



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101993900307915
Data Deposito	21/06/1993
Data Pubblicazione	21/12/1994

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE COMPRENDENTI 8-CLORO-3-(BETADIETILAMINOET
CUMARINA BASE E RELATIVI SALI, ATTE AL TRATTAMENTO DI CONDIZIONI
PATOLOGICHE CARATTERIZZATE DA ELEVATA PRODUZIONE DI OSSIDO DI AZOTO

EX NO VO
PD 93 A 0 0 0 1 4 1

PD R 0 0 1 2 7

FIDIA
FARMACEUTICI ITALIANI
ABANO TERME (PD)
c.f. 00204260285



- 1 -

Descrizione di una invenzione industriale dal titolo "COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE COMPRENDENTI 8-CLORO-3 (β-DIETILAMINOETIL)-4-METIL-7-ETOSSICARBONILMETOSI CUMARINA BASE E RELATIVI SALI, ATTE AL TRATTAMENTO DI CONDIZIONI PATOLOGICHE CARATTERIZZATE DA ELEVATA PRODUZIONE DI OSSIDO DI AZOTO" della FIDIA Farmaceutici Italiani Derivati Industriali ed Affini, Società per Azioni, con sede in via Ponte della Fabbrica, 3A, Abano Terme, Padova, Italia, nella persona del suo Presidente e Legale Rappresentante, Avv. Ennio Arengi.

Inventori designati: Massimo Di Rosa, Rocco Cirillo, Edward Joseph Hornby, Marco Prosdocimi

Depositata il 21/06/1993 con No. PD93A000141

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce all'impiego del cloricromene (8-cloro-3-(β-dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina) base e relativi sali per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento di patologie caratterizzate da elevata produzione di ossido di azoto (NO) quali, in particolare, tutte quelle patologie in cui sia pregevole un'attività antiinfiammatoria e/o immunosoppressiva di suddetto farmaco, o più in generale in tutte quelle situazioni patologiche di vasodilatazione e/o danno tissutale conseguente ad iperproduzione di NO.

TECNICA ANTERIORE

1. Il cloricromene

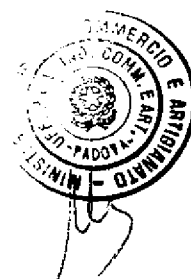
E' noto che il cloricromene è stato ottenuto per la prima volta allo stato puro, mediante processi altamente selettivi, messi a punto dalla stessa






Richiedente (US 4,296,039, US 4,452,811). In particolare è descritto che la selettiva alogenazione con un atomo di cloro in posizione 8 della molecola cumarinica ha il pregio di conferire spiccate proprietà vasodilatatorie coronariche, nonché attività antiaritmica (US 4,349,566) ed antiaggregante piastrinica (US 4,302,741) a suddetto prodotto.

Gli effetti del cloricromene, sia in vitro che in vivo, sono stati ampiamente evidenziati in diversi modelli sperimentali. In particolare è stato dimostrato che il prodotto presenta una serie di importanti effetti a livello piastrinico che si traducono in una prevenzione dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica indotta da diversi stimoli, quali acido arachidonico, collagene, ADP, adrenalina o platelet activating factor (PAF) o da una combinazione di stimoli (Galli C. et al.: "Effects of 8-monochloro-3- β -diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxy carbonyl methoxy coumarin (AD6) on aggregation, arachidonic acid metabolism and thromboxane B2 formation in human platelets. Pharmacol. Res. Comun. 1980: 12: 329-337; Prosdocimi M. et al.: Action of AD6 (8-monochloro-3-beta-diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxy-carbonyl-methoxy coumarin) on human platelets in vitro. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1986: 332: 305-310; Travagli R. A. et al.: "Molecular aspects of cloricromene (AD6) distribution in human platelets and its pharmacological effects. Thromb. Res. 1989: 54: 327-338). Inoltre è stato evidenziato che la potente azione inibitoria di AD6 a livello della produzione di acido arachidonico, precursore della sintesi del trombossano, avviene verosimilmente mediante un'azione bloccante a livello della fosfolipasi A₂ (Porcellati S. et al.: "The coumarin derivative AD6 inhibits the release of



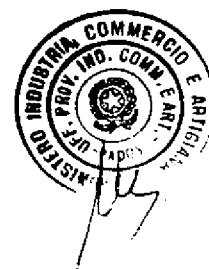
57

arachidonic acid by interfering with phospholipase A2 activity in human platelets stimulated with thrombin. Agents Actions 1990: 29: 364-373).

Recentemente è stato dimostrato che il cloricromene è anche in grado di inibire l'adesione di cellule polimorfonucleate a cellule endoteliali (Bertocchi et al: In vitro inhibition of human polymorphonuclear cell function by cloricromene. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1989: 339: 697-703). Inoltre, il prodotto può avere positivi effetti a livello delle interazioni biochimiche fra piastrine e leucociti polimorfonucleati (Zatta A. et al. Polymorphonuclear leukocyte-dependent modulation of platelet function: effect of cloricromene. Eur. J. Pharmacol. 1991: 198: 97-100), che sono note essere rilevanti negli stati trombotici ed ischemici.

Parallelamente è stata ampiamente dimostrata l'efficacia del cloricromene in differenti modelli sperimentali in vivo. In particolare è stato dimostrato che il prodotto riduce la formazione del trombo laddove viene indotta una stenosi critica arteriosa (Prosdocimi M.: "Stenosis and vascular damage as an experimental model of arterial thrombosis: a role for prostanoids. In: Samuelsson B. et al. eds. Prostanoids and Drugs. Plenum Publishing Corporation, 1989: 113-119; Prosdocimi M. et al.: Inhibition by AD6 (monochloro-3-beta-diethylamino-ethyl-4-methyl-7-ethoxycarbonyl-methoxy coumarin) of platelet aggregation in dog stenosed coronary artery. Thromb. Res. 1985: 39: 399-409;).

Pertanto dall'analisi delle attuali conoscenze sul cloricromene, non è stata mai proposta la possibilità di impiegare terapeuticamente tale composto in condizioni patologiche di vasodilatazione e danno tissutale indotto da ossido di azoto NO, quali ad esempio infiammazione polmonare, edema; eritema,



MINISTERO
DELL'INDUSTRIA,
COMMERCE E
ARTIGIANATO
1989

67

dermatite, psoriasi, ulcerazioni cutanee; artrosi, artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni; shock ipotensivo, shock settico, shock ipovolemico; vasculiti, come ad esempio infiammazioni conseguenti a trombo-flebiti, emorroidi; colite ulcerosa o, più in generale, in quelle situazioni patologiche di vasodilatazione e/o danno tissutale in cui sia presente una iperproduzione di ossido di azoto.

2. Ruolo biologico dell'ossido di azoto (NO)

La scoperta della formazione di ossido di azoto nei tessuti dei mammiferi, e la comprensione del suo ruolo biologico è stato oggetto di notevoli studi nell'arco degli ultimi anni. L'ossido di azoto è un potente vasodilatatore, sintetizzato nella parete dei vasi da due distinte NO sintetasi che utilizzano L - arginina come substrato. Uno di questi due enzimi è sempre presente nell'endotelio vascolare sia animale che umano in due isoforme, ove sintetizza basse concentrazioni di NO che attivano la guanilato ciclasi presente nella muscolatura liscia vascolare; tale enzima è responsabile del mantenimento del tono vascolare e opera il controllo fisiologico della pressione sanguigna (Vallance P. et al: "Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man." Lancet 1989: 997-1000). La seconda NO sintetasi è indotta nell'endotelio vascolare degli animali, nelle cellule muscolari lisce vascolari umane, nei macrofagi ed in altre cellule umane ad opera di endotossine batteriche e di alcune citochine. Studi in vitro hanno rilevato che l'induzione di tale enzima produce una prolungata e massiccia sintesi di NO, che porta ad una costante vasodilatazione e ad una iporeattività ai vasocostrittori correlate al danno indotto da NO. In queste condizioni, è stata dimostrata l'efficacia di



9

trattamenti con prodotti analoghi della L-arginina, quali in particolare della NG-monomethyl-L-arginina (L-NMMA) che inibisce entrambi i tipi di NO sintetasi e può essere selettiva per le forme di danno tissutale indotto (Gross S.S., Stühr D.J., Aisaki K., Jaffe E.A., Levi R. and Criffith O.W. (1990) "Macrophage and endothelial nitric oxide synthesis: cell type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine", Biochem. Biophys. Res. Comm., 170: 96-103). Interessanti risultati sono stati ottenuti anche utilizzando i glucocorticoidi (Rees D. D. et al: "Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock". Biochem. Biophys. Res. Comm. 173: 541-547, 1990).

E' inoltre da considerare che l'enzima NO sintetasi è stato identificato anche in altri sistemi quali ad es. nel sistema nervoso, sia centrale che periferico, sensorio e motorio (Schmidt H. H. et al: "Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol". Biochem. Biophys. Res. Comm. 165, 284-291, 1989; Murphy S. et al: "Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide". J. Neurochem. 55: 349-351. 1990) nel sistema visivo, a livello della retina (Ross, C. a. et al: "Messenger Molecules in the Cerebellum". Trends Neurosci. 13, 216-222, 1990) ove potrebbe spiegare la patogenesi di alcune malattie a carico di tale distretto anatomico (Lolley R. N. et al: "Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: simulation of an inherited disease". Science 196: 664-666, 1977).

Si deve pertanto considerare, alla luce della riscontrata induzione di tale



enzima, non solo in cellule appartenenti al sistema reticolo endoteliale, ma anche in svariate altre cellule e tessuti, che il release di NO può avere importanti conseguenze biologiche, determinando situazioni patologiche di vasodilatazione e di danno tissutale.

Inoltre anche situazioni di immunità non specifica sarebbero collegate all'induzione di NO sintetasi. NO generato immunologicamente, oltre ad essere citostatico o citotossico per microorganismi patogeni e cellule tumorali, potrebbe anche avere effetti avversi su cellule ospiti indotte ad esprimere NO sintetasi o in cellule adiacenti. Infatti macrofagi, epatociti e cellule di adenocarcinoma in cui è stato indotto NO, hanno manifestato segni di tossicità adesso correlato (Albina J. E. et al: "Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine deiminase pathway." J. Immunol. 143: 3641-3646, 1989; Billiar T. R. et al: "An L-arginine dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro" J. Eng. Med. 189: 1467-1472, 1989; O'Connor K. J. et al: "Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase and the related cell damage in adenocarcinoma cells." Biochim. Biophys. Acta, submitted 1991).

Le conseguenze biologiche di questi cambiamenti, così come le circostanze in cui il release di NO porta a disfunzioni e/o morte cellulare, devono essere ancora chiaramente comprese. Tuttavia condizioni di danno tissutale locale o sistemico, associato a situazioni immunologiche, potrebbero essersi verificate in stretta relazione con il release di NO. L'ossido di azoto oltre ai suoi effetti sulla vitalità e sulla proliferazione cellulare, potrebbe anche giocare un ruolo nella normale regolazione della risposta cellulare a



6p

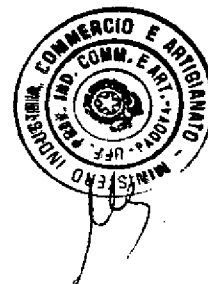
- 7 -

mitogeni. Al momento attuale non è noto se NO, formato dall'enzima inducibile, contribuisca anche ad azioni citotossiche di altre cellule che giocano un ruolo nell'immunità specifica; tuttavia è stata dimostrata l'induzione della sintesi di NO in linfociti T (Kir K. S. J. et al: "cloned murine T-lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide". Bioch. Biophys. Res. Comm. 173, 600-665, 1990).

Pertanto dalle evidenze soprarassunte, emerge l'importante ruolo dell'ossido di azoto, ed in particolare dell'induzione dell'enzima NO sintetasi, in svariati tipi cellulari e quindi l'importante ruolo di NO in relazione a cambiamenti patologici riscontrabili in diversi tessuti.

Fra gli agenti farmacologici, per i quali è stata finora dimostrata un'azione inibitoria sull'induzione dell'NO sintetasi, sono da segnalare in particolare i glucocorticoidi: la scoperta che tali agenti inibiscono l'induzione di detto enzima rivela la potenziale importanza di NO in svariate condizioni, quali ad esempio infiammazione polmonare, edema; eritema, dermatite, psoriasi, ulcerazioni cutanee; artrosi, artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni; shock ipotensivo, shock settico, shock ipovolemico; vasculiti, come ad esempio infiammazioni conseguenti a trombo-flebiti, emorroidi; colite ulcerosa o, più in generale, in quelle situazioni patologiche di vasodilatazione e/o danno tissutale in cui sia presente una iperproduzione di ossido di azoto.

Dalle indicazioni sopracitate, anche se a titolo puramente esemplificativo, risulta molto chiaramente il notevole valore terapeutico di farmaci efficaci nel ridurre l'iperproduzione di NO ed, in particolare, nell'inibire



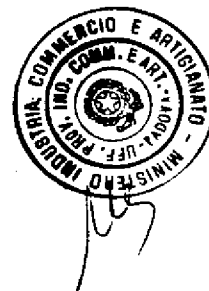
l'espressione dell'enzima NO sintetasi di tipo inducibile.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Ora noi abbiamo sorprendentemente trovato, e costituisce oggetto della presente invenzione, che il cloricromene (8-cloro-3-(β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina cloridrato) è un efficace inibitore della NO sintetasi e può pertanto essere pregevolmente impiegato per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento di patologie caratterizzate da iperproduzione di ossido di azoto (NO), quali ad esempio infiammazione polmonare, edema; eritema, dermatite, psoriasi, ulcerazioni cutanee; artrosi, artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni; shock ipotensivo, shock settico, shock ipovolemico; vasculiti, come ad esempio infiammazioni conseguenti a trombo-flebiti, emorroidi; colite ulcerosa o, più in generale, in quelle situazioni patologiche di vasodilatazione e/o danno tissutale in cui sia presente una iperproduzione di ossido di azoto.

L'oggetto della presente invenzione risulterà dalla descrizione degli esperimenti che abbiamo eseguito impiegando il cloricromene nei seguenti modelli sperimentali:

1. Anelli di aorta isolata da ratti in cui è stata misurata la perdita del tono indotto da lipopolisaccaride (LPS);
2. Colture di macrofagi di topo trattate con LPS.
3. Dermatite essudativa da croton oil nel topo
4. Granuloma pouch da croton oil nel ratto
5. Peritonite da acido acetico nel ratto
6. Edema della zampa da serotonina nel ratto



Sp

7. Writhing test da fenilchinone nel topo

MATERIALI E METODI

1.1 Aorta isolata

Ratti maschi Wistar (del peso di circa 280-320 gr) venivano sottoposti ad anestesia eterea e trattati per via endovenosa con 4 mg/kg di lipopolisaccaride (LPS) di Salmonella Thyphi.

Il cloricromene veniva somministrato in unico bolo (2 mg/kg) per via endovenosa 30 minuti prima dell'iniezione con LPS; i ratti di controllo ricevevano una soluzione di NaCl (0,9% in 1 ml/kg) mentre i ratti "naive" non ricevevano nè LPS nè cloricromene.

L'aorta toracica veniva quindi rimossa, a distanza di 3 hr dalla somministrazione di LPS, e posta in soluzione di Krebs bicarbonato pH 7,4, avente la seguente composizione (mM): NaCl 118.4; KCl 4.7; MgSO₄ 1.2; CaCl₂ 1.3; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25.0 e glucosio 11.7. Ciascuna aorta, previa opportuna rimozione del tessuto adiposo e connettivo circostante, veniva tagliata in anelli di circa 2 mm di lunghezza. Gli anelli venivano quindi posti in bagnetti da 10 ml contenenti soluzione Krebs in cui veniva fatto gorgogliare carbossigeno (95% di O₂ e 5 CO₂) alla temperatura di 37°C. Gli anelli venivano collegati ad un registratore mediante trasduttori isometrici: il "tono" veniva equilibrato con una tensione di circa 1 gr per 90-120 minuti. La tensione isometrica veniva monitorata continuamente usando un trasduttore di forza collegato ad un registratore (Ugo Basile, Comerio, Varese). Gli esperimenti sono stati tutti condotti in presenza di 10 µM di indometacina.

Successivamente gli anelli venivano contratti con fenilefrina (PE, 300 µM)



e la perdita spontanea del tono vascolare veniva monitorata per 4 ore.

In un diverso set di esperimenti gli anelli di aorta venivano contratti con concentrazioni crescenti di PE (1 nM - 10 μ M) al fine di ottenere curve cumulative dose/risposta.

I risultati (media $\pm$ errore standard medio S.E.M.) erano espressi come g. di tensione/mg di tessuto.

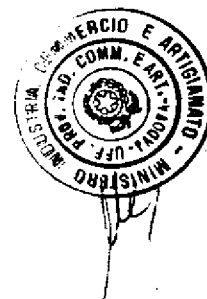
2.1 Culture cellulari

Culture di macrofagi murini (linea cellulare J774 - American Tissue Culture Catalogue T1B67) venivano coltivate in fiaschette Techne, centrifugate a 25 rpm ed incubate a 37°C in terreno di coltura "Dulbecco's modified Eagle's medium" supplementato con 10% di siero bovino fetale, 2% di glutamina, penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 μ g/ml).

Le cellule venivano piastrate in piastre di coltura da 24 pozzetti (Falcon) alla densità di 2.5×10^5 cellule e lasciate ad aderire a 37°C in 5% CO₂-95% O₂ per 2 ore. Il terreno veniva quindi sostituito con terreno fresco e le cellule venivano attivate con LPS (100 ng/ml) ed incubate con il farmaco in esame. Il cloricromene è stato testato alle seguenti concentrazioni: 2-20 e 200 μ M.

E' stata quindi misurata la produzione di NO mediante determinazione della quantità di nitriti (NO₂⁻), presente nel terreno di coltura, secondo il metodo di Griess (Di Rosa M. et al: "Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages." Biochem. Biophys. Res. Commun. 172: 1246, 1990).

I risultati sono espressi come nmoli di NO₂ rilasciato da 10⁶ cellule in 24 ore. L'analisi statistica, per entrambe le due prove, è stata effettuato



9

Il test consiste nell'induzione di una dermatite essudativa nel padiglione auricolare del topo mediante instillazione di un irritante cutaneo, l'olio di croton, responsabile di una tipica reazione infiammatoria "vascolare" caratterizzata da iperemia ed edema. La reazione infiammatoria, a lenta evoluzione e lunga durata, interessa gli strati profondi del derma dove si estende gradualmente dal sito di applicazione a tutto il padiglione auricolare, raggiungendo la massima intensità alla 6° ora. Il meccanismo patogenico responsabile dei fenomeni vascolari ed essudativi riconosce l'intervento di numerosi fattori (attivazione della Proteinkinasi-C, del sistema chininico e del complemento; liberazione di enzimi lisosomiali, autacoidi vasoattivi, prostaglandine e fattori chemiotattici; infiltrazione cellulare; modificazione del collagene). Topi del peso di 28-30 gr. sono stati suddivisi in gruppi di 6 elementi. E' stato utilizzato il metodo descritto da Tubaro et al. (Agent and Actions, 17, 197, 1985). La dermatite è stata indotta nel topo in anestesia da pentobarbital (37 mg/kg i.p.) mediante instillazione nella superficie interna dell'orecchio destro di una soluzione contenente 35 µg di croton oil in 15 µl di acetone. A distanza di 6 h, i topi sono stati sacrificati in etere per procedere al taglio del padiglione auricolare edematoso (dx) e di quello sano controlaterale. E' stata studiata l'attività di AD6 sia per somministrazione sistemica (i.p. in 10 ml/kg di salina), che per applicazione locale (veicolando il prodotto direttamente nella soluzione croton/acetone). Gli effetti del trattamento sono stati valutati in base



Gj

all'incremento del peso dell'orecchio trattato rispetto al controlaterale 6 h dopo l'installazione del flogogeno, assumendo quale indice di attività antiinfiammatoria l'inibizione percentuale rispetto ai controlli.

Confronti tra medie sono stati eseguiti mediante il test "t" di Student.

Sulla curva dose-effetto riferita all'inibizione % dell'edema è stata calcolata la DE40 secondo il metodo di Litchfield e Wilcoxon (J. Pharmac. Exp. Therap., 96, 99, 1949).

4.1. Attività cronica antiinfiammatoria di AD6 (somministrazione i.p.) nel granuloma pouch da croton-oil nel ratto

Il test consiste nell'induzione di una reazione infiammatoria sub-acuta localizzata nel tessuto sottocutaneo del dorso di ratto, mediante inoculazione di aria seguita da una soluzione di croton-oil in acetone. Il modello sperimentale permette di seguire due distinti aspetti di un processo infiammatorio estremamente comune nella patologia umana, e cioè l'essudazione e la formazione di tessuto granulomatoso, rappresentato da una sacca granulomatosa piena di essudato.

Il meccanismo patogenetico è correlato all'azione irritante specifica del croton-oil (esteri del forbolo) che causa attivazione della Proteinkinasi-C, del complemento e del chininogeno plasmatico, con conseguente formazione di chinine (bradichinina), notevole essudazione e migrazione leucocitaria. E' stato utilizzato il metodo di Seyle (J. Amer. Med. Ass., 152, 1207, 1953) modificato da Finney & Somers (J. Pharm. Pharmac. 10, 613, 1958) che consiste nell'iniezione s.c. di 25 ml di aria, seguita da 0.5 ml di una soluzione di croton-oil al 2% in olio di semi. Ratti (Sprague-Dawley) del peso di 130-140 gr venivano suddivisi in gruppi omogenei di 6



6

- PBZ50-100 mg/kg/die

Come farmaco di confronto è stato impiegato il fenilbutazone (PBZ), quale antiinfiammatorio non steroideo particolarmente attivo in questo modello sperimentale.

E' stato determinato l'andamento dose-effetto ed il time-course di AD6 per via orale ed endovenosa.

E' stato utilizzato il metodo descritto da Arrigoni-Martelli (Boll. Chim. Farm. 107, 29, 1968) che, in base alla misurazione del volume di essudato peritoneale, permette di valutare la capacità protettiva di un farmaco sullo sviluppo della reazione infiammatoria acuta indotta nel ratto dall'iniezione

i.p. di acido acetico (10 mg/kg di una soluzione allo 0.5%).

30 minuti dopo l'iniezione dell'acido acetico gli animali sono stati sacrificati mediante inalazione eterea e si è proceduto, dopo laparotomia, alla misurazione del versamento peritoneale raccolto mediante pipette Pasteur.

Ratti (Sprague-Dawley) maschi del peso di 200-300 gr, sono stati suddivisi in gruppi omogenei di 5 animali ciascuno.

AD6, in soluzione fisiologica salina, è stato somministrato per via orale (gavage) ed endovenosa nei seguenti volumi:

- 10 ml/kg (os)
- 1 ml/kg (i.v.)

Il trattamento è stato eseguito al tempo di picco (definito nell'ambito delle prove relative alla cinetica dell'effetto antalgico) e cioè:

A) Somministrazione orale (1 h prima del test)

- Controlli Salina 10 ml/kg
- AD6 0.05 - 0.075 - 0.1 - 0.2 mg/kg

B) Somministrazione i.v. (5 minuti prima del test)

- Controlli Salina 1 ml/kg
- AD6 0.025 - 0.5 - 0.075 - 0.1 - 0.2 - 0.4 mg/kg
- Proendotel 0.05 - 0.1 - 0.2 mg/kg

6.1. Edema della zampa da serotonina nel ratto

Ratti (Sprague-Dawley) maschi del peso di 140-160 gr. sono stati suddivisi in gruppi omogenei di 5 elementi ciascuno.

Il test consiste nell'induzione di una reazione edematosa localizzata mediante inoculazione subplantare di serotonina. La reazione, a rapida evoluzione, è



bf

correlata ad aumento della permeabilità capillare, essenzialmente dovuto all'azione vasomotrice diretta della serotonina e ad attivazione del chininogeno plasmatico (con formazione di bradichinina).

L'edema è stato indotto nella zampa posteriore destra del ratto mediante iniezione di 0.1 ml di una soluzione allo 0.05% di serotonina creatininsolfato.

La misurazione del volume della zampa è stata eseguita mediante pletismografo a mercurio, prima dell'iniezione del flogogeno e dopo 45 minuti. Lo sviluppo dell'edema è stato valutato in base all'incremento del volume della zampa rispetto al valore basale.

Il trattamento farmacologico è stato eseguito per via intraperitoneale (10 minuti prima del test) e i.v. (5 minuti prima del test).

Come farmaci di confronto, nelle prove eseguite per via i.p., sono stati utilizzati fenilbutazone (PBZ) e ciproheptadina (CYP)

A) Somministrazione i.p. (10 minuti prima del test):

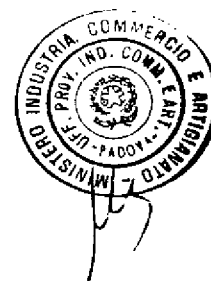
- Controlli..... Salina 10 ml/kg
- AD6..... 0.05 - 0.075 - 0.1 - 0.15 mg/kg
- PBZ..... 100 mg/kg
- CYP..... 0.5 mg/kg

B) Somministrazione i.v. (5 minuti prima del test)

- Controlli Salina 1 ml/kg
- AD6..... 0.01 - 0.05 - 0.1 mg/kg

7.1. Attività antalgica di AD6 nel test del writhing da fenilchinone nel topo

Topi Swiss maschi del peso di 28-30 gr. sono stati suddivisi in gruppi omogenei di 6 animali/dose.



by

E' stato utilizzato il metodo descritto da Siegmund et al. (Proc. Soc. Exp. Biol., 95, 729, 1957) che si basa sulla capacità di un farmaco di antagonizzare la sindrome provocata nel topo dall'iniezione endoperitoneale di 0.25 ml di una soluzione allo 0.02% di fenilchinone in alcool etilico al 5%. La sintomatologia dolorosa é caratterizzata da contrazioni intermittenti all'addome con stiramenti del tronco (writhes) che iniziano mediamente dopo 3 minuti dall'iniezione dell'algogeno e durano per circa 120 minuti. In pratica il rilievo di tale sintomatologia viene eseguito contando il numero di writhes esibiti da ciascun animale in 5 minuti (dal 5° al 10° minuto successivo all'iniezione del fenilchinone), quando cioè la reazione dolorosa é più intensa e gli stiramenti addominali più ravvicinati e costanti.

AD6, in soluzione fisiologica salina, é stato somministrato per via orale (gavage), intraperitoneale ed endovenosa nei seguenti volumi:

- 10 ml/kg (os e i.p.)
- 1 ml/kg (i.v.)

Il trattamento é stato eseguito al tempo di picco (definito nell'ambito delle prove relative alla cinetica dell'effetto antalgico, ved; par. 2), e cioè:

A) somministrazione orale (1 h prima del test)

- controlli salina 10 ml/kg
- AD6 0.025 - 0.25 - 0.75 - 0.1 - 0.2 mg/kg

B) somministrazione i.p. (5 minuti prima del test)

- controlli salina 10 ml/kg
- AD6 0.01 - 0.25 - 0.05 - 0.75 - 0.1 - 0.2 mg/kg

C) somministrazione i.v. (5 minuti prima del test)

- controlli salina 1 ml/kg



Gj

- AD6 0.0005 - 0.001 - 0.005 - 0.01 - 0.02 - 0.1 mg/kg

STUDIO FARMACOCINETICO SU BASE FARMACODINAMICA

Lo studio é stato eseguito utilizzando il test del writhing da fenilchinone nel topo (ved. par. 1).

Topi Swiss maschi del peso di 28-30 gr. sono stati suddivisi in gruppi omogeni di 6 animali ciascuno.

AD6 é stato somministrato per via orale, intraperitoneale ed endoveneosa a vari intervalli di tempo prima dell'iniezione i.p. dell'algogeno.

Alle diverse vie di somministrazione é stata impiegata la dose corrispondente all'effetto massimo:

- 0.1 mg/kg per via os e i.p.
- 0.01 mg/kg per via i.v.

E' stato valutato il time-course dell'effetto antalgico del prodotto (Tab. 10-11-12).

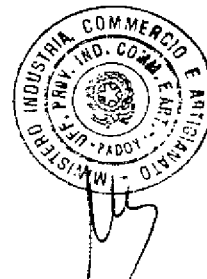
RISULTATI

In sintesi, dall'insieme delle prove sperimentali, emerge che:

1.2. Effetto sulla reattività e tono vascolare

Il trattamento con LPS induce una perdita nel tempo del tono vascolare di anelli di aorta precontratti con PE. Tale rilassamento si manifesta in misura significativamente superiore rispetto alla aorte provenienti da animali non trattati con LPS.

Il trattamento farmacologico con cloricromene (2 mg/kg ev. in unico bolo) attenua significativamente l'aumentato rilassamento e la ridotta sensibilità a PE in ratti trattati con LPS. Negli animali in cui é stato somministrato il cloricromene, la vasocostrizione indotta da concentrazioni crescenti di PE e



la massima forza di contrazione raggiungibile sono significativamente più elevate (Fig. 1) e più prolungate nel tempo (Fig. 2) rispetto ai gruppi di controllo trattati con LPS e salina (NaCl 0.9%).

2.2. Effetto sulla formazione di NO_2^- in colture di macrofagi

Il trattamento con LPS induce un aumento significativo della produzione di nitriti (NO_2^-).

Il co-trattamento con cloricromene inibisce la produzione di NO_2^- : l'effetto è concentrazione-dipendente, raggiungendo una inibizione di circa il 48% in presenza di 200 μM di cloricromene (Fig. 3).

3.2. Effetto sulla dermatite essudativa da croton-oil nel topo

AD6 esercita una spiccata azione protettiva, dose-dipendente, nei confronti della dermatite essudativa indotta dall'instillazione di croton-oil nell'orecchio del topo.

L'effetto è ben apprezzabile e statisticamente significativo sia dopo applicazione locale del prodotto (insieme all'irritante) che dopo somministrazione intraperitoneale (Tabelle 1-2 - Figure 4-5).

4.2. Effetto nel granuloma pouch da croton-oil nel ratto

AD6, per somministrazione i.p. alle dosi di 0.05 - 0.1 mg/kg/die per 5 giorni, esplica una significativa azione antiessudativa/antigranulomatosa in questo modello sperimentale.

L'effetto ottenuto alla dose di 0.1 mg/kg è sovrapponibile a quello dato dal fenilbutazone a 50 mg/kg (Tabella 3 - Figura 5A).

5.2. Effetto nella peritonite da acido acetico nel ratto

Somministrato per via orale e i.v., AD6 esercita una attività antiinfiammatoria che si manifesta esclusivamente a bassi dosaggi, entro un



67

range da 0.025 a 0.1 mg/kg.

Per le diverse vie di somministrazione l'effetto massimo (rilevato al tempo di picco) è raggiunto alla dose di 0.1 mg/kg con i seguenti valori:

- per os - 33% (tempo di picco: 1 ora)
- per i.v. - 45% (tempo di picco 5 minuti)

(Tab. 4-4A-4B - Fig. 6-7-8)

6.2. Effetto sull'edema della zampa da serotonina nel ratto

Somministrato per via i.p., AD6 inibisce lo sviluppo dell'edema da serotonina in maniera modesta, ma statisticamente significativa, nel range di dosi comprese tra 0.05 e 0.1 mg/kg. L'effetto si riduce con l'ulteriore incremento della dose. L'inibizione raggiunta alla dose massima attiva (0.1 mg/kg) è stata del 39% rispetto ai controlli.

Il fenilbutazone (PBZ)(100 mg/kg) si è dimostrato del tutto privo di effetti in questo modello sperimentale, mentre la ciproheptadina (CYP) ha esercitato la propria spiccata azione antiserotoninica, determinando alla dose di 0.5 mg/kg una inibizione dell'edema pari al 78%.

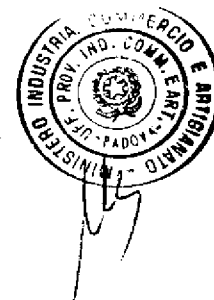
Per via i.v. l'attività antiedemigena di AD6 è inferiore a quella osservata dopo trattamento i.p.

Il range di dosi attive è compreso tra 0.01 e 0.05 mg/kg (massima risposta - 25%)(Tabelle 5-6 - Figura 8A).

7.2. Effetto antalgico di AD6

Dopo somministrazione orale ed intraperitoneale, AD6 esplica una discreta attività antalgica al PQ-writhing test, per dosi comprese tra 0.01 e 0.1 mg/kg (Tab. 7-8, Fig. 12-13).

L'effetto, raggiunto il picco alla dose di 0.1 mg/kg, si riduce nettamente con



67

l'incremento della dose (curva a campana).

Dopo somministrazione i.v., AD6 esplica una spiccata attività antalgica per dosi di oltre 10 volte inferiori a quelle attive per via orale e i.p. (Tab. 9, Fig. 14).

Per questa via di somministrazione il picco di attività, nettamente superiore a quello dato per os. e i.p., è raggiunto alla dose di 0.01 mg/kg.

Ulteriori incrementi di dose riducono l'effetto, ma in maniera più graduale e meno accentuata rispetto a quanto osservato per os. e i.p.

Dosi ed attività massime alle diverse vie di somministrazione:

- 0.1 mg/kg p.o. -52% (tempo di picco: 1 ora)
- 0.1 mg/kg i.p. -64% (tempo di picco: 5 minuti)
- 0.01 mg/kg i.v. -78% (tempo di picco: 5 minuti)

Somministrazione orale

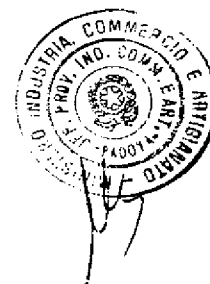
La determinazione del time-course dell'effetto antalgico di AD6 (0.1 mg/kg) evidenzia un picco di attività dopo 1 ora, che si mantiene quasi in plateau fino alla 3° ora, seguito da un decremento relativamente rapido, con dimezzamento dell'effetto intorno alla 5° ora (Tab. 10, Fig. 9).

Somministrazione i.p.

Per questa via di somministrazione l'attività di AD6 (0.1 mg/kg) si manifesta molto rapidamente (picco dopo 5 minuti) e tende a ridursi con un andamento biesponenziale: piuttosto rapido entro la 1° ora e più lento nei tempi successivi. Il tempo di dimezzamento dell'effetto è di circa 2 ore (Tab. 11, Fig. 10).

Somministrazione i.v.

Per questa via di somministrazione l'attività di AD6 (0.01 mg/kg) si



manifesta molto rapidamente (picco dopo 5 minuti) e si mantiene a valori prossimi al picco per circa 30 minuti.

Successivamente l'effetto si riduce in maniera graduale, con tempo di dimezzamento di circa 2 ore (Tab. 12, Fig. 11).

FORMULAZIONI FARMACEUTICHE

Il cloricromene, 8-cloro-(3- β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base e i relativi sali utilizzati nella presente invenzione possono essere somministrati nell'uomo così come tali o in associazione con altri farmaci terapeuticamente accettabili, mediante l'impiego di varie formulazioni farmaceutiche di cui si riportano di seguito alcuni esempi:

Esempio 1: una capsula contiene:

Principio attivo:

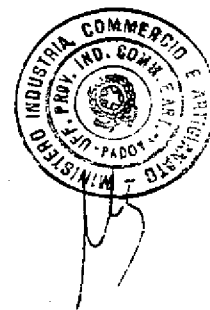
- cloricromene cloridrato 100,00 mg

Eccipienti:

- saccarosio	92,77 mg
- amido di mais	30,93 mg
- magnesio stearato	34,60 mg
- povidone	25,48 mg
- fosfato di potassio monobasico	20,80 mg
- cellulosa acetato trimetilato	95,42 mg
- opercolo di gelatina	77,00 mg

Esempio 2: un flacone liofilizzato contiene:

Principio attivo:



- cloricromene cloridrato 30,00 mg

Eccipienti:

- mannitolo 30,00 mg

ogni fiala solvente contiene:

- sodio cloruro 45,00 mg
- acqua p.p.i. q.b. a 5,00 ml

Esempio 3 : una supposta contiene:

Principio attivo:

- cloricromene cloridrato 50,00 mg

Eccipienti:

- gliceridi semisintetici q.b.a. 2,00 gr

Esempio 4 : (sistema transdermico) un cerotto contiene:

Principio attivo:

- cloricromene base 200,00 mg

Eccipienti:

- enhancer di assorbimento q.b.
- base oleosa q.b.

Il sistema transdermico é costituito da un reservoir contenente il farmaco, un adesivo cutaneo ed una membrana esterna impermeabile.

Esempio 5: una crema dermatologica contiene:

Principio attivo:

- cloricromene cloridrato 5,00 gr



gr

Eccipienti:

- emulsionante primario 2,50 gr
- emulsionante secondario 0,80 gr
- olio neutro 5,00 gr
- glicerolo 6,00 gr
- acqua depurata q.b.a. 100,00 gr

Esempio 6: un unguento dermatologico contiene:

Principio attivo:

- cloricromene base 5,00 gr

Eccipienti:

- base oleosa di assorbimento 10,00 gr
- olio neutro q.b.a. 100,00 gr

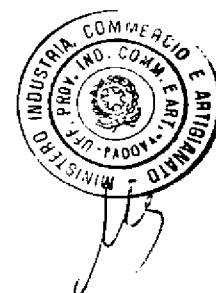
Esempio 7: un gel cutaneo contiene:

Principio attivo:

- cloricromene cloridrato 5,00 gr

Eccipienti:

- agente solubilizzante 20,00 gr
- enhancer di assorbimento 10,00 gr
- agente gelificante 7,00 gr
- olio neutro q.b.a. 100,00 gr



9

Tabella 1: DERMATITE ESSUDATIVA DA CROTON-OIL NEL TOPO

Attività antiedemigena di AD₆ per via intraperitoneale. Determinazione del peso dell'orecchio edematoso (dx) e di quello sano (sin.) eseguita 6 ore dopo l'installazione del croton-oil.

N. 6 animali/gruppo

Trattamento i.p.	Dose mg/kg	Incremento peso orecchio dx vs. sin	Inib. %	P t-Student	DE40 mg/kg
Salina	---	28.83 ± 1.83	---	-----	
AD ₆	0.01	23.43 ± 1.22	19	< 0.05	
	0.025	18.18 ± 1.81	37	< 0.01	0.03
	0.05	11.98 ± 1.28	58	< 0.001	(0.01-0.08)
	0.01	3.33 ± 0.47	71	< 0.001	
	0.02	19.48 ± 1.19	32	< 0.01	

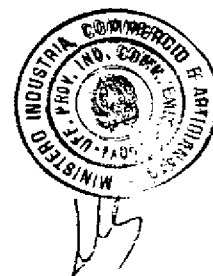
Tabella 2: DERMATITE ESSUDATIVA DA CROTON-OIL NEL TOPO

Attività antiedemigena di AD₆ per applicazione locale (insieme al croton). Determinazione del peso dell'orecchio edematoso (dx) e di quello sano (sin.) eseguita 6 ore dopo l'installazione del croton-oil.

Farmaco di confronto: indometacina

N. 5 animali/gruppo

Trattamento "in situ"	Dose mg/kg	Incremento peso orecchio dx vs. sin % ± e.s.	Inib. %	P t-Student	DE40 approx. mg/kg
Controlli	---	23.57 ± 1.31	---	-----	
AD ₆	0.05	11.08 ± 1.12	26	< 0.01	
	0.1	13.08 ± 1.14	54	< 0.001	0.07
	0.2	14.38 ± 0.64	49	< 0.001	



by

Tabella 3: GRANULOMA POUCH DA CROTON-OIL NEL RATTO

Attività antiessudativa/anti-granulomatosa di AD₅ per somministrazione i.p.
nel ratto ripetuta per 5 giorni consecutivi.
Al 6° giorno: sacrificio a prelievo essudato raccolto nella sacca
sottocutanea esame macroscopico della parete granulomatosa
della sacca.

Farmaco di confronto: Fenilbutazone (PBZ)

N. 6 animali/gruppo

Trattamento i.p.	Dose mg/kg	Volume essudato ml $\pm$ s.e.	Inib. %	Aspetto macrosc. parete sacca
Controlli	---	1.53 $\pm$ 0.31		Intensa iperemia notevole spessore
AD ₅	0.05 x 5gg	1.98 $\pm$ 0.08*	44	modesta iperemia parete sottile
	0.1 x 5gg	1.38 $\pm$ 0.06*	61	
PBZ	50 x 5gg	1.42 $\pm$ 0.08*	60	modesta iperemia parete sottile
	100 x 5gg	0.70 $\pm$ 0.06*	80	

*) $p < 0.01$ t-Student

Tabella 4: PERITONITE DA ACIDO ACETICO NEL RATTO

Effetti di AD₅ per somministrazione endovenosa eseguita 5 min. prima
dell'iniezione i.p. di acido acetico (10 ml/kg soluzione 0.5%).

N. 5 animali/gruppo

Trattamento i.v.	Dose mg/kg	Volume essudato ml $\pm$ s.e.	p t-Student	Inib. %
Controlli	---	2.22 $\pm$ 0.07	-----	-----
AD ₅	0.025	2.00 $\pm$ 0.05	<0.05	10
	0.05	1.90 $\pm$ 0.05	<0.01	14
	0.075	1.62 $\pm$ 0.06	<0.001	27
	0.1	1.22 $\pm$ 0.05	<0.001	45
	0.2	1.68 $\pm$ 0.06	<0.001	24
	0.4	2.06 $\pm$ 0.07	n.s.	7



g

TABELLA 4A
PERITONITE DA ACIDO ACETICO NEL RATTO

Effetti di AD6 per somministrazione orale.

Trattamento os eseguito 1 h prima dell'iniezione i.p. di acido acetico (10 ml/kg soluzione 0.5%)

N. 5 animali per gruppo

Trattamento	Dose mg/kg	Volume essudato ml $\pm$ e.s.	P t-student	Inibizione %
-------------	------------	----------------------------------	----------------	--------------

orale: 1 h prima

Controlli	---	2.22 $\pm$ 0.08	---	---
AD6	0.025	1.95 $\pm$ 0.08	<0.05	12
	0.05	1.90 $\pm$ 0.07	<0.05	14
	0.075	1.68 $\pm$ 0.09	<0.01	24
	0.1	1.48 $\pm$ 0.06	<0.001	33
	0.2	1.62 $\pm$ 0.06	<0.001	27



67

TABELLA 4B

CINETICA DELL'ATTIVITA' ANTI-ESUDATIVA NEL RATTO
(PERITONITE AC. ACETICO)

Time-course dell'attività antiessudativa di AD6 per somministrazione orale nel ratto eseguita a vari intervalli di tempo prima del test.

Dose: 0.1 mg/kg os

N.5 animali per gruppo.

Trattamento os	tempo (ore)	Volume essudato ml $\pm$ e.s.	Inibizione %	P t-Student
Controlli AD6	0.16	2.30 $\pm$ 0.11 1.98 $\pm$ 0.07	-- 14	<0.05
Controlli AD6	0.5	2.16 $\pm$ 0.09 1.68 $\pm$ 0.07	-- 22	<0.01
Controlli AD6	1	2.22 $\pm$ 0.08 1.56 $\pm$ 0.06	-- 33	<0.001
Controlli AD6	2	2.24 $\pm$ 0.06 1.62 $\pm$ 0.06	-- 27	<0.001
Controlli AD6	3	2.30 $\pm$ 0.09 1.82 $\pm$ 0.07	-- 21	<0.01
Controlli AD6	5	2.28 $\pm$ 0.08 2.00 $\pm$ 0.08	-- 12	n.s.
Controlli AD6	6	2.24 $\pm$ 0.07 2.12 $\pm$ 0.06	-- 5	n.s.



bp

Tabella 5: EDEMA DELLA ZAMPA DA SEROTONINA NEL RATTO

Attività antiedemigena di AD₅ per somministrazione i.p. nel ratto eseguita 10 min. prima del test.
Farmaci di confronto: Fenilbutazone (PBZ)
Dipropetadina (CYP)

N. 5 animali per gruppo (controlli n = 10)

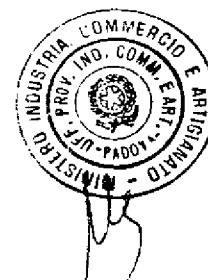
Trattamento i.p.	Dose mg/kg	Volume essudato ml $\pm$ s.e.	P t-Student	Ind. V
Controlli	---	0.54 $\pm$ 0.03	-----	-----
AD ₅	0.05	0.48 $\pm$ 0.03	n.s.	11
	0.075	0.43 $\pm$ 0.02	<0.05	20
	0.1	0.33 $\pm$ 0.02	<0.01	19
	0.15	0.40 $\pm$ 0.02	<0.01	26
PBZ	100	0.50 $\pm$ 0.03	n.s.	7
CYP	0.5	0.12 $\pm$ 0.02	<0.01	78

Tabella 6: EDEMA DELLA ZAMPA DA SEROTONINA NEL RATTO

Attività antiedemigena di AD₅ per somministrazione i.v. nel ratto eseguita 5 min. prima del test.

N. 5 animali per gruppo

Trattamento i.v.	Dose mg/kg	Volume essudato ml $\pm$ s.e.	P	Ind. V
Controlli	---	0.48 $\pm$ 0.02	-----	-----
AD ₅	0.01	0.42 $\pm$ 0.03	<0.05	13
	0.05	0.36 $\pm$ 0.02	<0.01	25
	0.1	0.46 $\pm$ 0.02	n.s.	4



6

TABELLA 7

WRITHING TEST DA FENILCHINONE NEL TOPO

Attività antalgica di AD6 per somministrazione orale nel topo
eseguita 1 h prima del test.

N.6 animali/dose.

Trattamento ca	Dose mg/kg	N. WRITHES in 5'	$\pm$ e.s	P t-Student	INIBIZIONE %	ED ₅₀ approx mg/kg
Controlli	---	29.5	$\pm$ 1.02	---	--	
AD6	0.025	20.8	$\pm$ 0.90	<0.001	29	0.07
	0.05	19.0	$\pm$ 1.04	<0.001	35	
	0.075	17.2	$\pm$ 0.75	<0.001	42	
	0.1	14.2	$\pm$ 0.78	<0.001	51	
	0.2	18.8	$\pm$ 0.49	<0.001	36	



REDA
PARTE II
2000
G

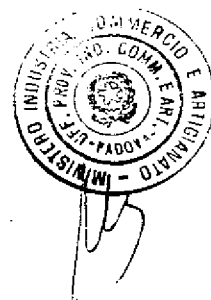
TABELLA 8

WRITHING TEST DA FENILCHINONE NEL TOPO

Attività antalgica di AD6 per somministrazione intraperitoneale nel topo
eseguita 5 min prima del test..

N.6 animali/dose.

Trattamento i.p.	Dose mg/kg	N. WRITHES in 5'	$\pm$ e.s	P t-Student	INIBIZIONE %	ED50 approx mg/kg
Controlli	---	30.2	$\pm$ 0.65	---	--	
AD6	0.01	23.2	$\pm$ 0.70	<0.001	23	3.04
	0.025	19.0	$\pm$ 1.04	<0.001	37	
	0.05	16.6	$\pm$ 0.75	<0.001	45	
	0.075	15.0	$\pm$ 0.80	<0.001	50	
	0.1	10.8	$\pm$ 0.70	<0.001	64	
	0.2	13.8	$\pm$ 0.51	<0.001	54	



[Handwritten signature]

TABELLA 9

WRITHING TEST DA PENILCHINONE NEL TOPO

Attività antalgica di AD6 per somministrazione endovenosa nel topo
eseguita 5 min prima del test.

N.6 animali/dose.

Trattamento i.v.	Dose mg/kg	N. WRITHES in 5'	$\pm$ e.s.	P t-Student	INIBIZIONE %	ED50 (L.F.) mg/kg
Controlli	---	29.3	$\pm$ 0.95	---	--	
AD6	0.0005	20.2	$\pm$ 0.87	<0.001	30	0.0022 (0.0006-0.009)
	0.001	16.5	$\pm$ 0.77	<0.001	44	
	0.005	10.2	$\pm$ 0.70	<0.001	65	
	0.01	6.3	$\pm$ 0.42	<0.001	78	
	0.02	3.2	$\pm$ 0.60	<0.001	72	
	0.1	11.7	$\pm$ 0.81	<0.001	60	



[Handwritten signature]

57

TABELLA 10

CINETICA DELL'ATTIVITA' ANTALGICA NEL TOPO
(WRITHING DA FENILCHINONE)

Time-course dell'attività antalgica di AD6 per somministrazione orale
nel topo eseguita a vari intervalli di tempo prima del test.

Dose: 10.1 mg/kg os

N.6 animali per gruppo.

Trattamento os	tempo (ore)	Writhing n. ± e.s.	Inibizione %	P t-Student
Controlli AD6	0.5	30.0 ± 1.03 24.6 ± 0.80	-- 18	<0.01
Controlli AD6	1	29.5 ± 1.02 14.2 ± 0.78	-- 52	<0.001
Controlli AD6	2	29.8 ± 0.65 16.0 ± 0.85	-- 46	<0.001
Controlli AD6	3	30.0 ± 1.02 14.0 ± 0.63	-- 53	<0.001
Controlli AD6	4	29.8 ± 0.83 17.3 ± 0.82	-- 40	<0.01
Controlli AD6	6	30.5 ± 1.04 24.6 ± 0.19	-- 19	<0.01



4

TABELLA 11

CINETICA DELL'ATTIVITA' ANTALGICA NEL TOPO

(WRITHING DA FENILCHINONE)

Time-course dell'attività antalgica di AD6 per somministrazione i.p.
nel topo eseguita a vari intervalli di tempo prima del test.

Dose: 0.1 mg/kg i.p.

N.6 animali per gruppo.

Trattamento i.p.	tempo (ore)	writhing n. $\pm$ e.s.	Inibizione %	P t-Student
Controlli AD6	0.08	30.2 $\pm$ 0.75 10.8 $\pm$ 0.70	-- 64	<0.001
Controlli AD6	0.16	29.8 $\pm$ 0.48 11.7 $\pm$ 0.67	-- 61	<0.001
Controlli AD6	0.5	29.5 $\pm$ 1.02 12.2 $\pm$ 1.08	-- 59	<0.001
Controlli AD6	1	29.7 $\pm$ 0.61 17.3 $\pm$ 0.41	-- 41	<0.001
Controlli AD6	3	29.8 $\pm$ 0.95 23.2 $\pm$ 0.92	-- 22	<0.001
Controlli AD6	4	29.8 $\pm$ 0.83 26.0 $\pm$ 0.82	-- 13	<0.01

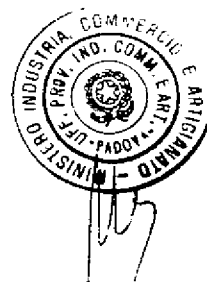


TABELLA 12

CINETICA DELL'ATTIVITA' ANTALGICA NEL TOPO

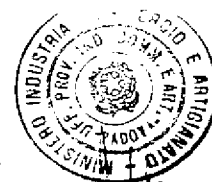
(WRITHING DA FENILCHINONE)

Time-course dell'attività antalgica di AD6 per somministrazione i.v.
nel topo eseguita a vari intervalli di tempo prima del test.

Dose: 0.31 mg/kg i.v.

N.6 animali per gruppo.

Trattamento i.v.	tempo (ore)	writhing n. $\pm$ e.s.	Inibizione %	p t-Student
Controlli AD6	0.08	29.3 $\pm$ 0.95 6.3 $\pm$ 0.42	-- 78	<0.001
Controlli AD6	0.16	29.2 $\pm$ 0.87 7.0 $\pm$ 0.63	-- 76	<0.001
Controlli AD6	0.5	30.0 $\pm$ 0.82 8.3 $\pm$ 0.76	-- 72	<0.001
Controlli AD6	1	29.5 $\pm$ 0.50 11.2 $\pm$ 0.79	-- 62	<0.001
Controlli AD6	2	28.7 $\pm$ 0.88 17.2 $\pm$ 0.79	-- 40	<0.001
Controlli AD6	4	29.5 $\pm$ 0.92 23.3 $\pm$ 0.88	-- 21	<0.01

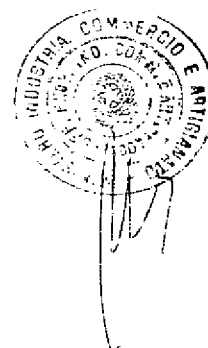


6/

RIVENDICAZIONI

Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione, e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

1. Impiego dell'8-cloro-3-(β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base e relativi sali come principio attivo per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento terapeutico di patologie caratterizzate da elevata produzione di ossido di azoto.
2. Impiego dell'8-cloro-3-(β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base e relativi sali come principio attivo per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento terapeutico di situazioni patologiche, secondo la rivendicazione 1, caratterizzate da vasodilatazione e/o danno tissutale.
3. Impiego dell' 8-cloro-3-(β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base e relativi sali come principio attivo per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento terapeutico, secondo le rivendicazioni 1-2, in cui le patologie da trattare sono ad esempio correlate ad infiammazione polmonare, edema, eritema, dermatite, psoriasi, ulcerazioni cutanee, artrosi, artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni, shock ipotensivo, shock settico, shock ipovolemico, vasculiti, come ad esempio infiammazioni conseguenti a trombo-flebiti, emorroidi, colite ulcerosa.



2013
11/01/2014

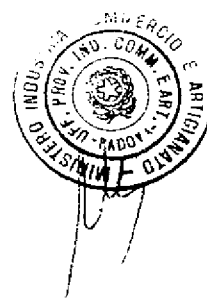
67

4. Impiego di composizioni farmaceutiche secondo le rivendicazioni 1-3, caratterizzate dal fatto di contenere una dose farmacologicamente efficace di detto principio attivo in combinazione con eccipienti e diluenti farmacologicamente accettabili.
5. Composizioni farmaceutiche secondo le rivendicazioni 1-4, contenenti una dose farmacologicamente efficace dell'8-cloro-3-(β -dietilamino-etil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base o di un relativo sale in combinazione con eccipienti e diluenti farmacologicamente accettabili, atte al trattamento terapeutico di patologie caratterizzate da elevata produzione di ossido di azoto.
6. Composizioni farmaceutiche secondo le rivendicazioni 1-5, contenenti una dose farmacologicamente efficace dell'8-cloro-3-(β -dietilamino-etil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base o di un relativo sale, atte al trattamento terapeutico di situazioni patologiche caratterizzate da vasodilatazione e/o danno tissutale.
7. Composizioni farmaceutiche secondo le rivendicazioni 1-6, contenenti una dose farmacologicamente efficace dell'8-cloro-3-(β -dietilamino-etil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base o di un relativo sale, atte al trattamento terapeutico di situazioni patologiche quali ad esempio quelle correlate ad infiammazione polmonare, edema, eritema, dermatite, psoriasi, ulcerazioni cutanee, artrosi, artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni, shock ipotensivo, shock settico, shock ipovolemico, vasculiti, come ad esempio infiammazioni conseguenti a trombo-flebiti, emorroidi, colite ulcerosa.
8. Composizioni farmaceutiche, secondo le rivendicazioni 5-7,



5

9. Composizioni farmaceutiche, secondo le rivendicazioni 5-7, caratterizzate dal fatto di essere preparate in formulazioni per la somministrazione parenterale.
10. Composizioni farmaceutiche, secondo le rivendicazioni 5-7, caratterizzate dal fatto di essere preparate in formulazioni per la somministrazione topica.
11. Metodo terapeutico per il trattamento di patologie caratterizzate da elevata produzione di ossido di azoto, consistente nella somministrazione di una dose farmacologicamente accettabile dell'8-cloro-3-(β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi-cumarina base o di un relativo sale, da solo o in associazione con altri farmaci.
12. Metodo terapeutico per il trattamento di patologie caratterizzate da vasodilatazione e/o danno tissutale, consistente nella somministrazione di una dose farmacologicamente accettabile dell'8-cloro-3-(β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base o di un relativo sale, da solo o in associazione con altri farmaci.
13. Metodo terapeutico secondo le rivendicazioni 11-12 per il trattamento di situazioni patologiche quali ad esempio quelle correlate ad infiammazioni polmonari, edema; eritema, dermatite, psoriasi, ulcerazioni cutanee; artrosi, artrite reumatoide ed altre malattie autoimmuni, shock ipotensivo, shock settico, shock ipovolemico, vasculiti, come ad esempio infiammazioni conseguenti a trombo-flebiti,



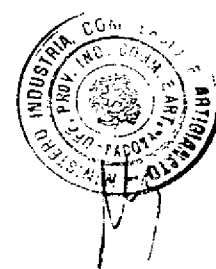
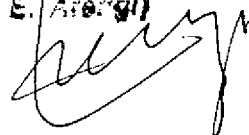
emorroidi, coliti ulcerose, consistente nella somministrazione di una dose farmacologicamente accettabile dell'8-cloro-3-(β -dietilaminoetil)-4-metil-7-etossicarbonilmetossi cumarina base o di un relativo sale, da solo o in associazione con altri farmaci.

14. Metodo terapeutico, secondo le rivendicazioni 10-13, caratterizzato dal fatto che detta somministrazione è effettuata per via orale.
15. Metodo terapeutico, secondo le rivendicazioni 10-13, caratterizzato dal fatto che detta somministrazione è effettuata per via parenterale.
16. Metodo terapeutico, secondo le rivendicazioni 10-13, caratterizzato dal fatto che detta somministrazione è effettuata per via endovenosa.
17. Metodo terapeutico, secondo le rivendicazioni 10-13, caratterizzato dal fatto che detta somministrazione è effettuata per via topica.

FIDIA s.p.a.

PRESIDENT

(Dr. E. Argeri)



67

DERMATITE DA CROTON OIL

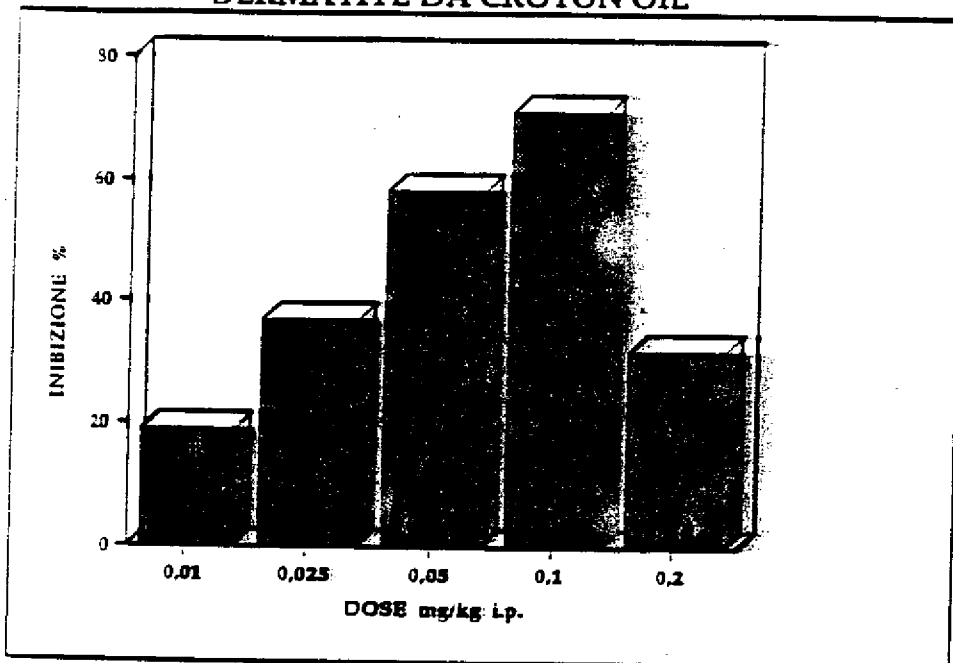


FIG. 4

Dermatite essudativa da croton-oil nell'orecchio del topo.

Attività antiedemigena di AD6 per somministrazione i.p. eseguita 10 minuti prima del test.

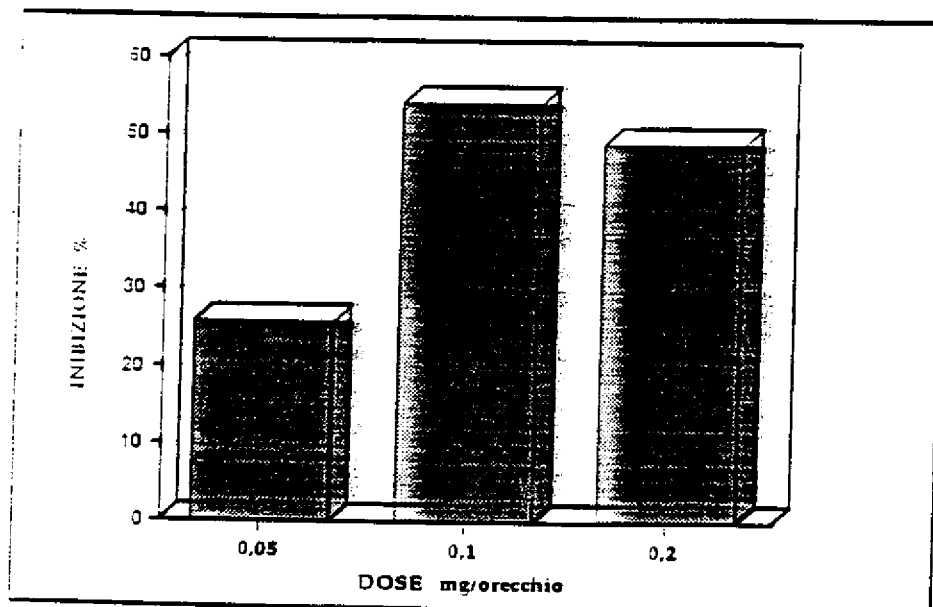


FIG. 5

Dermatite essudativa da croton-oil nell'orecchio del topo.

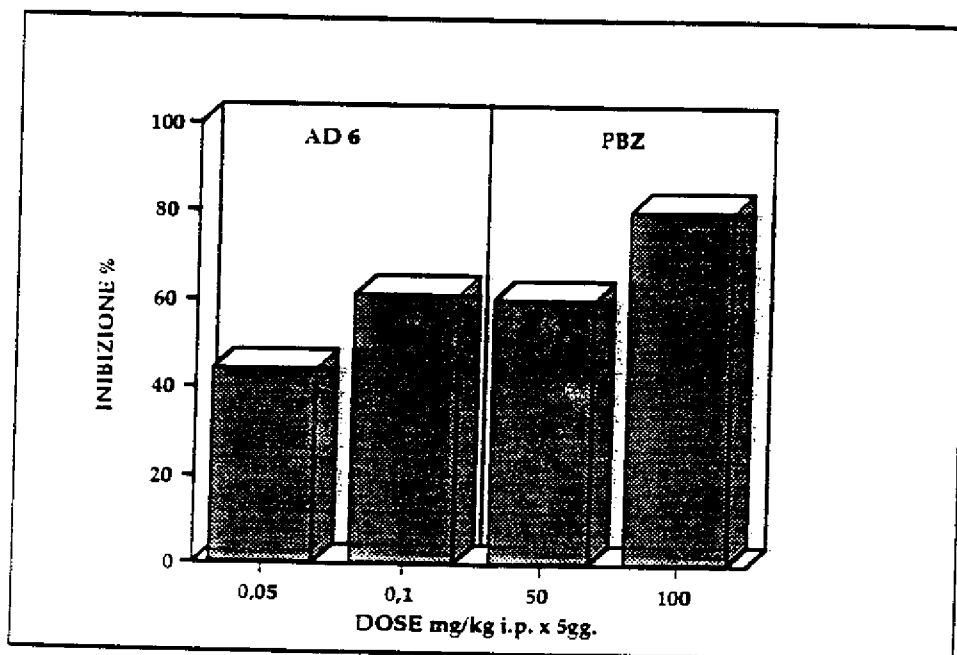
Attività antiedemigena di AD6 per applicazione locale (insieme al croton oil)



69

GRANULOMA POUCH DA CROTON OIL NEL RATTO

FIG. 5 A



bf

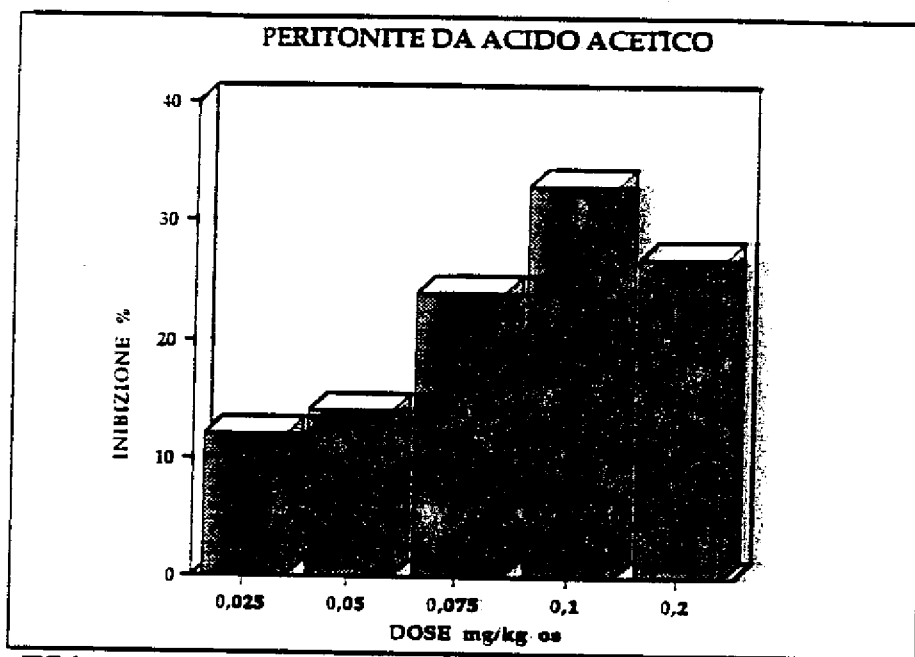


FIG.6

Peritonite da acido acetico nel ratto.

Effetto anti-essudativo di AD6 per somministrazione orale
eseguita 1 ora prima del test.

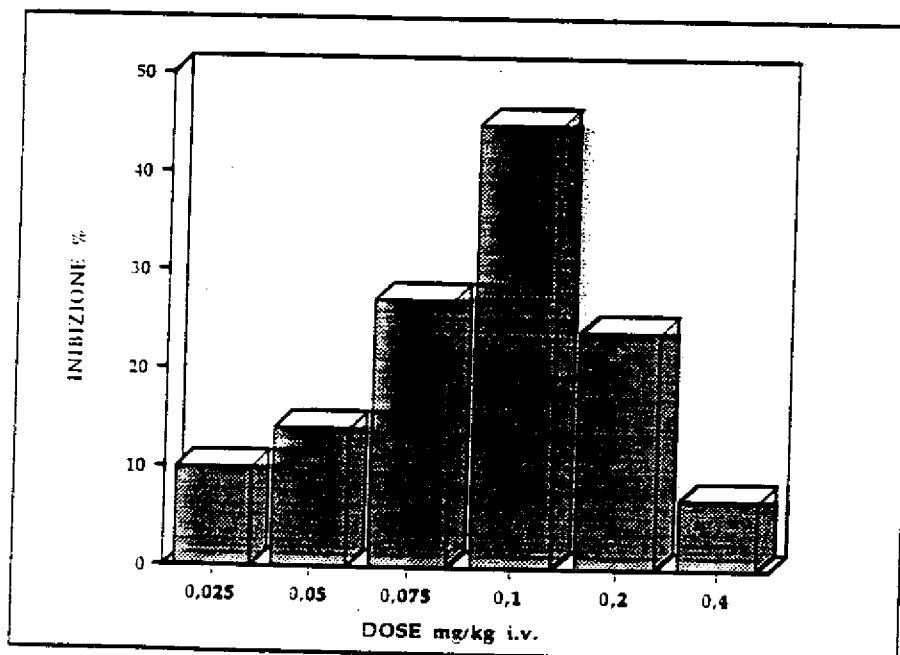


FIG.7

Peritonite da acido acetico nel ratto.

Effetto anti-essudativo di AD6 per somministrazione i.v. eseguita
5 minuti prima del test.



[Signature]

67

**CINETICA DELL'ATTIVITA' ANTI-ESSUDATIVA NEL RATTO
(PERITONITE DA ACIDO ACETICO)**

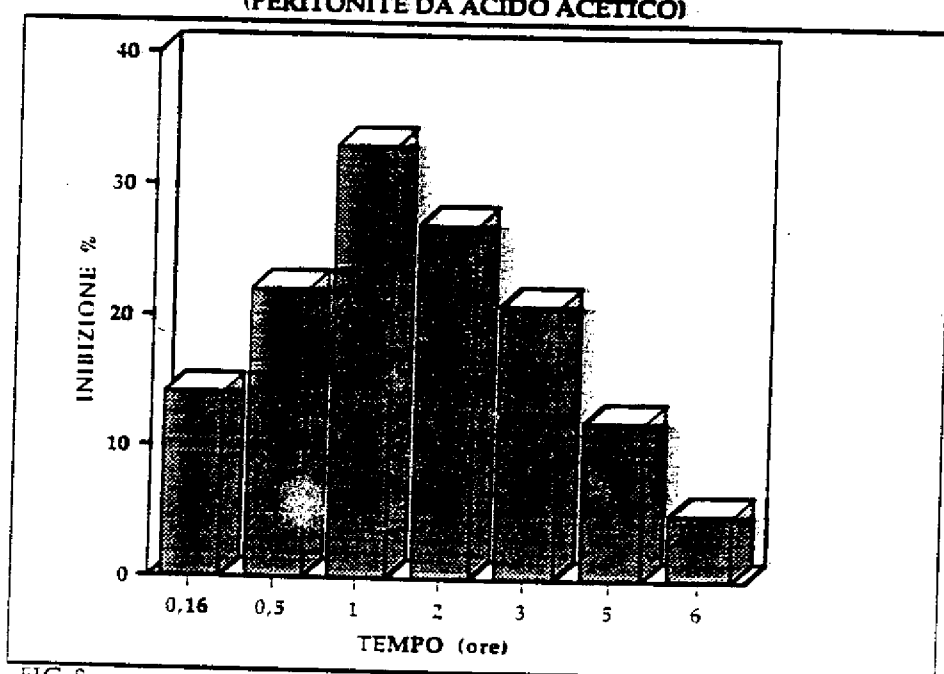


FIG.8

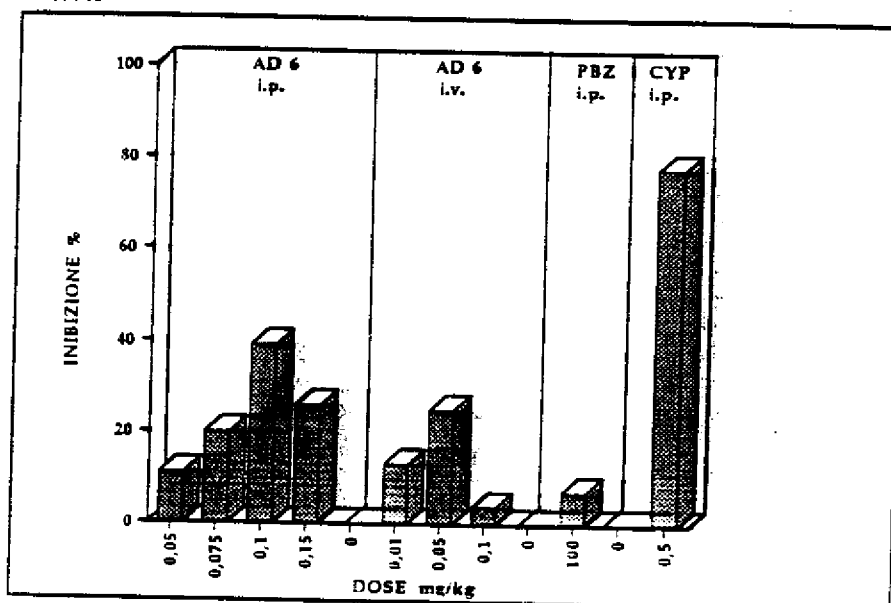
Time-course dell'effetto anti-essudativo di AD6 per
somministrazione orale (0.1 mg/kg)



bf

EDEMA DA SEROTONINA DELLA ZAMPA DI RATTO

FIG. 8 A



CINETICA DELL'ATTIVITA' ANTALGICA NEL TOPO
(WRITHING DA FENILCHINONE)

FIG. 9

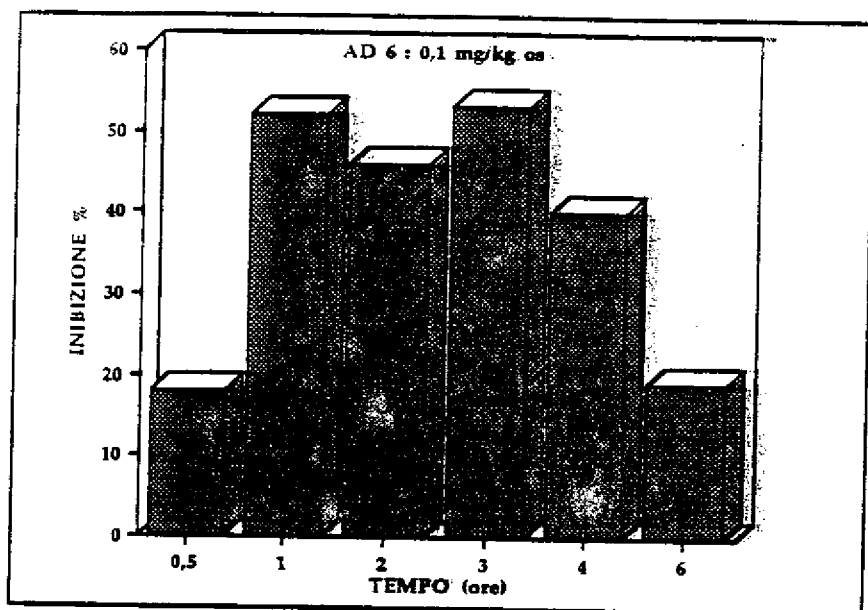


FIG. 10

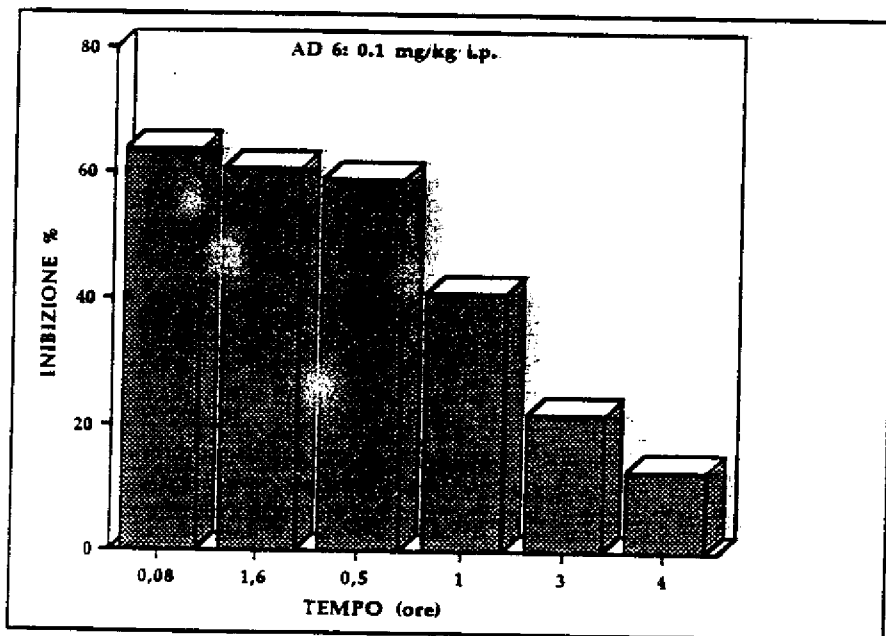
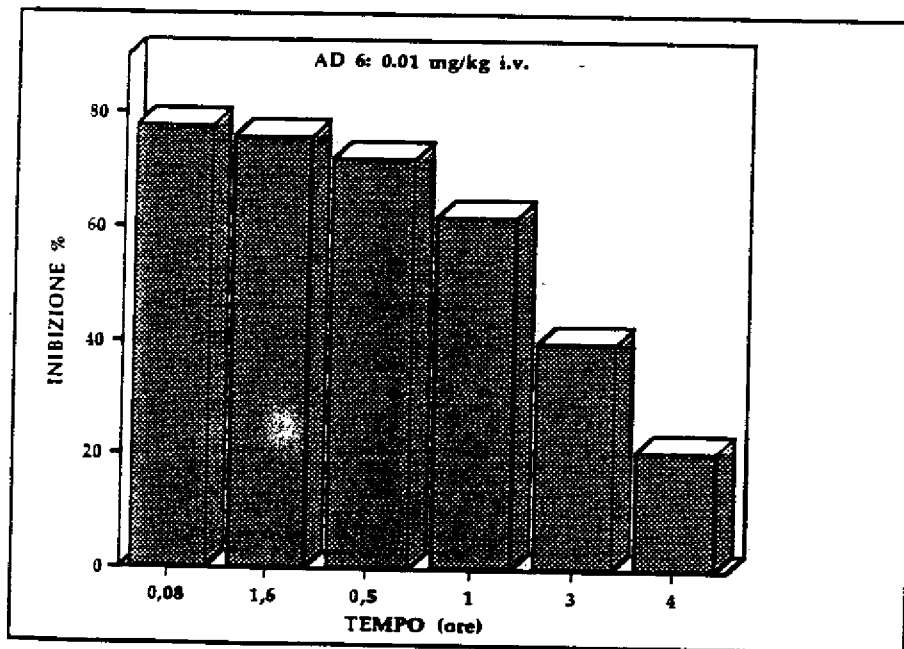


FIG. 11



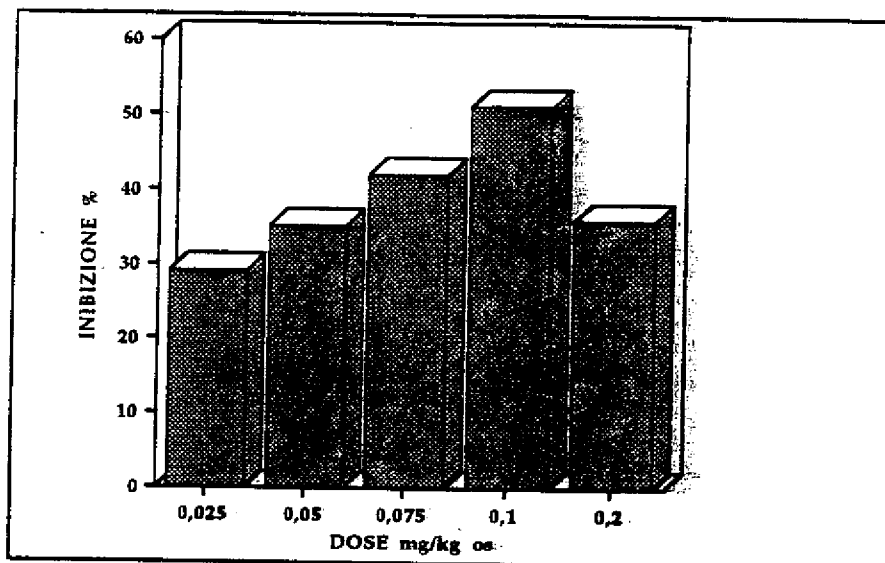
FIDIA
FARMACEUTICI ITALIANI
ABANO TERME (PD)
c.f. 00204201253

Gf



WRITHING TEST DA FENILCHINONE NEL TOPO

FIG.12.



FIDIA
FARMACEUTICI ITALIANI
ABANO TERME (PD)
c.f. 00204260285

Handwritten signature

FIG.13

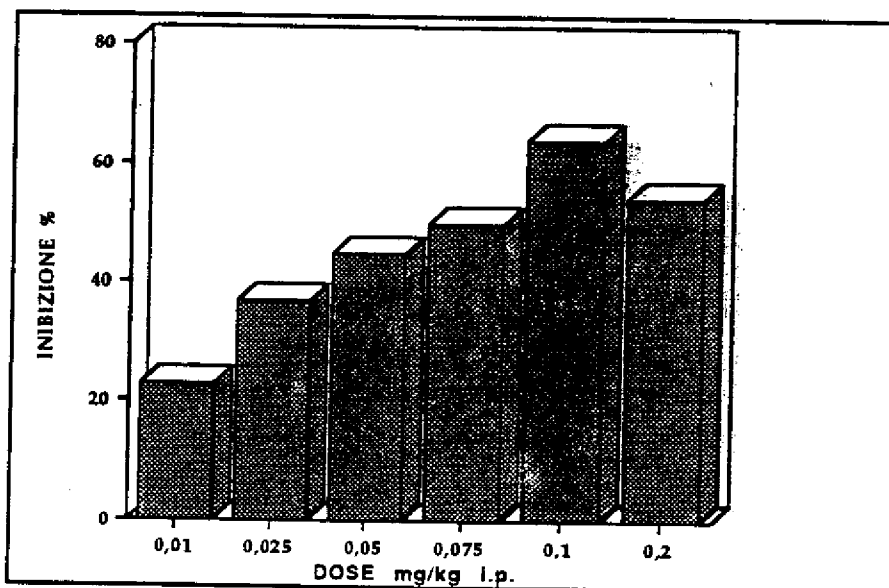
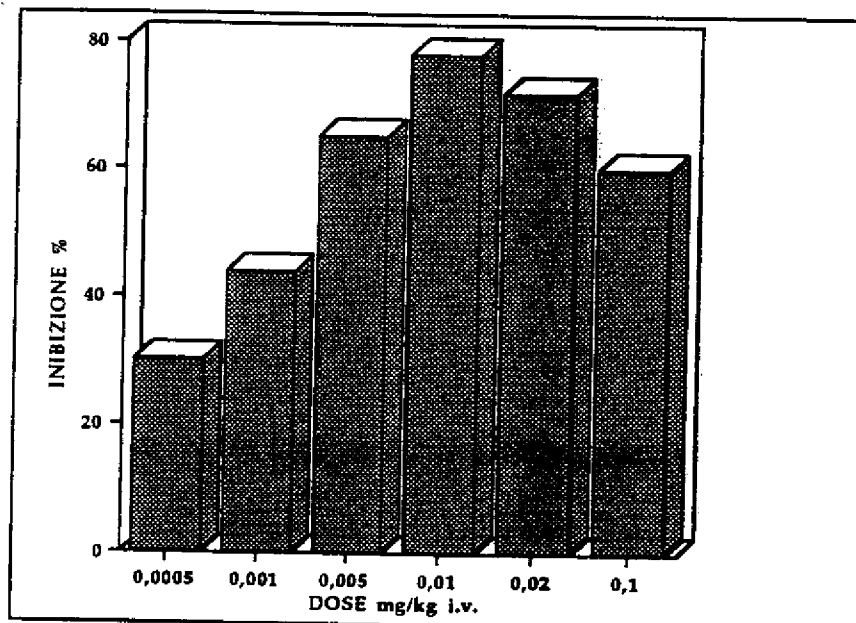


FIG.14



Handwritten signature