



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

## FLORE

# Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

### **New compositions of the treatment of chemoresistant and/or potentially chemoresistant leukemias**

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

*Original Citation:*

New compositions of the treatment of chemoresistant and/or potentially chemoresistant leukemias / Arcangeli A.; Becchetti A.; Pillozzi S.; Masselli M.; De Lorenzo E.. - (2010).

*Availability:*

This version is available at: 2158/594778 since:

*Terms of use:*

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

*Publisher copyright claim:*

(Article begins on next page)

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IB2010/055112

International filing date: 10 November 2010 (10.11.2010)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT

Number: RM2010A000048

Filing date: 09 February 2010 (09.02.2010)

Date of receipt at the International Bureau: 23 December 2010 (23.12.2010)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)





IB 10/55112

# Ministero dello Sviluppo Economico

Dipartimento per l'impresa e l'internazionalizzazione  
Direzione Generale Per La Lotta Alla Contraffazione - UIBM

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - Divisione IX

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2010 A 000048.

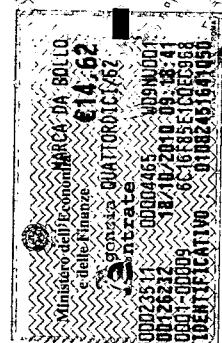
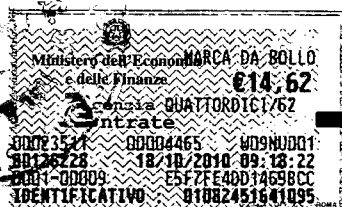
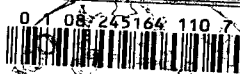
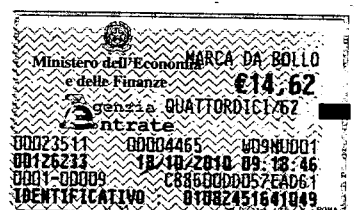
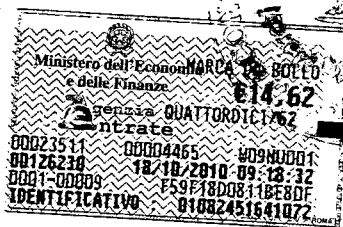
Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Si compone di pagg. 63

ROMA li... 22 NOV. 2010

IL FUNZIONARIO

*Pasle / Paris*  
Dr.ssa Paola Giuliano



# Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale

## Richiedente/i

Denominazione: **NOI PER VOI ONLUS**;  
Natura Giuridica: **PG (Persona Giuridica)**;  
Codice Fiscale: **94022050481**;  
Indirizzo: ; Localita' Residenza: ; Comune: **FIRENZE**; Cap: ; Provincia Residenza: **FIRENZE (FI)**; Stato: **ITALIA (IT)**;

## Recapito

Cognome/Denominazione: ; Nome: ;  
Indirizzo recapito: ; Localita' Recapito: ; Comune: ; Provincia: (); Cap: ;

## Titolo

Descrizione: **NUOVE COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DI LEUCEMIE CHEMIORESISTENTI E/O DI LEUCEMIE POTENZIALMENTE CHEMIORESISTENTI.**

## Inventori Designati

Cognome: **ARCANGELI**; Nome: **ANNAROSA**; Nazionalita': **ITALIA**

Cognome: **BECCHETTI**; Nome: **ANDREA**; Nazionalita': **ITALIA**

Cognome: **PILLOZZI**; Nome: **SERENA**; Nazionalita': **ITALIA**

Cognome: **MASSELLI**; Nome: **MARIKA**; Nazionalita': **ITALIA**

Cognome: **DE LORENZO**; Nome: **EMANUELE**; Nazionalita': **ITALIA**

## Classi Proposte

Sezione: **A**; Classe: **61**; Sottoclasse: **K**;

## Priorita'

Stato o Organizzazione: **ITALIA**; Tipo: **Domanda di Brevetto d'Invenzione**  
Numero Domanda o Esposizione: **RM2009A000578**; Data Deposito o Esposizione: **2009-11-10**

## Mandatario abilitato presso UIBM

Numero Iscrizione Albo: **1105**  
Cognome: **PREDAZZI** Nome: **VALENTINA ET AL.**

Denominazione Studio: **SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.P.A.**  
Indirizzo: **PIAZZA DI PIETRA, 38-39**  
Comune: **ROMA** Cap: **00186** Provincia: **ROMA**  
Numero Domicilio Professionale: **020**

## Annotazioni Speciali

Descrizione: **LETTERA D'INCARICO GENERALE DEPOSITATA 10/11/2009, N. RM2009A000578**

## Documentazione Allegata o con Riserva di Presentazione

Tipo Documento: **Riassunto in Italiano**; N. Es. All. : **1**; N.Es.Ris.: **0**; N. Pag. per Esemplare: **1**;

Tipo Documento: **Descrizione in Italiano**; N. Es. All. : **1**; N.Es.Ris.: **0**; N. Pag. per Esemplare: **48**;

Tipo Documento: **Rivendicazione in Italiano**; N. Es. All. : **1**; N.Es.Ris.: **0**; N. Pag. per Esemplare: **4**;

Tipo Documento: **Tavole Disegno**; N. Es. All. : **1**; N.Es.Ris.: **0**; N. Pag. per Esemplare: **4**;

Tipo Documento: **Attestato Versamento**; **SI**;

## Attestato di Versamento

Importo Pagato: **50.00** Euro; Importo in Lettere: **CINQUANTA/00** Euro;

Data Compilazione: **2010-02-09**



**Camera di Commercio Industria, Artigianato e  
Agricoltura di ROMA**

**Verbale di Deposito  
Domanda di Brevetto  
per INVENZIONE INDUSTRIALE**

**Numero domanda: RM2010A000048**

**CCIAA di deposito: ROMA**

**Data di deposito: 09/02/2010**

***In data 09/02/2010 il richiedente ha presentato a me sottoscritto la seguente domanda di brevetto per Invenzione Industriale.***

**ROMA, 09/02/2010**

**L'Ufficiale Rogante**

**Diritti di Segreteria      15,00 EURO**

## **A. RICHIEDENTE**

---

**Cognome Nome/** NOI PER VOI ONLUS  
**Denominazione** Codice fiscale: 94022050481  
Indirizzo: FIRENZE (FI)  
Natura Giuridica: Persona Giuridica

## **C. TITOLO**

---

**Titolo** NUOVE COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DI LEUCEMIE  
CHEMIORESISTENTI E/O DI LEUCEMIE POTENZIALMENTE  
CHEMIORESISTENTI.

## **D. INVENTORE DESIGNATO**

---

**Cognome Nome** ARCANGELI ANNAROSA  
Nazionalità: ITALIA

**Cognome Nome** BECCHETTI ANDREA  
Nazionalità: ITALIA

**Cognome Nome** PILLOZZI SERENA  
Nazionalità: ITALIA

**Cognome Nome** MASSELLI MARIKA  
Nazionalità: ITALIA

**Cognome Nome** DE LORENZO EMANUELE  
Nazionalità: ITALIA

## **E. CLASSE PROPOSTA**

---

**Classe** A61K - PREPARAZIONI PER USO MEDICO, DENTARIO E PER  
TOELETTE

## **F. PRIORITA'**

---

**Priorità** Derivante da: DOMANDA DI INVENZIONE  
Luogo: ITALIA  
Numero domanda: RM2009A000578  
Data: 10/11/2009

## **I. MANDATARIO ABILITATO PRESSO L'UIBM**

---

**Mandatario** Numero iscrizione albo: 1105  
**PREDAZZI VALENTINA**

*Denominazione* SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.P.A.

*Studio* Indirizzo: ROMA (RM)  
PIAZZA DI PIETRA 39 cap 00186

## **L. ANNOTAZIONI SPECIALI**

---

**Annotazione** LETTERA D'INCARICO GENERALE DEPOSITATA 10/11/2009, N.  
**speciale** RM2009A000578

## **M. DOCUMENTAZIONE DICHIARATA**

---

**Lista documenti** **Attestato Versamento**

Numero esemplari allegati : 1

Numero esemplari di cui si riserva la presentazione: 0

Numero pagine per esemplare : 0

**Riassunto, Descrizione, Rivendicazione**

Numero esemplari allegati : 1

Numero esemplari di cui si riserva la presentazione: 0

Numero pagine per esemplare : 1

**Tavole Disegno**

Numero esemplari allegati : 1

Numero esemplari di cui si riserva la presentazione: 0

Numero pagine per esemplare : 4

**Rivendicazione in Italiano**

Numero esemplari allegati : 1

Numero esemplari di cui si riserva la presentazione: 0

Numero pagine per esemplare : 4

**Descrizione in Italiano**

Numero esemplari allegati : 1

Numero esemplari di cui si riserva la presentazione: 0

Numero pagine per esemplare : 48

**Versamento** Importo: 50,00

**in euro**

**Copia autentica** Non richiesta

**Anticipata accessibilità Non concessa  
al pubblico**



**"NUOVE COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DI LEUCEMIE  
CHEMIORESISTENTI E/O DI LEUCEMIE POTENZIALMENTE CHEMIORESISTENTI"**

DESCRIZIONE

La presente descrizione riguarda composizioni farmaceutiche per uso nel trattamento  
5 di leucemie chemioresistenti o potenzialmente chemioresistenti, metodi di trattamento  
di dette leucemie con dette composizioni, sistemi in vitro per lo screening di sostanze  
idonee all'uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti o potenzialmente  
chemioresistenti.

10

STATO DELLA TECNICA ANTERIORE

Leucemia è un termine generico che comprende un ampio spettro di malattie:  
una prima suddivisione è fra forme acute e forme croniche. Inoltre, la patologia può  
essere suddivisa in leucemie linfoblastiche (o linfoidi) e leucemie mieloidi. La  
combinazione dei due criteri classificativi porta all'identificazione di quattro principali  
15 forme di leucemia: Leucemia acuta linfoblastica (ALL); Leucemia linfoide cronica  
(CLL); Leucemia mieloide acuta (AML); Leucemia mieloide cronica (CML). ALL è la  
forma di leucemia più comune in età pediatrica, ma può colpire anche gli adulti, sopra  
i 65 anni. I trattamenti standard comprendono la chemioterapia e la terapia radiante.  
La sopravvivenza varia in funzione dell'età: 70-80% nei bambini, 50% negli adulti. La  
20 CLL colpisce per lo più adulti, maschi, sopra i 55 anni, mai si osserva nei bambini. La  
sopravvivenza a 5 anni è pari al 75%. La AML colpisce più frequentemente gli adulti,  
più raramente i bambini, e la sopravvivenza a 5 anni di questa forma leucemica è pari  
al 40%. Anche in questo caso il trattamento di elezione è la chemioterapia, e, in alcuni  
casi, il trapianto di midollo osseo. La CML colpisce per lo più adulti, solo in piccola  
25 percentuale i bambini. Il trattamento d'elezione prevede un inibitore a bersaglio  
molecolare, cioè l'Imatinib (Gleevec), che inibisce la proteina bcr/abl. La  
sopravvivenza a 5 anni è pari all'80%.

Negli ultimi anni la sopravvivenza alle leucemie acute, ed in particolar modo delle ALL  
pediatriche, è aumentata notevolmente. Nonostante questo, in un'elevata percentuale

di bambini e/o di adulti affetti da questa neoplasia, si verificano ancora ricadute. Questi fallimenti della chemioterapia portano all'indicazione al trattamento con trapianto del midollo osseo, con un forte impatto non solo sul paziente stesso, ma anche sul servizio sanitario, a causa degli elevati costi dei trapianti. La causa  
5 principale del fallimento del trattamento è da attribuirsi a meccanismi di farmaco-resistenza intrinseci o acquisiti. E' stato dimostrato che le cellule stromali del midollo osseo forniscono un rifugio per alcune popolazioni di cellule leucemiche, in particolare per quelle popolazioni staminali, che sono responsabili dello sviluppo e del mantenimento della malattia leucemica, e che possono evadere così l'apoptosi indotta  
10 dalla chemioterapia e acquisire un fenotipo resistente al trattamento (Konopleva, M et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 16: 1713-1724 (2002).

I meccanismi di protezione mediati dalle cellule stromali coinvolgono complesse interazioni reciproche tra fattori derivati dallo stroma, in particolare la chemochina  
15 SDF-1 $\alpha$  (stroma-derived factor 1 $\alpha$ ) ed il suo recettore CXCR4 (Zeng, Z et al. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol. Cancer Ther.* 5: 3113-3121 (2006). Un ulteriore meccanismo con cui le cellule stromali conferiscono protezione alle cellule leucemiche, implica l'interazione tra i recettori di adesione (in particolare  
20 l'integrina VLA4), espressi sulle cellule leucemiche, e molecole di adesione, come la fibronectina, presenti sulla superficie delle cellule stromali midollari (Tabe, Y et al. Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res.* 67: 684-694 (2007)). Dati recenti evidenziano come le integrine siano in grado di innescare segnali di  
25 sopravvivenza cellulare, mediante la formazione di complessi macromolecolari con diverse proteine presenti sulla membrana plasmatica. Uno dei partner coinvolti in questi complessi è rappresentato dai canali ionici. La proteina canale non è solamente un interattore passivo, ma spesso retroagisce controllando l'attivazione integrinica e la segnalazione a valle (Arcangeli, A Becchetti, A. Complex functional

interaction between integrin receptors and ion channels. Trends Cell Biol. 16: 631-639 (2006)). Questi meccanismi possono fornire una conferma molecolare alle recenti dimostrazioni che i canali ionici, soprattutto i canali di  $K^+$ , segnano e regolano stadi specifici della progressione neoplastica, e quindi possono rappresentare nuovi bersagli per la terapia antitumorale (Arcangeli, A et al. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. Cur. Med. Chem. 16(1): 66-93 (2009)). Tra i canali ionici, i canali hERG1 (anche noto come KCNH2 o Kv11.1, Gene Bank AAH01914.2), codificati dall'*ether-a-gò-gò-related gene 1*, rappresentano un esempio importante di come questo tipo di canale di  $K^+$  sia in grado di formare complessi multiproteici sulla membrana plasmatica delle cellule tumorali (Arcangeli, A, Becchetti, A. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. Trends Cell Biol. 16: 631-639 (2006). Inoltre, i canali hERG1 rappresentano un importante bersaglio farmacologico per la terapia antineoplastica, come già ipotizzato e riportato nella letteratura pubblicata dagli inventori (5), e come dimostrato dal fatto che i farmaci bloccanti hERG1 (che chiameremo da ora in avanti "hERG1 blockers") inibiscono la crescita e la progressione neoplastica, sia *in vitro* che *in vivo* (Arcangeli, A et al. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. Cur. Med. Chem. 16(1): 66-93 (2009)).

Pillozzi S et al, 2002 (Pillozzi S., et al. HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic haemopoietic progenitors. Leukemia, 16, 1791-1798, (2002)) e Pillozzi S et al, 2007 (Pillozzi S, et al. VEGFR-1 (FLT-1),  $\beta 1$  integrin and hERG  $K^+$  channel form a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. Blood, 110: 1238-1250, (2007), oltre al già citato Arcangeli A et al., 2009 (Arcangeli, A et al. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. Cur. Med. Chem. 16(1): 66-93 (2009)), evidenziano l'importanza del ruolo del canale hERG1 nella malattia leucemica. Nel primo articolo si descrive come l'attività di hERG1 sia correlata con i meccanismi proliferativi e con la progressione nel ciclo cellulare, sia in linee cellulari che in casi primari di AML. A

differenza delle cellule progenitrici ematopoietiche normali, hERG1 è risultato essere costitutivamente espresso nelle cellule leucemiche ed è necessario per la loro progressione nel ciclo cellulare. Gli articoli citati mostrano come la somministrazione di "bloccanti hERG1" (farmaci antiaritmici di classe III, come E4031 o Way 123,398),  
5 comprometta la crescita cellulare.

Nella seconda pubblicazione sono stati descritti la presenza e il ruolo di un complesso macromolecolare comprendente, oltre al canale hERG1, il recettore per il fattore angiogenetico VEGF-A di tipo 1 (FLT-1), e i recettori di adesione della famiglia delle integrine, sia in linee cellulari di AML, sia in blasti leucemici di FAB diverso, isolati da  
10 pazienti affetti da tale patologia. Inoltre, sono stati forniti dati a dimostrazione di come l'attivazione di FLT-1 sia in grado di indurre un'intensa attività migratoria e invasiva nelle cellule di AML, e come tale effetto dipenda dalla formazione del complesso segnalatorio. In particolare, la corretta attività del canale hERG1 è risultata cruciale per innescare l'attività segnalatoria del recettore FLT-1 e la conseguente migrazione  
15 delle cellule leucemiche. L'associazione (sia fisica che funzionale) tra FLT-1, hERG1 e  $\beta_1$  è stata dimostrata anche nei blasti primari di AML, nei quali è stata dimostrata non solo la co-espressione dei geni *herg1* e *flt-1*, ma anche la co-immunoprecipitazione delle tre proteine di membrana coinvolte nella formazione del complesso. Inoltre, dagli studi condotti è emerso che la presenza del recettore FLT-1  
20 insieme al canale hERG1 funzionale conferisce ai blasti leucemici un fenotipo pro-migratorio. Infine, sono stati condotti esperimenti su topi immunodeficienti inoculati con cellule leucemiche, dimostrando che l'over-espressione di hERG1 induce i blasti leucemici ad uscire nel sangue periferico ed invadere così siti extramidollari. In altre parole, l'espressione funzionale del canale hERG1 sulla membrana plasmatica  
25 conferisce un vantaggio selettivo ai blasti leucemici, che acquisiscono una maggiore capacità di lasciare il microambiente midollare ed entrare in circolo. Nel complesso, nel lavoro citato, è stato dimostrato che il canale hERG1 è in grado di regolare differenti aspetti fisio-patologici della AML, come la sopravvivenza e la proliferazione cellulare all'interno del midollo osseo, e l'aumento della motilità e della migrazione  
30 trans-endoteliale. Gli autori ritengono che, nel loro insieme, questi effetti possano

essere responsabili della maggiore malignità dei blasti herg1+, dimostrata *in vivo* in una coorte di pazienti affetti da AML.

Infine, nella pubblicazione Arcangeli, A et al. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. Cur. Med. Chem. 16(1): 66-93 (2009), gli autori hanno portato diverse evidenze sperimentali non solo sul fatto che hERG1 svolga un ruolo fondamentale nel controllo di diversi aspetti della progressione neoplastica, sia in leucemie che in tumori solidi umani, ma anche sul fatto che esso rappresenta un ottimo bersaglio farmacologico per la terapia antineoplastica. Infatti, in letteratura, ma anche sul mercato farmaceutico, esistono numerosi farmaci in grado di bloccare il canale hERG1 (gli "hERG1 blockers"). Nella pubblicazione (5) gli autori riportano numerose evidenze, sia *in vitro* che *in vivo*, che alcuni "hERG1 blockers" (in particolare gli antiaritmici di III classe, come E4031 e Way 123,398) si comportano come potenziali farmaci antitumorali.

E' evidente la necessità di individuare farmaci e terapie che permettano di curare con efficacia le leucemie chemioresistenti.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

L'invenzione della presente descrizione si basa sulla scoperta che la chemioresistenza in numerose forme leucemiche è eliminata o fortemente ridotta da un trattamento con almeno un composto per terapie antitumorali in combinazione con almeno un bloccante hERG1, che esercitano, con un inatteso effetto sinergico un effetto proapoptotico sulle cellule leucemiche chemioresistenti.

La presente invenzione si riferisce quindi a:

-nuove combinazioni di uno o più bloccante di canali hERG1 e di uno o più composti per terapie antitumorali, per uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti.

-composizioni farmaceutiche comprendenti almeno un composto per terapie antitumorali in combinazione con almeno un inibitore del canale di potassio hERG1, per uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti; e

-metodi terapeutici per il trattamento di dette leucemie con dette composizioni.

La presente invenzione si riferisce, inoltre,

-al metodo *in vitro* di co-coltura di cellule leucemiche con cellule stromali midollari comprendente il passaggio di mettere in coltura cellule stromali midollari e aggiungere  
5 successivamente cellule leucemiche di linee cellulari o cellule leucemiche primarie.

-dette Co-culture cellulari: e

-un metodo *in vitro* di screening per l'identificazione di sostanze o combinazioni di sostanze efficaci per il trattamento delle leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti comprendente i seguenti passaggi:

10 a) trattare dette co-culture cellulari come precedentemente definite in cui dette cellule leucemiche sono chemioresistenti con una o più sostanze o combinazioni di sostanze;

b) valutare l'apoptosi delle cellule leucemiche dopo il trattamento;

c) identificare le sostanze o le combinazioni di sostanze efficaci nel ripristino delle  
15 vie apoptotiche.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELLE FIGURE

**Figura 1.** Effetto dei farmaci inibitori di hERG1 sull'apoptosi indotta dalla Doxorubicina su cellule leucemiche umane, coltivate *in vitro* in assenza o in presenza di cellule  
20 midollari stromali (MSC) e trattate con E4031, Eritromicina, Sertindolo e Way (indicato con +) o non trattate (indicato con -). A, B) Cellule 697; C) Cellule ALL(3), ALL(4) e ALL(6). Aliquote di  $1 \times 10^5$  cellule sono state centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti e lavate con PBS 1X prima dell'incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti con anticorpo primario (monoclonale murino, anti hERG1 diretto contro una porzione  
25 extracellulare del canale, diluito 1:50). Al termine dell'incubazione si eseguono lavaggi con PBS 1X e successiva incubazione per 15 minuti con anticorpo secondario (anti-mouse IgG FITC ( $1 \mu\text{g}/10^6$  cells)). Il pellet viene lavato due volte in PBS e risospeso in 500  $\mu\text{l}$  di una soluzione di PBS più formalina all'1%. L'analisi viene eseguita con il citofluorimetro FACScan a flusso citometrico (*Becton Dickinson*). E' stata  
30 standardizzata una metodica che consente di esprimere in termini quantitativi assoluti

l'espressione di hERG1 a livello della membrana cellulare indipendentemente dal citofluorimetro impiegato, dal voltaggio dei fotomoltiplicatori e dall'operatore. La rivelazione dell'antigene in esame è ottenuta mediante traccianti fluorescenti che generano un segnale il quale viene tradotto in termini di intensità di fluorescenza.

5 L'Indice Medio di Fluorescenza (MFI) è definito come il rapporto tra la fluorescenza media del campione e la fluorescenza rivelata in campione incubato con l'anticorpo secondario (che è fluorescente e che pertanto mostra un segnale non dovuto al legame diretto antigene-anticorpo). In altre parole tale indice può essere calcolato come il rapporto tra il segnale specifico del campione marcato con anticorpo primario  
10 e secondario (fluorescenza media campione=FC) ed il segnale aspecifico ottenuto dallo stesso campione marcato con il solo anticorpo secondario (fluorescenza media controllo Fc) e moltiplicato per 100: cioè  $MFI = \frac{FC}{Fc} \cdot 100$ . I valori ottenuti, riportati in una scala percentuale, consentono di avere una stima che è indipendente dal fluorocromo legato all'anticorpo secondario (possono essere utilizzati oltre al FITC,  
15 Cy3, Cy5, Alexa 488, PE) e dal citofluorimetro utilizzato.

**Figura 2.** Effetto di cortisonici, inibitori di hERG1 e della combinazione cortisonici/inibitori di hERG1 in un modello in vivo di malattia leucemica umana (cellule leucemiche umane REH inoculate in topi NOD/SCID). Le cellule sono state inoculate mediante iniezione nella vena caudale ed al settimo giorno dall'inoculo, gli animali  
20 sono stati trattati con E4031, Dexametasone, Dexametasone + E4031 per due settimane; i topi di controllo sono stati trattati, secondo lo stesso protocollo, con sola soluzione fisiologica. Al termine delle due settimane di trattamento gli animali sono stati sacrificati ed è stato effettuato l'espianto di milza e midollo osseo. L'attecchimento midollare è stato valutato misurando la percentuale di cellule hCD45<sup>+</sup>  
25 *versus* cellule mCD45<sup>+</sup> mediante analisi citofluorimetrica. Sulle sezioni di midollo degli animali trattati è stato effettuato il Tunel assay, per la valutazione dell'apoptosi.

**Figura 3.** In questa figura è riportata la tabella 2 da pag 759 dell'articolo Witchel HJ and Hancox JC- Familial and acquired Long QT syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current- Clin Exp Pharmacol Physiol 27, 753-766, 2000.  
30 Nella tabella sono riportati alcuni principi attivi che possono essere selezionati come

bloccante di canali hERG1 e i riferimenti alle citazioni degli studi clinici o molecolari sulla loro attività bloccante di canali hERG1 idonei alla realizzazione della miscela o delle composizioni della presente descrizione.

**Figura 4.** L'attività di hERG1 regola la chemio resistenza indotta dallo stroma in cellule leucemiche. a) Le linee cellulari REH e RS4;11 sono state coltivate in presenza o meno di MSCs e trattate con doxorubicina (0.1µg/ml), prednisone (5 µM) o metotrexato (1.5 µM), in presenza o meno dell' inibitore di hERG1 E4031 (20 µM) per 48 ore. La percentuale di cellule Annessina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> è stata valutata dopo 48 ore di coltura. b) Le linee cellulari REH e RS4;11 sono state trattate con doxorubicina (0.1 µg/ml) in presenza o meno degli inibitori di hERG1 eritromicina (100 µM) o sertindolo (1 µM). La percentuale di cellule Annessina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> è stata valutata dopo 48 ore di coltura.

#### GLOSSARIO

**hERG1** indica il canale del potassio codificato dal gene umano KCNH2 (o Kv11.1, Gene Bank AAH01914.2) in tutte le sue isoforme possibili, dove è indicato hERG1 nel testo si può leggere anche come "omologo di mammifero" di hERG1.

**Leucemie:** con il termine leucemie nella presente descrizione, come in ambiente medico, si intende un insieme di malattie maligne caratterizzate dalla proliferazione incontrollata, quindi, neoplastica di una cellula ematopoietica.

La definizione "**leucemie potenzialmente chemioresistenti**" indica forme leucemiche in cui metodi predittivi mostrano che la forma leucemica analizzata abbia potenziali sviluppi di chemioresistenza.

**Chemioresistenza:** nella presente descrizione con la parola chemioresistenza o chemio resistenza o più in generale per farmaco-resistenza si intende una riduzione o un'assenza di responsività di cellule tumorali ad un farmaco particolare come, ad esempio, un farmaco chemioterapico o un farmaco comunque utilizzato in terapie antitumorali, solo o in combinazione con altri farmaci comunemente usati in terapie antitumorali.



**MFI:** si intende l'intensità di fluorescenza media del campione marcato con un anticorpo primario anti-hERG1 e successivamente con un anticorpo secondario marcato anti anticorpo primario, rapportata all'intensità di fluorescenza di un campione delle stesse cellule marcato con il solo anticorpo secondario marcato con un fluorocromo. Nel caso specifico è un indice indiretto, semi-quantitativo, della quantità

5 di proteina hERG1 presente sulla membrana plasmatica delle cellule in esame.

Come "**dosaggio tipico di composti antitumorali nelle terapie antitumorali**" s'intende il dosaggio tipicamente utilizzato come dose unitaria nei protocolli medici standard o indicato nei fogli di accompagnamento delle confezioni dei medicinali antitumorali noti al tecnico del settore. Tale valore, assolutamente riconoscibile dal

10 tecnico del settore, variando da farmaco a farmaco, non può essere definito in modo applicabile a tutti gli antitumorali di uso comune senza essere definito come qui indicato.

La definizione, applicata a qualsiasi antitumorale indica esattamente il dosaggio

15 comunemente prescritto ed indicato nei protocolli medici e farmacologici per la terapia antitumorale per ciascuno degli antitumorali noti al tecnico del settore. Sono riportati nella descrizione sotto vari esempi di tali valori.

### Trattamenti terapeutici

#### 20 a) forme pediatriche

#### Leucemia acuta linfatica (pediatrica)

	farmaco	dose
INDUZIONE PREFASE		
	<b>PREDNISONE</b>	40-60mg/mq/die os
	<b>METOTREXATE</b>	12 mg ( $\geq 3$ anni età) intratecale; 3.3 mg /mq im
INDUZIONE FASE 1A		
	<b>DESAMETAZONE</b>	10mg/mq/die p.o.
	<b>VINCRISTINA</b>	1.5 mg/mq e.v.
	<b>DAUNOBLASTINA</b>	30 mg/mq/dose e.v.
	<b>DOXORUBICINA</b>	60-75 mg/mq ev
	<b>L-ASPARAGINASI</b>	5.000-6000 UI/mq/dose i.m.
INDUZIONE FASE 1B		

	<b>CICLOFOSFAMIDE</b>	1000 mg/mq/dose e.v.
	<b>6-MERCAPTOPURINA</b>	60 mg/mq/die p.o.
	<b>CITOSINA ARABINOSIDE</b>	75 mg/mq/die s.c. o e.v
	<b>METOTREXATE</b>	12 mg ( $\geq 3$ anni età) intratecale
<b>CONSOLIDAMENTO</b>		
	<b>6-MERCAPTOPURINA</b>	25 mg/mq os
	<b>CITROVORUM FACTOR</b>	7,5 mg/mq e.v.
<b>REINDUZIONE</b>		
<b>Ila</b>	<b>DESAMETAZONE</b>	10 mg/mq/die per os
	<b>VINCRISTINA</b>	1.5 mg/mq ev
	<b>ADRIAMICINA</b>	30 mg/mq/dose e.v.
	<b>L-ASPARAGINASI</b>	10.000 UI/mq/dose i.m.
<b>Ilb</b>	<b>CICLOFOSFAMIDE</b>	1000 mg/mq e.v.
	<b>6-TIOGUANINA</b>	60 mg/mq/die p.o.
	<b>CITOSINA ARABINOSIDE</b>	75 mg/mq/die s.c. o e.v.
<b>MANTENIMENTO</b>		
	<b>6-MERCAPTOPURINA</b>	25 mg/mq os
	<b>METOTREXATE</b>	20 mg/mq p.o

#### Leucemia acuta mieloide (pediatrica)

	farmaco	dose
<b>PREFASE</b>		
	<b>CITOSINA ARABINOSIDE</b>	40mg/mq/die ev
<b>INDUZIONE</b>		
	<b>IDARUBICINA</b>	10mg/mq/die ev
	<b>ETOPOSIDE</b>	100mg/mq ev
	<b>CITOSINA ARABINOSIDE</b>	20-70 mg /mq/die ev
<b>CONSOLIDAMENTO</b>	<b>CITOSINA ARABINOSIDE</b>	20-70mg/mq ev
	<b>ETOPOSIDE</b>	125mg/mq/die ev
<b>CONDIZIONAMENTO</b>		
	<b>BUSULFANO</b>	16mg/Kg/die ev os
	<b>MELFALAN</b>	140mg/mq/die ev
	<b>CICLOFOSFAMIDE</b>	60mg/Kg/die ev

**b) forme dell'adulto**

Leucemia linfatica acuta

5

	<b>farmaco</b>	<b>dose</b>
<b>INDUZIONE</b>		
	<b>VINCRISTINA</b>	1.4 mg/mq ev
	<b>DOXORUBICINA</b>	60-75 mg/mq ev
	<b>CITARABINA</b>	100 mg/mq ev
	<b>ETOPOSIDE</b>	60-120 mg/mq ev
	<b>METOTREXATE</b>	2-20 mg/settimana IR
	<b>CICLOFOSFAMIDE</b>	4-6 mg/kg ev
	<b>PREDNISONE</b>	30-60 mg/die os
	<b>ASPARAGINASI</b>	6000 u/mq i.m
<b>CONSOLIDAMENTO</b>		
	<b>ARA-C</b>	2000 mg/mq x 2 e.v.
	<b>VP-16</b>	150 mg/mq e.v.

Leucemia linfatica croica

	<b>farmaco</b>	<b>dose</b>
<b>INDUZIONE/CONSOLIDAMENTO</b>	<b>CICLOFOSFAMIDE</b>	300 mg/mq ev
	<b>PREDNISONE</b>	40 mg/mq os
	<b>VINCRISTINA</b>	1 mg/mq ev
	<b>DOXORUBICINA</b>	25 mg/mq ev
	<b>FLUDARABINA</b>	25 mg/mq ev
	<b>BENDAMUSTINA</b>	110 mg/mq ev
	<b>RITUXIMAB</b>	375 mg/mq ev
	<b>ALEMTUZUMAB</b>	3-30 mg /die ev

10

Leucemia acuta mieloide (eccetto M3)

	<b>farmaco</b>	<b>dose</b>
INDUZIONE		
	<b>DAUNOROBICINA</b>	60 mg/mq ev
	<b>CITARABINA</b>	100 mg/mq ev
	<b>PREDNISONE</b>	40 mg/mq os
	<b>6-TIOGUANINA</b>	70 mg/mq ev
	<b>IDROSSIUREA</b>	20-30 mg/Kg/die os
CONSOLIDAMENTO		
	<b>CITARABINA</b>	500 mg/mq ev

5 M3

	<b>farmaco</b>	<b>dose</b>
INDUZIONE		
	<b>IDARUBICINA</b>	12 mg/mq e.v
	<b>ATRA</b>	45 mg/mq p.o.
	<b>METILPREDNISOLONE</b>	25 mg/mq os

Leucemia mieloide cronica

	<b>farmaco</b>	<b>dose</b>
FASE CRONICA		
	<b>IDROSSIUREA</b>	500-2000 mg/die/ os
	<b>INTERFERONE ALFA</b>	3-5 milioni U/mq/die sc
	<b>IMATINIB</b>	400 mg/die os
	<b>CITARABINA</b>	100 mg/mq/die ev
FASE ACCELERATA		

	<b>IMATINIB</b>	600-800 mg/die os
FASE BLASTICA		
	<b>INTERFERONE ALFA</b>	3-5 milioni U/mq/die sc
	<b>IDROSSIUREA</b>	40 mg/Kg/die ev
	<b>6-MERCAPTOPURINA</b>	0.5-1 mg/Kg/die po

**Nome chimico di bloccanti del canale hERG1**

**E4031**

N-[4-[[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-piperidinil]carbonil]fenil]metanesolfonammide

5 diidrocloruro

**SERTINDOLO**

1-(2-{4-[5-CLORO-1-(4-FLUORO-FENIL)-1H-INDOL-3-IL]-PIPERIDIN-1-IL}-ETIL)-  
IMIDAZOLIDIN-2-ONE; 1-[2-[4-[5-Cloro-1-(4-fluorofenil)-1h-indol-3-il]-1-piperidinil]etil]-  
2-imidazolidinone

10 **ERITROMICINA:**

6-(4-dimetilammino-3-idrossi-6-metil-ossan-2-ile)ossi-14-etil-7,12,13-triidrossi-4-(5-  
idrossi-4 metossi-4,6-dimetil-ossan-2-ile)ossi-3,5,7,9,11,13- esametil-1  
ossaciclotetradecan-2,10-dione

**WAY 123,398**

15 N-metil-N-(2-(metil(1-metil-1H-benzimidazol-2-il)amino)etil)  
(metilsolfonil)amino)benzensolfonammide HCl

**AMIODARONE**

20 **(2-{4-[(2-butil-1-benzofuran-3-il)carbonil]-2,6-diiodiofenossi}etil)dietilamina**

**DOFETILIDE**

N-[4-(2-[[2-(4-metasulfonamidofenossi)etil](metil)amino]etil)fenil]metasulfonamide

25

**BRETILIO**

N-(2-bromobenzil)-N,N-dimetiletanolamina

30

**SEMATILIDE**

N-(2-dietilaminoetil)-4-metanesulfonamido-benzamide

**IBUTILIDE**

*N*-(4-{4-[etil(eptil)amino]-1-idrossibutil}fenil)metasulfonamide

5

**TEDISAMIL**

3,7-bis(ciclopropilmetil)spiro[3,7-diazabicciclo[3.3.1]nonane-9,1'-ciclopentano

10 **CHINIDINA**

(*S*)-[(4*S*,5*R*,7*R*)-5-etinil-1-azabicciclo[2.2.2]octan-7-yl]-(6-metossiquinolin-4-yl)metanolo

**PROPAFENONE**

15

1-[2-(2-idrossi-3-propilaminopropossi)fenil]-3-fenilpropano-1

**PROCAINAMMIDE**

20

4-amino-*N*-(2-diethylaminoetil)benzamide

**DISOPIRAMIDE**

25

*N*-(piperidin-2-ylmethyl)-2,5-bis(2,2,2-trifluoroethoxy)benzamide

**TERODILINA**

*N*-terz-butil-4,4-di(fenil)butan-2-amina

30

**TERFENADINA**

*RS*)-1-(4-*tert*-butylphenil)-4-{4-[hydroxy(diphenil)methyl]piperidin-1-yl}-butan-1-ol

**ALOPERIDOLO**

35

4-[4-(4-clorofenil)-4 idrossipiperidin-1-il]-1-(4-fluorofenil)-butano-1

**CISAPRIDE**

40

4-amino-5-cloro-*N*-((3*S*,4*S*)-1-[3-(4-fluorophenoxy)propil]-3-metoxypiperidin-4-yl)-2-metoxybenzamide

**CLOROQUINA**

45

*N'*-(7-cloroquinolin-4-yl)-*N,N*-diethyl-pentane-1,4-diamine

**OLOFONTRINA**

50

3-(dibutylamino)-1-[1,3-dichloro-6-(trifluorometil)phenanthren-9-yl]propan-1-ol

**TIORIDAZINA**

10-{2-[(RS)-1-Methylpiperidin-2-yl]ethyl}-2-methylsulfanyl-phenothiazine

**PENTAMIDINA**

5 4,4'-[pentane- 1,5-diylbis(oxy)]dibenzenecarboximidamide

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Come dettagliato nella sezione "stato della tecnica", una delle principali cause  
10 del fallimento delle chemioterapie tradizionali nel trattamento delle leucemie,  
soprattutto delle forme acute, linfoidi e mieloidi, risiede nel fatto che tali forme  
possono sviluppare chemioresistenza. Una delle principali cause di chemioresistenza  
risiede nell'effetto protettivo esercitato dal microambiente del midollo osseo, ed in  
particolare dalle cellule midollari stromali. Va sottolineato che all'interno del midollo  
15 osseo risiedono, sopravvivono e proliferano le cellule leucemiche staminali, dalle quali  
originano le cellule leucemiche che invadono il circolo periferico. Sono proprio le  
cellule leucemiche che risiedono nel midollo che devono essere eliminate dalla  
chemioterapia, per evitare la malattia leucemia, ma è proprio nel midollo osseo che  
può crearsi un meccanismo di protezione, che evita la distruzione, o meglio  
20 l'induzione della morte apoptotica, delle cellule leucemiche.

Nella presente descrizione è rivelato un metodo *in vitro* sviluppato dagli autori che  
mima la situazione che si riscontra *in vivo* nelle leucemie chemioresistenti che  
comprende il mettere in cocoltura (co-coltura) cellule leucemiche con cellule stromali  
midollari.

25 Tale metodo, può essere realizzato utilizzando linee cellulari leucemiche resistenti e  
non o cellule leucemiche primarie prelevate da campioni biologici.

Il campione biologico da cui le cellule leucemiche saranno ottenute, potrà essere  
qualsiasi campione di paziente affetto da leucemia da cui è possibile isolare dette  
cellule; in particolare, quindi sarà possibile utilizzare, ad esempio, sangue e campioni  
30 di tessuto. A titolo esemplificativo e non limitante ai fini della presente descrizione, i

campioni di tessuto utilizzabili sono campioni freschi o congelati ottenuti da aspirati midollari, sangue periferico e biopsie linfonodali di pazienti leucemici.

I campioni biologici ottenuti, indipendentemente dalla loro natura, potranno essere utilizzati sia freschi che non. Il tecnico del settore non necessita in questa descrizione  
5 di informazioni relative alle diverse tecniche di conservazione del materiale biologico dal momento che sarà in grado di scegliere senza alcuno sforzo di attività inventiva quella più idonea alle sue esigenze tenuto conto dell'informazione dettagliate riportante in qualsiasi manuale di laboratorio.

L'isolamento delle cellule leucemiche, dall'insieme di cellule di diversa natura presenti  
10 nel campione biologico, può essere effettuata sfruttando una qualsiasi delle caratteristiche molecolari che definiscono biochimicamente dette cellule leucemiche.

Le cellule leucemiche possono essere isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità (Abrams Ra, et al. Ficoll-Hypaque separation of bone marrow cells. Blood, 1985 66: 472-473). In generale è da considerarsi idoneo ai fini della presente  
15 descrizione qualsiasi metodo noto al tecnico del settore che consenta di isolare da un insieme di cellule la popolazione di cellule leucemiche da aggiungere in cocoltura alle cellule stromali.

Le cellule stromali midollari potranno essere ottenute mediante tecniche note al tecnico del settore, ad esempio possono essere isolate e mantenute in coltura come  
20 riportato in Manabe A. et al. Blood 1992 May 1;79(9):2370-7 pag. 2371

Le cellule stromali midollari possono essere preparate mettendo in coltura in cluster da 96 pozzetti cellule mononucleate isolate dal midollo di donatori sani deplete dalle cellule T come descritto da Manabe e collaboratori (Manabe et al, 1992).

25 Le cellule mononucleate possono essere separate mediante centrifugazione in gradiente di densità, lavate più volte con il terreno RPMI-1640 e risospese alla concentrazione di  $2 \times 10^6$ /ml nel terreno di coltura Fischer addizionato con FCS al 5%, siero di cavallo al 15%, transferrina (0.4 mg/ml), idrocortisone ( $10^{-6}$  mol/l), L-glutammina (2 mmol/l), 2-mercaptoetanololo ( $10^{-4}$  mol/l). Aliquote da 10 ml di  
30 sospensione cellulare sono state distribuite in fiasche da 25 cm e a frequenza



settimanale il terreno è stato sostituito per il 50%. Le cellule raggiungono la confluenza dopo un periodo di coltura di 4-6 settimane.

Il metodo di cocoltura qui descritto comprende il seguente passaggio:

- 5 messa in coltura di cellule stromali midollari in un terreno idoneo (AIM-V, Gibco) e successiva aggiunta in coltura nello stesso terreno, di cellule leucemiche primarie o provenienti da linee cellulari.

Le cellule stromali midollari potranno essere piastrate in piastre a più pozzetti, in un numero da 50.000 a 100.000. dopo un periodo di tempo di incubazione compreso tra  
10 12 e 24h alle condizioni (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) saranno aggiunte cellule leucemiche (circa in un numero compreso tra 80.000 ed 100.000 per pozzetto contenente 50.000-100.000 stromali) e la cocoltura cellulare potrà essere incubata per un periodo di 2 ore alle condizioni 37°C, 5% CO<sub>2</sub> prima di aggiungere la sostanza o la miscela di sostanze da saggiare.

15

Ogni particolare forma di realizzazione indicata in maniera dettagliata è presente nella sezione esempi e risultati sperimentali che segue. Qualsiasi indicazione presente in tale sezione potrà essere applicata a forme di realizzazione simili senza necessità di attività inventiva da parte del tecnico del settore.

- 20 Qualsiasi dato presente in detta sezione potrà inoltre essere applicato, singolarmente, alla descrizione dettagliata qui presente.

Il metodo in vitro come sopra descritto, mima in maniera sorprendentemente efficace lo sviluppo della chemioresistenza delle cellule leucemiche che si realizza in vivo.

- 25 Il metodo, realizzato su numerosi campioni di cellule leucemiche primarie, di pazienti di cui si è conosciuto il decorso clinico, ha portato allo sviluppo di chemioresistenza in vitro unicamente nelle co-culture di cellule primarie di pazienti che hanno effettivamente sviluppato una leucemia chemioresistente, mentre, le cellule di pazienti la cui forma leucemica non ha sviluppato chemioresistenza, non hanno portato allo sviluppo di chemioresistenza in vivo mediante il metodo sopra descritto.

Un chiaro esempio della funzionalità e dell'efficacia del metodo è dato dalla figura 1 dove nel pannello C, in cui sono state messe in co-coltura cellule primarie leucemiche, si vede che nei primi due casi le cellule leucemiche libere sono estremamente sensibili al farmaco (istogramma bianco msc- E4031- eritro-) mentre in co-coltura (istogramma grigio msc+ E4031- eritro-) l'effetto del farmaco è praticamente inesistente. I pazienti da cui provenivano tali cellule primarie hanno sviluppato chemioresistenza. Nel terzo caso, (ALL6), la presenza delle cellule MSC esercita un lievissimo effetto protettivo rispetto ai casi ALL4 e ALL3, che riduce di meno del 10% l'efficacia del farmaco sulle cellule in co-coltura. Il paziente da cui provenivano tali cellule, non ha sviluppato una forma leucemica chemioresistente. Il metodo della presente descrizione quindi, permette di mimare in vitro ciò che si realizzerà in vivo, e può essere utilizzato prevalentemente per due scopi, il primo, quello di screening di composti o combinazioni di composti in grado di abbattere la chemioresistenza e di indurre l'apoptosi delle cellule leucemiche, il secondo, quello diagnostico di previsione o monitoraggio dello sviluppo di chemioresistenza nelle forme leucemiche analizzate. Tale metodo diagnostico, potrà anche essere inglobato in un metodo terapeutico che preveda la somministrazione di quantitativi efficaci di composizioni per il trattamento di forme leucemiche chemioresistenti o potenzialmente chemioresistenti in pazienti che le necessitano, in quanto tale metodo permette di prevedere quali pazienti svilupperanno forme leucemiche chemioresistenti.

Oggetto della presente descrizione sono anche le cellule in co-coltura ottenibili mediante il metodo descritto sopra che potranno anche essere definite come "la co-coltura" o la "cocoltura".

Con questa definizione si indica la co-coltura risultante dal metodo sopra descritto sulla quale potranno essere effettuati alcuni ulteriori passaggi che porteranno alternativamente, al metodo di screening farmacologico di seguito descritto, o al metodo diagnostico/terapeutico di seguito descritto.

Al fine di effettuare uno screening di composti o combinazioni di composti utilizzabili per il trattamento di leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti, è qui descritto un metodo che permette di saggiare l'efficacia di sostanze o

combinazioni di sostanze da poter utilizzare per il trattamento di leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti.

Utilizzando il metodo sopra descritto con cellule leucemiche di pazienti, gli autori dell'invenzione hanno osservato che l'effetto proapoptotico dei composti antitumorali sulle cellule leucemiche è completamente abrogato quando le cellule leucemiche sono coltivate in presenza di cellule stromali ed hanno anche osservato che tale di chemioresistenza, indotto dalle cellule stromali nelle cellule chemioresistenti o potenzialmente chemioresistenti, è completamente revertito, come riportato in dettaglio negli esempi e in figura 1 e confermato ulteriormente negli esperimenti in vivo su topo (figura 2), se il composto antitumorale è usato in combinazione con uno o più bloccante del canale hERG1.

E' quindi oggetto dell'invenzione un metodo *in vitro* di screening per l'identificazione di sostanze o combinazioni di sostanze efficaci per il trattamento delle leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti comprendente i seguenti passaggi:

b) trattare le co-culture cellulari (cellule leucemiche e cellule stromali midollari) sopra descritte con una o più sostanze o combinazioni di sostanze da saggiare;

c) valutare l'apoptosi delle cellule leucemiche dopo il trattamento.

Tutte le forme di realizzazione del metodo di co-cultura sopra descritto si applicano al metodo di screening qui rivelato.

Il passaggio b) può essere descritto anche come trattare le co-culture ottenute nel passaggio a) del metodo di co-cultura sopra descritto con una o più sostanze o combinazioni di sostanze da saggiare.

Come sostanze o combinazioni di sostanze efficaci per il trattamento delle leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti s'intendono sostanze o combinazioni di sostanze che hanno l'effetto di inibire sin dall'inizio lo sviluppo di cellule leucemiche chemioresistenti o di revertire la chemioresistenza delle cellule leucemiche trattate con dette sostanze e di ripristinare il pathway apoptotico.

In una forma di realizzazione le combinazioni di sostanze saggiate potranno mostrare un effetto sinergico in cui la somma delle azioni terapeutiche di ciascuna sostanza

presa singolarmente è inferiore all'azione terapeutica della combinazione di dette sostanze nel trattamento di cellule o forme leucemiche chemioresistenti.

In un'altra forma di realizzazione, il metodo di screening della presente descrizione permette di identificare nuove sostanze o nuovi usi di sostanze note, come antitumorali che abbattano la chemioresistenza leucemica.

Le sostanze da saggiare possono essere aggiunte alla co-coltura a diverse concentrazioni e per diversi tempi d'incubazione ad esempio dopo circa 24,36, 48 ore di incubazione a circa 37° C. Le concentrazioni ed i tempi a cui saggiare le sostanze potranno essere determinate dal tecnico del settore senza necessità di attività inventiva.

Il valore dell'apoptosi delle cellule leucemiche dopo il trattamento con le sostanze da saggiare può essere determinato mediante diverse tecniche note al tecnico del settore, come ad esempio metodi citofluorimetrici. Nei metodi citofluorimetrici può essere, ad esempio, identificata la quantità di cellule leucemiche in apoptosi mediante anticorpi o sostanze marcate con un fluoroforo in grado di legare specifici marcatori che indicano lo stato di apoptosi della cellula. Un idoneo marcatore dell'apoptosi quale la fosfatidilserina potrà essere rivelato mediante il legame con l'annexina V marcata con un fluoroforo come ad esempio la fluoresceina.

Quando il marcatore dell'apoptosi è anche esposto dalle cellule necrotiche, come nel caso della fosfatidilserina, potrà essere usato un secondo marcatore per distinguere le due popolazioni cellulari come ad esempio lo ioduro di propidio che lega selettivamente le cellule necrotiche.

Tutti i prodotti necessari per la lettura dei risultati o una parte di questi possono essere forniti in un kit per lo screening di sostanze potenzialmente idonee all'uso nella terapia delle leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti.

Tutti i reagenti o una parte di essi possono essere aliquotati in uno o più contenitori e possono essere forniti sotto forma di kit.

Gli stessi campioni analizzati con il metodo sopra descritto sono stati analizzati anche utilizzando un metodo per la misurazione dei livelli di espressione del canale hERG1

che consente di esprimere in termini quantitativi assoluti l'espressione di hERG1 a livello della membrana cellulare di campioni di cellule leucemiche.

L'analisi di questi campioni come descritto in dettaglio negli esempi e in figura mostra una corrispondenza tra l'effetto della combinazione composto chemioterapico (o antitumorale)+inibitore di hERG1 e i livelli di espressione di hERG1, in particolare  
5 tanto più è elevata l'espressione di hERG1 più significativamente le cellule leucemiche rispondono al trattamento combinato composto chemioterapico (o antitumorale)+inibitore hERG1.

I dati ottenuti *in vitro* relativi alla correlazione tra l'espressione di hERG1 e la  
10 responsività delle cellule leucemiche ai chemioterapici sono stati, fino ad ora, confermati dai dati clinici dei pazienti da cui provenivano i campioni: lo sviluppo della chemioresistenza *in vitro* si è osservato nei pazienti nei quali era stato ottenuto un alto valore di espressione di hERG1 e per i quali il decorso clinico ha confermato l'effettivo sviluppo clinico della chemioresistenza. Questi dati quindi supportano ulteriormente  
15 l'efficacia della combinazione composto chemioterapico (o antitumorale)+inibitore hERG1 per uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti.

E' stato quindi scoperto, che l'utilizzo di "bloccanti hERG1", in associazione con composti antitumorali o chemioterapici comunemente usati nella terapia di induzione e/o di mantenimento delle leucemie e inefficaci, da soli, contro le leucemie  
20 chemioresistenti, provoca un inatteso effetto sinergico tra le due sostanze, che elimina la chemioresistenza leucemica.

Questo effetto crea l'ulteriore, indubbio, vantaggio di poter evitare il ricorso al trapianto, che oggi rimane l'opzione d'elezione di fronte ad una forma leucemica che non risponde alla chemioterapia, o comunque di fronte a forme di malattia che hanno i  
25 segni, anche precoci, della mancanza di risposta. Va ricordato che il trapianto di midollo osseo presenta numerose e gravi conseguenze cliniche per il paziente (non ultima la possibilità di sviluppare una grave ^graft versus host disease^ (cioè il rigetto esercitato dal trapianto verso i tessuti dell'ospite), e rappresenta un costo veramente gravoso per il servizio sanitario.

Una forma di realizzazione della presente descrizione riguarda una miscela di almeno un bloccante di canali hERG1 in combinazione con almeno un composto per terapie antitumorali (qui definito anche come "antitumorale" in generale) per uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti.

Secondo la presente descrizione, si intendono come leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti, tutte le forme leucemiche in grado di dare chemioresistenza o resistenza ai farmaci comunemente utilizzati nelle terapie anti tumorali. Nella presente descrizione sono definite leucemie potenzialmente chemioresistenti tutte le forme leucemiche in cui metodi predittivi di tale chemioresistenza suggeriscono che la forma leucemica analizzata abbia potenziali sviluppi di chemioresistenza.

Un esempio non limitativo di forme leucemiche chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti sono scelte nel gruppo comprendente leucemie dell'adulto e leucemie pediatriche quali ad esempio la leucemia acuta linfoblastica pediatrica o dell'adulto, la leucemia acuta mieloide pediatrica o dell'adulto, la leucemia cronica linfoblastica dell'adulto e la leucemia cronica mieloide dell'adulto.

La leucemia linfoblastica acuta è un tipo di leucemia di natura maligna con carattere progressivo che colpisce prevalentemente i bambini con un'età inferiore ai 15 anni, la percentuale di incidenza diminuisce invece negli adulti. La classificazione della Leucemia acuta linfoblastica prevede 3 forme diverse a seconda della forma dei blasti.

Per leucemia acuta mieloidie (LMA o LAM) in campo medico, si intende una neoplasia di carattere maligno caratterizzata dalla proliferazione di granucolociti

Tutte le forme di realizzazione della presente descrizione sono applicabili agli esseri umani e anche ai mammiferi in generale.

Secondo la presente descrizione è definito come bloccante di canali hERG1 qualsiasi composto noto al tecnico del settore in grado di bloccare, diminuire o inibire (rallentare o abolire) completamente o in parte l'attività dei canali hERG1 (vedere ad esempio Fig. 3).

Secondo la presente descrizione, detto bloccante di canali hERG1 è selezionato nel gruppo comprendente principi attivi antiaritmici di classe III, principi attivi antiaritmici di classe I, principi attivi antistaminici, principi attivi in patologie psichiatriche, principi attivi anti microbici, principi attivi per la mobilità gastro intestinale.

5 E' evidente che possono essere selezionati tutti i principi attivi che fanno parte di queste classi che hanno un'attività bloccante di canali hERG1 e non quei principi attivi che fanno parte di queste classi, ma non hanno un'attività bloccante di canali hERG1. Sono inclusi nella presente descrizione gli inibitori di hERG1 indicati nella figura 3.

10 Detti principi attivi antiaritmici di classe III possono essere scelti nel gruppo comprendente E4031, WAY 123,398, amiodarone, dofetilide, D-sotalol, bretilio, almokalant, sematilide, ibutilide, tedisamile, azimilide.

Detti principi attivi antiaritmici di classe I scelti nel gruppo comprendente Chinidina, propafenone, procainammide, disopiramide, pepridile, prenilamina, terodilina.

Detti principi attivi antistaminici possono essere scelti tra terfenadina, astemizolo.

15 Detti principi attivi per uso nel trattamento di patologie psichiatriche possono essere scelti nel gruppo comprendente aloperidolo, antidepressivi triciclici, clorpromazina, tioridazina o sertindolo.

Detti principi attivi antimicrobici possono essere scelti nel gruppo comprendente eritromicina, pentamidina, quinina, cloroquina, alofantrina.

20 Detti principi attivi per la mobilità gastro intestinale come ad esempio il cisapride.

Nella figura 3 della presente descrizione, corrispondente alla Tabella 2 a pag 759 dell'articolo Witchel HJ and Hancox JC- Familial and acquired Long QT syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current- Clin Exp Pharmacol Physiol 27, 753-766, 2000 sono riportati alcuni principi attivi che possono essere selezionati come  
25 bloccante di canali hERG1 e i riferimenti alle citazioni degli studi clinici o molecolari sulla loro attività bloccante di canali hERG1 idonei alla realizzazione delle miscele o delle composizioni della presente descrizione.

Detto composto per terapie antitumorali potrà essere qualsiasi composto antitumorale idoneo alla cura delle leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente

chemioresistenti noto al tecnico del settore, un esempio non limitativo di tali composti antitumorali comprende la doxorubicina, cortisonici, metotrexato, asparaginasi.

Tra i cortisonici comunemente utilizzati nella terapia antitumorale, il tecnico del settore potrà identificare qualsiasi cortisonico idoneo, tra questi potrà ad esempio essere  
5 utilizzato il cortisolo, prednisone, prendisolone, desametasone e betametasone.

Le miscele possono essere preparate miscelando uno o più bloccanti dei canali hERG1 e uno o più composti antitumorali secondo le tecniche note al tecnico del settore senza particolare difficoltà di sperimentazione e senza necessità di attività inventiva.

10 Un'ulteriore forma di realizzazione riguarda una composizione farmaceutica per uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti comprendente una miscela di almeno un bloccante di canali hERG1 in combinazione con almeno un composto per terapie antitumorali come precedentemente definiti e descritti.

15 Tali composizioni farmaceutiche potranno essere preparate secondo le tecniche note al tecnico del settore sia utilizzando una miscela di uno o più bloccante di canali hERG1 in combinazione con uno o più composti per terapie antitumorali precedentemente preparata sia miscelando i singoli principi attivi direttamente durante la preparazione della composizione.

20 Ovviamente le composizioni potranno essere preparate usando uno o più degli inibitori (alias bloccanti) di hERG1 come sopra descritti o un loro sale farmaceuticamente accettabile e uno o più dei composti (o farmaci) antitumorali come sopra descritti o un loro sale farmaceuticamente accettabile.

Tali composizioni potranno ovviamente comprendere uno o più veicoli, diluenti e/o  
25 eccipienti farmaceuticamente accettabili. Le composizioni potranno essere in qualsiasi forma ritenuta idonea dal tecnico del settore quali forme solide, semisolide, liquide, granulari, per inalazione o per aerosol.

Le forme liquide potranno essere forme idonee alla somministrazione orale o sistemica.



Le composizioni farmaceutiche qui descritte potranno essere idonee per somministrazione orale (ad esempio somministrazione boccale e sottolinguale), rettale, topica (somministrazione sottolinguale boccale o transdermica), vaginale, parenterale (ad esempio sottocutanea, intramuscolare, intravenosa o intradermica),  
5 per inalazione o nasale ad un mammifero quale un essere umano.

Composizioni farmaceutiche idonee per somministrazione orale possono essere capsule, compresse, pasticche, polveri, granuli, soluzioni o sospensioni in liquidi acquosi o non acquosi, spume o battuti commestibili, emulsioni liquide olio in acqua o emulsioni liquide acqua in olio.

10 Ad esempio, per la somministrazione orale in forma di pasticca o capsula, i composti sopra indicati potranno essere combinati con un veicolo inerte non tossico farmaceuticamente accettabile come etanolo, glicerolo, acqua e simili. Potranno essere presenti anche aromi, conservanti, agenti dispersanti e coloranti.

Le capsule possono essere preparate riempiendo involucri di gelatina con i composti  
15 sopra indicati. Lubrificanti e scivolanti come silica colloidale, talco, stearato di magnesio, stearato di calcio, o polietilen glicole solido possono essere aggiunti alla miscela prima dell'azione di riempimento. Un agente disintegrante o solubilizzante potrà essere aggiunto per migliorare la disponibilità del medicamento quando viene ingerita la capsula.

20 Inoltre, quando desiderato o necessario, possono essere anche incorporati nella composizione leganti, lubrificanti agenti disintegranti, agenti coloranti. Leganti idonei includono ad esempio amido, gelatina, zuccheri naturali come glucosio o beta lattosio, come addolcenti, gomme naturali e sintetiche quali acacia, tragacanto o alginato di sodio, carbossimetil cellulosa, polietilen glicole, cere e simili. I lubrificanti utilizzati in  
25 queste forme includono oleato di sodio, stearato di sodio, stearato di magnesio, benzoato di sodio, acetato di sodio, cloruro di sodio, e simili. I disintegranti includono ad esempio amido, metilcellulosa, agar, bentonite, gomma di xantano e simili. Le compresse sono formulate, ad esempio, preparando una miscela in polvere, come granulato o semilavorato, aggiungendo un lubrificante e un disintegrante e  
30 pressandole in compresse. Una miscela in polvere si prepara miscelando il composto

sminuzzato in modo adeguato, con un diluente o una base come descritto sopra e, opzionalmente, con un legante come carbossimetilcellulosa, un alginato una gelatina o polivinilpirrolidone, un ritardante per soluzioni come la paraffina, un acceleratore di riassorbimento come un sale quaternario e/o un agente di assorbimento come la bentonite, la caolina o il difosfato di calcio. La miscela in polvere può essere granulata bagnandola con un legante quale uno sciroppo, pasta di amido, mucillagine di acadia o soluzioni di materiali cellulosici o polimerici e forzandola attraverso un divisorio. Come alternativa alla granulazione, la miscela in polvere può essere fatta passare attraverso la compressa ed il risultato sono semilavorati formati in modo imperfetto rotti in granuli. I granuli possono essere lubrificati per prevenire l'appiccicarsi agli stampi che formano le compresse mediante aggiunta di acido stearico, sale di stearato, o un olio minerale. La miscela lubrificata è quindi pressata in compresse. Le miscele di uno o più bloccante di canali hERG1 in combinazione con uno o più composti per terapie antitumorali della presente invenzione possono essere anche combinati con un veicolante inerte che fluisce liberamente ed essere pressati in compresse direttamente senza passare per i passaggi di granulazione o semilavorazione. Un rivestimento protettivo trasparente o opaco consistente in un rivestimento di sigillamento di gommalacca, un rivestimento di zucchero o materiale polimerico ed un rivestimento lucido di cera possono essere forniti. Si possono aggiungere coloranti a questi rivestimenti in modo da riconoscere ad esempio diverse unità di dosaggio.

Una composizione farmaceutica idonea alla somministrazione orale in forma di compressa potrà comprendere uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili e/o eccipienti idonei alla preparazione di formulazioni in compresse. Esempi di tali veicoli includono lattosio e cellulosa. La compressa può anche o invece contenere uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, ad esempio agenti leganti, lubrificanti quali stearato di magnesio, e/o disintegranti per compresse.

Una composizione farmaceutica idonea alla somministrazione orale in forma di capsula può essere preparata utilizzando procedura di incapsulamento. Ad esempio, pellet contenenti l'ingrediente attivo, possono essere preparati utilizzando un veicolo

idoneo farmaceuticamente accettabile e quindi essere immessi in una capsula di gelatina dura. Alternativamente, possono essere preparate una dispersione o una sospensione utilizzando qualsiasi veicolo idoneo farmaceuticamente accettabile, ad esempio una gomma acquosa o un olio e la dispersione o sospensione può essere  
5 quindi immessa in una capsula di gelatina morbida.

La composizione potrà essere in forma di dosaggio unitario quale una compressa o una capsula per somministrazione orale, ad esempio per somministrazione orale ad un essere umano. Quando opportuno, le formulazioni a unità di dosaggio per somministrazione orale possono essere micro incapsulate. La formulazione può  
10 essere preparata anche in modo da prolungare o mantenere il rilascio ad esempio rivestendo o incastrando materiale particolato in polimeri, cere o simili.

Liquidi per uso orale come soluzioni, sciroppi ed elisir possono essere preparati in forma di unità di dosaggio in modo che una determinata quantità contenga un quantitativo dei composti sopra indicati predeterminato. Gli sciroppi possono essere  
15 preparati sciogliendo i composti in una soluzione acquosa opportunamente aromatizzata, mentre gli elisir sono preparati mediante l'uso di un veicolo alcolico non tossico. Le sospensioni possono essere formulate disperdendo il composto in un veicolo atossico. Possono essere anche aggiunti solubilizzanti ed emulsionanti quali isostearil alcoli etossilati e eteri poliossietilensorbitolici, conservanti, aromi quali olio di  
20 menta piperita o saccarina o altri dolcificanti artificiali e simili. Una formulazione liquida consisterà generalmente in una sospensione o soluzione dei composti sopra indicati in uno o più veicoli liquidi idonei farmaceuticamente accettabili, ad esempio un solvente acquoso quale acqua, etanolo o glicerina, o un solvente non acquoso, quali polietilen glicole o un olio. La formulazione potrà anche contenere un agente di  
25 sospensione, conservante, aromatizzante e/o colorante.

Le composizioni atte ad una somministrazione parenterale possono includere soluzioni acquose o non acquose sterili per iniezione che possono contenere antiossidanti, tamponi, batteriostatici e soluti che rendono la soluzione isotonica col  
30 sangue del ricevente desiderato, e sospensioni acquose o non acquose sterili che

possono includere agenti per sospensione e addensanti. Una composizione parenterale può comprendere una soluzione o sospensione dei composti in un veicolo ad esempio acquoso sterile o in un olio parenteralmente accettabile. Alternativamente, la soluzione potrà essere liofilizzata; la composizione farmaceutica parenterale liofilizzata potrà essere ricostituita con un solvente idoneo appena prima  
5 della somministrazione.

Le formulazioni potranno essere presentate in contenitori mono dose o multi dose, ad esempio fiale o provette sigillate, e potranno essere conservate in condizione liofilizzata che richiede solo l'aggiunta del veicolante liquido sterile, ad esempio acqua  
10 per iniezioni, immediatamente prima dell'uso. Soluzioni e sospensioni per iniezioni estemporanee potranno essere preparate da polveri, granuli, liofilizzati e compresse sterili.

Nel caso di somministrazione parenterale, la composizione potrà anche essere fornita con i componenti attivi in contenitori separati miscelabili opportunamente secondo il  
15 dosaggio desiderato tenendo conto del peso, dell'età del sesso e dello stato di salute del paziente che ne ha bisogno.

Composizioni per somministrazione nasale o per inalazione possono convenientemente essere formulate come aerosol, gocce, gel o polveri secche.

Le composizioni atte alla somministrazione nasale in cui il veicolo è un solido  
20 includono una polvere ruvida avente una dimensione delle particelle ad esempio nell'intervallo da 20 a 500 micron che è somministrata in modo tale che sia presa la fiutata, e cioè mediante rapida inalazione attraverso il passaggio nasale da un contenitore della polvere tenuto vicino al naso. Formulazioni idonee in cui il veicolo sia un liquido, per somministrazione come spray o gocce nasali, includono soluzioni  
25 acquose o oleose della composizione.

Le composizioni atte alla somministrazione mediante inalazione, includono polveri di particelle sottili o nebulizzati che possono essere generati mediante vari tipi di aerosol a dose pressurizzata, nebulizzatori o inalatori calibrati.

Le formulazioni per aerosol, ad esempio per somministrazione per inalazione,  
30 possono comprendere una soluzione o una sospensione sottile della sostanza attiva

in un solvente acquoso o non acquoso farmaceuticamente accettabile. Le formulazioni per aerosol possono essere presentate in quantità a dose singola o multipla in forma sterile in un contenitore sigillato che può prendere la forma di una cartuccia o di una ricarica da utilizzare in un dispositivo nebulizzatore o inalatore. I  
5 farmaci bloccanti potranno essere somministrati o per via orale o per via parenterale..  
Le composizioni qui descritte per facilitare la somministrazione e l'uniformità di dosaggio possono essere presentate in forma di dosi unitarie contenenti un quantitativo predeterminato di uno o più bloccanti di canali hERG1 e di uno o più composti per terapie antitumorali. Esempi di tali forme di dosaggio unitario sono  
10 compresse (comprese compresse intaccate o ricoperte), capsule, pillole, polveri, soluzioni iniettabili o sospensioni, cucchiainate da te, cucchiainate da tavola e simili, e loro multipli separati.

Il dosaggio esatto e la frequenza di somministrazione dipenderà dalla particolare combinazione di bloccanti dei canali hERG1 e di composti per terapie antitumorali.  
15 utilizzata, dalla particolare condizione da trattare, dalla severità della condizione da trattare, dall'età, dal peso e dalle condizioni fisiche generali del particolare paziente così come da altre medicine che il paziente stia assumendo, come è ben noto agli esperti del settore. Inoltre, è evidente che detto quantitativo efficace può essere abbassato o aumentato secondo le risposte del paziente trattato e/o secondo la  
20 valutazione del medico che prescrive i composti della presente invenzione. I dosaggi efficaci qui indicati sono quindi, solamente indicativi.

La composizione qui descritta potrà comprendere uno o più di detti inibitori in un dosaggio unitario compreso tra circa 0,3 e circa 100mg/Kg/die complessivamente, ad esempio circa 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 mg/Kg/die.

25 Un esempio non limitativo delle posologie che possono essere utilizzate per i bloccanti dei canali hERG1 sopra indicati sono le seguenti:

Sulla base degli esperimenti in vitro ed in vivo i dosaggi per la somministrazione di inibitori di hERG1 in combinazione con i composti antitumorali saranno nel range ritenuto efficace e sicuro in base alla biodisponibilità dei singoli farmaci.

30 Il dosaggio di composti antitumorali potrà essere, nella composizione dell'invenzione,

un dosaggio quale quello comunemente utilizzato nella terapia contro le leucemie non chemioresistenti per Kg di peso corporeo o anche un dosaggio inferiore dato l'effetto sinergico legato alla presenza dell'inibitore h ERG1.

Nelle composizioni qui indicate il dosaggio unitario del principio attivo antitumorale  
5 potrà essere circa il 100%, circa 90%, circa l'80%, circa il 70%, circa il 60%, circa il 50%, circa il 40%, circa il 30% o meno rispetto alle dosi unitarie comunemente utilizzate nella terapia contro la leucemia.

Per dose unitaria si intende la dose che viene somministrata di volta in volta al paziente sia essa suddivisa in più somministrazioni nell'arco della giornata, sia essa  
10 giornaliera, o sia essa ad intervalli di giorni.

Seguono esempi non limitativi delle posologie attualmente utilizzate per gli antitumorali sopra indicati applicabili nelle percentuali sopra indicate alla composizione farmaceutica e alla sua dose unitaria secondo la presente descrizione:

#### Posologia

##### 15 Metotrexato

Generalmente il metotrexato non viene utilizzato da solo come farmaco selettivo al fine di indurre la remissione della leucemia linfoblastica. E' comunque utilizzato il dosaggio di 3,3 mg/mq di superficie corporea di metotrexato associato a 40-60 mg/mq di superficie corporea di prednisolone al giorno per 4-6 settimane. Al raggiungimento  
20 della remissione, il metotrexato viene somministrato per via intramuscolare con dose di mantenimento di 20-30 mg/mq, due volte alla settimana. Le somministrazioni bisettimanali sembrano essere più efficaci delle somministrazioni quotidiane. In alternativa, 2,5 mg/kg del farmaco possono essere somministrati per via endovenosa ogni 14 giorni.

##### 25 doxorubicina cloridrato

via endovenosa: quando Adriblastina è impiegata come unico agente antitumorale la dose consigliata negli adulti è di 60-75 mg/ m<sup>2</sup> di superficie corporea da somministrarsi per iniezione ev (endovenosa) a intervalli di 21 gg. compatibilmente con le condizioni ematomidollari. La dose inferiore (60 mg/ m<sup>2</sup>) è raccomandata per i pazienti con  
30 riserve midollari ridotte dovute ad età avanzata, terapie precedenti, o infiltrazione

neoplastica midollare. La dose di 60-75 mg/ m<sup>2</sup> può essere somministrata in una unica iniezione o suddivisa in 2-3 gg. consecutivi. Specialmente per l'età pediatrica è stata suggerita una posologia alternativa di 30 mg/ m<sup>2</sup>/die ev per 3 gg. consecutivi; tale ciclo è da ripetersi ogni 4 settimane. La dose cumulativa di Adriblastina per via ev, indipendentemente dallo schema di somministrazione, non deve superare i 550 mg/ m<sup>2</sup> di superficie corporea (vedere Avvertenze speciali e precauzioni d'impiego nel RCP). Adriblastina è attualmente impiegata estensivamente anche in polichemioterapia a dosi usuali di 25-50 mg/ m<sup>2</sup> ogni 3-4 settimane in combinazione con altri agenti dotati di azione mielodepressiva e a dosi di 60-75 mg/ m<sup>2</sup> se combinata con altri farmaci che non presentano tossicità midollare.

#### Prednisone

E' un medicinale normalmente somministrato per via orale: la dose terapeutica d'attacco nell'adulto di peso medio corrisponde a mg 20-30 al giorno. Questa dose iniziale viene rapidamente ridotta nello spazio di tempo di una settimana ad una dose di mantenimento che oscilla in media intorno ai 10 mg al giorno: possono essere richiesti anche dosaggi minori in rapporto al peso corporeo ed all'età del paziente. La posologia di mantenimento deve essere sempre la minima capace di controllare la sintomatologia ed e' comunque fissata dal medico che, se incorrerà in una dose inadeguata assisterà alla ripresa graduale dei disturbi.

La riduzione posologica deve essere sempre graduale. Per la somministrazione di dosi elevate in particolari forme ematologiche, dermatologiche, ecc. si possono usare le compresse a dosaggio unitario maggiore da mg 25. E' importante sottolineare che il fabbisogno corticosteroidico è variabile e quindi la posologia va individualizzata, tenendo conto della malattia e della risposta del paziente alla terapia.

Cortisonici utilizzati sono anche: cortisolo, prednisone, prendisolone, desametasone e betametasone

#### Asparaginasi.

Dose raccomandata per via endovenosa 6,000 UI/m<sup>2</sup> 3 volte a settimana per un totale di 12 dosi.

Ulteriori informazioni sulla posologia nel trattamento delle leucemie sono disponibili al tecnico del settore senza alcun utilizzo di attività inventiva da parte dello stesso e senza particolari difficoltà nel reperire le indicazioni. La posologia potrà essere anche semplicemente quella indicata sui foglietti illustrativi dei farmaci antitumorali sopra  
5 indicati.

La presente descrizione fornisce anche un metodo per il trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti comprendente la somministrazione a pazienti che ne abbiano bisogno, di quantitativi efficaci di una composizione come qui descritta.

10 Dette forme leucemiche chemio resistenti o potenzialmente chemio resistenti possono essere scelte nel gruppo comprendente leucemie dell'adulto e leucemie pediatriche quali ad esempio la leucemia acuta linfoblastica pediatrica o dell'adulto, la leucemia acuta mieloide pediatrica o dell'adulto, la leucemia cronica linfoblastica dell'adulto e la leucemia cronica mieloide dell'adulto.

15 Nel metodo di trattamento il dosaggio esatto e la frequenza di somministrazione delle composizioni dipenderà dalla particolare combinazione di bloccanti dei canali hERG1 e di composti per terapie antitumorali utilizzata, dalla particolare condizione da trattare, dalla severità della condizione da trattare, dall'età, dal peso e dalle condizioni  
20 fisiche generali del particolare paziente così come da altre medicine che il paziente stia assumendo, come è ben noto agli esperti del settore.

Alcuni dosaggi efficaci che possono essere somministrati sono indicati qui di seguito:

Uno o più di detti inibitori di hERG1 potranno essere somministrati ad un dosaggio unitario compreso tra circa 0,3 e circa 100mg/Kg/die complessivamente, ad esempio  
circa 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 mg/Kg/die in combinazione con uno o più  
25 composti antitumorali il cui dosaggio unitario potrà essere circa il 100%, circa 90%, circa l'80%, circa il 70%, circa il 60%, circa il 50%, circa il 40%, circa il 30% o meno rispetto alle dosi unitarie comunemente utilizzate nella terapia contro la leucemia.

Il metodo per il trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti può essere preceduto da uno o più passaggi di  
30 screening noti al tecnico del settore al fine di determinare se un paziente è affetto da



leucemia chemioresistente.

In una forma di realizzazione detto metodo di trattamento comprende i seguenti passaggi di screening per definire l'effettiva presenza di chemioresistenza in atto o potenziale:

- 5 a) incubare un campione x di cellule leucemiche primarie di un paziente con un anticorpo primario monoclonale anti hERG1 specifico per la porzione esterna alla membrana di detto canale ionico;
- b) incubare con un anticorpo secondario marcato con fluorocromo specifico per l'anticorpo primario le cellule ottenute dopo l'incubazione del punto a) e un  
10 campione y di cellule leucemiche primarie dello stesso paziente non precedentemente incubate con detto anticorpo primario;
- c) valutare la fluorescenza di entrambi i campioni mediante citofluorimetria;
- d) calcolare il valore di MFI come rapporto tra fluorescenza rivelata nel campione x e fluorescenza rivelata nel campione y, se il valore di MFI è uguale o  
15 maggiore a 25;
- e) somministrare quantitativi efficaci di una composizione qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 12.

I passaggi di screening qui descritti hanno lo scopo di predire se forme leucemiche scelte nel gruppo comprendente leucemie dell'adulto e leucemie pediatriche quali ad  
20 esempio la leucemia acuta linfoblastica pediatrica o dell'adulto, la leucemia acuta mieloide pediatrica o dell'adulto, la leucemia cronica linfoblastica dell'adulto e la leucemia cronica mieloide dell'adulto.

Le informazioni relative alla previsione dello sviluppo e/o al monitoraggio dell'andamento della chemioresistenza nel tempo saranno ottenute mediante  
25 un'analisi e un'elaborazione dei dati ottenuti relativi ai livelli di espressione del canale ionico hERG1 sulla membrana plasmatica di cellule leucemiche. Le cellule leucemiche da analizzare saranno cellule ottenute da campioni biologici di forme leucemiche scelte nel gruppo comprendente leucemia acuta linfoblastica, leucemia acuta mieloide, leucemie pediatriche, leucemie dell'adulto.

30 Il campione biologico da cui le cellule leucemiche saranno ottenute, potrà essere qualsiasi campione di paziente affetto da leucemia da cui è possibile isolare dette cellule; in particolare, quindi sarà possibile utilizzare, ad esempio, sangue e campioni

di tessuto. A titolo esemplificativo e non limitante ai fini della presente descrizione, i campioni di tessuto utilizzabili sono campioni freschi o congelati ottenuti da aspirati midollari, sangue periferico e biopsie linfonodali di pazienti leucemici.

I campioni biologici ottenuti, indipendentemente dalla loro natura, potranno essere  
5 utilizzati sia freschi che non. Il tecnico del settore non necessita in questa descrizione di informazioni relative alle diverse tecniche di conservazione del materiale biologico dal momento che sarà in grado di scegliere senza alcuno sforzo di attività inventiva quella più idonea alle sue esigenze tenuto conto dell'informazione dettagliate riportante in qualsiasi manuale di laboratorio.

10 L'isolamento delle cellule leucemiche, dall'insieme di cellule di diversa natura presenti nel campione biologico, può essere effettuata sfruttando una qualsiasi delle caratteristiche molecolari che definiscono biochimicamente dette cellule leucemiche.

Le cellule leucemiche possono essere isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità (Abrams Ra, et al. Ficoll-Hypaque separation of bone marrow cells. Blood,  
15 1985 66: 472-473). In generale è da considerarsi idoneo ai fini della presente descrizione qualsiasi metodo noto al tecnico del settore che consenta di isolare da un insieme di cellule la popolazione di cellule leucemiche da analizzare.

Nella presente descrizione, è rivelata l'elaborazione di un indice (MFI) direttamente correlato all'espressione di canali hERG1 sulle cellule analizzate che permette di  
20 prevedere se i pazienti da cui provengono i campioni esaminati svilupperanno o meno chemioresistenza ( o farmacoresistenza) durante il decorso della malattia. I valori di MFI permettono quindi di conoscere a priori la tendenza alla chemioresistenza della forma leucemica in esame e forniscono al medico mezzi utili per poter progettare un trattamento terapeutico efficace. Il canale ionico hERG1, è un canale di  $K^+$ , che come  
25 già evidenziato, è in grado di formare complessi multiproteici sulla membrana plasmatica di cellule tumorali e di regolare stadi specifici della progressione neoplastica.

Il canale hERG1, presenta una porzione extracellulare di circa 100 aminoacidi che può essere utilizzata per definire epitopi di riconoscimento da sfruttate per lo sviluppo  
30 di anticorpi. Le porzioni extracellulari sono la porzione S1-S2; la porzione S3-S4 e la

porzione S5-PORO e la porzione S1-S2 si presta in modo particolare per lo sviluppo di anticorpi. Ai fini della presente invenzione tali epitopi saranno utilizzati per lo sviluppo di un anticorpo monoclonale anti hEGR1, secondo quanto noto al tecnico del settore.

- 5 Per realizzare l'anticorpo monoclonale, sarà sufficiente qualsiasi tecnica standard per lo sviluppo di anticorpi primari: va ricordato qui brevemente che ogni specifico anticorpo, che riconosce uno specifico determinante antigenico (epitopo), è prodotto da uno specifico linfocita B. L'isolamento e la coltura in vitro di una cellula capace di produrre un singolo anticorpo rappresenta una fonte di anticorpi monoclonali
- 10 (monospecifici). Tuttavia i linfociti B, quando sono coltivati in vitro, muoiono dopo brevissimo tempo, e quindi non possono essere una fonte per la produzione a lungo termine di anticorpi.

La tecnologia dell'anticorpo monoclonale comprende l'isolamento di questi linfociti B, e la loro successiva fusione con cellule trasformate (cellule mielomatose), utili per le loro caratteristiche di maggior crescita e sopravvivenza. Molte delle risultanti cellule

15 ibride (o ibridomi), che vengono coltivate in vitro, manterranno l'immortalità, oltre a produrre grandi quantità dell'anticorpo monospecifico.

La fusione tra i linfociti B (provenienti dalla milza e dai linfonodi di un animale immunizzato) e il mieloma di topo (l'animale più usato), si ottiene mediante l'intervento

20 di un promotore di fusione di membrana, come il polietilenglicole.

Il terreno su cui sono allevati gli ibridi è di tipo selettivo conosciuto con il nome di HAT, che proprio per la sua composizione, inibisce la crescita sia dei mielomi che delle cellule della milza non fuse, ma non dell'ibridoma che completa le due linee parenterali.

- 25 Gli ibridomi sono sottoposti a screening per la ricerca degli anticorpi specifici cercati e quelli scelti vengono avviati alla conservazione o alla produzione in massa.

Inoltre, anticorpi monoclonali anti hERG1 specifici per epitopi presenti nella porzione extracellulare sono disponibili anche in commercio (ad esempio ALX-804-652-R300 della Alexis-Biochemical oppure ABIN195450 della Antibodies on-line) e possono

essere utilizzati ai fini della presente invenzione senza che in questa descrizione siano forniti ulteriori dettagli. In particolare, la concentrazione di anticorpo da utilizzare come anche il tempo di incubazione delle cellule leucemiche con l'anticorpo primario monoclonale anti hERG1 dovrà essere sufficiente, come noto al tecnico del settore, a

5 garantire il legame tra determinate antigenico e anticorpo. I dettagli relativi a protocolli di incubazione con anticorpo sono ampiamente noti al tecnico del settore e, nel caso si utilizzino anticorpi commerciali, riportate nelle istruzioni del fornitore. A mero scopo esemplificativo, come riportato negli esempi sotto descritti, se l'anticorpo utilizzato sarà quello sviluppato contro l'epitopo compreso fra i residui 575-588 (numero di

10 accesso in Genbank NM000238) potrà essere effettuata una incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti con una diluizione dell'anticorpo 1:50.

La rilevazione dell'anticorpo primario monoclonale può essere effettuata mediante utilizzo di un opportuno anticorpo secondario marcato che come noto dovrà essere specifico per la regione costante, detta anche porzione Fc, dell'anticorpo primario, a

15 sua volta correlata al tipo di animale utilizzato per lo sviluppo dell'anticorpo primario stesso. In una particolare forma di realizzazione in cui l'anticorpo primario è sviluppato in topo, l'anticorpo secondario, come ben noto al tecnico del settore, sarà un anticorpo secondario anti-mouse.

Il metodo qui divulgato è strettamente correlato nella sua esecuzione all'utilizzo di un

20 citofluorimetro dal momento che gli inventori mediante questa tecnica hanno individuato la possibilità di esprimere in termini quantitativi assoluti l'espressione di hERG1 a livello della membrana plasmatica cellulare. Per questo motivo l'anticorpo secondario dovrà essere marcato con un fluorocromo. L'anticorpo secondario potrà essere marcato con qualsiasi fluorocromo comunemente utilizzato nella marcatura di

25 anticorpi secondari e in particolare potranno essere usati un fluorocromo scelto nel gruppo comprendente: idrossicumarina, aminocumarina, metossicumarina, Cascade Blue®, Pacific Blue™, Pacific Orange™, Lucifer Yellow, NDB, ficoeritrina (PE), coniugati di PE, Texas Red®, clorofilla di Peridinin (PerCP), TruRed, FluorX, fluoresceina, BODIPY-FL, TRICT, X-rodamina, alloficocianina (APC), coniugati di

30 APC, Alexa Fluor®, FITC, Cy3, Cy5, Cy2, Cy7.

La rilevazione dell'antigene di interesse in esame si ottiene grazie al fatto che i traccianti fluorescenti generano un segnale che viene tradotto nella prima volta nella presente descrizione in termini di intensità media di fluorescenza (MFI). La traduzione del segnale emesso in MFI rende possibile la definizione di un valore che, indipendentemente dal citofluorimetro impiegato, dal voltaggio dei fotomoltiplicatori e dall'operatore, definisce il livello di espressione del canale hERG1 sulla membrana cellulare.

L'Indice Medio di Fluorescenza (MFI) è definito come il rapporto tra la fluorescenza media di un'aliquota di un campione incubata con anticorpo primario e successivamente con anticorpo secondario anti primario marcato con fluorocromo e la fluorescenza rivelata in un'aliquota di controllo dello stesso campione incubata unicamente con l'anticorpo secondario (che è fluorescente e che pertanto mostra un segnale non dovuto al legame diretto antigene-anticorpo "fondo"). In altre parole tale indice può essere calcolato come il rapporto tra il segnale specifico del campione marcato con anticorpo primario e secondario (fluorescenza media campione=FC) ed il segnale aspecifico (fondo) ottenuto dallo stesso campione marcato con il solo anticorpo secondario ( fluorescenza media controllo Fc) e moltiplicato per 100: cioè  $MFI = FC/Fc \cdot 100$ . I valori ottenuti, riportati in una scala percentuale, consentono di avere una stima che è indipendente dal fluorocromo legato all'anticorpo secondario e dal citofluorimetro utilizzato.

Studi condotti dagli inventori su cellule leucemiche di pazienti affetti da leucemia, hanno evidenziato come sia possibile stabilire un valore di MFI oltre il quale è possibile predire lo sviluppo della chemioresistenza. In particolare, gli autori hanno sviluppato un metodo di coltura *in vitro* che mima la situazione che si riscontra in vivo nelle leucemie chemioresistenti che comprende la cocoltura di cellule leucemiche con cellule stromali midollari. Tale cocoltura *in vitro* mima gli effetti di protezione e di induzione della chemioresistenza osservati nelle cellule leucemiche nel midollo osseo e permette quindi di comprendere i meccanismi molecolari alla base di tale fenomeno. Come evidente dalla figura 1 C, cellule leucemiche cocoltivate con cellule stromali

risultano essere significativamente meno responsive al trattamento con doxorubicina rispetto alla coltura con le sole cellule leucemiche. La non responsività al farmaco chemioterapico, indotta sperimentalmente con la cocoltura *in vitro*, è revertita con un protocollo terapeutico che prevede la somministrazione combinata del chemioterapico con un inibitore del canale hERG1. I valori di MFI calcolati per le medesime cellule leucemiche chemioresistenti indicano che tanto più il valore di MFI è maggiore di 25 tanto più significativamente le cellule leucemiche rispondono al trattamento combinato chemioterapico+inibitore hERG1. Questi dati ottenuti *in vitro* relativi al valore di MFI e la responsività delle cellule leucemiche ai chemioterapici trovano corrispondenza negli studi effettuati *in vivo* dove lo sviluppo della chemioresistenza si è osservato in pazienti nei quali a priori si era ottenuto un valore di MFI maggiore di 25 e per i quali il decorso clinico ha confermato lo sviluppo della chemioresistenza.

In particolare, gli studi condotti dagli autori hanno permesso di definire un valore di MFI predittivo dello sviluppo delle chemioresistenza o utile per il monitoraggio delle chemioresistenza stessa prima, dopo o durante un particolare protocollo terapeutico. Nello specifico un fattore MFI maggiore o uguale a 25 è indice predittivo dello sviluppo di chemioresistenza e, nel caso di monitoraggio durante una cura, di persistenza della chemioresistenza.

Il valore di MFI più alto di 25 sarà quindi un indice di una maggiore efficacia del trattamento basato sulle composizioni qui definite e descritte.

I seguenti esempi e risultati sperimentali hanno lo scopo di indicare delle vie di realizzazione della presente descrizione senza essere tuttavia limitativi della stessa.

25

#### ESEMPI E RISULTATI SPERIMENTALI

Nonostante i miglioramenti nelle possibilità di cura, la resistenza alla chemioterapia resta uno dei più grandi ostacoli al trattamento efficace in una proporzione significativa di bambini con leucemia linfoblastica acuta (ALL), in particolare in quelli con ALL recrudescente. Le cellule mesenchimali del midollo osseo (MSC) possono

contribuire a generare la resistenza ai farmaci nelle cellule leucemiche e sono stati proposti vari meccanismi per spiegare questo effetto quali l'interazione molecolare tra il fattore derivato dallo stroma  $1\alpha$  (SDF- $1\alpha$ ) ed il suo recettore CXCR4 che potrebbero innescare il coinvolgimento dell'integrina e l'attivazione di cascate di segnale a valle

5 che promuovrebbero la sopravvivenza delle cellule leucemiche. Vi sono recenti evidenze che indicano che le integrine possono formare complessi macromolecolari con canali ionici, e che il complesso canale/integrina risultante potrebbe regolare la sopravvivenza delle cellule. Tra i canali ionici, quelli codificati dal gene *ether-a-gò-gò-related gene 1*, i canali hERG1, sono stati dimostrati formare complessi proteici con le

10 integrine in numerosi tipi di cellule tumorali. Negli esperimenti con le linee cellulari ALL REH, RS4;11 e 697 gli autori hanno trovato che il contatto delle cellule ALL con MSC induceva l'espressione di un complesso di segnale sulla membrana plasmatica costituito dai canali hERG1, la subunità  $\beta_1$  dell'integrina ed il recettore della chemochina CXCR4 sulla superficie delle cellule ALL. Questo complesso proteico

15 innescava l'attivazione di vie intracellulari pro-sopravvivenza. Gli autori hanno trovato che i canali hERG1 sono al centro di questo meccanismo di protezione. Le tre linee cellulari e tutti i casi (n = 63) di ALL primarie esprimevano hERG1, e l'esposizione a bloccanti di hERG1 poteva abrogare questo effetto protettivo dell'MSC e aumentare considerevolmente la citotossicità dei farmaci chemoterapici comunemente utilizzati per

20 trattare ALL quali doxorubicina, prednisone e metotrexato. In effetti, la chemioresistenza mediata dalle MSC potrebbe essere superata da numerosi bloccanti di hERG1 inclusi gli antiaritmici classici di classe III, quali E4031 e Way 123,398, così come altri agenti classificati come sostanze bloccanti di hERG1 quali il sertindolo e l'eritromicina. Questi risultati sono stati osservati sia in linee cellulari ALL, sia in cellule

25 ALL primarie e sono stati corroborate da studi in modelli murini di ALL. In particolare, i bloccanti di hERG1 potrebbero superare la resistenza ai farmaci, mediata da MSC, in cellule ALL inoculate in topi immunodeficienti: topi trattati con bloccanti di hERG1 mostravano un marcato aumento nella percentuale di apoptosi delle cellule ALL nel midollo osseo, un ridotto peso leucemico e una ridotta infiltrazione nel fegato e nel

30 midollo di cellule ALL. Inoltre, i bloccanti di hERG1 miglioravano anche l'effetto anti-

leucemico di corticosteroidi in topi iniettati con cellule resistenti ai corticosteroidi (le cellule della linea cellulare REH). Infatti, E4031 riduceva la colonizzazione nel midollo osseo, e questo effetto era correlato ad un aumento di apoptosi delle cellule ALL ed era maggiore di quello prodotto dal solo desametasone. Il trattamento con  
5 desametasone ed E4031 aboliva quasi lo sviluppo della leucemia nei topi. Insomma, il blocco di hERG1 risulta nell'impedimento della crescita delle cellule ALL ed aumenta l'effetto della chemioterapia anti ALL. Dato che alcuni degli inibitori hERG1 che si sono dimostrati efficaci sono disponibili per uso medico e non danno rischi seri di aritmia cardiaca, devono essere considerate per il trattamento della resistenza ai  
10 farmaci ALL.

Alla base di questa invenzione sta l'identificazione della presenza del canale hERG1 sulla membrana plasmatica delle cellule leucemiche, e dalla sua capacità di formare complessi macromolecolari con altre proteine di membrana, in particolare con le integrine contenenti la subunità beta1 (come VLA4 e VLA5), recettori per fattori di  
15 crescita e recettori per chemochine (vedi pubblicazioni 7 e 5). L'attività segnalatoria di tali complessi, e, all'interno di questa, la funzionalità del canale hERG1 si sono dimostrati fondamentali per regolare la sopravvivenza delle cellule leucemiche all'interno del midollo osseo. Ricordiamo ancora una volta che le cellule ematopoietiche normali e leucemiche risiedono nel midollo osseo in zone  
20 specializzate, definite "nicchie" che forniscono le condizioni strutturali e fisiologiche per la loro crescita e sopravvivenza. I meccanismi di adesione che facilitano la sopravvivenza delle cellule staminali e leucemiche nel midollo osseo e, viceversa la loro migrazione attraverso gli strati stromali e quindi fuori dal midollo osseo, includono l'integrina VLA4. Questo processo è diretto anche dalla chemochina SDF1 $\alpha$  secreta  
25 dallo stroma midollare e dal suo recettore CXCR4, presente sulla membrana delle cellule leucemiche. Gli esperimenti condotti dagli inventori sono stati condotti su cellule leucemiche umane: REH, RS e 697. In tutte le linee analizzate, è stato riscontrato, mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione, la formazione di un complesso multiproteico formato dal recettore per le chemochine CXCR4, la subunità



integrinica beta 1 e il canale hERG1. La formazione del complesso CXCR4/hERG1 risulta stimolata dal ligando per il recettore CXCR4; mentre la subunità integrinica  $\beta_1$  si associa al complesso CXCR4/hERG1 solo in seguito alla attivazione integrinica. Inoltre la co-cultura delle linee cellulari leucemiche linfoblastiche di tipo B con cellule midollari stromali produce un aumento notevole dell'associazione dell'integrina al complesso CXCR4/hERG1. Abbiamo inoltre dimostrato che la proteina ILK (Integrin-linked kinase) è espressa nelle linee cellulari di leucemia linfoblastica acuta di tipo B (LLA-B) coltivate in condizioni standard di cultura; e l'attività di questa chinasi risulta incrementata sia dalla stimolazione con SDF1a sia dalla attivazione integrinica, sia dalla co-cultura con cellule stromali midollari umane, e tale attivazione è mediato dalle integrine. Abbiamo dimostrato che le cellule leucemiche LLA-B attivano la fosforilazione delle MAPK e Akt se coltivate con le cellule midollari stromali e tale attivazione è integrino-dipendente; l'aggiunta dell'inibitore di hERG1 inibisce in modo significativo l'attivazione indotta dallo stroma di tali vie segnalatorie.

15 ESEMPIO 1

Co-cultura Di Cellule Stromali E Di Cellule Leucemiche

Le cellule stromali utilizzate negli esperimenti sono state prelevate ed espanse da aliquote di una linea cellulare immortalizzata di origine mesenchimale, ottenuta dall'istituto St. Jude Children's Hospital di Memphis (USA). Le cellule sono state risospese alla concentrazione di  $2 \times 10^6$ /ml in RPMI-1640, 10% siero fetale bovino (FCS, *Hyclone*), 2 mmol/l di L-glutammina (*Euroclone*), 1% di penicillina streptomina (*Euroclone*) e  $10^{-6}$  mol/l di L-idrocortisone (*Sigma*, St Louis, MO, USA). Le cellule stromali tenute in incubatore a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> e 90% di umidità, dopo circa una settimana di coltura, al raggiungimento di uno strato aderente e confluyente di fibroblasti, sono state utilizzate per esperimenti di co-cultura di linee di leucemie linfoblastiche acute su piastre da 96 pozzetti.

Il giorno precedente all'esperimento, per consentire l'adesione delle cellule stromali al fondo del pozzetto, è stato eseguito un coating di fibronectina 0,1% (*Sigma*) alla concentrazione finale di 1 µg per pozzetto. Sono stati aggiunti 10 µl di fibronectina (diluata in PBS) ad ogni pozzetto e le piastre sono state lasciate aperte, sotto la cappa

aspirante, per una notte. Il giorno successivo, il terreno presente nella fiasca delle stromali è stato eliminato e le cellule lavate con PBS e lasciate nell'incubatore per 2 minuti circa, per permetterne un iniziale distacco dal fondo. Successivamente è stato rimosso il PBS e aggiunti 5 ml di tripsina (*Euroclone*) incubando a 37° C; dopo un  
5 minuto circa si sbatte vigorosamente la fiasca, fino al distacco totale delle cellule. Queste vengono poi lavate una volta in RPMI-1640 con 10% di siero bovino fetale, 2mmol/l L-glutammina (*Euroclone*) e 1% penicillina-streptomina (*Euroclone*), risospese in un terreno fresco contenente 10<sup>6</sup> mol/l di L-idrocortisone (*Sigma*) e distribuiti 200 µl per pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Il giorno successivo si è  
10 proceduto alla conta delle cellule da piastrare sullo stroma, prelevandone 20 µl circa dalla fiasca nella quale sono mantenute in coltura e aggiungendo 20 µl di Tripan Blue (rapporto 1:1). La conta delle cellule vitali è eseguita con la camera di Burker. Dopo aver tolto il terreno di coltura, tramite rimozione del 50% del terreno e re-infusione di nuovo medium senza idrocortisone (passaggio effettuato per 7 volte), la sospensione  
15 cellulare è stata piastrata alla concentrazione di 100.000 cellule per pozzetto, dopo centrifuga a 1200 rpm per 5 minuti e risospensione in terreno AIM-V (*Gibco*). Per ogni linea cellulare sono quindi stati allestiti sia pozzetti contenenti cellule stromali che leucemiche sia pozzetti contenti solo cellule leucemiche.

## 20 ESEMPIO 2

### Saggio Di Effetti Farmacologici Sulle Co-culture Cellulari Ottenute Nell'esempio 1

Per testarne gli effetti *in vitro*, sono stati aggiunti ai pozzetti per ogni linea cellulare ottenuta all'esempio 1, i seguenti farmaci: inibitori hERG1 (E4031 20 µM, Way 20 µM, erithromicina, 100 µM, sertindolo (1µM)), doxorubicina (0.1 µg/ml) (Amersham, GE  
25 Healthcare); prednisone (5 µM) (Sigma-Aldrich); metotrexate (1,5 µM).

Per effettuare la conta, avvenuta dopo 48 ore di incubazione a 37° C e 5% di CO<sub>2</sub>, le cellule sono state recuperate dalle piastre. Si è proceduto quindi ad effettuare la valutazione dell'apoptosi. Durante l'apoptosi, avvengono una serie di cambiamenti sulla superficie cellulare, una di queste alterazioni della membrana plasmatica è la  
30 traslocazione della fosfatidilserina (PS) dal lato interno a quello esterno della

membrana plasmatica. Il riconoscimento della PS da parte dei macrofagi permette loro di fagocitare la cellula apoptotica, prevenendo il meccanismo infiammatorio. L'analisi della PS sulla membrana delle cellule apoptotiche è effettuata grazie alla metodica dell'annessina V-Fluoresceina e lo ioduro di propidio (PI) (Annexin-V-Fluos Staining Kit, Roche). L'annessina è una proteina  $Ca^{2+}$ -dipendente, legante i fosfolipidi la quale mostra una grande affinità per la PS, caratteristica che ne permette l'utilizzo per differenziare le cellule apoptotiche da quelle vitali. Poiché anche le cellule necrotiche possono esporre la PS come conseguenza della perdita dell'integrità della membrana, è necessario aggiungere un altro marcatore per differenziare le due popolazioni cellulari. Viene utilizzato quindi lo ioduro di propidio che, legandosi alle cellule necrotiche, permette la discriminazione tra queste e le cellule apoptotiche. Il protocollo dell'annessina prevede per prima cosa la preparazione del mix di reazione, contenente 20  $\mu$ l di annessina in 1 ml di incubation buffer e in 20  $\mu$ l di ioduro di propidio (1 ml di tale preparazione è sufficiente per 10 campioni). Una concentrazione di circa  $10^6$  cellule viene lavata in PBS e centrifugata a 200 g per 5 minuti; il pellet e poi risospeso in 100  $\mu$ l della soluzione precedentemente preparata per 10-15 minuti ad una temperatura di 15-25° C. Ai campioni vengono poi aggiunti 500  $\mu$ l di tampone di incubazione prima di effettuare la lettura al citofluorimetro

valutazione dell'apoptosi

Centrali ai fini della presente invenzione sono stati esperimenti in cui è stata determinato il ruolo del canale hERG1 sulla sopravvivenza delle cellule leucemiche, valutando i fenomeni apoptotici. Durante l'apoptosi, avvengono una serie di cambiamenti sulla superficie cellulare, una delle più precoci alterazioni (detta early apoptosis) della membrana plasmatica è la traslocazione della fosfatidilserina dal lato interno a quello esterno della membrana plasmatica. Questo test valuta la fosfatidilserina sulla membrana delle cellule apoptotiche, grazie alla metodica dell'annessina V-Fluoresceina (che va a legarsi alla fosfatidilserina, vedi Materiali e Metodi) e lo ioduro di propidio. Poiché anche le cellule necrotiche possono esporre la fosfatidilserina come conseguenza della perdita dell'integrità della membrana, è necessario aggiungere un altro marcatore per differenziare le due popolazioni cellulari

e viene utilizzato quindi lo ioduro di propidio che, legandosi alle cellule necrotiche, permette la discriminazione tra queste e le cellule apoptotiche. Abbiamo quindi identificato tre popolazioni cellulari: i) cellule vitali (annessina V-/ioduro di propidio -), ii) cellule apoptotiche (early apoptosi) (annessina V+), e iii) cellule in apoptosi tardiva o necrotiche (annessina V +/- ioduro di propidio +). Tutte le linee cellulari (697, RS, REH) sono state coltivate sia in assenza sia in presenza di cellule midollari stromali umane (MSC), in modo da riprodurre il più fedelmente possibile la condizione che avviene all'interno del midollo osseo. Gli esperimenti sono inoltre stati condotti, aggiungendo farmaci che vengono comunemente usati per la terapia delle leucemie (doxorubicina (0.1 µg/ml); prednisone (5 µM); metotrexate (1,5 mM)), in assenza o in presenza dei bloccanti di hERG1 (E4031, 20 µM; Way 123,398, 20 µM; erythromycin, 100 µM; sertindole (1µM)), Dopo un incubazione di 48 ore, le cellule sono state separate dallo stroma e processate per l'analisi dell'apoptosi.

### 15 ESEMPIO 3

#### Effetti Delle Combinazioni Di Sostanze Antitumorali E Inibitori hERG1

Nella Figura 1 sono riportati i risultati salienti ai fini della presente invenzione. Dal pannello A della figura si osserva come l'effetto proapoptotico del farmaco doxorubicina (DOXO) su cellule 697 (prima barra bianca sulla sinistra) viene quasi completamente abrogato quando le cellule leucemiche vengono coltivate in presenza di cellule stromali midollari (MSC) (barra grigia). Tale effetto protettivo dello stroma viene però revertito se la co-coltura con le cellule stromali viene effettuata in presenza dell'inibitore specifico del canale hERG1, E4031 (barra nera a sinistra), con un livello di significatività pari a  $p < 0.001$ . Un comportamento simile di protezione da parte dello stroma midollare viene esercitato, anche se a livelli diversi, sui farmaci prednisone (PDN) e metotrexate (MTX). E' da osservare come l'E4031, da solo, abbia un effetto pro-apoptotico (ultima barra in grigio nel pannello A), che però risulta notevolmente potenziato dalla combinazione con la doxorubicina. Nel pannello B vengono riportati dati analoghi, ottenuti su cellule 697 trattate con doxorubicina, in assenza e in presenza di cellule stromali midollari (MSC), in assenza e in presenza di altri due

farmaci bloccanti di hERG1: eritromicina e sertindolo. E' da osservare che tali farmaci, purché bloccanti di hERG1 non hanno effetto di allungamento del QT, e quindi non hanno effetti di cardiotoxicità, che invece possono avere gli antiaritmici di III classe come l'E4031.

- 5 Nel pannello C è riportato l'effetto della combinazione doxorubicina+ E4031 (oppure + eritromicina) su linee leucemiche di ALL (ALL(3), ALL(4), ALL(6)). Anche in questi casi l'effetto pro-apoptotico della combinazione farmacologica è molto evidente, e supera la chemioresistenza indotta dalle MSC (vedi le barre nere nei diversi pannelli della Figura 1C). Tale effetto di protezione sulla chemioresistenza indotta dalle cellule stromali del midollo osseo è meno evidente nelle cellule ALL(6).

10 Nel pannello C della figura 1 sono anche riportati i valori di MFI dei campioni analizzati calcolati come descritto nell'esempio 4. Si può notare la corrispondenza tra un maggiore effetto della combinazione antitumorale+inibitore di hERG1, ed un elevato indice MFI.

15

#### ESEMPIO 4

##### Valutazione E Calcolo Dell'MFI

- Effetto dei farmaci inibitori di hERG1 sull'apoptosi indotta dalla Doxorubicina su cellule leucemiche umane, coltivate *in vitro* in assenza o in presenza di cellule midollari stromali (MSC) e trattate con E4031, Eritromicina, Sertindolo e Way (indicato con +) o non trattate (indicato con -). A, B) Cellule 697; C) Cellule ALL(3), ALL(4) e ALL(6). Aliquote di  $1 \times 10^5$  cellule sono state centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti e lavate con PBS 1X prima dell'incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti con anticorpo primario (monoclonale murino, anti hERG1, prodotto nel nostro laboratorio, e diretto contro una porzione extracellulare del canale, diluito 1:50). Al termine dell'incubazione si eseguono lavaggi con PBS 1X e successiva incubazione per 15 minuti con anticorpo secondario (anti-mouse IgG FITC ( $1 \mu\text{g}/10^6 \text{cells}$ )). Il pellet viene lavato due volte in PBS e risospeso in 500  $\mu\text{l}$  di una soluzione di PBS più formalina all'1%. L'analisi viene eseguita con il citofluorimetro FACScan a flusso citometrico (*Becton Dickinson*). Abbiamo standardizzato una metodica che consente di esprimere in
- 20
- 25
- 30

termini quantitativi assoluti l'espressione di hERG1 a livello della membrana cellulare indipendentemente dal citofluorimetro impiegato, dal voltaggio dei fotomoltiplicatori e dall'operatore. La rivelazione dell'antigene in esame si ottiene grazie a traccianti fluorescenti che generano un segnale il quale viene tradotto in termini di intensità di fluorescenza. L'Indice Medio di Fluorescenza (MFI) è definito come il rapporto tra la fluorescenza media del campione e la fluorescenza rivelata in campione incubato con l'anticorpo secondario (che è fluorescente e che pertanto mostra un segnale non dovuto al legame diretto antigene-anticorpo. In altre parole tale indice può essere calcolato come il rapporto tra il segnale specifico del campione marcato con anticorpo primario e secondario (fluorescenza media campione=FC) ed il segnale aspecifico ottenuto dallo stesso campione marcato con il solo anticorpo secondario (fluorescenza media controllo Fc) e moltiplicato per 100: cioè  $MFI = \frac{FC}{Fc} \cdot 100$ . I valori ottenuti, riportati in una scala percentuale, consentono di avere una stima che è indipendente dal fluorocromo legato all'anticorpo secondario (possono essere utilizzati oltre al FITC, Cy3, Cy5, Alexa 488, PE) e dal citofluorimetro utilizzato. Dai dati ottenuti da esperimenti effettuati su cellule di pazienti di cui si è conosciuto il decorso clinico, si è visto che un MFI maggiore o uguale a 25 è indice di presenza o di futuro sviluppo di chemioresistenza.

## 20 ESEMPIO 5

### Verifica In Vivo Del Modello Di Co-Cultura

E' riportato in figura 2 l'effetto di cortisonici, inibitori di hERG1 e della combinazione cortisonici/inibitori di hERG1 in un modello in vivo di malattia leucemica umana (cellule leucemiche umane REH inoculate in topi NOD/SCID). Le cellule sono state inoculate mediante iniezione nella vena caudale ed al settimo giorno dall'inoculo, gli animali sono stati trattati con E4031, Dexametasone, Dexametasone + E4031 per due settimane; i topi di controllo sono stati trattati, secondo lo stesso protocollo, con sola soluzione fisiologica. Al termine delle due settimane di trattamento gli animali sono stati sacrificati ed è stato effettuato l'espianto di milza e midollo osseo. L'attecchimento midollare è stato valutato misurando la percentuale di cellule hCD45<sup>+</sup>

*versus* cellule mCD45<sup>+</sup> mediante analisi citofluorimetrica. Sulle sezioni di midollo degli animali trattati è stato effettuato il Tunel assay, per la valutazione dell'apoptosi.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Konopleva, M et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 16: 1713-1724 (2002);
- 5 2 Zeng, Z et al. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol. Cancer Ther.* 5: 3113-3121 (2006);
- 3 Tabe, Y et al. Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res.* 67: 684-10 694 (2007);
- 4 Arcangeli, A Becchetti, A. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol.* 16: 631-639 (2006);
- 5 Arcangeli, A et al. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Cur. Med. Chem.* 16(1): 66-93 (2009).
- 15 6 Pillozzi S., et al. HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic haemopoietic progenitors. *Leukemia*, 16, 1791-1798, (2002);
- 7 Pillozzi S, et al. VEGFR-1 (FLT-1),  $\beta_1$  integrin and hERG  $K^+$  channel form a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood*, 110: 1238-1250, (2007). 20
- 8 Abrams Ra, et al. Ficoll-Hypaque separation of bone marrow cells . *Blood*, 1985 66: 472-473.
- 9 Manabe A. et al. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1992 May 1;79(9):2370-7.



### RIVENDICAZIONI

1. Miscela comprendente uno o più bloccante di canali hERG1 in combinazione  
5 con uno o più composti per terapie antitumorali, per uso nel trattamento di leucemie  
chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti.

2. Miscela, secondo la rivendicazione 1, in cui detto bloccante di canali hERG1 è  
selezionato nel gruppo comprendente principi attivi antiaritmici di classe III, principi  
10 attivi antiaritmici di classe I, principi attivi antistaminici, principi attivi per uso nel  
trattamento di patologie psichiatriche, principi attivi anti microbici, principi attivi per la  
promozione della mobilità gastro intestinale.

3. Miscela secondo la rivendicazione 2 in cui detti principi attivi antiaritmici di  
15 classe III sono scelti nel gruppo comprendente E4031, WAY 123,398, amiodarone,  
dofetilide, D-sotalolo, bretilio, almokalant, sematilide, ibutilide, tedisamile, azimilide,  
detti principi attivi antiaritmici di classe I sono scelti nel gruppo comprendente  
Chinidina, propafenone, procainammide, disopiramide, pepridile, prenilamina,  
terodilina, detti principi attivi antistaminici sono scelti nel gruppo comprendente  
20 terfenadina, astemizolo, detti principi attivi per uso nel trattamento di patologie  
psichiatriche sono scelti nel gruppo comprendente l'aloiperidool, antidepressivi  
triciclici, clorpromazina, tioridazina, sertindolo, detti principi attivi antimicrobici sono  
scelti nel gruppo comprendente eritromicina, pentamidina, quinina, cloroquina,  
alofantrina, detti principi attivi per la promozione della mobilità gastro intestinale sono  
25 il cisapride.

4. Miscela secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3 in cui detto composto per  
terapie antitumorali è scelto nel gruppo comprendente doxorubicina, cortisonici,  
metotrexato, asparaginasi.

30

5. Miscela secondo la rivendicazione 4 in cui detto composto cortisonico è scelto  
nel gruppo comprendente prednisone, prendisolone, desametasone, betametasone,  
cortisolo.

35 6. Miscela secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 in cui dette leucemie

chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti sono scelte nel gruppo comprendente leucemie dell'adulto e leucemie pediatriche quali la leucemia acuta linfoblastica pediatrica o dell'adulto, la leucemia acuta mieloide pediatrica o dell'adulto, la leucemia cronica linfoblastica dell'adulto e la leucemia cronica mieloide dell'adulto.

7. Composizione farmaceutica comprendente la miscela secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 per uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti.

10

8. Composizione secondo la rivendicazione 7 ulteriormente comprendente uno o più veicolanti e/o diluenti e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

9. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7 o 8 per somministrazione parenterale, orale, nasale, per aerosol, sistemica.

15

10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-9 in cui detti uno o più inibitori di hERG1 hanno una concentrazione per dose unitaria tra circa 0,3 e circa 100 mg/Kg/die.

20

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-10 in cui dette leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti sono scelte nel gruppo comprendente leucemie dell'adulto e leucemie pediatriche quali la leucemia acuta linfoblastica pediatrica o dell'adulto, la leucemia acuta mieloide pediatrica o dell'adulto, la leucemia cronica linfoblastica dell'adulto e la leucemia cronica mieloide dell'adulto.

25

12. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-11 in una forma scelta nel gruppo di sospensione, emulsione, crema, spray, granulato, polvere, soluzione, capsula, compressa, pasticca, liofilizzato, pillola.

30

13. Metodo per il trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti comprendente il seguente passaggio:

e) somministrare a pazienti che ne abbiano bisogno, quantitativi efficaci di una composizione di qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 12.

5 14. Metodo per il trattamento di leucemie chemioresistenti e/o di leucemie potenzialmente chemioresistenti comprendente i seguenti passaggi:

a) incubare un campione x di cellule leucemiche primarie di un paziente con un anticorpo primario monoclonale anti hERG1 specifico per la porzione esterna alla membrana di detto canale ionico;

10 b) incubare con un anticorpo secondario marcato con fluorocromo specifico per l'anticorpo primario le cellule ottenute dopo l'incubazione del punto a) e un campione y di cellule leucemiche primarie dello stesso paziente non precedentemente incubate con detto anticorpo primario;

c) valutare la fluorescenza di entrambi i campioni mediante citofluorimetria;

15 d) calcolare il valore di MFI come rapporto tra fluorescenza rivelata nel campione x e fluorescenza rivelata nel campione y, se il valore di MFI è uguale o maggiore a 25;

e) somministrare quantitativi efficaci di una composizione qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 12.

20 15. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 14 in cui la quantità di bloccante di canali hERG1 in detta composizione per dose unitaria è compresa tra 0,3 e circa 100 mg/Kg/die.

25 16. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 15 in cui la quantità di detto composto antitumorale in detta composizione è compresa tra il 100% ed il 50% della quantità usata come dosaggio tipico di detto composto nelle terapie antitumorali.

30 17. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 16, in cui dette forme leucemiche sono scelte nel gruppo comprendente leucemie dell'adulto e leucemie pediatriche quali la leucemia acuta linfoblastica pediatrica o dell'adulto, la leucemia acuta mieloide pediatrica o dell'adulto, la leucemia cronica linfoblastica

dell'adulto e la leucemia cronica mieloide dell'adulto.

18. Metodo *in vitro* di co-coltura di cellule leucemiche con cellule stromali midollari comprendente il passaggio:

- 5 a) mettere in coltura cellule stromali midollari aggiungere successivamente cellule leucemiche di linee cellulari o cellule leucemiche primarie.

19. Co-culture cellulari comprendenti cellule leucemiche e cellule stromali midollari ottenibili mediante il metodo secondo la rivendicazione 18.

10

20. Metodo *in vitro* di screening per l'identificazione di sostanze o combinazioni di sostanze efficaci per il trattamento delle leucemie chemioresistenti e/o potenzialmente chemioresistenti comprendente i seguenti passaggi:

- 15 a) trattare le co-culture cellulari secondo la rivendicazione 19 in cui dette cellule leucemiche sono chemioresistenti con una o più sostanze o combinazioni di sostanze;
- b) valutare l'apoptosi delle cellule leucemiche dopo il trattamento;
- c) identificare le sostanze o le combinazioni di sostanze efficaci nel ripristino delle vie apoptotiche.

RIASSUNTO

La presente descrizione riguarda composizioni farmaceutiche per uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti o potenzialmente chemioresistenti, metodi di trattamento  
5 di dette leucemie con dette composizioni, sistemi in vitro per lo screening di sostanze idonee all'uso nel trattamento di leucemie chemioresistenti o potenzialmente chemioresistenti.

(figura 1)

10

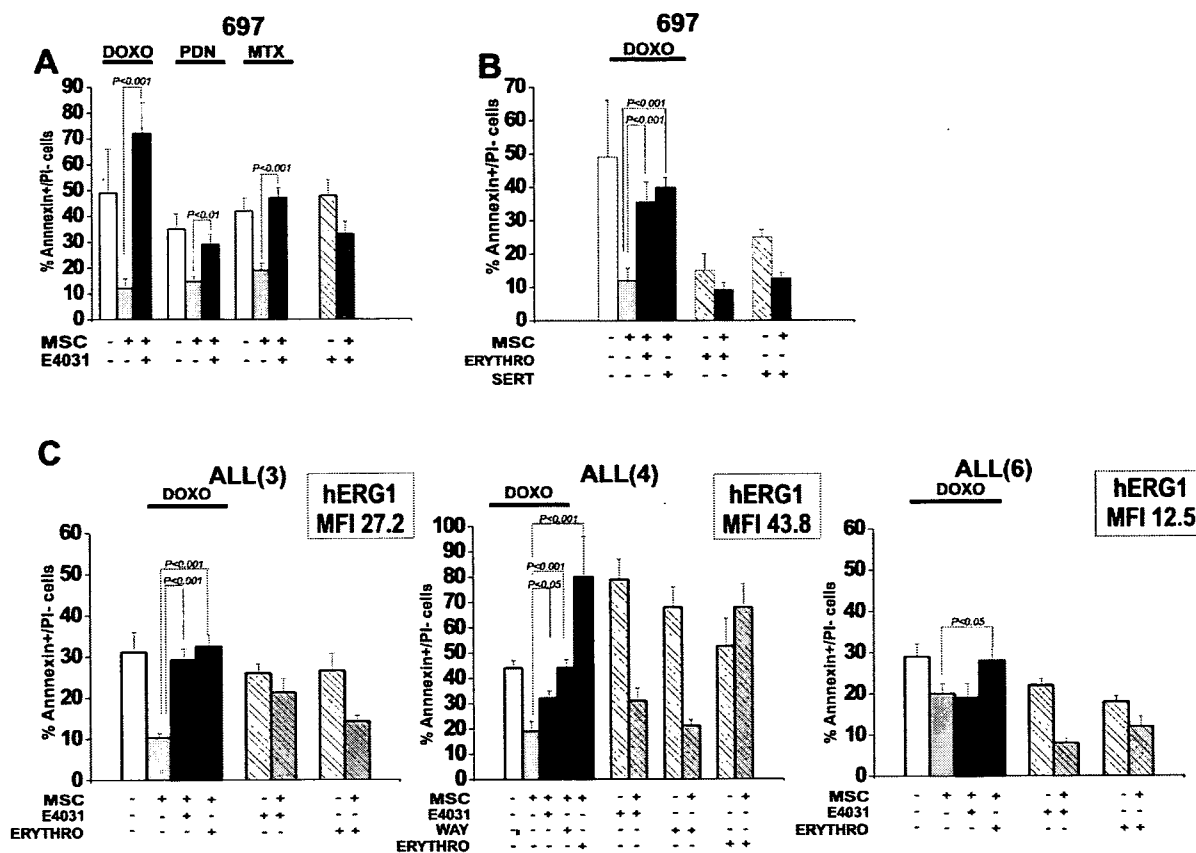
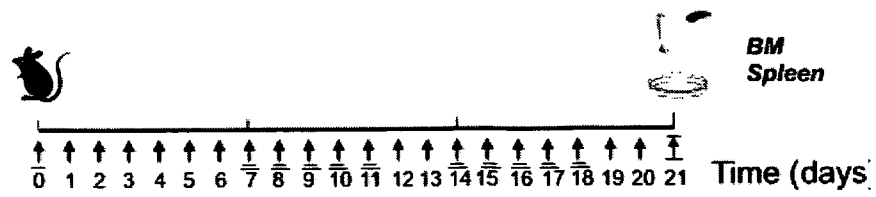


Fig. 1



|→ i.v. Inoculum of REH cells

||→ i.p. a- Saline

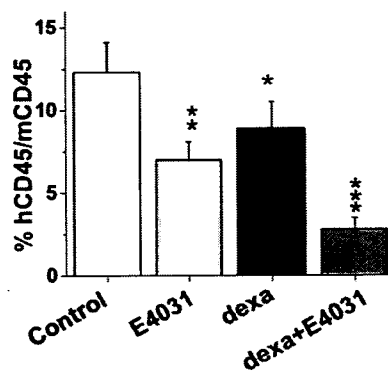
b- E4031

c- dexamethasone

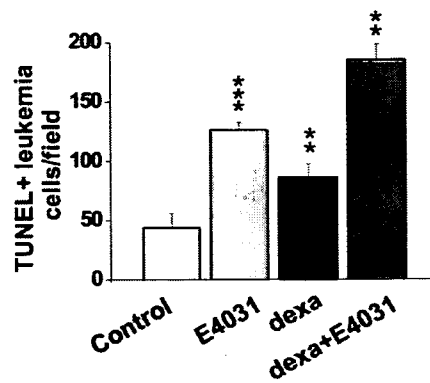
d- dexamethasone + E4031

↪ sacrifice

A



B



C

FIG. 2

Tabella 2.

Agenti Farmacologici	Referenze	
	Cliniche	Inibizione I <sub>Kr</sub> /HERG
<b>antiaritmici di classe III</b>		
Amiodarone	124	62, 65
Dofetilide	125	37, 45
D-Sotalolo	51	49
Bretilio		126
Almokalant	127	128
Sematilide	129	130
Ibutilide	131	132
Tedisamil	133	134
Azimilide	135	61
<b>antiaritmici di classe I</b>		
Quinidine	136	36, 73, 137
Propafenone	138	79, 139
Procainamide	140	
Disopiramide	141	76
Bepridile	83	81
Prenilamine	142	
Terodilina	90	91
<b>farmaci non cardiaci</b>		
Antistamine		
Terfenadina	143	98
Astemizole	143	99
Psychiatric drugs		
Haloperidol	144	103
Antidepressivi triciclici	145	107, 146
Chlorpromazine	147	
Thioridazine	148	149
Sertindolo	150	104
Antimicrobici e antimalarici		
Eritromicina	151	109, 152
Pentamidina	153	
Quinina	154	
Cloroquina	155	
Halofantrina	156	
Inibitori motilità gastro-intestinale		
Cisapride	157	158



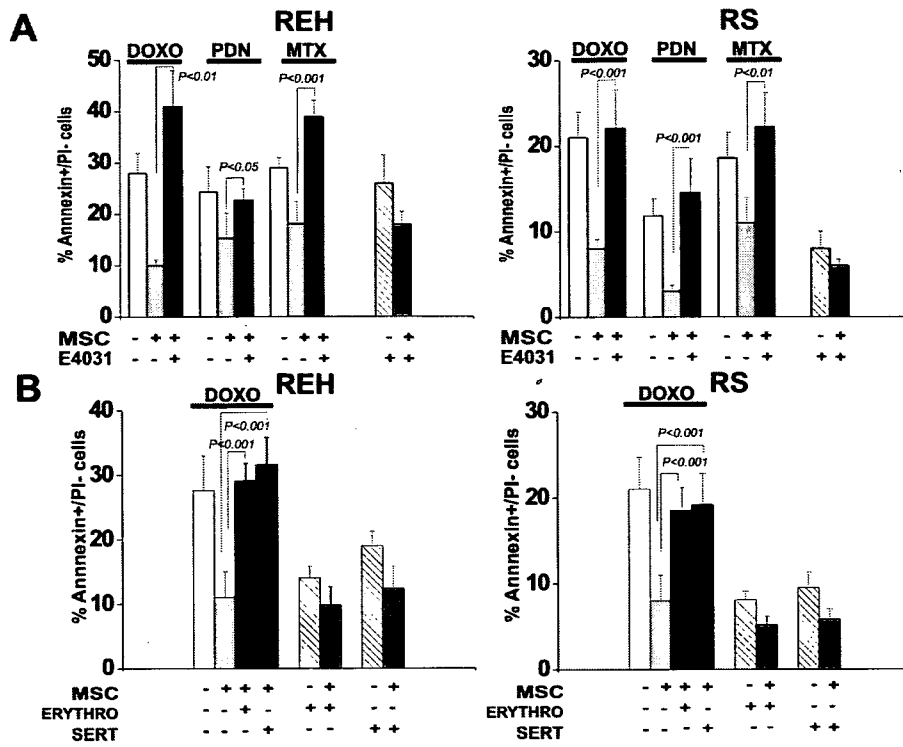


Fig 4