



Ministero dello Sviluppo Economico

Ricevuta di presentazione

per

Brevetto per invenzione industriale



Domanda numero: 102018000007669

Data di presentazione: 31/07/2018

DATI IDENTIFICATIVI DEL DEPOSITO

Ruolo	Mandatario
Depositante	Roberta Cesa
Data di compilazione	31/07/2018
Riferimento depositante	BIT21341-RC/PS
Titolo	COMPOSIZIONI COMPRENDENTI BLOCCANTI DEI CANALI DEL CALCIO PER L'USO NEL TRATTAMENTO DI INFEZIONI VIRALI
Carattere domanda	Ordinaria
Esenzione	NO
Accessibilità al pubblico	NO
Numero rivendicazioni	10
Autorità depositaria	

RICHIEDENTE/I

Natura giuridica	Persona giuridica
Denominazione	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO
Partita IVA	02099550010
Tipo Società	le universita'
Nazione sede legale	Italia
Comune sede legale	Torino (TO)
Indirizzo	Via Verdi
Civico	8
CAP	10124
Telefono	
Fax	
Email	
Pec	

Quota percentuale

100.0%

DOMICILIO ELETTIVO

Cognome/R.sociale

Buzzi, Notaro & Antonielli d'Oulx S.r.l.

Indirizzo

Corso Vittorio Emanuele II, 6

Cap

10123

Nazione

Italia

Comune

Torino (TO)

Telefono

011 - 8392911

Fax

011 - 8392929

Email\PEC

brevetti@pec.bnaturin.eu

MANDATARI/RAPPRESENTANTI

Cognome

Nome

Bosotti

Luciano

Buzzi

Franco

Crovini

Giorgio

De Bonis

Paolo

Freyria Fava

Cristina

Frontoni

Stefano

Gallarotti

Franco

Marchitelli

Mauro

Meindl

Tassilo Bertram

Notaro

Giancarlo

Cesa

Roberta

INVENTORI

Cognome

Nome

Nazione residenza

LUGANINI

ANNA

Italia

GRIBAUDO	GIORGIO	Italia
DI NARDO	GIOVANNA	Italia
GILARDI	GIANFRANCO	Italia

CLASSIFICAZIONI

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

NUMERO DOMANDE COLLEGATE

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Tipo documento	Riserva	Documento
Rivendicazioni	NO	BIT21341 riv IT.pdf.p7m hash: 206dedb34b9af4b6e67e3960215dc11d
Disegni	NO	BIT21341 disegni.pdf.p7m hash: ee9d2647e27b1801878b8aab8219743b
Rivendicazioni in inglese	NO	BIT21341 riv EN.pdf.p7m hash: 61b0554b1bf4b5ae511b80b10c97e5a5
Riassunto	NO	BIT21341 riassunto.pdf.p7m hash: d3be61088d760af831bec9b500780929
Descrizione in italiano*	NO	BIT21341 descrizione.pdf.p7m hash: bc4fa560b102a8d0caf1d7b6d445539f
Lettera di Incarico	SI	hash:

PAGAMENTI

Tipo	Identificativo	Data
Bollo	01170362572395	27/02/2018

ESENZIONI INDICATE

Esenzione
su diritti e
tasse

DM 02/04/2007 - art. 2: esonero dal pagamento dei diritti di deposito e di trascrizione relativamente ai brevetti per invenzioni industriali, e modelli di utilita' a vantaggio di: Universita'; Amministrazioni Pubbliche aventi fra i loro scopi istituzionali finalita' di ricerca; Amministrazioni della Difesa; Amministrazioni delle Politiche Agricole, alimentari e forestali.

DOVUTO

Gli importi indicati non tengono conto delle eventuali esenzioni applicabili

Importo Tasse:

€ 50,00

Importo Imposta Bollo:

€ 20,00

NOTE

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

“Composizioni comprendenti bloccanti dei canali del calcio per l'uso nel trattamento di infezioni virali”,

di: Università degli Studi di Torino, nazionalità italiana, via Verdi 8, 10124 Torino

Inventori designati: Anna LUGANINI, Giorgio GRIBAUDO, Giovanna DI NARDO, Gianfranco GILARDI

Depositata il: 31 luglio 2018

TESTO DELLA DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente descrizione si riferisce a composizioni comprendenti bloccanti dei canali del calcio per l'uso nel trattamento di infezioni virali in un soggetto, in particolare infezioni da citomegalovirus umano (HCMV).

Sfondo

Il Citomegalovirus umano (HCMV) è un patogeno opportunisto che determina la malattia nell'ospite con sistema immunitario parzialmente o totalmente compromesso, ad esempio in soggetti sottoposti a terapia immunosoppressiva, come i soggetti trapiantati (in cui HCMV è anche la principale causa di rigetto acuto e/o cronico e prognosi di ridotta sopravvivenza) o in pazienti affetti da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). In questi individui, l'infezione primaria o la riattivazione di un'infezione latente da HCMV possono determinare infezioni disseminate multi-organo con elevata mortalità.

HCMV è inoltre la causa virale più importante di difetti congeniti nei neonati con infezione contratta dalla madre durante la gravidanza.

Numerosi studi epidemiologici hanno poi evidenziato un'associazione diretta tra l'infezione da HCMV e lo sviluppo di aterosclerosi, anche in soggetti immunocompetenti.

Per la terapia delle infezioni da HCMV, ad oggi è disponibile un esiguo pannello di farmaci, in particolare farmaci inibitori della DNA polimerasi virale; tali farmaci, tuttavia, possono presentare effetti collaterali (quali ad esempio tossicità acuta e a lungo termine, ridotta efficacia, limitazioni nella

somministrazione e soprattutto rapida selezione di ceppi virali farmaco-resistenti).

Di conseguenza, l'utilizzo di composti inibitori della DNA polimerasi virale è strettamente limitato a pazienti a rischio (ad esempio pazienti con AIDS, trapiantati d'organo). Inoltre, l'assenza di un vaccino in grado di prevenire l'infezione da HCMV nelle categorie di individui a rischio e la mancanza di trattamenti prenatali efficaci e sicuri per prevenire la trasmissione madre-feto e/o per ridurre le conseguenze di un'infezione congenita da HCMV, rendono lo sviluppo di nuove molecole antivirali, che siano meno tossiche e possibilmente dotate di meccanismi d'azione diversi dagli inibitori della DNA polimerasi virale, una priorità per la salute pubblica.

Sintesi dell'invenzione

La presente descrizione ha lo scopo di fornire nuove composizioni per l'uso nel trattamento di infezioni da HCMV in grado di superare i suddetti inconvenienti.

Secondo la presente descrizione, tale scopo viene raggiunto grazie all'oggetto specificamente indicato nelle rivendicazioni che seguono, che vengono intese come parte integrante della presente descrizione.

Una forma di realizzazione della presente descrizione fornisce una composizione per l'uso nel trattamento di infezioni virali da Citomegalovirus umano in un soggetto, la composizione comprendendo almeno un bloccante dei canali del calcio selezionato tra efonidipina e lercanidipina.

In una o più forme di attuazione, la composizione comprende almeno un bloccante dei canali del calcio selezionato tra efonidipina e lercanidipina in combinazione con un composto inibitore dell'enzima DNA polimerasi virale selezionato tra ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet, preferibilmente ganciclovir.

In una o più forme di attuazione, infezioni virali trattabili con le composizioni oggetto della presente descrizione comprendono infezioni virali da citomegalovirus umano che sono resistenti al trattamento con almeno un composto inibitore dell'enzima DNA polimerasi virale, preferibilmente

selezionato nel gruppo costituito da ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet.

In una o più forme di attuazione, composizioni oggetto della presente descrizione sono destinate al trattamento di infezioni virali da HCMV in un soggetto sottoposto a trapianto d'organo ed eventualmente affetto da ipertensione.

In una o più forme di attuazione, composizioni oggetto della presente descrizione sono destinate al trattamento di un soggetto che non risponde alla terapia con almeno un composto inibitore della DNA polimerasi virale selezionato nel gruppo costituito da ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet.

In una o più forme di attuazione, le composizioni possono comprendere efonidipina e/o lercanidipina in forma cloridrata.

La presente descrizione fornisce inoltre un procedimento per il trattamento di infezioni virali da citomegalovirus umano che comprende la fase di somministrazione di una composizione comprendente almeno un bloccante dei canali del calcio selezionato tra efonidipina e lercanidipina opzionalmente in combinazione con almeno un composto inibitore dell'enzima DNA polimerasi virale, preferibilmente selezionato nel gruppo costituito da ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet.

Breve descrizione dei disegni

Una o più forme di attuazione saranno ora descritte, a puro titolo di esempio non limitativo, con riferimento alle figure annesse, in cui:

- la Figura 1 mostra il valore di citotossicità di efonidipina e lercanidipina (espressa come valore di CC_{50} ovvero concentrazione di ogni singolo composto tale da inibire del 50% la vitalità cellulare) valutata a 6 giorni di esposizione di fibroblasti umani (HFF) a differenti concentrazioni di tali bloccanti, insieme ai valori di inibizione (EC_{50}) della replicazione di un ceppo di laboratorio di HCMV, chiamato AD169, da parte di efonidipina e lercanidipina;

- la Figura 2 illustra risultati di esperimenti volti a dimostrare l'effetto di efonidipina e lercanidipina nella soppressione della replicazione di un ceppo

clinico di HCMV resistente al trattamento con il composto ganciclovir,

- la Figura 3 illustra risultati di esperimenti volti a dimostrare l'effetto di efonidipina e lercanidipina in combinazione nella soppressione della replicazione di un ceppo clinico di HCMV resistente al trattamento con il composto ganciclovir,

- la Figura 4 illustra risultati di esperimenti volti a dimostrare l'effetto di efonidipina in combinazione con ganciclovir nella soppressione della replicazione del ceppo di laboratorio AD169,

- la Figura 5 illustra risultati di esperimenti volti a dimostrare l'effetto di lercanidipina in combinazione con ganciclovir nella soppressione della replicazione del ceppo di laboratorio AD169.

Descrizione dettagliata di forme di realizzazione preferite

Nella descrizione che segue, numerosi dettagli specifici vengono dati per fornire una comprensione approfondita delle forme di realizzazione. Le forme di realizzazione possono venire messe in pratica senza uno o più dei dettagli specifici, o con altri procedimenti, componenti, materiali, ecc. In altri casi, strutture, materiali od operazioni ben noti non vengono mostrati o descritti in dettaglio per evitare di confondere aspetti delle forme di realizzazione.

Il riferimento tutta la presente descrizione a "una (aggettivo numerale) forma di realizzazione" o "una (articolo indeterminativo) forma di realizzazione" indica che un/una particolare aspetto, struttura o caratteristica descritto/descritta in relazione alla forma di realizzazione è incluso/inclusa in almeno una forma di realizzazione. Quindi, le forme delle espressioni "in una (aggettivo numerale) forma di realizzazione" o "in una (articolo indeterminativo) forma di realizzazione" in vari punti di tutta la presente descrizione non si riferiscono necessariamente tutte alla stessa forma di realizzazione. Inoltre, i/le particolari aspetti, strutture o caratteristiche possono venire combinati/combinati in qualsiasi modo adatto in una o più forme di realizzazione. I titoli forniti in questa sede sono solo per convenienza e non interpretano l'ambito o lo scopo delle forme di realizzazione.

Allo scopo di identificare nuovi composti con attività anti-HCMV, gli Inventori della presente domanda hanno adottato l'approccio del *drug repurposing* (DR) o riposizionamento dei farmaci. Questa strategia si basa sull'idea di "dare nuova vita" a farmaci/molecole già approvate per l'uso clinico, o in disuso, con attività note, indirizzandoli verso nuove applicazioni terapeutiche. Il vantaggio principale di questa strategia consiste nella definizione di nuove attività farmacologiche di molecole di cui è già nota la biodisponibilità, la farmacocinetica e la tossicologia, con l'evidente conseguenza di ridurre drasticamente costi e tempi del processo di sviluppo del farmaco candidato.

Nel corso dell'attività di *drug repurposing* svolta dagli Inventori, è stato possibile identificare (all'interno di uno spettro di un numero di molecole superiore a 2000) bloccanti dei canali del calcio (CCB) di terza generazione, già utilizzati per il trattamento dell'ipertensione di lieve e/o media entità, che sorprendentemente si sono rivelati particolarmente efficaci anche come inibitori della replicazione del citomegalovirus umano (HCMV). I bloccanti dei canali del calcio di terza generazione presentano caratteristiche farmacologiche favorevoli, quali il rilascio prolungato oltre il tempo di emivita e una buona efficacia, nonostante i bassi livelli plasmatici, con conseguente riduzione degli effetti collaterali.

Gli Inventori della presente domanda hanno osservato che specifici bloccanti dei canali del calcio di terza generazione, in particolare efonidipina e lercanidipina, molecole appartenenti alla famiglia delle diidropiridine, presentano una elevata efficacia antivirale.

In una o più forme di attuazione, la composizione oggetto della presente descrizione può comprendere efonidipina e/o lercanidipina in una concentrazione (peso/vol) compresa tra 1 e 25 ng/ml, preferibilmente tra 4 e 16 ng/ml.

In una o più forme di attuazione, la composizione oggetto della presente descrizione può comprendere efonidipina in forma cloridrata e/o lercanidipina in forma cloridrata.

In una o più forme di attuazione, la composizione oggetto della presente

descrizione può comprendere, oltre ad almeno un composto selezionato tra efonidipina e lercanidipina, almeno un composto in grado di inibire l'attività della DNA polimerasi virale, preferibilmente un composto selezionato tra ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, forscarnet.

Con l'espressione "farmaci inibitori della DNA polimerasi" si intende un gruppo di composti comunemente impiegati per il trattamento di infezioni da HCMV, tale gruppo comprendente ad esempio ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, forscarnet.

Gli Inventori della presente domanda hanno dimostrato che una tale composizione è in grado di esercitare un effetto potenziato sull'inibizione della replicazione di HCMV.

Inoltre, la presente descrizione fornisce l'evidenza che composizioni comprendenti efonidipina e/o lercanidipina sono anche efficaci nel trattamento di infezioni virali da HCMV umano che non rispondono al trattamento con composti inibitori della DNA polimerasi, ad esempio nel trattamento di ceppi di HCMV resistenti all'azione del composto ganciclovir.

In una o più forme di attuazione, la composizione può inoltre comprendere almeno un eccipiente, un veicolo, un diluente farmaceuticamente accettabile.

Il termine "farmaceuticamente accettabile" è inteso a definire, senza alcuna particolare limitazione, qualsiasi componente adatto a preparare una composizione farmaceutica da somministrare a un essere vivente.

Esempi di veicoli farmaceuticamente accettabili noti nell'arte sono ad esempio riempitivi, diluenti, aromi, coloranti, fluidificanti, lubrificanti, conservanti, umettanti, dolcificanti.

La quantità dell'almeno un bloccante dei canali del calcio può variare in funzione di fattori diversi quali, ad esempio, la gravità dell'infezione da trattare, il numero di somministrazioni giornaliere.

L'attività antivirale delle composizioni oggetto della presente descrizione è stata valutata mediante PRA (*Plaque Reduction Assay*) *in vitro* nei confronti sia del ceppo di laboratorio di HCMV AD169 sia dell'isolato clinico TR che è un

ceppo resistente al trattamento con il composto inibitore della DNA polimerasi ganciclovir (GCV).

I dati ottenuti dimostrano che composizioni comprendenti almeno un composto selezionato tra efonidipina e lercanidipina sono dotate di una potente attività anti-HCMV a concentrazioni micromolari e non presentano tossicità verso le cellule.

I test condotti sul ceppo HCMV TR hanno inoltre dimostrato che composizioni comprendenti almeno un composto selezionato tra efonidipina e lercanidipina sono efficaci nel trattamento di infezioni virali da HCMV che non rispondono ai trattamenti con composti inibitori della DNA polimerasi virale comunemente utilizzati.

Le composizioni oggetto della presente descrizione presentano quindi l'ulteriore vantaggio di consentire di trattare un sottogruppo di pazienti per i quali i farmaci correntemente utilizzati, ad esempio i farmaci il cui bersaglio è la DNA polimerasi virale, risultano eccessivamente tossici o non efficaci.

Questo aspetto assume ancor più valore considerando che la comparsa di ceppi di HCMV resistenti ai farmaci disponibili rappresenta un problema importante, soprattutto in pazienti trapiantati per i quali i trattamenti pre-emptive con inibitori della DNA polimerasi virale si possono protrarre a lungo. In tali soggetti, il problema viene aggravato dal fatto che spesso i ceppi resistenti a un inibitore della DNA polimerasi sono cross-resistenti anche ad altri composti inibitori della DNA polimerasi virale.

Composizioni comprendenti efonidipina e lercanidipina rappresentano pertanto una valida alternativa nella prevenzione e controllo della riattivazione dell'infezione da HCMV in questo particolare gruppo di pazienti.

Sulla base dei dati disponibili in letteratura circa la posologia clinica di efonidipina e lercanidipina nel trattamento dell'ipertensione è importante osservare che la concentrazione plasmatica massima raggiunta dopo somministrazione di una dose orale di 10 mg di lercanidipina cloridrata è di 9 ng/ml (Chaudhary et al., 2016), corrispondente a ~ 14 μ M. Con una dose orale di 40 mg di efonidipina cloridrata si raggiunge una concentrazione superiore ai 16 ng/ml (Man et al., 2015), che equivale a 24 μ M. Ciò significa che le

concentrazioni di efonidipina e lercanidipina in grado di inibire la proliferazione di HCMV valutate *in vitro*, come di seguito dimostrato, risiedono ampiamente nell'intervallo di dosi clinicamente raggiungibili e accettate nell'impiego di efonidipina e lercanidipina per il trattamento dell'ipertensione.

Inoltre, dal momento che efonidipina e lercanidipina hanno un bersaglio terapeutico differente e un meccanismo d'azione diverso da quello degli attuali farmaci anti-HCMV, composizioni comprendenti almeno uno tra efonidipina e lercanidipina in combinazione con composti inibitori della DNA polimerasi virale in uso clinico possono fornire un'efficacia nel trattamento di infezioni virali da HCMV ulteriormente potenziato, come illustrato nel seguito.

Una tale combinazione di composti antivirali può risultare ancora più efficace verso le infezioni da HCMV permettendo di ridurre le dosi da somministrare di ciascun composto e di diminuire gli effetti collaterali connessi alla terapia monofarmaco contrastando in questo modo anche la selezione di virus farmaco-resistenti.

Infine, è da sottolineare come recenti studi abbiano dimostrato un'associazione diretta tra infezione persistente da HCMV e aumento di rischio di sviluppare malattie vascolari (aterosclerosi e restenosi), sia in soggetti immunocompetenti sia nei soggetti trapiantati.

Infatti, l'infezione da HCMV è in grado di determinare in un'ampia gamma di tipi cellulari diversi, una overespressione di citochine infiammatorie (IL-6, TNF- β e MCP-1) e di enzimi coinvolti nel sistema renina e angiotensina, responsabili dell'aumento della pressione arteriosa.

In virtù della loro duplice attività, antivirale e antipertensiva, efonidipina e lercanidipina rappresentano un vantaggio terapeutico per soggetti HCMV-sieropositivi anche a rischio di sviluppo di patologie vascolari, come sclerosi vascolari in seguito a trapianto d'organo.

MATERIALI E METODI

Cellule e condizioni di coltura

Fibroblasti primari derivano da prepuzio umano (ATCC SCRC-1041) e cellule VERO (ATCC CCL-81) derivano dai reni di una *scimmia verde africana*

(Chlorocebus). Entrambe le linee cellulari sono state coltivate in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM; Euroclone) in presenza di 10% di FBS (Euroclone), 2mM glutamina, 100U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina solfato. Tutte le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in presenza del 5% di CO₂.

Molecole

Efonidipina cloridrata (Efonidipine hydrochloride monoethanolate; E0159, Sigma Aldrich), Lercanidipina cloridrata (1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-2-[(3,3-diphenylpropyl)methylamino]-1,1-dimethylethyl methyl ester 3,5-pyridinedicarboxylic acid hydrochloride; L6668, Sigma Aldrich), Ganciclovir (2-Amino-1,9-dihydro-9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]-6H-purin-6-one,9-(1,3-Dihydroxy-2 propoxymethyl)guanin, Sigma Aldrich), Manidipina (Manidipine dihydrochloride, CV-4093, Selleck Chemicals) sono stati risospesi in 100% DMSO sterile.

Virus

Il ceppo di laboratorio di HCMV AD169 è stato ottenuto dall'ATCC (VR-538), mentre l'isolato clinico HCMV TR è stato isolato dall'umor vitreo di un paziente HIV positivo avente una retinite da HCMV (Smith et al., 1998). Tale virus è stato propagato su fibroblasti umani per essere clonato in un cromosoma batterico artificiale (BAC) (Murphy et al., 2003). HCMV TR ricostituito in fibroblasti mantiene la capacità originale di poter infettare cellule endoteliali, epiteliali, monociti e macrofagi (Ryckman et al, 2006). Tale ceppo clinico (Dr. Jay Nelson, Vaccine and Gene Therapy Institute, OHSU) è resistente al composto antivirale ganciclovir (GCV).

Ceppi di controllo utilizzati per testare la specificità dei composti in questione nei confronti di virus HCMV sono un isolato clinico di Adenovirus (AdV) e isolati clinici di Herpes Simplex Virus di tipo 1 e di tipo 2 (HSV-1 e HSV-2) forniti dalla Dott.ssa Ghisetti, Ospedale Amedeo di Savoia di Torino.

Per la produzione dei diversi stock virali le cellule HFF o le cellule VERO per HSV-1/2, sono state infettate ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0.01 Unità Formanti Placche PFU/ml. Le fiasche sono state quindi incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ in DMEM al 2% di FBS fino alla comparsa di un

caratteristico effetto citopatico. Gli stock di virus sono stati ottenuti sonicando le cellule, recuperando il surnatante dopo centrifugazione e congelando a -80°C.

I ceppi di HCMV sono stati titolati dopo 4 giorni tramite una metodica immunoistochimica indiretta su HFF con un anticorpo monoclonale diretto contro le proteine immediate-precoci IE1 e IE2 di HCMV (clone E13, Argene; Gerna et al., 1992).

Adenovirus e HSV-1/2 (ceppi di controllo) sono stati invece titolati con la metodica delle placche: dopo le 2 h di adsorbimento virale, le cellule sono state incubate con 1 ml di DMEM con FBS 3% e P/S contenente metilcellulosa 0,8% (Sigma-Aldrich) per circa 6 giorni, per quanto riguarda l'Adenovirus, e 2 giorni per HSV-1/2. Trascorso questo tempo, il monostrato cellulare è stato fissato con 0,6 ml per pozzetto di formaldeide al 4% in PBS 1X. Dopo 1 h a temperatura ambiente (RT), le cellule sono state colorate con 0,3 ml di cristalvioletto 1% in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare per permettere la conta delle placche.

Analisi di citotossicità

Cellule HFF e cellule VERO sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 18 mila cellule/pozzetto in 100 µl di DMEM+10% di FBS per 24 h a 37°C. Il giorno dopo il terreno è stato sostituito con terreno completo fresco e addizionato di concentrazioni crescenti sia di Efonidipina cloridrata (EFO), che di Lercanidipina cloridrata (LERC). Dopo 6 giorni o 3 giorni, rispettivamente per quanto concerne le HFF e le VERO, il numero di cellule vitali è stato saggiato mediante il test del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Pauwels et al., 1998). Questo metodo è un saggio enzimatico colorimetrico che permette di quantificare l'attività delle deidrogenasi mitocondriali presenti in cellule metabolicamente attive. Nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stato aggiunto un volume di DMSO affinché la sua percentuale finale fosse identica a quella delle diverse concentrazioni di molecole testate, per escludere che un possibile effetto citopatico dipendesse dal solvente utilizzato per solubilizzare i composti.

Analisi della riduzione delle placche virali

Cellule HFF o VERO sono state seminate alla densità di 6×10^4 cellule/ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state pretrattate con diverse concentrazioni di EFO o LERC (25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,12 μ M, 1,56 μ M, e 1 μ M) per 2 h a 37°C e quindi infettate per 2 h a 37°C con 60 PFU/pozzetto dei seguenti virus: HCMV-AD169, HCMV-TR, HSV-1, HSV-2 e Adenovirus.

Parallelamente cellule sono state pretrattate anche con composizioni comprendenti sia EFO sia LERC per valutarne un possibile implemento dell'attività antivirale nei confronti dell'isolato virale HCMV TR.

Test analoghi sono stati anche effettuati per testare l'efficacia di un diverso bloccante dei canali del calcio, sempre appartenente alla famiglia delle dididropiridine, ovvero la manidipina, a diverse concentrazioni (25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,12 μ M, 1,56 μ M, e 1 μ M). L'efficacia è stata testata sul ceppo HCMV-TR (resistente a ganciclovir), ad oggi sconosciuta.

Ulteriori test sperimentali sono stati condotti somministrando ganciclovir (GCV) ad una concentrazione pari a 3 μ M da solo (concentrazione corrispondente alla sua EC_{50}) o in combinazione con EFO e/o LERC in concentrazioni crescenti (25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,12 μ M, 1,56 μ M, e 1 μ M) su un ceppo HCMV AD169.

Al termine dell'incubazione di 2 h, è stato rimosso l'inoculo virale, le cellule sono state lavate con PBS 1X ed è stato aggiunto terreno completo (DMEM con FBS 3% e P/S) contenente metilcellulosa 0,8% (Sigma-Aldrich) e le diverse concentrazioni dei composti da saggiare. Come controllo, ad alcuni pozzetti (infettati, ma non trattati) è stata aggiunto DMSO, affinché la sua percentuale corrispondesse a quella delle diverse concentrazioni di molecole testate. Dopo un'incubazione di 6 giorni per i ceppi di HCMV e Adenovirus, o 2 giorni per i virus HSV-1 e HSV-2, il monostrato cellulare è stato fissato con 0,6 ml per pozzetto di formaldeide al 4% in PBS 1X. Dopo 1 h a temperatura ambiente (RT), le cellule sono state colorate con 0,3 ml di cristalvioletto 1% in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto e il loro numero medio è stato espresso in

percentuale rispetto al numero medio delle placche contate nei pozzetti di controllo di infezione. Il numero di placche è stato poi correlato alla concentrazione di EFO, LERC, EFO+LERC, manidipina, GCV, GCV+EFO, GCV+LERC per determinare la concentrazione che produce una riduzione del 50% (EC₅₀) delle unità infettive.

RISULTATI

Fibroblasti umani (HFF) sono stati pre-trattati con concentrazioni crescenti di efonidipina cloridrata (EFO) e lercanidipina cloridrata (LERC) e poi infettati con il ceppo di laboratorio AD169 in presenza dei composti, che sono rimasti nel terreno di coltura per tutta la durata del saggio.

Come controllo dei test sperimentali, alcuni pozzetti sono stati infettati e trattati con DMSO per escludere che l'effetto dei composti testati dipendesse dal solvente utilizzato per risospenderli.

Come mostra la Figura 1, composizioni comprendenti EFO o LERC inibiscono efficacemente la replicazione di AD169 a concentrazioni micromolari; la dose in grado di inibire del 50% la formazione di placche (EC₅₀) è pari a 3,5 µM.

Per verificare che tale riduzione virale non fosse dovuta ad un effetto citotossico generalizzato delle molecole sulle cellule, è stata valutata la vitalità cellulare con il metodo MTT dopo 6 di esposizione ai composti.

La concentrazione citotossica per il 50% delle cellule (CC₅₀) è circa 340 µM e 127 µM, rispettivamente per EFO e LERC, dimostrando quindi che l'attività antivirale è specifica e non è dovuta a citotossicità generalizzata.

Ulteriori test sperimentali hanno inoltre dimostrato che EFO e LERC presentano una evidente attività antivirale anche verso ceppi di HCMV resistenti al trattamento con composti inibitori della DNA polimerasi, ossia il ceppo TR, che è un isolato clinico resistente al ganciclovir, uno dei farmaci antivirali di prima scelta nei casi di infezione da Citomegalovirus.

Anche in questo caso, test condotti su fibroblasti umani trattati con EFO o LERC e infettati con il virus TR hanno dimostrato una EC₅₀ molto bassa, nell'intorno di 4 µM (Figura 2).

Test condotti su fibroblasti umani trattati con EFO e LERC in combinazione e infettati con il virus TR hanno dimostrato una EC_{50} ancora più bassa, nell'intorno di 2,20 μ M (Figura 3).

Questi risultati dimostrano che i due composti EFO e LERC non possiedono un'attività ceppo-specifica, ma soprattutto mantengono la loro attività anche contro un ceppo resistente al ganciclovir.

Test analoghi sono stati condotti parallelamente utilizzando un diverso composto antagonista dei canali del calcio ovvero la manidipina. A questo proposito, cellule HFF infettate dal ceppo di HCMV resistente al ganciclovir, ossia il ceppo TR sono state trattate con manidipina a concentrazioni crescenti. L' EC_{50} ottenuta somministrando una composizione comprendente tale composto è maggiore di 25 μ M, un valore circa 6 volte superiore rispetto al valore ottenuto somministrando EFO o LERC.

Sono state anche testate composizioni comprendenti ganciclovir da solo o in combinazione con EFO o LERC su ceppi di HCMV AD169.

I risultati hanno confermato che la concentrazione usata di ganciclovir riduce del 50% la replicazione virale. Composizioni comprendenti ganciclovir in combinazione con EFO presentano una EC_{50} pari a 1,3 μ M (Figura 4). Composizioni comprendenti ganciclovir in combinazione con LERC presentano una EC_{50} pari a 1,8 μ M (Figura 5).

La riduzione significativa di EC_{50} che si osserva somministrando una composizione comprendente EFO o LERC in combinazione con ganciclovir assume una rilevanza fondamentale in quanto l'associazione di composti che agiscono con differenti meccanismi di azione permette di ottenere un'azione più efficace, di ridurre le dosi di ciascun farmaco, diminuendo quindi gli eventuali effetti collaterali connessi alla terapia monofarmaco e soprattutto limitando lo sviluppo di virus farmaco-resistenti che potrebbero condurre ad un inevitabile fallimento terapeutico.

Per valutare la specificità dell'effetto antivirale dei composti attivi, essi sono stati saggiati contro altri tre diversi virus a DNA (Adenovirus e HSV-1/2). Cellule HFF (per Adenovirus) o VERO (per HSV-1/2) sono state pre-trattate con concentrazioni crescenti dei composti e infettate con 60 PFU/pozzetto di

ciascun virus. Anche per quanto riguarda l'infezione da HSV1/2, l'effetto inibitorio dei composti in esame non è dovuto ad un effetto citotossico, in quanto il test dell'MTT, valutato su cellule VERO dopo 3 giorni di trattamento, ha dato un valore di CC₅₀ paragonabile a quello ottenuto sui fibroblasti umani. Come nei casi precedenti, per controllo alcuni campioni sono stati infettati e trattati con DMSO. L'analisi dei dati ottenuti ha dimostrato che EFO e LERC non inibiscono la replicazione né dell'Adenovirus, né di HSV-1/2, confermando la specificità della loro attività antivirale nei confronti di HCMV.

Per la prima volta è stato pertanto dimostrato come due anti-ipertensivi siano efficaci nel contrastare l'infezione di un ceppo di HCMV (TR) resistente al ganciclovir (GCV), il principale farmaco utilizzato nella terapia antivirale contro HCMV.

Il fatto che tali molecole siano in grado di impedire la replicazione di HCMV è molto importante da un punto di vista clinico, poiché il TR è un vero isolato clinico in grado di infettare le cellule endoteliali ed epiteliali sia *in vitro*, che *in vivo*. Queste cellule hanno un ruolo essenziale nella patogenesi della malattia, nella trasmissione inter-umana, e nella persistenza del virus nell'uomo; perciò con il saggio PRA effettuato *in vitro* è stato simulato ciò che potenzialmente potrebbe succedere *in vivo*.

E' importante osservare inoltre che altri composti calcio antagonisti quali la manidipina non presentano l'efficacia dimostrata per i composti EFO e LERC nei confronti del ceppo HCMV TR e che in taluni casi, ad esempio per il composto lomerizina (1- [bis (4-fluorofenil)metil]-4-(2,3,4-trimetossi-benzil)-piperazina dicloridrato) - anch'esso un calcio-antagonista, in grado di agire sui canali voltaggio-dipendenti sia di tipo L sia di tipo T - non si osserva alcuna attività inibitoria sulla replicazione di HCMV.

Composizioni comprendenti composti bloccanti dei canali del calcio, nello specifico almeno un composto selezionato tra efonidipina e lercanidipina consentono pertanto di ottenere una efficacia inaspettata nei confronti di infezioni virali da HCMV, anche resistenti al trattamento con farmaci inibitori della DNA polimerasi.

Questa evidenza risulta estremamente rilevante anche in considerazione del fatto che ad oggi, peraltro in mancanza di un vaccino efficace, i farmaci di elezione nel trattamento delle infezioni virali da HCMV sono proprio i composti inibitori della DNA polimerasi virale che possono presentare, tuttavia, alcuni svantaggi legati, ad esempio, a effetti collaterali, limitazioni nella somministrazione, ma soprattutto l'induzione della comparsa di ceppi virali resistenti (Ahmed, 2011).

Inoltre, l'infezione persistente e cronica di HCMV è associata ad un aumento del rischio di sviluppare patologie vascolari (aterosclerosi e restenosi), sia in soggetti immunocompetenti sia in soggetti trapiantati (Streblow et al., 2008). Soprattutto per questo tipo di patologie, infatti, ci sono prove evidenti che l'infezione da HCMV sia in grado di stimolare, in un'ampia gamma di tipi cellulari diversi, una overespressione di citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF- β e MCP-1) e di enzimi coinvolti nel sistema renina e angiotensina (Zhang et al., 2011; Luganini et al., 2016) che inducono alla vasocostrizione e conseguentemente all'aumento della pressione arteriosa.

Presentando un bersaglio terapeutico diverso da quello dei composti inibitori della DNA polimerasi virale, efonidipina e lercanidipina possono consentire un più efficace contenimento dell'immunopatogenesi mediata dal virus HCMV e della sua diffusione.

Il controllo dell'infezione da HCMV per limitare lo sviluppo di ipertensione e aterosclerosi può fornire pertanto una nuova strategia per prevenire e trattare malattie cardiovascolari associate all'infezione da HCMV.

In virtù della loro duplice attività, antivirale e antipertensiva, efonidipina e lercanidipina presentano inoltre un vantaggio terapeutico per i soggetti HCMV-sieropositivi a rischio di sviluppo di patologie vascolari in seguito a trapianto d'organo.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Ahmed A. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection.(2011). Infect Disord Drug Targets. Oct;11(5):475-503.

Chaudhary DV, Patel DP, Shaha PA, Shaha JV, Sanyalc M, Shrivastav PS. (2016). Determination of lercanidipine in human plasma by an improved UPLC–MS/MS method for a bioequivalence study. J Pharm Anal. 6(2): 87-94.

Gerna G, Baldanti F, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Revello MG. Monitoring of ganciclovir sensitivity of multiple human cytomegalovirus strains coinfecting blood of an AIDS patient by an immediate-early antigen plaque assay. (1992) Antivir. Res. 19:333–345.

Luganini A, Terlizzi ME, Gribaudo G. Bioactive Molecules Released From Cells Infected with the Human Cytomegalovirus. (2016) Front Microbiol. May 13;7:715. doi: 10.3389/fmicb.2016.00715. eCollection 2016. Review.

Man L, Hongna Z, Yang T, Dan Z, Xiaolin W, Lina Z, Jing H, Huichen L. (2015). Determination of efonidipine in human plasma by LC–MS/MS for pharmacokinetic applications. J Pharm Biomed Anal. 25;103:1-6.

Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, Hahn G, Nelson JA, Myers RM, Shenk TE. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. (2003). Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 9; 100(25):14976-81.

Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. (1998). J.virol.Methods 20:309-321.

Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. (2006). *J Virol.* Jan; 80(2):710-22.

Smith IL, Taskintuna I, Rahhal FM, Powell HC, Ai E, Mueller AJ, Spector SA, Freeman WR. Clinical failure of CMV retinitis with intravitreal cidofovir is associated with antiviral resistance. (1998). *Arch Ophthalmol.* Feb; 116(2):178-85.

Streblow DN, Dumortier J, Moses AV, Orloff SL, Nelson JA. 2008. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 397-415.

Zhang M, Yang Y, Yang X, Cai J. 2011. Human cytomegalovirus infection is a novel etiology for essential hypertension. *Med. Hypotheses* 76, 682-684.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione per l'uso nel trattamento di infezioni virali da Citomegalovirus umano (HCMV) di un soggetto, la composizione comprendendo almeno un bloccante dei canali del calcio selezionato tra efonidipina e lercanidipina.

2. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la composizione comprende efonidipina e lercanidipina.

3. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui la composizione comprende efonidipina in una concentrazione (peso/vol) compresa tra 1 e 25 ng/ml, preferibilmente tra 4 e 16 ng/ml.

4. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la composizione comprende lercanidipina in una concentrazione (peso/vol) compresa tra 1 e 25 ng/ml, preferibilmente tra 4 e 16 ng/ml.

5. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la composizione comprende inoltre almeno un composto selezionato tra ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet, preferibilmente ganciclovir.

6. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui dette infezioni virali sono resistenti al trattamento con almeno un composto inibitore della DNA polimerasi virale.

7. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 6, in cui l'almeno un composto inibitore della DNA polimerasi virale è selezionato nel gruppo costituito da ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet.

8. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui detto soggetto è un soggetto sottoposto a trapianto d'organo.

9. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 8, in cui detto soggetto sottoposto a trapianto d'organo è affetto da ipertensione.

10. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi rivendicazione precedente, in cui detto soggetto non risponde alla terapia con almeno un

composto inibitore della DNA polimerasi virale selezionato nel gruppo costituito da ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet.

RIASSUNTO

Composizione per l'uso nel trattamento di infezioni virali da HCMV comprendente almeno un bloccante dei canali del calcio selezionato tra efonidipina e lercanidipina.

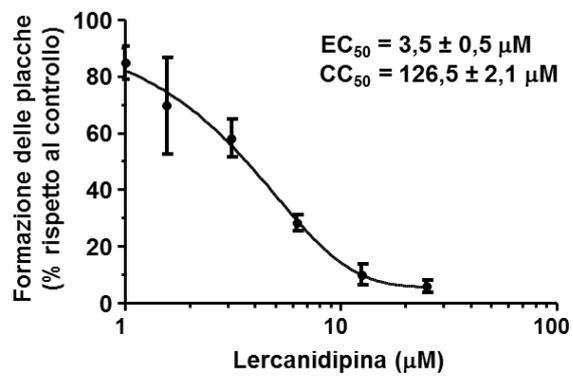
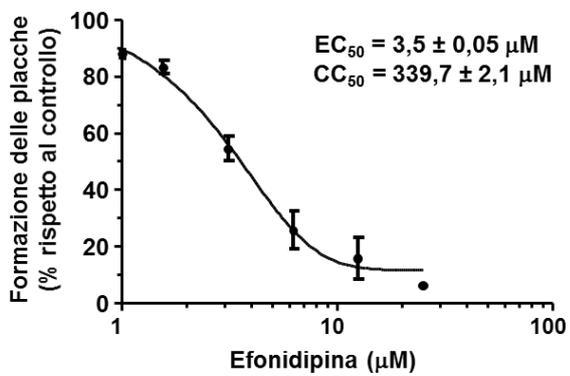


Figura 1

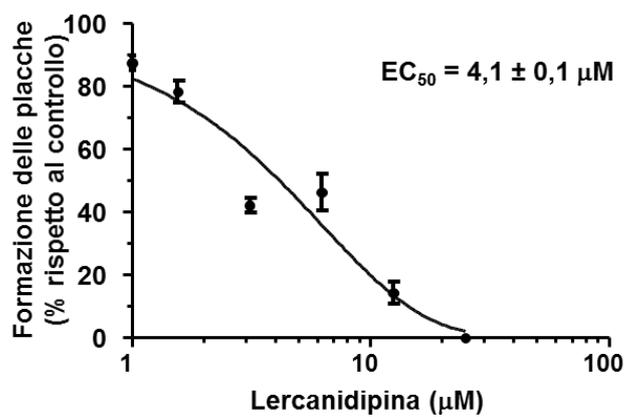
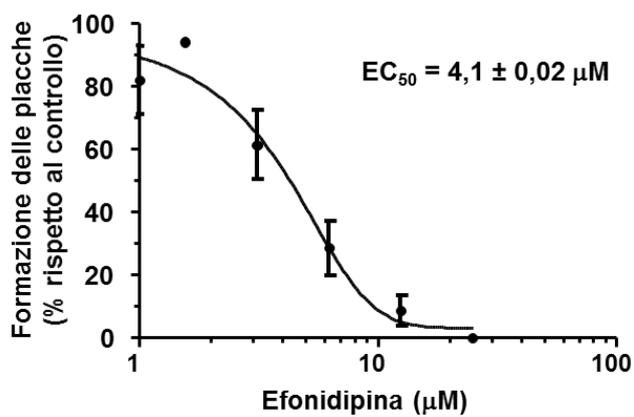


Figura 2

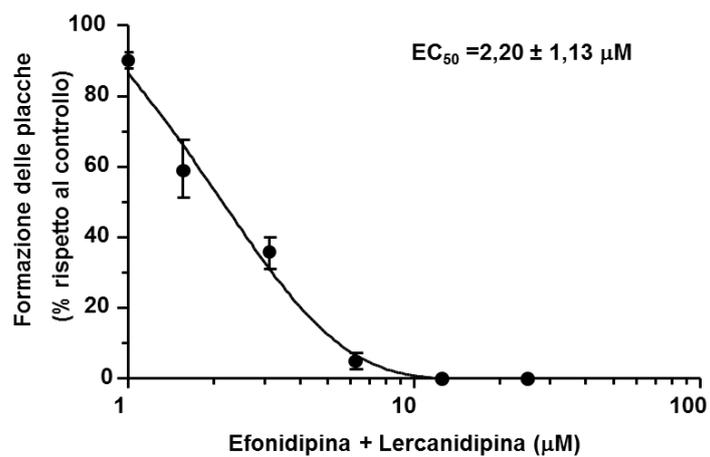


Figura 3

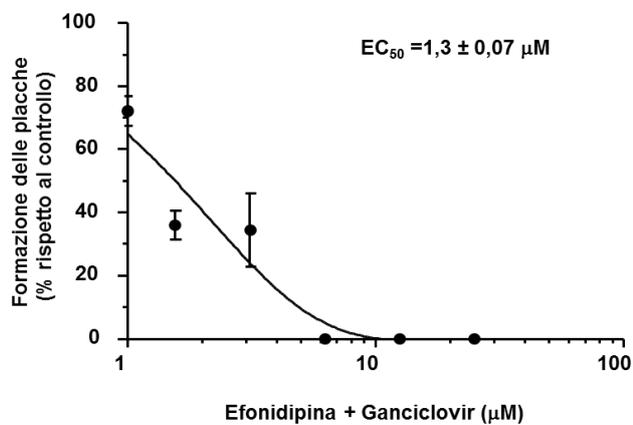


Figura 4

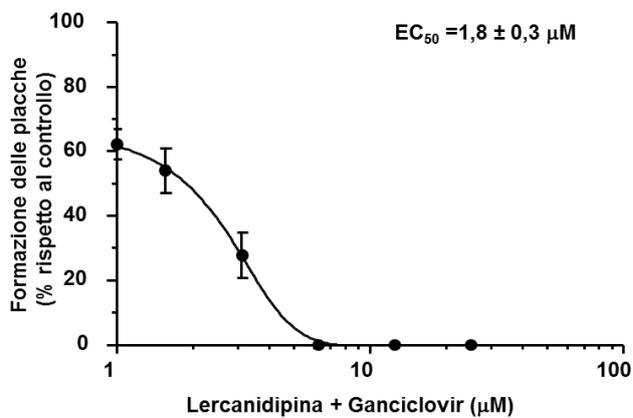


Figura 5

CLAIMS

1. Composition for use in the treatment of viral human cytomegalovirus (HCMV) infections of a subject, the composition comprising at least one calcium channel blocker selected from efonidipine and lercanidipine.

2. Composition for use according to claim 1, wherein the composition comprises efonidipine and lercanidipine.

3. Composition for use according to claim 1 or claim 2, wherein the composition comprises efonidipine in a concentration (w/v) between 1 and 25 ng/ml, preferably between 4 and 16 ng/ml.

4. Composition for use according any preceding claims, wherein the composition comprises lercanidipine in a concentration (w/v) between 1 and 25 ng/ml, preferably between 4 and 16 ng/ml.

5. Composition for use according to any preceding claims, wherein the composition further comprises at least one compound selected from ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet, preferably ganciclovir.

6. A composition for use according to any preceding claims, wherein said viral infections are resistant to the treatment with at least one viral DNA polymerase inhibitor compound.

7. A composition for use according to claim 6, wherein the at least one DNA polymerase inhibitor compound is selected from the group consisting of ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet.

8. Composition for use according to any one of the previous claims, wherein said subject is a transplant subject.

9. Composition for use according to claim 8, wherein said transplant subject is affected by hypertension.

10. Composition for use according to any one of the previous claims, wherein said subject is a subject unresponsive to the treatment with at least one viral DNA polymerase inhibitor compound selected from the group consisting of ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet.