



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900624468
Data Deposito	22/09/1997
Data Pubblicazione	22/03/1999

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C		

Titolo

USO DI 2-AMMINOTETRALINE-6, 7 SOSTITuite PER LA PREPARAZIONE DI COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE ATTE AL TRATTAMENTO DI PATOLOGIE INFIAMMATORIE E/O AUTOIMMUNI

La presente invenzione riguarda l'uso di 2-amminotetraline-6,7-sostituite e dei loro sali farmacologicamente accettabili per produrre composizioni farmaceutiche atte sia al trattamento profilattico e terapeutico dello shock settico che al trattamento di patologie infiammatorie e/o autoimmuni, che verranno
5 definite più dettagliatamente in seguito, in cui è accertato un ruolo eziopatogenetico delle citochine infiammatorie.

2-amminotetraline-6,7-sostituite, attive nel trattamento dello shock settico, sono già note.

EP-A-0 730861 i cui insegnamenti sono incorporati per riferimento nella
10 presente descrizione descrive una classe di tali 2-amminotetraline-6,7-sostituite e fra queste in particolare la (R,S)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina (nel seguito indicata con la sigla ST 626).

Le 2-amminotetraline-6,7-sostituite per l'uso secondo la presente invenzione sono anch'esse composti noti ma per applicazioni terapeutiche del tutto differenti. Infatti, in J. Chem. Soc. (1967), 288-93 sono descritte come
15 composti ad attività broncodilatatrice; in Tetrahedron let., 22/38, 3707-10, 1981 sono descritte come composti ad attività dopaminergica.

E' evidente che non vi è alcuna relazione fra le già note attività broncodilatatrice e dopaminergica di tali amminotetraline e l'attività terapeutica
20 nello shock settico e in patologie infiammatorie e/o autoimmuni in cui è accertato un ruolo eziopatogenetico delle citochine infiammatorie.

Le patologie infiammatorie e/o autoimmuni da trattare con le composizioni della presente invenzione comprendono ad esempio l'artrite reumatoide, la pancreatite, alcune malattie infiammatorie intestinali (ad es.
25 l'inflammatory bowel disease), il lupus eritematoso sistemico, la

glomerulonefrite e l'encefalomielite.

Per la sua diffusione e rilievo socio-economico, nel seguito si farà esclusivamente riferimento allo shock settico, fermo restando che anche le altre patologie la cui eziopatogenesi è riconducibile alle citochine infiammatorie vengono efficacemente trattate in accordo all'invenzione.

Lo shock settico è una sindrome clinica che può insorgere conseguentemente a gravi infezioni sostenute sia da batteri Gram negativi che da batteri Gram positivi, protozoi e virus ed è caratterizzata da leucocitosi, febbre, tachicardia, ipotensione, insufficienza renale, respiratoria, cardiaca ed epatica. Va tuttavia sottolineato come la gravità dello shock settico sia indipendente dal tipo di microrganismo responsabile della sindrome (Parrillo J. E., Pathogenetic mechanisms of septic shock, *N. Engl. J. Med.*, **328**:1471-1477, 1993) e sia piuttosto correlata all'entità della risposta infiammatoria individuale nei confronti dell'agente responsabile dell'insulto tossico.

Benché negli ultimi anni si sia registrato un significativo miglioramento della terapia antibiotica e dei protocolli di intervento nelle unità di terapia intensiva, lo shock continua a rimanere una delle cause importanti di morbidità e mortalità nel paziente ospedalizzato. Si calcola infatti che negli USA sia responsabile di oltre 100.000 decessi annui (Glauser M. P., Zanetti G., Baumgartner J. D., and Cohen J., Septic shock: pathogenesis, *Lancet*, **338**:732-736, 1991).

Lo shock settico trova come momento determinante e qualificante la reazione dell'organismo a prodotti derivanti dalla lisi o dal metabolismo microbico.

Tra queste sostanze, la prima ad essere individuata e la più utilizzata in

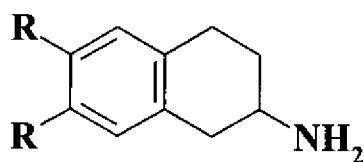
ricerche sperimentali è il lipopolisaccaride (LPS), presente nella parete di batteri Gram negativi e costituito chimicamente da una porzione polisaccaridica variabile per le varie specie batteriche e da una lipidica (lipide A) costante, rilevabile in forma micellare nel sangue di soggetti setticemici. Se
5 somministrato all'animale, l'LPS è capace di riprodurre tutta la sintomatologia cardiocircolatoria e neurologica riscontrabile nello shock (Olson N. C., Salzer W. L., McCall C. E., Biochemical, physiological and clinical aspects of endotoxemia, *Molec. Aspects. Med.*, 10:511-629, 1988). Quindi ad esso è attribuibile la qualifica di "primum movens" nella catena di eventi che,
10 attraverso l'attivazione della via intrinseca ed estrinseca della cascata coagulativa e la secrezione di citochine di origine prevalentemente monocito-macrofagica quali TNF, IL-1 e IL-6, porta allo scatenamento della sintomatologia clinica.

Il crescente rilievo assunto negli ultimi anni da questa patologia, la sua
15 gravità e gli inadeguati presidi terapeutici oggi disponibili rendono auspicabile la rapida scoperta di nuovi agenti terapeutici atti a contrastarne efficacemente la progressione.

E' stato ora trovato che una classe di 2-amminotetraline-6,7-sostituite note è potentemente efficace nella prevenzione e nel trattamento terapeutico
20 delle patologie sopramenzionate.

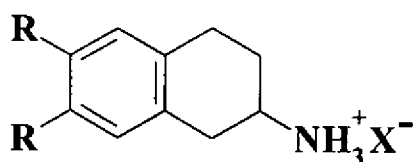
Le 2-amminotetraline-6,7-sostituite per l'uso secondo la presente inven-

zione possono presentarsi sia sotto forma di base libera di formula generale (I):



(I)

che sotto forma di sale farmacologicamente accettabile di formula (II):



(II)

in cui:

R è metossi o ossidril e

X⁻ è l'anione monovalente di un acido farmacologicamente accettabile.

Fra le 2-amminotetraline-6,7-sostituite di formula (I) o (II) risultano particolarmente preferiti i composti in cui

(1) R = metossi: (R,S)-2-ammino-6,7-dimetossitetralina cloridrato

(nel seguito: ST 1213)

(2) R = OH: (R,S)-2-ammino-6,7-diidrossitetralina cloridrato

(nel seguito: ST 1236)

Per sale farmacologicamente accettabile delle 2-amminotetraline-6,7-sostituite di formula (II) si intende qualsiasi sale di queste con un acido che non

dia origine ad indesiderati effetti tossici o collaterali. Tali acidi sono ben noti ai farmacologi ed agli esperti di tecnologia farmaceutica.

Esempi non limitativi di tali sali sono ad esempio cloruro, bromuro, orotato, aspartato acido, citrato acido, fosfato acido, fumarato e fumarato acido, lattato, maleato e maleato acido, ossalato acido, solfato acido, glucosio fosfato, tartrato e tartrato acido. Un elenco di sali approvati dalla FDA è riportato in Int. J. of Pharm. 33, (1986), 201-217, pubblicazione che è incorporata per riferimento nella presente descrizione.

L'approccio metodologico più largamente utilizzato al fine di riuscire a valutare nell'indagine preclinica il possibile effetto protettivo di una sostanza nello shock settico è quello di utilizzare modelli sperimentali di intossicazione da tossina (endo o esotossina), iniettata direttamente nell'animale da laboratorio, o liberata massivamente dalle cellule infettanti inoculate nell'animale.

Nel seguito vengono riportati i risultati ottenuti con i composti ST 1213 [(R,S)-2-ammino-6,7-dimetossitetralina cloridrato] e ST 1236 [(R,S)-2-ammino-6,7-diidrossitetralina cloridrato] in confronto al composto di riferimento ST 626 [(R,S)-2-ammino-6-fluoro-7-metossitetralina cloridrato]. Come già detto, il composto ST 626 è il composto noto strutturalmente più affine ai composti per l'uso secondo la presente invenzione e di cui è altresì nota la stessa attività farmacologica.

Tali risultati provano l'efficacia preventiva e terapeutica dei composti secondo l'invenzione, fornendo altresì indicazioni su uno dei possibili meccanismi di azione: drastica riduzione dei livelli ematici delle citochine infiammatorie (TNF, IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) e significativa riduzione dei livelli circolanti di Ossido Nitrico (NO).

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEI COMPOSTI

ST 1213 e ST 1236 IN MODELLI MURINI DI SHOCK SETTICO.

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (C. River), di circa sei settimane di età (10 animali per gruppo sperimentale). Gli animali sono stati stabulati in stanze con temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidità relativa di $50 \pm 15\%$ con ciclo di 12 ore di luce (7.00 - 19.00) e 12 di buio (19.00 - 7.00), con mangime ed acqua ad libitum.

I composti saggiati sono stati: ST 1213, ST 1236 e ST 626 (composto di riferimento). Il pH delle soluzioni dei composti è stato corretto, quando necessario, con NaOH 0,1 N (mantenendo la soluzione a freddo e in continua agitazione) per ottenere valori non inferiori a pH 5,5.

Le sostanze utilizzate sono state: LPS (*Escherichia coli* sierotipo O26:B6), lotto 73570 JB (Difco), LPS (*Salmonella typhosa*), lotto 81H4018 (Sigma), SEB (*Staphylococcus aureus*), lotto 144H4024 (Sigma), D-galattosamina lotto 031EE002485 (Merck).

Modello di intossicazione con LPS da *E. coli* e *S. typhosa*

Gli animali sono stati trattati per via intraperitoneale (i.p.) con LPS da *E. coli* o *S. typhosa*. La preparazione di endotossina è stata risospesa in soluzione fisiologica sterile e somministrata in un volume di 200 μl alla dose di 10,0 - 12,5 mg/kg (*E. coli*) e 23,0 - 27,0 mg/kg (*S. typhosa*), corrispondenti circa ad una DL_{80} .

I composti saggiati sono stati somministrati i.v. in 200 μl di fisiologica, ad una dose corrispondente ad 1/10 delle rispettive DL_{50} , 30 minuti prima e 5 minuti dopo il trattamento con LPS, oppure 5 e 30 minuti dopo il challenge.

Modello di intossicazione con LPS (da *E. coli*) in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

Gli animali sono stati sensibilizzati con D-galattosamina (1000 mg/kg, i.p.), e contemporaneamente hanno ricevuto l'LPS da *E. coli* (0,3 mg/kg, i.p.),
 5 in un volume totale di 200 μ l. La dose di LPS utilizzata corrisponde circa alla DL₈₀ dell'endotossina nell'animale sensibilizzato con D-galattosamina.

I composti saggiati sono stati somministrati i.v. in 200 μ l di fisiologica, ad una dose corrispondente ad 1/10 delle rispettive DL₅₀, 30 minuti prima e 5 minuti dopo, oppure 5 e 30 minuti dopo il trattamento con LPS.

Modello di intossicazione con SEB (enterotossina stafilococcica) in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

Gli animali sono stati sensibilizzati con D-galattosamina (1000-1500 mg/kg, i.p.), e contemporaneamente hanno ricevuto l'enterotossina SEB (3 mg/kg, i.p.) in un volume totale di 200 μ l. La dose di SEB utilizzata corrisponde
 15 circa alla DL₈₀ ed è stata determinata in un esperimento preliminare.

I composti saggiati sono stati somministrati i.v. in 200 μ l di fisiologica, ad una dose corrispondente ad 1/10 delle rispettive DL₅₀, 30 minuti prima e 5 minuti dopo, oppure 5 e 30 minuti dopo il trattamento con SEB.

In tutti gli esperimenti gli animali sono stati osservati per un periodo di
 20 10 giorni, prendendo quotidianamente nota degli eventuali decessi.

La significatività dell'effetto protettivo dei composti oggetto di studio è stata valutata mediante test esatto di Fisher ad una coda.

RISULTATI

Modello di intossicazione con LPS di *Escherichia coli*.

25 I risultati ottenuti nel modello di shock con LPS da *E. coli* sono riportati

nelle Tab. 1(A e B). Il composto ST 1213 protegge in maniera significativa ($p<0,001$) dalla mortalità indotta da LPS, allorquando la sostanza viene somministrata 30 minuti prima e 5 minuti dopo il challenge (Tab. 1A). Tale protezione si osserva anche secondo uno schema di trattamento post-challenge, seppure con una significatività inferiore ($p<0,05$) (Tab. 1B).

Tab. 1 Effetto protettivo di ST 1213 nel modello di shock settico da LPS di *Escherichia coli* nel topo. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5') (A) o esclusivamente post-challenge (+5' e +30') (B).

A

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo LPS	31/39	—	—
ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	25/38	+14	n.s.
Controllo LPS	25/31	—	—
ST 1213 (6 mg/kg, i.v.)	10/30	+47	<0,001

B

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo LPS	20/21	—	—
ST 1213 (6 mg/kg, i.v.)	14/20	+15	<0,05

a = aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

Modello di intossicazione con LPS di *Salmonella typhosa*.

Nel modello di shock con LPS da *S. typhi* entrambi i composti risultano essere protettivi quando somministrati pre- e post-challenge con $p < 0,001$ per ST 1213 e $p < 0,05$ per ST 1236. (Tab. 2).

ST 1213 somministrato anche secondo un protocollo di trattamento post-challenge conserva, se pure in maniera ridotta, la sua efficacia protettiva (Tab. 3).

Tab. 2 Effetto protettivo di ST 1213 e ST 1236 nel modello di shock settico da LPS di *Salmonella typhosa* nel topo. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo LPS	14/20	—	—
ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	6/20	+40	<0.05
Controllo LPS	14/20	—	—
ST 1213 (6 mg/kg, i.v.)	2/20	+60	<0,001
Controllo LPS	16/20	—	—
ST 1236 (19 mg/kg, i.v.)	9/20	+35	<0,05

a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

Tab. 3 Effetto protettivo di ST 1213 nel modello di shock settico da LPS di *Salmonella typhosa* nel topo. Trattamento post-challenge (+5' e + 30').

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo LPS	22/30	—	—
ST 1213 (6 mg/kg, i.v.)	14/30	+27	<0,05

a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

Modello di intossicazione con LPS da *E. coli* in animali sensibilizzati con D-galattosamina

Nel modello di shock con LPS da *E. coli* in animali sensibilizzati con D-Galattosamina il composto ST 1236 determina una riduzione della mortalità estremamente significativa ($p < 0,001$) (Tab. 4).

Tab. 4 Effetto protettivo di ST 1236 nel modello di shock settico da LPS di *Escherichia coli* nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo LPS + D-GalN	25/29	—	
ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	21/28	+11	n.s.
Controllo LPS + D-GalN	17/20	—	—
ST 1236 (19 mg/kg, i.v.)	4/19	+64	<0,001

a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

Modello di intossicazione con enterotossina SEB in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

I risultati ottenuti nel modello di shock con enterotossina SEB in animali sensibilizzati con D-Galattosamina sono riportati nelle Tab. 5 e 6. I due composti determinano un consistente incremento del numero degli animali sopravvissuti rispetto al controllo (46% e 90%) se somministrati 30 minuti prima e 5 minuti dopo il challenge (Tab. 5). Viceversa, eseguendo il trattamento post-challenge l'effetto protettivo permane ma non risulta statisticamente

significativo (Tab. 6).

Tab. 5 Effetto protettivo di ST 1213 e ST 1236 nel modello di shock settico da enterotossina SEB nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo SEB + D-GalN	19/28	—	—
ST 1213 (6 mg/kg, i.v.)	6/28	+46	<0,001
Controllo SEB + D-GalN	18/20	—	—
ST 1236 (19 mg/kg, i.v.)	0/20	+90	<0,001

a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

Tab. 6 Effetto protettivo di ST 1213 e ST 1236 nel modello di shock settico da enterotossina SEB nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento post-challenge (+5' e +30').

Trattamento (dose)	Morti/Totale	Incremento ^a sopravvivenza (%)	P ^b
Controllo SEB + D-GalN	18/20	—	—
ST 1213 (6 mg/kg, i.v.)	14/20	+20	n.s.
Controllo SEB + D-GalN	16/20	—	—
ST 1236 (19 mg/kg, i.v.)	10/20	+30	n.s.

a = Aumento (in percentuale) della sopravvivenza degli animali trattati rispetto al controllo.

b = La significatività statistica è stata calcolata con il test esatto di Fisher ad una coda.

EFFETTO DEI COMPOSTI ST 1213 e ST 1236 SULLA PRODUZIONE DI TNF INDOTTA DA LPS IN COLTURE DI SANGUE INTERO DI RATTO.

Le colture di sangue intero stimulate con LPS sono state negli ultimi tempi utilizzate come sistema sperimentale che, sebbene con alcune limitazioni, mima la condizione fisiopatologica della endotossinemia, situazione in cui il lipopolisaccaride dei batteri Gram negativi è rilasciato in circolo, venendo così

a contatto con le cellule del sistema immune. Di recente, infatti, questo sistema sperimentale è stato adottato per lo studio di potenziali inibitori del rilascio di TNF e IL-1 (GC Rice et al., *Shock*, 4:254-266, 1994. AJH Gearing et al., *Nature*, 370:555-557, 1994. K Tschaikowsky, *Biochim Biophys Acta*, 1222:113-121, 1994. A Haziot et al, *J Immunol*, 152:5868-5876, 1994).

In questi esperimenti sono stati utilizzati ratti Wistar maschi (C. River) di 175-200 grammi. Gli animali sono stati stabulati in stanze aventi temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidità relativa di $50 \pm 15\%$, luce ciclata di 12 ore di luce (7.00-19.00), mangime e acqua *ad libitum*.

I composti saggiati sono stati ST 1213 e ST 1236. L'endotossina utilizzata era LPS (*Salmonella typhosa*) lotto 81H4018 (Sigma).

Il sangue, prelevato da ratti Wistar sacrificati mediante decapitazione, è stato raccolto in provette di polipropilene (0,450 ml/provetta) contenenti eparina come anticoagulante. I composti da saggiare sono stati dapprima disciolti in soluzione fisiologica sterile. Successivamente volumi pari a 0,025 ml di soluzioni concentrate 20x dei composti in esame sono stati aggiunti alle provette contenenti i campioni ematici, così da avere concentrazioni finali pari a 0,050 mM. Dopo una incubazione di 1h a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 , alle provette sono stati aggiunti 0,025 ml di una soluzione concentrata 20x di LPS di *S. typhosa*, in modo da avere una concentrazione finale di LPS pari a $1 \mu\text{g/ml}$. Dopo una ulteriore incubazione di 4 h, nelle stesse condizioni sopramenzionate, le provette sono state centrifugate 5 min a 10.000 rpm e i supernatanti sono poi stati stoccati e congelati a -80°C in attesa del dosaggio di TNF.

Per il saggio biologico del TNF si effettuano, in terreno RPMI

addizionato con 1% FCS, diluizioni seriali dei campioni contenenti TNF (TNF standard, supernatanti colturali, siero, fluidi biologici ecc.) direttamente nelle micropiastre Primaria, lasciando 50 μ l/pozzetto di ogni diluizione allestita.

Si aggiungono alle diluizioni dei campioni 50 μ l/pozzetto di una soluzione madre di Actinomicina D-mannitolo (4 μ g/ml) preparata in terreno RPMI addizionato con 1% FCS. Questo inibitore consente di amplificare la sensibilità delle cellule al TNF.

Si distribuiscono in ogni pozzetto 100 μ l di una sospensione cellulare di L929 (fibrosarcoma murino sensibile all'azione tossica del TNF) standardizzata a 4×10^5 cell./ml. Si allestiscono gli appropriati controlli, vale a dire il controllo Actinomicina D (cellule+Actinomicina ma senza TNF) e il controllo cellule (cellule in presenza del solo terreno colturale).

Si incubano le piastre per 18 ore a 37°C e 5% CO₂.

Viene preparata una miscela colorante contenente XTT (1 mg/ml) e PMS (125 μ M), secondo le modalità sotto riportate. L'XTT viene sciolto (1 mg/ml) in RPMI caldo (60 °C). La soluzione madre di PMS è 100 mM (stabile per circa 20 giorni a +4°C e al buio) e viene preparata sciogliendo il PMS in PBS e sonicando brevemente per portare in soluzione il PMS in modo completo. La soluzione 100 mM di PMS viene quindi diluita 1:800 in XTT, ottenendosi così una concentrazione finale di PMS pari a 125 μ M in XTT 1 mg/ml. La miscela colorante XTT-PMS deve essere filtrata prima dell'uso.

Terminata l'incubazione di 18 ore, si aggiungono a tutti i pozzetti 50 μ l della miscela colorante XTT-PMS, ottenendo così un volume finale di 250 μ l/pozzetto con concentrazioni finali di XTT e PMS pari a 0,2 mg/ml e 25 μ M rispettivamente. Viene allestito anche un "bianco", costituito da pozzetti

contenenti 200 μ l di terreno colturale + 50 μ l della miscela XTT-PMS.

Si incubano le piastre per 2-2,5 ore a 37°C e 5% CO₂ (tempo totale di incubazione = 20 ore circa).

Si leggono i valori di assorbanza dei campioni al lettore colorimetrico per micropiastre (*microtiter plate reader*) utilizzando la lunghezza d'onda di lettura a 450 nm e la lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm (programmando il lettore colorimetrico per la sottrazione automatica dei valori di assorbanza del "bianco").

Il titolo del TNF viene calcolato come segue. Per definizione, 1 unità di attività biologica è data dal valore semimassimale (=50%) di assorbanza del controllo Actinomicina D.

Le diluizioni dei campioni generano una curva di valori di assorbanza la cui porzione lineare è descritta dall'equazione $y=ax + b$. Dopo aver inserito i valori di a e b (ottenuti dall'analisi di regressione lineare effettuata al computer) e dopo aver sostituito la y con il valore di assorbanza semimassimale (che corrisponde ad 1 unità biologica) del controllo Actinomicina D, si risolve l'equazione rispetto alla x, che rappresenta il reciproco delle diluizioni del campione. Il valore ottenuto fornisce il titolo di TNF espresso in U/ml.

La valutazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il test t di Student a due code.

RISULTATI

I risultati ottenuti (Tab. 7) indicano che i composti saggiati hanno ridotto, seppure in modo differenziato, la produzione di TNF dalle colture ematiche stimulate con LPS. Esaminando più in dettaglio i dati, si può notare come il composto ST 1236 induce una riduzione del 59% dei livelli di TNF,

mentre il composto ST 1213 induce un decremento dei valori di TNF del 31%.

Tab. 7 Effetto dei composti ST 1213 e ST 1236 sulla produzione di TNF da parte di colture di sangue di ratto (n=5) stimulate con LPS di *S. typhosa* (1 μ g/ml). Le sostanze sono state saggiate a una concentrazione di 50 μ M. Le condizioni sperimentali sono quelle riportate nei Materiali e Metodi.

Trattamento	TNF (Valori % medi)	Dev. Std.	p*
LPS	100	0	-
LPS+ST 1213	69	22	<0,02
LPS+ST 1236	41	15	<0,001

* Test t di Student a due code.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEI COMPOSTI ST 1213 E ST 1236 SUI LIVELLI CIRCOLANTI DI TNF IN ALCUNI MODELLI MURINI DI SHOCK.

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (C. River), di circa sei settimane di età (10 animali per gruppo sperimentale). Gli animali sono stati stabulati in stanze con temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidità relativa di $50 \pm 15\%$ con ciclo di 12 ore di luce (7.00 - 19.00) e 12 di buio (19.00 - 7.00), con mangime ed acqua ad libitum.

I composti saggiati sono stati: ST 1213, ST 1236 e ST 626 (composto di riferimento). Il pH delle soluzioni dei composti è stato corretto, quando necessario, con NaOH 0,1 N (mantenendo la soluzione a freddo e in continua agitazione) per ottenere valori non inferiori a pH 5,5.

Le sostanze utilizzate sono state: LPS (*Escherichia coli* sierotipo

dei livelli di TNF indotti da LPS di *E. Coli* ($p < 0,01$) (Tab. 8) ed un decremento ancora più rilevante ($p < 0,0001$) dei livelli circolanti della citochina nel modello con LPS di *S. typhosa* (Tab. 9).

- 5 Tab. 8 Valutazione dei livelli serici di TNF dopo somministrazione di ST 1213 (6 mg/kg, iv) nel modello di shock settico da LPS di *Escherichia coli* nel topo. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

10	TNF (U/ml)			
	Trattamento	Media	E.S.	P
	Controllo LPS	50,0	12,4	—
	ST 1213	12,0	1,6	0,01

- 15 Tab. 9 Valutazione dei livelli serici di TNF dopo somministrazione di ST 1213 (6 mg/kg, iv) nel modello di shock settico da LPS di *Salmonella typhosa* nel topo. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

20	TNF (U/ml)			
	Trattamento	Media	E.S.	P
	Controllo LPS	154.2	41.0	—
	ST 626	35.0	10.0	0,01
25	Controllo LPS	58,1	10,1	0,0001
	ST 1213	5,0	1,7	

O26:B6), lotto 73570 JB (Difco), LPS (*Salmonella typhosa*), lotto 81H4018 (Sigma), D-galattosamina lotto 031EE002485 (Merck).

Modello di intossicazione con LPS da *E. coli* e *S. typhosa*

5 Le condizioni sperimentali sono esattamente quelle descritte precedentemente.

Modello di intossicazione con LPS (da *E. coli*) in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

Le condizioni sperimentali sono esattamente quelle descritte precedentemente.

10 In entrambi i modelli i prelievi ematici sono stati effettuati 90 minuti dopo il challenge (picco ematico del TNF). Il sangue è stato prelevato dal plesso retro-orbitale degli animali, precedentemente anestetizzati mediante breve inalazione con etere. I campioni ematici sono stati incubati 2 ore a temperatura ambiente ed il siero così ottenuto è stato quindi centrifugato a 3000 rpm per 20
15 minuti prima di essere congelato a -80°C in attesa del dosaggio.

Per il saggio biologico del TNF si effettuano in terreno RPMI addizionato con 1% FCS, diluizioni seriali dei campioni ematici direttamente nelle micropiastre Primaria, lasciando 50 µl/pozzetto di ogni diluizione allestita.

Si procede quindi come descritto precedentemente.

20 La valutazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il test t di Student a una coda.

RISULTATI

Modello di intossicazione con LPS di *Escherichia coli* e *S. typhosa*.

25 I risultati ottenuti con ST 1213 in questi 2 modelli di intossicazione mostrano come il trattamento con il composto causi una significativa riduzione

./.

Modello di intossicazione con LPS da *E. coli* in animali sensibilizzati con D-galattosamina.

I risultati ottenuti nel modello di shock con LPS da *E. coli* in animali sensibilizzati con D-Galattosamina evidenziano come il composto ST 1236 riduca in modo estremamente significativo ($p < 0,0001$) il rilascio di TNF, indotto da LPS in animali sensibilizzati all'endotossina (Tab. 10).

Tab. 10 Valutazione dei livelli serici di TNF dopo somministrazione di ST 1236 (19 mg/kg, iv) nel modello di shock settico da LPS di *Escherichia coli* nel topo sensibilizzato con D-Galattosamina. Trattamento pre- e post-challenge (-30' e +5').

Trattamento	TNF (U/ml)		
	Media	E.S.	P
Controllo LPS + D-GalN	81,6	15,1	-
ST 1236	0,4	0,1	0,0001

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL COMPOSTO ST 1213 SUI LIVELLI CIRCOLANTI DI INTERLEUCHINA-1BETA (IL-1 β), INTERLEUCHINA-6 (IL-6) ed INTERFERON-GAMMA (IFN- γ) NEL TOPO INTOSSICATO CON LPS di *E. coli* O CON L'ENTEROTOSSINA SEB.

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (C. River), di circa sei settimane di età (10 animali per gruppo sperimentale). Gli animali sono stati stabulati in stanze con temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidità relativa di 50

± 15% con ciclo di 12 ore di luce (7.00 - 19.00) e 12 di buio (19.00 - 7.00), con mangime ed acqua ad libitum.

Il composto utilizzato è stato: ST 1213.

Le sostanze usate sono state: LPS (*Escherichia coli* sierotipo O26:B6),
5 lotto 73570 JB (Difco), SEB (*Staphylococcus aureus*), lotto 144H4024 (Sigma),
D-galattosamina lotto 031EE002485 (Merck).

Modello di intossicazione con LPS da *E. coli*.

Le condizioni sperimentali sono esattamente quelle descritte precedentemente

10 Modello di intossicazione con SEB (enterotossina stafilococcica) in topi sensibilizzati con D-galattosamina.

Le condizioni sperimentali sono esattamente quelle descritte precedentemente.

In entrambi i modelli i prelievi ematici sono stati effettuati 2 ore dopo
15 il challenge per l'IL-6, 4 ore dopo il challenge per l'IL-1 β e 6 ore dopo il
challenge per l'IFN- γ . Il sangue è stato prelevato dal plesso retro-orbitale degli
animali, precedentemente anestetizzati mediante breve inalazione con etere. I
campioni ematici sono stati incubati 2 ore a temperatura ambiente ed il siero
così ottenuto è stato quindi centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti prima di
20 essere congelato a -80°C in attesa del dosaggio.

I saggi biologici sono stati effettuati seguendo le indicazioni suggerite nei kits impiegati. In particolare è stato utilizzato:

- Mouse IL1 β Immunoassay (MLB00, R&D Systems)
- Mouse IL-6 EIA Kit (8-6706, PerSeptive Diagnostics)
- 25 - Mouse IFN- γ EIA Kit (8-6716, PerSeptive Diagnostics).

La valutazione statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il test t di Student a una coda.

RISULTATI

Modello di intossicazione con LPS da *E. coli*.

5 Il composto ST 1213 riduce in modo significativo ($p < 0,0001$) la produzione di IFN- γ ma non delle altre due citochine in esame Tab. 11.

10 Tab. 11 Valutazione dei livelli serici di IL-1 β , IL-6 e IFN γ dopo somministrazione di ST 1213 (6 mg/kg, iv) nel modello di intossicazione con LPS da *E. coli*. Trattamento effettuato ai tempi -30' e +5' rispetto al challenge.

	Protocollo -30' e +5'								
	IL-1beta (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			IFN-gamma (pg/ml)		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
15 Trattamento									
Controllo LPS	162	28	—	45995	8686	—	32	2	—
ST 1213	157	15	n.s.	56708	11304	n.s.	9	1	0,0001

20 **Modello di intossicazione con SEB (enterotossina stafilococcica) in topi sensibilizzati con D-galattosamina.**

Il composto ST 1213 risulta efficace nel modulare significativamente l'IL-1 β e l'IL-6 ma non l'IFN- γ (Tab. 12).

25

Tab. 12 Valutazione dei livelli serici di IL-1 β , IL-6 e IFN γ dopo somministrazione di ST 1213 (6 mg/kg, iv) nel modello di intossicazione con SEB. Trattamento effettuato ai tempi -30' e +5' rispetto al challenge.

Trattamento	IL-1beta (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			IFN-gamma (pg/ml)		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
Controllo SEB + D-GalN	18	4		562	47	—	40	3	—
ST 1213	1,6	0,6	0,001	182	69	0,001	37	5	n.s.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI ST 1213 (6 mg/kg, i.v.) SUI LIVELLI PLASMATICI DI OSSIDO NITRICO (NO) INDOTTO DALLA INOCULAZIONE DI LPS DI *E. coli*.

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (C. River), di 6-7 settimane di età (6-9 animali per gruppo sperimentale). Gli animali sono stati stabulati in stanze con temperatura costante di $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidità relativa di $50 \pm 15\%$ con ciclo di 12 ore di luce (7.00 - 19.00) e 12 di buio (19.00 - 7.00), con mangime ed acqua ad libitum.

Il composto utilizzato è stato ST 1213. L'endotossina di *E. coli* (LPS sierotipo O26:B6, lotto 73570, Difco), disciolta in soluzione fisiologica sterile, è stata iniettata (5 mg/kg) per via endoperitoneale.

Il trattamento con ST 626 (composto di riferimento) e ST 1213 è stato invece effettuato per via endovenosa (6 mg/kg per entrambi i composti, equivalente a circa 1/10 della DL_{50} i.v.) a +5' e +30' rispetto al challenge con LPS (tempo 0).

I prelievi ematici sono stati effettuati 20 ore dopo il challenge con LPS (picco ematico di NOx). Il sangue è stato prelevato dal plesso retro-orbitale degli animali, precedentemente anestetizzati con etere, e raccolto in provette eparinate. I campioni sono stati centrifugati a 2200 rpm per 10 minuti e il plasma è stato poi congelato a -80°C in attesa del dosaggio di NOx.

Prima del saggio, i campioni sono stati diluiti 1:3 in acqua distillata e quindi centrifugati 90' a 4700 g su filtri Millipore Ultrafree-MC, 10,000 NMWL (Cat. No. UFC3LGC00).

Il dosaggio del contenuto di NOx nei campioni è stato effettuato utilizzando il kit recentemente immesso nel commercio dalla Cabru (*Nitrate/Nitrite assay Kit*, Cat. No. 780001).

La valutazione dei dati ottenuti è stata effettuata utilizzando il test "t" di Student a due code.

RISULTATI

La modalità di somministrazione adottata per ST 1213, basata sul trattamento post-challenge, appare efficace nel ridurre significativamente i livelli di NOx indotti dall'LPS (42% di decremento di concentrazione). Il composto di riferimento ST 626, è viceversa in grado di causare una riduzione non significativa dei livelli circolanti di Nox (21%).

Tab.13 Effetto di ST 1213 (6 mg/kg, i.v.) sui livelli plasmatici di NOx (μ M) indotti dall'LPS di *E. coli* in topi BALB/c. La sostanza è stata somministrata dopo 5 e 30 minuti dall'iniezione endoperitoneale dell'LPS (5 mg/kg).

5

10

Condizioni sperimentali	N° campioni	NOx (mM) media $\pm$ E.S.	Decremento concentrazione NOx ^a (%)	P
Controllo LPS	6	453.5 $\pm$ 13.2	–	–
ST 626	8	359.3 $\pm$ 37.9	21	n.s.
Controllo LPS	9	891.0 $\pm$ 51.4	–	–
ST 1213	9	518.0 $\pm$ 64.0	42	<0.001

a = decremento (in percentuale) dei livelli plasmatici di Nox del gruppo dei trattati rispetto ai relativi controlli.

15 b = significatività statistica valutata con il test “t” di Student a due code.

Roma, 22 settembre 1997

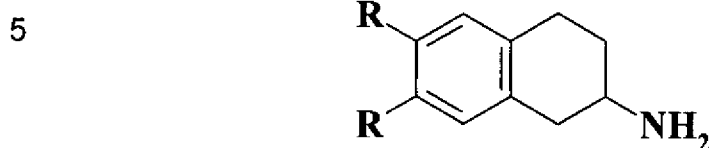
SIGMA TAU
 IND. FARM. RIUNITE s.p.a.
 Viale Shakespeare, 47
 00144 ROMA



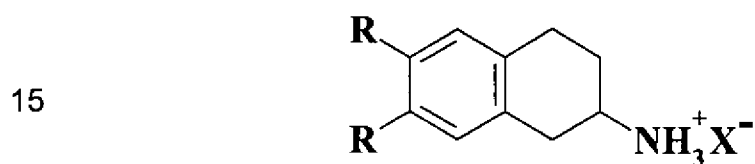
./.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di 2-amminotetraline-6,7-sostituite di formula generale (I)

**(I)**

o dei loro sali farmacologicamente accettabili di formula generale (II)

**(II)**

in cui:

R è metossi o ossidrile e

X⁻ è l'anione monovalente di un acido farmacologicamente accettabile,
per preparare una composizione farmaceutica atta al trattamento terapeutico
di patologie infiammatorie e/o autoimmuni indotte da citochine
infiammatorie.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui la composizione farmaceutica è atta al trattamento profilattico e terapeutico dello shock settico.
3. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui la composizione farmaceutica è atta al trattamento terapeutico di artrite reumatoide, pancreatite, inflammatory
5 bowel disease, lupus eritematoso sistemico, glomerulonefrite ed encefalomielite.
4. Uso secondo le rivendicazioni 1-3, in cui l'anione monovalente di un acido farmacologicamente accettabile è scelto tra cloruro, bromuro, orotato, aspartato acido, citrato acido, fosfato acido, fumarato e fumarato acido,
10 lattato, maleato e maleato acido, ossalato acido, solfato acido, glucosio fosfato, tartrato e tartrato acido.
5. Uso secondo le rivendicazioni 1-3, in cui la 2-amminotetralina-6,7-sostituita è la (R,S)-2-ammino-6,7-dimetossitetralina cloridrato.
6. Uso secondo le rivendicazioni 1-3, in cui la 2-amminotetralina-6,7-
15 sostituita è la (R,S)-2-ammino-6,7-diidrossitetralina cloridrato.

Roma, 22 settembre 1997



SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE s.p.a.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA