

MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	**102001900907374**
Data Deposito	**08/02/2001**
Data Pubblicazione	**08/08/2002**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

NUOVI DERIVATI BENZAMIDINICI DOTATI DI ATTIVITA' ANTI-INFIAMMATORIA ED IMMUNOSOPPRESSIVA.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo: "Nuovi derivati benzamidinici dotati di attività anti-infiammatoria ed immunosoppressiva"

Di: ROTTA RESEARCH LABORATORIUM S.p.A., nazionalità italiana, Via Valosa di Sopra 7/9, 20052 Monza (Milano)

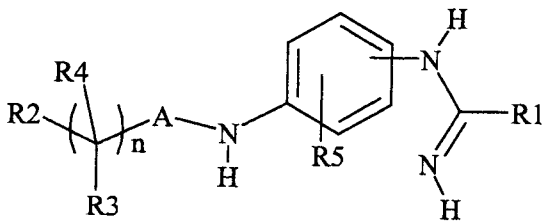
Inventori designati: Francesco MAKOVEC, Simona ZANZOLA, Roberto ARTUSI e Lucio ROVATI

Depositata il: 8 FEB. 2001 TO 2001A 000110

***

DESCRIZIONE

La presente invenzione ha per oggetto nuovi derivati amidinici della fenilendiammina che possono essere rappresentati dalla formula generale (I) sotto indicata ed in cui:



(I)

- A è scelto indipendentemente tra il gruppo carbossamido, il gruppo tiocarbossammido, il gruppo carbonile;
- R_1 è scelto tra un gruppo alchile avente da 1 a 3 atomi di carbonio ed il gruppo ammino semplice o

JACOBACCI & PERANI S.p.A.

PR/cp

sostituito con il gruppo nitro o metile;

- R_2 è scelto indipendentemente tra idrogeno, un gruppo alchile avente da 1 a 4 atomi di carbonio, il gruppo metossi, etossi, propossi, un residuo cicloalcanico mono-, bi- o triciclico avente da 5 a 12 atomi di carbonio, il gruppo adamantilico, un gruppo arile, naftile o eterociclico semplice o sostituito con gruppi metile, metossi, idrossi, ammino o alogeno;
- R_3 ed R_4 sono scelti indipendentemente tra idrogeno ed un gruppo alchile avente da 1 a 3 atomi di carbonio;
- R_5 è scelto indipendentemente tra idrogeno, ed i gruppi metile, metossile ed ossidrile;
- n è un numero intero da 0 a 6;
- il gruppo amidinico è in posizione para o meta al gruppo "-A-NH-".

I composti della presente invenzione dimostrano di essere dei potenti antagonisti di diversi mediatori dell'infiammazione e sono inoltre dotati di proprietà immunorepressive. In vitro essi dimostrano di essere degli inibitori della Nitrico Ossido Sintasi inducibile (iNOS) e dell'enzima ciclo-ossigenasi (COX). In vivo dimostrano di essere dei potenti inibitori della citochina "tumour necrosis

factor" (TNFα). Inoltre molti dei prodotti oggetto dell'invenzione sono in grado di antagonizzare l'attività collagenasica delle metallo-proteasi.

L'ossido nitrico (NO) è formato a livello cellulare dalla L-arginina per mezzo dell'enzima NOS. Esistono tre sotto tipi di questo enzima. L'enzima inducibile (iNOS) in presenza di citochine pro-infiammatorie o di endotossine è espresso in molti tipi di cellule tra cui macrofagi e neutrofili.

La vasodilatazione, una caratteristica dell'infiammazione acuta, dipende per molti mediatori del processo infiammatorio, come ad esempio istamina, bradichinina, sostanza P, PAF etc. dal rilascio di NO. In generale l'NO potenzia le risposte infiammatorie in numerosi modelli sperimentali sia acuti che cronici.

E' da notare che l'NO può essere prodotto massivamente in risposta ad uno stimolo indotto da citochine nelle articolazioni infiammate di pazienti con artrite reumatoide ed osteoartrite e che le concentrazioni plasmatiche nel liquido sinoviale di NO in questi pazienti sono generalmente molto elevate.

E' inoltre interessante il fatto che l'attività della iNOS è molto elevata anche nel colon di pa-

zienti con colite ulcerativa.

Le prostaglandine (PGE) sono dei mediatori dell'infiammazione generati dall'enzima ciclo-ossigenasi (COX). L'isoforma inducibile (COX-2) è sovraprodotta ("upregulated") nei tessuti infiammati e ciò comporta una aumentata sintesi di PGE.

Esistono delle interazioni tra i sistemi NOS e COX e pertanto il ruolo del NO nell'infiammazione può dipendere non solo dal suo effetto diretto ma anche dal suo effetto modulatorio sulla bio-sintesi delle PGE.

TNFα è una citochina primaria che inizia la cascata di eventi che caratterizzano un processo infiammatorio inducendo la sintesi e la liberazione di citochine secondarie ed enzimi quali le metallo proteasi (MMP, tra cui la collagenasi), iNOS e COX-2. Come già accennato, la mucosa intestinale è una delle sedi più importanti della produzione di citochine pro-infiammatorie, come osservato in patologie quali l'infiammazione cronica del colon (IBS) e la colite ulcerativa.

Si può pertanto ritenere che i composti oggetto della presente invenzione possano essere usati con vantaggio nella terapia di diverse malattie dell'uomo caratterizzate da un'infiammazione non spe-

cifica, come ad esempio l'artrite reumatoide, una sindrome a decorso cronico che può evolvere in una distruzione progressiva delle strutture articolari e periarticolari, l'osteoartrosi, una malattia caratterizzata dalla degenerazione della cartilagine articolare accompagnata spesso da un'infiammazione secondaria della membrana sinoviale, oppure in altre forme patologiche come nell'apparato gastrointestinale la colite ulcerosa, la malattia di Crohn, l'IBS o le allergie e le intolleranze alimentari.

Si può preconizzare un favorevole impiego dei composti oggetto dell'invenzione anche in altri distretti ed apparati, come nel trattamento di patologie dell'apparato cardiovascolare a base infiammatoria o aterosclerotica sensibili al trattamento di inibitori della iNOS.

Inoltre per i composti oggetto dell'invenzione dotati di attività inibente le MMP si può prevederne un favorevole utilizzo nella terapia di forme tumorali, potendo essi potenzialmente prevenire l'invasione localizzata o metastatica di cellule tumorali, sia inibendo l'attivazione di vari fattori di crescita sia bloccando l'angiogenesi.

Un enorme numero di studi è stato effettuato nella ricerca di farmaci ad attività anti-infiamma-

toria capaci di esplicare un'azione inibente le citochine pro-infiammatorie e che fossero privi degli effetti collaterali dei farmaci anti-infiammatori classici (COX inibitori).

Recentemente in un lavoro monografico Chiou et al. [Exp. Opin. Ther. Patents 6(1), 41-56 (1996)] hanno recensito un gran numero di pubblicazioni e brevetti in cui sono descritte diverse classi di composti che inibiscono la produzione di citochine, bloccando il loro rilascio oppure i loro recettori o i loro enzimi convertenti. Parimenti sono stati pubblicati molti lavori monografici sugli inibitori delle MMP come ad esempio quello di Summers et al [Annual Reports in Med. Chemistry 33, 131-140 (1998)] in cui vengono esaminate diverse classi chimiche di inibitori le MMP e discusso il loro potenziale terapeutico. Tra gli altri sono stati pubblicati dei brevetti in cui viene descritta l'attività NO Sintasi inibitrice di varie amidine come ad esempio nel brevetto PCT/GB/92/02387 e nel brevetto PCT/GB/94/01325.

I composti descritti sono tuttavia dei derivati amidinici di amminoacidi, molto simili strutturalmente a derivati analoghi della L-arginina come la L-N-monometilarginina, oggetto del brevetto WO91/

IACOBACCI & PERANI S.p.A.

04024, ma diversi sia strutturalmente che come attività farmacologica complessiva delle benzamidine oggetto della presente invenzione.

Tutte queste pubblicazioni e ricerche dimostrano come esista una forte richiesta terapeutica per trovare nuovi farmaci anti-infiammatori sempre più potenti e meglio tollerati. In accordo con tale necessità, l'oggetto della presente invenzione è quello di mettere a disposizione della terapia nuovi farmaci dotati contemporaneamente di attività anti-infiammatorie ed immunorepressive, esplicate mediante la loro attività combinata iNOS e COX antagonista, quella inibente le MMP e quella inibente la produzione di TNF-α e di poter essere quindi usati favorevolmente nella terapia di patologie dell'uomo caratterizzate da un'infiammazione non specifica o su base autoimmune.

Forme farmaceutiche dei composti oggetto dell'invenzione possono essere preparate secondo tecniche convenzionali come ad esempio compresse, confetti, capsule, supposte, sospensioni, soluzioni, cerotti, creme o pomate e possono essere somministrate per via orale, parenterale, rettale, transdermica o transmucosale od altre forme adeguate per ottenere l'effetto terapeutico, come ad esempio

MODIANO & PERANI S.p.A.

preparazioni solide per uso orale ad azione protratta che permettano il rilascio controllato nel tempo della sostanza attiva.

L'ingrediente attivo viene somministrato al paziente di norma con una dose di riferimento variabile da 0,1 a 10 mg/kg di peso corporeo per dose.

Per la somministrazione per via parenterale è preferibile l'impiego di un sale idrosolubile dei composti in oggetto, come il cloridrato oppure un altro sale derivato da un acido inorganico od organico non tossico e farmaceuticamente accettabile. Per i derivati dell'invenzione a carattere lievemente acido, come i derivati in cui R_1 è il gruppo nitro-ammino si possono preparare con metodi convenzionali i corrispondenti sali sodici o equivalenti.

Come ingredienti inattivi si possono usare sostanze comunemente impiegate in tecnica farmaceutica come eccipienti, leganti, aromatizzanti, disaggreganti, sostanze stimolanti l'assorbimento transdermico e transmucosale, coloranti, umettanti ecc..

Il procedimento per la preparazione dei derivati oggetto dell'invenzione consiste in una serie di reazioni che comprende:

a) far reagire la 1,3 oppure la 1,4-fenilendiammi-

na di formula (IV) opportunamente sostituita ed in cui R_5 ha il significato sopra riportato, con l'opportuno isotiocianato (VA) o cloruro acilico (VB) o isocianato (VC), in cui R_2, R_3, R_4 ed n hanno il significato sopra riportato, in presenza di un eccesso di feniledíammina, in un solvente inerte ed ad una temperatura compresa tra 4°C e quella di riflusso del solvente utilizzato, a dare le aniline corrispondenti di formula (III) in cui R_2, R_3 R_4, R_5, A ed n hanno il significato sopra riportato ed in cui il gruppo amminico è in posizione meta o para alla catena con il gruppo "A-NH"(vedasi lo schema generale di sintesi, passaggio 1);

b) far reagire le aniline di formula (III) in cui R_2, R_3, R_4, R_5, A ed n hanno il significato sopra riportato con l'opportuno imidato di formula II, generalmente salificato sotto forma di cloridrato, in cui R_1 ha il significato sopra riportato.

La reazione procede in presenza di un eccesso di (II) rispetto a (III) (preferibilmente di 2 moli a 1) ed in presenza di una quantità stechiometrica riferita a (II) di una base terziaria, preferibilmente trietilammina, in un solvente inerte anidro, come ad esempio tetraidrofurano, ad una temperatura compresa tra 4°C e quella di ebollizione del sol-

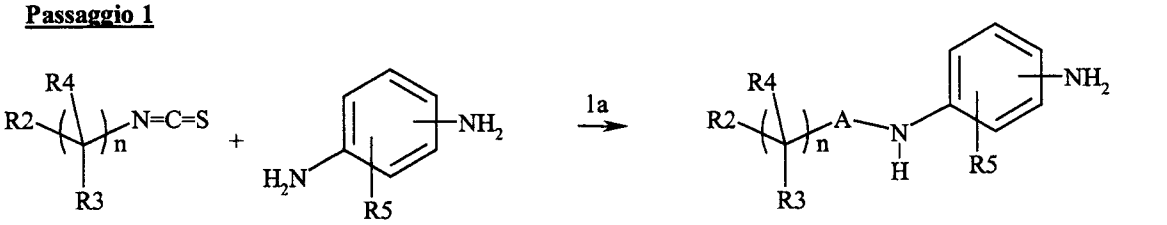
vente per un tempo compreso tra 2 e 48 ore a dare i corrispondenti derivati finali di formula (I), in cui A, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 ed n hanno il significato sopra riportato ed in cui il gruppo amidinico è in posizione para o meta al gruppo "A-NH".

I composti di formula (I) descritti in Tabella 2 (I-30 e I-31) sono stati ottenuti utilizzando reattivi diversi da quelli di formula generale (II) ed in particolare, rispettivamente, il benzotriazolo-1-carbossammidinio tosilato (vedi Esempio 5) e la N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina (vedi Esempio 6).

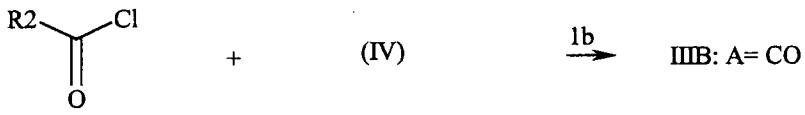
Le fenilendiammine di partenza, così come gli isotiocianati (VA), gli acil cloruri (VB), gli isocianati (VC) e gli imidati di formula (II) sono reperibili in commercio oppure sono stati preparati con metodi convenzionali secondo la letteratura esistente.

Schema generale di sintesi (Schema 1)

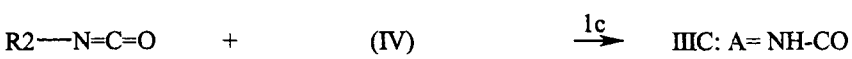
Passaggio 1



(VA) (IV) (III) IIIA: A = NH-CS

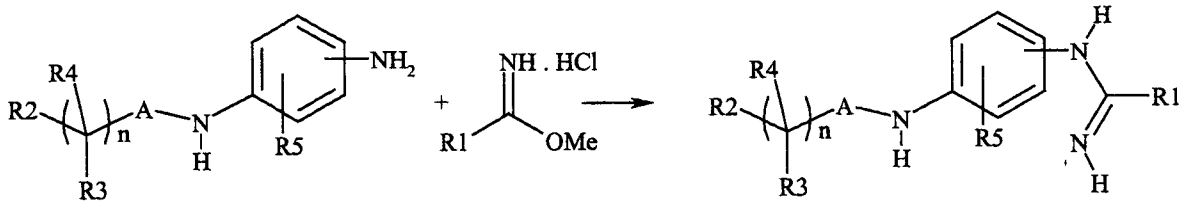


(VB)



(VC)

Passaggio 2



(III) (II) (I)

I seguenti esempi vengono qui di seguito riportati per meglio illustrare l'invenzione.

Esempio 1

Preparazione della N-(4-amminofenil)-N'-pentiltiourea (Composto III-4 di Tabella 1).

71.8 g di 1,4-fenilendiammina (0.66 mol) vengono sospesi in 300 ml di tetraidrofurano e 43 g di pentilisotiocianato (0.33 mol), sciolti in 50 ml di tetraidrofurano, sono gocciolati lentamente sotto agitazione ed a temperatura ambiente. Dopo 24 ore il solvente viene evaporato sotto vuoto ed il residuo, ripreso con acetato di etile, viene lavato con acqua, acido citrico 0.1 N, sodio bicarbonato saturo, acqua fino a pH neutro. Il solvente viene anidrificato con sodio solfato anidro ed evaporato sotto vuoto ottenendo 75 g di prodotto grezzo che viene ricristallizzato da toluene. Ottenuti 60 g.

Formula: $C_{12}H_{19}N_3S$ (P.m. 237.46). Resa 77%.

TLC: (Cloroformio/Metanolo 9/1) rf 0.7. P.f. 125°C.

HPLC: tempo di ritenzione (rt) 4.60 minuti.

Condizioni HPLC: colonna Supelcosil LC-DP, 100 x 4.6 mm, eluente KH_2PO_4 0.01M 25/MetOH 27/ MetCN 48 (pH 2.1), flusso 0.4 ml/min, detector UV a 248 nm.

^{1}HNMR (DMSO-d_6), ppm: 2.21 (bt, 3H, J = 5.60 Hz); 0.98-1.71 (m, 6H); 3.33 (q, 2H, J = 6.68 Hz); 4.93 (bs, 2H); 6.45 (d, 2H, J = 8.59 Hz); 6.81 (d, 2H, J = 8.59 Hz); 7.05 (m, 1H); 8.88 (s, 1H).

Tutti i composti intermedi di formula (III) secondo l'invenzione in cui A è il gruppo tiocarbossammido sono stati sintetizzati impiegando la medesima procedura (vedi Schema 1, passaggio 1a).

Esempio 2

Preparazione della N-(4-amminofenil)-N'-pentilamide (Composto III-22 di Tabella 1).

20.2 g di 1,4-fenilendiammina (0.181 mol) vengono sciolti in 200 ml di tetraidrofurano assieme a 11.1 ml di trietilammina (0.080 mol). La soluzione viene raffreddata a 0°C e 10 ml di caproil cloruro (0.0724 mol) sono gocciolati lentamente in modo che la temperatura non superi 5°C. Finita l'aggiunta si fa salire la temperatura a quella ambiente. Dopo 24 ore di reazione il solvente viene evaporato sotto vuoto ed il residuo, ripreso con acetato di etile, viene lavato con acqua. Il solvente viene anidrificato con sodio solfato anidro ed evaporato sotto vuoto ottenendo 12 g di prodotto grezzo che viene ricristallizzato da toluene. Ottenuti 7.5 g.

Formula: $C_{12}H_{18}N_2O$ (P.m. 206.28). Resa 51%

IACOBACCI & PERANI S.p.A

TLC: (Cloroformio/Metanolo 9/1) rf 0.51. P.f. 88.5-89°C.

HPLC: tempo di ritenzione (rt) 5.54 minuti.

Condizioni HPLC: vedi esempio 1.

^{1}HNMR (DMSO-d_6), ppm: 0.86 (bt, 3H, J = 5.59 Hz); 1.03-1.79 (m, 6H); 2.18 (t, 2H, J = 6.99 Hz); 4.69 (s, 2H); 6.43 (d, 2H, J = 8.39 Hz); 7.15 (d, 2H, J = 8.39 Hz); 9.28 (s, 1H).

Esempio 3

Preparazione della N-(4-amminofenil)-N'-cicloesilurea (Composto III-28 di Tabella 1).

10.4 g di 1,4-fenilendiammina (0.095 mol) vengono sospesi in 100 ml di tetraidrofurano e 5 ml di cicloesilisocianato (0.038 mol), sciolti in 20 ml di tetraidrofurano, sono gocciolati lentamente sotto agitazione ed a temperatura ambiente. Dopo 24 ore si filtra il solido formatosi lavando con tetraidrofurano freddo, acqua ed etere etilico. Ottenuti 8.8 g.

Formula: $C_{13}H_{19}N_3O$ (P.m. 233.31). Resa 98%

TLC: (Cloroformio/Metanolo 9/1) rf 0.40. P.f. 199.8-202.4°C.

HPLC: tempo di ritenzione (rt) 6.39 minuti.

Condizioni HPLC: vedi esempio 1.

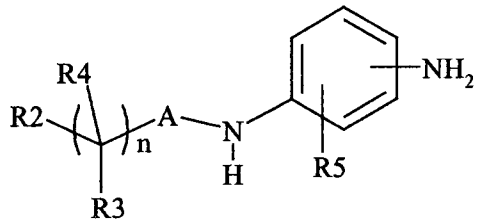
^{1}HNMR (DMSO-d_6), ppm: 0.75-2.00 (m, 10H); 3.47

ALBAGLI & PERANI S.p.A.

(m, 1H); 4.62 (bs, 2H); 5.75 (d, 2H, J = 7.50 Hz); 6.49 (d, 2H, J = 8.75 Hz); 7.00 (d, 2H, J = 8.75 Hz); 7.75 (bs, 1H).

Nella seguente Tabella 1 vengono riportati alcuni derivati di formula (III), ottenuti secondo quanto descritto, con alcune caratteristiche chimico-fisiche che li identificano.

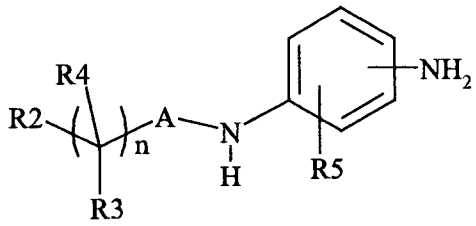
Tabella 1: Composti di formula (III)



(III)

Composto	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristallizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
III-1	CH_3	-	0	NH-CS	$C_8H_{11}N_3S$	173.5-174.2 (A)	0.65 (I)
III-2	CH_3	H	2	NH-CS	$C_{10}H_{15}N_3S$	118.6-120.2	0.58 (I)
III-3	CH_3	H	3	NH-CS	$C_{11}H_{17}N_3S$	124.5-127	0.67(I)
III-4	CH_3	H	4	NH-CS	$C_{12}H_{19}N_3S$	113-115 (B)	0.70 (I)
III-5	CH_3	H	5	NH-CS	$C_{13}H_{21}N_3S$	119.5-120.3	0.75 (I)
III-6	CH_3	H	6	NH-CS	$C_{14}H_{23}N_3S$	107.0-107.4	0.75 (I)
III-7	Isopropil	H	2	NH-CS	$C_{12}H_{19}N_3S$	153.5-154.6 (B)	0.60 (I)

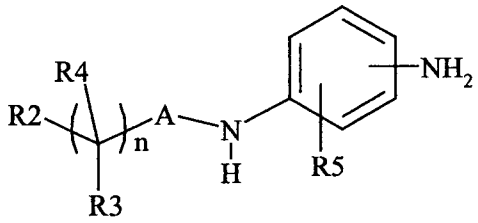
Tabella 1: Composti di formula (III)



(III)

Composto	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristallizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
III-8	CH_3	CH_3	1	NH-CS	$C_{10}H_{15}N_3S$	137.2-137.8 (B)	0.63 (I)
III-9	Etil	CH_3	1	NH-CS	$C_{12}H_{19}N_3S$	165.6-166.8	0.75 (I)
III-10	CH_3-O	H	3	NH-CS	$C_{11}H_{17}N_3OS$	104.6-105.2	0.65 (I)
III-11	Cicloesil	-	0	NH-CS	$C_{13}H_{19}N_3S$	168.6-169.4	0.70 (I)
III-12	Fenil	-	0	NH-CS	$C_{13}H_{13}N_3S$	263.0-264.0 (A)	0.79 (II)
III-13	Fenil	H	2	NH-CS	$C_{15}H_{17}N_3S$	168.2-169.0	0.83 (II)
III-14	Fenil	H	3	NH-CS	$C_{16}H_{19}N_3S$	117.3-117.9	0.83 (II)
III-15	4-F-Fenil	H	2	NH-CS	$C_{15}H_{17}ClFN_3S$	190.2-191.6	0.85 (II)

Tabella 1: Composti di formula (III)

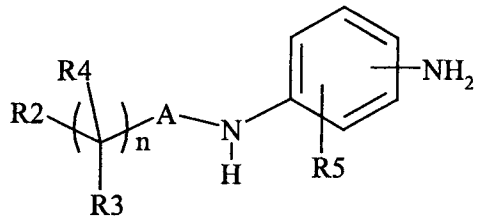


(III)

Composto	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristallizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
III-16	4-Cl-Fenil	H	2	NH-CS	$C_{15}H_{16}ClN_3S$	116.6-116.7	0.83 (II)
III-17	2,6-diF-Fenil	H	2	NH-CS	$C_{15}H_{15}F_2N_3S$	147.7-149.7	0.50 (I)
III-18	2-Piridil	H	1	NH-CS	$C_{13}H_{14}N_4S$	106.0-108.0	0.41 (I)
III-19	2-Piridil	H	2	NH-CS	$C_{14}H_{16}N_4S$	82.0-84.0	0.38 (I)
III-20	5-CH_3-2-Tiazolil	-	0	NH-CS	$C_{11}H_{12}N_4S_2$	157.5-159.0	0.40 (I)
III-21	CH_3	H	4	NH-CS	$C_{14}H_{23}N_3S$	101.4-102.8	0.75 (I)
III-22	CH_3	H	4	CO	$C_{12}H_{18}N_2O$	88.5-89.0 (B)	0.51 (I)
III-23	Cicloesil	-	0	CO	$C_{13}H_{18}N_2O$	176.1-177.0 (B)	0.50 (I)

IACOBACCI & PERANI S.p.A.

Tabella 1: Composti di formula (III)

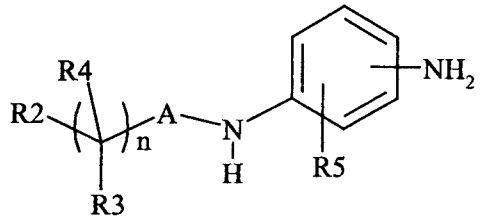


(III)

Composto	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristallizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
III-24	1-Adamantil	-	0	CO	$C_{17}H_{22}N_2O$	169.6-171.2	0.45 (I)
III-25	2-Indolil	-	0	CO	$C_{15}H_{13}N_3O$	193.8-194.9 (A)	0.47 (I)
III-26	3-Indolil	H	1	CO	$C_{16}H_{14}N_3O$	122.0-122.7 (B)	0.40 (I)
III-27	1-CH_3-2-Indolil	-	0	CO	$C_{16}H_{15}N_3O$	232.6-235.3	0.55 (I)
III-28	Cicloesil	-	0	NH-CO	$C_{13}H_{19}N_3O$	199.8-202.4	0.40 (I)
III-29	Cicloesil	-	0	NH-CS	$C_{13}H_{19}N_3S$	101.0-102.8	0.70 (I)

BACCHADORI & PERANI S.p.A.

Tabella 1: Composti di formula (III)



(III)

Composto	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristallizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]

Nota: a) Tutti i composti esemplificati hanno R_4 eguale ad H con l'eccezione del composto III-9 in cui R_4 è uguale a CH_3

b) Tutti i composti esemplificati hanno il gruppo amminico in para al gruppo "NH-A" con l'eccezione del composto III-29 in cui il gruppo amminico è in meta al gruppo "NH-A".

c) Tutti i composti esemplificati hanno R_5 eguale ad H eccetto il composto III-21 in cui R_5 è 2,5-dimetile.

d) Solvente di cristallizzazione: A (isopropanolo); B (toluene).

e) Eluente: (I) cloroformio/metanolo (9/1) (v/v); (II) cloroformio/metanolo/ acqua/ammoniaca (85/25/2/1) (v/v).

Esempio 4

Preparazione della N-[4-(N-acetamidino)fenil]-N'-pentiltiourea (Composto I-4 di Tabella 2).

55 g di N-(4-amminofenil)-N'-pentiltiourea (0.23 mol) vengono sciolti in 300 ml di tetraidrofurano. Si aggiungono 64.5 ml di trietilammina (0.46 mol) e 50.7 g di metilacetimmidato cloridrato (0.46 mol) sotto agitazione a temperatura ambiente; il pH della sospensione è circa 9. Dopo 24 ore (il pH scende fino a 7) si filtra il solido lavando con poco tetraidrofurano ed etere etilico. Il residuo ripreso con acqua viene basificato con soda 4N fino a pH 11 e lasciato sotto agitazione per 1 ora, poi filtrato, lavato con acqua, etere etilico e purificato a caldo con acetonitrile. Ottenuti 51 g.

Formula: $C_{14}H_{22}N_4S$ (P.m. 278.42). Resa 80%.

TLC: (Butanolo/Acido acetico/Acqua 5/2/2) rf 0.70; (Cloroformio/Metanolo saturo di ammoniaca 9/1) rf 0.37. P.f. 191.4°C.

HPLC: tempo di ritenzione (rt) 7.70 minuti.

Condizioni HPLC: vedi Esempio 1.

^{1}HNMR (DMSO-d_6), ppm: 0.88 (bt, 3H, J = 5.60 Hz); 1.00-1.55 (m, 6H); 1.82 (s, 3H); 3.35 (m, 2H); 5.91 (bs, 1H); 6.63 (d, 2H, J = 8.56 Hz); 7.11 (d, 2H, J = 8.56 Hz); 7.28 (bs, 1H); 9.08 (bs, 1H).

Tutti i derivati di formula (I) in cui R1 è metile si preparano analogamente impiegando l'opportuna anilina di formula (III) al posto della N-(4-amminofenil)-N'-pentiltiourea.

Esempio 5

Preparazione della 1-guanidinofenil-4-cicloesiltiourea (Composto I-30 di Tabella 2).

15 g di N-(4-amminofenil)-N'-cicloesiltiourea (0.06 mol) vengono sospesi in 100 ml di acetonitrile e 20 g di benzotriazolo-1-carbossammidinio tosilato [0.06 mol, Katrizky, A. R. et al. Synth. Comm. 25(8), 1173-1186, (1995)] vengono aggiunti sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 72 ore il solvente viene evaporato sotto vuoto ed il residuo, ripreso con acetato di etile, viene lavato con sodio idrossido 0.1 N ed estratto con acido citrico 0.1 N. La fase acquosa è portata a pH 9 con sodio idrossido 2N, estratta con acetato di etile e la fase organica lavata con acqua. Il solvente è anidrificato su sodio solfato anidro ed evaporato sotto vuoto ottenendo 8 g di prodotto grezzo, purificato con etere isopropilico. Ottenuti 7.4 g.

Formula: $C_{14}H_{21}N_5S$ (P.m. 291.42). Resa 43%.

TLC: (Butanolo/Acido acetico/Acqua 5/2/2) rf 0.71. P.f. 188.6°C.

HPLC: tempo di ritenzione (rt) 8.0 minuti.

Condizioni HPLC: vedi Esempio 1.

^{1}HNMR (DMSO-d_6), ppm: 0.67-2.17 (m, 10H); 4.05 (m, 1H); 5.73 (bm, 6H); 6.71 (d, 2H, J = 8.43 Hz); 7.17 (d, 2H, J = 8.43 Hz).

Esempio 6

Preparazione della 1-nitroguanidinofenil-4-cicloesiltiourea (Composto I-31 di Tabella 2).

9 g di N-(4-amminofenil)-N'-cicloesiltiourea (0.036 mol) vengono sospesi in 140 ml di una miscela etanolo/acqua 1/1 e 3 g di N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina [0.021 mol, McKay, A. F. J. Am. Chem. Soc. 71, 1968-1970,(1949)] vengono aggiunti sotto agitazione a temperatura ambiente. Dopo 2 ore a temperatura ambiente la miscela di reazione è stata scaldata a riflusso per 1 ora, il precipitato che si forma filtrato a caldo, lavato con etere etilico ed essiccato. Ottenuti 3.8 g.

Formula: $C_{14}H_{20}N_6O_2S$ (P.m. 336.41). Resa 54%.

TLC: (Butanolo/Acido acetico/Acqua 5/2/2) rf 0.95. P.f. 215.2°C.

HPLC: tempo di ritenzione (rt) 4.16 minuti.

Condizioni HPLC: vedi Esempio 1.

^{1}HNMR (DMSO-d_6), ppm: 0.84-1.99 (m, 10H); 4.01 (m, 1H); 7.15 (d, 2H, J = 8.76 Hz); 7.42 (d, 2H, J

IACOBACCI & PERANI S.p.A.

= 8.76 Hz); 7.52 (bd, 1H, J = 7.64 Hz); 8.03 (bs, 2H); 9.28 (s, 1H); 9.42 (bs, 1H).

Esempio 7

Preparazione della N-[4-(N-acetamidino)fenil]-N'-pentiltiourea cloridrato (Cloridrato del Composto I-4).

3 g di N-[4-(N-acetamidino)fenil]-N'-pentiltiourea (0.011 mol) vengono sciolti in HCl 1N. Dopo 0.5 ore a temperatura ambiente il precipitato che si forma viene filtrato, lavato con poca acqua, con etere etilico ed essiccato. Ottenuti 3.2 g.

Formula: $C_{14}H_{23}ClN_4S$ (P.m. 314.88). Resa 93%.

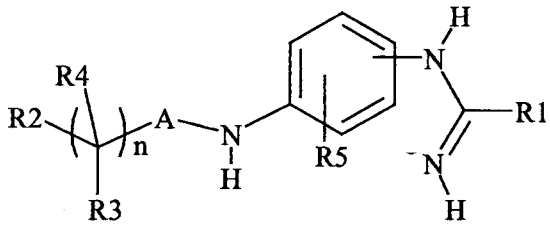
TLC: (Butanolo/Acido acetico/Acqua 5/2/2) rf 0.70. P.f. 180.6°C.

^{1}HNMR (DMSO-d_6), ppm: 0.84 (t, 3H, J = 5.60 Hz); 1.02-1.78 (m, 6H); 2.28 (s, 3H); 3.43 (bq, 2H, J = 6.05 Hz); 7.15 (d, 2H, J = 8.56 Hz); 7.73 (d, 2H, J = 8.56 Hz); 8.39 (m, 1H); 9.42 (bs, 1H); 10.38 (s, 1H); 11.28 (s, 1H).

Nella seguente Tabella 2 vengono riportati alcuni derivati di formula (I), ottenuti secondo l'invenzione, con alcune caratteristiche chimico-fisiche che li identificano, senza che per questo essi limitino in alcun modo lo spirito e lo scopo dell'invenzione stessa.

S.p.A.

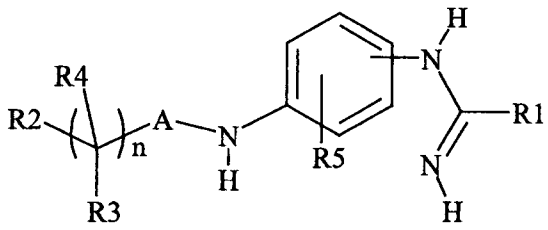
Tabella 2: Composti di formula (I)



(I)

	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristal-lizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
	I-1	CH_3	CH_3	-	0	NH-CS	$C_{10}H_{14}N_4S$	186.2-187.8	0.50
	I-2	CH_3	CH_3	H	2	NH-CS	$C_{12}H_{18}N_4S$	188.1-189.1 (A)	0.70
	I-3	CH_3	CH_3	H	3	NH-CS	$C_{13}H_{20}N_4S$	182.3-183.1 (A)	0.72
	I-4	CH_3	CH_3	H	4	NH-CS	$C_{14}H_{22}N_4S$	190.7-191.4 (A)	0.71
	I-5	CH_3	CH_3	H	5	NH-CS	$C_{15}H_{24}N_4S$	177.6-178.0	0.80
	I-6	CH_3	CH_3	H	6	NH-CS	$C_{16}H_{26}N_4S$	177.8-178.4	0.80
	I-7	CH_3	Isopropil	H	2	NH-CS	$C_{14}H_{22}N_4S$	177.7-179.1 (A)	0.58

Tabella 2: Composti di formula (I)

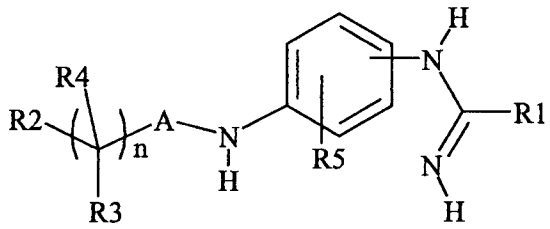


(I)

	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristal-lizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
	I-8	CH_3	CH_3	CH_3	1	NH-CS	$C_{12}H_{18}N_4S$	163.0-163.9 (A)	0.58
	I-9	CH_3	Etil	CH_3	1	NH-CS	$C_{14}H_{22}N_4S$	145.7-147.4 (B)	0.61
	I-10	CH_3	CH_3-O	H	3	NH-CS	$C_{13}H_{24}N_4OS$	146.9-149.6 (B)	0.54
	I-11	CH_3	Cicloesil	-	0	NH-CS	$C_{15}H_{22}N_4S$	171.3-171.6 (A)	0.60
	I-12	Etil	Cicloesil	-	0	NH-CS	$C_{16}H_{24}N_4S$	155.0-156.0	0.66
	I-13	CH_3	Fenil	H	0	NH-CS	$C_{15}H_{16}N_4S$	118.7-120.5	0.70
	I-14	CH_3	Fenil	H	2	NH-CS	$C_{17}H_{20}N_4S$	186.6-188	0.63

JACOBACCI & PERANI S.p.A.

Tabella 2: Composti di formula (I)

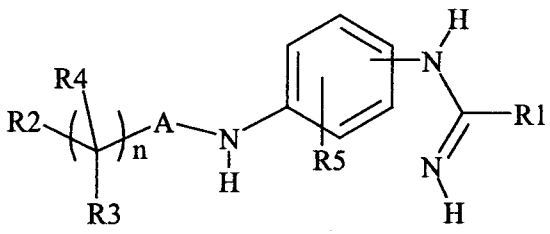


(I)

	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristal-lizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
	I-15	CH_3	Fenil	H	3	NH-CS	$C_{18}H_{22}N_4S$	146.6-148.0 (B)	0.60
	I-16	CH_3	4-F-Fenil	H	2	NH-CS	$C_{17}H_{19}FN_4S$	179.1-181.6	0.57
	I-17	CH_3	4-Cl-Fenil	H	2	NH-CS	$C_{17}H_{19}ClN_4S$	174.0-176.0 (A)	0.60
	I-18	CH_3	2,6-diF-Fenil	H	2	NH-CS	$C_{17}H_{18}F_2N_4S$	158.8-160.4	0.58
	I-19	CH_3	2-Piridil	H	1	NH-CS	$C_{15}H_{17}N_5S$	159.0-161.0 (A)	0.48
	I-20	CH_3	2-Piridil	H	2	NH-CS	$C_{16}H_{19}N_5S$	171.5-173.0 (A)	0.42
	I-21	CH_3	5-CH_3-2-Tiazolil	-	0	NH-CS	$C_{13}H_{15}N_5S_2$	107.8-110.1	0.45

JACOBACCI & PERANI S.p.A.

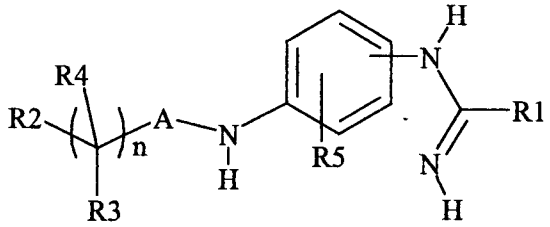
Tabella 2: Composti di formula (I)



(I)

	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristal-lizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
	I-22	CH_3	CH_3	H	4	NH-CS	$C_{16}H_{26}N_4S$	118-121.7 (B)	0.61
	I-23	CH_3	CH_3	H	4	CO	$C_{14}H_{21}N_3O$	160.4-161.6	0.60
	I-24	CH_3	Cicloesil	-	0	CO	$C_{15}H_{21}N_3O$	194.6-195.8 (B)	0.60
	I-25	CH_3	1-Adamantil	-	0	CO	$C_{19}H_{25}N_3O$	224.4-224.7	0.61
	I-26	CH_3	2-Indolil	-	0	CO	$C_{17}H_{16}N_4O$	192.0-193.5	0.61
	I-27	CH_3	3-Indolil	H	1	CO	$C_{18}H_{18}N_4O$	159.0-160.0	0.51
	I-28	CH_3	1-CH_3-2-Indolil	-	0	CO	$C_{18}H_{18}N_4O$	195.5-196.5	0.68

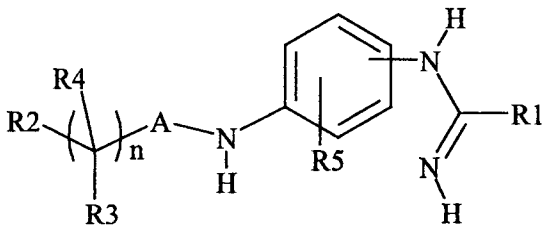
Tabella 2: Composti di formula (I)



(I)

	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristal-lizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]
	I-29	CH_3	Cicloesil	-	0	NH-CO	$C_{15}H_{22}N_4O$	220.2-224.6	0.50
	I-30	NH_2	Cicloesil	-	0	NH-CS	$C_{14}H_{21}N_5S$	176.5-179.4	0.71
	I-31	NO_2-NH	Cicloesil	-	0	NH-CS	$C_{14}H_{20}N_6O_2S$	213.9-215.2	0.95
	I-32	CH_3	Cicloesil	-	0	NH-CS	$C_{15}H_{22}N_4S$	171.4-173.2	0.66

Tabella 2: Composti di formula (I)



(I)

	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	Formula bruta	P.F. (solvente di cristallizzazione)[d]	TLC (R_f)[e]

Nota: a) Tutti i composti esemplificati hanno R_4 eguale ad H con l'eccezione del composto I-9 in cui R_4 è uguale a CH_3

b) Tutti i composti esemplificati hanno il gruppo amminico in para al gruppo "NH-A" con l'eccezione del composto I-32 in cui il gruppo amminico è in meta al gruppo "NH-A".

c) Tutti i composti esemplificati hanno R_5 eguale ad H eccetto il composto I-22 in cui R_5 è 2,5-dimetile.

d) Solvente di cristallizzazione: A (acetonitrile); B (toluene).

e) Eluente: butanolo/acido acetico/ acqua (5/2/2) (v/v).

ATTIVITA' FARMACOLOGICA

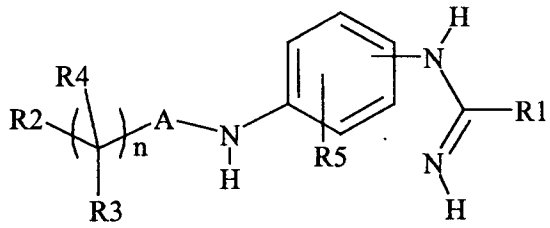
a) L'attività inibente la formazione di NO misurata come NO_2^-(nitriti), PGE_2 e proteasi neutre è stata studiata in vitro su terreni di coltura di condrociti articolari di coniglio stimolati con la citochina IL-1β (1 ng/ml) per 48 ore. Per la preparazione dei condrociti si è seguito il metodo descritto da Berenbaum et al. [FEBS Letters 340, 51-55 (1994)]. Brevemente, frammenti di cartilagine asportata in sterilità dai capi articolari di spalla, anca e ginocchio di coniglio, sono stati sminuzzati finemente e digeriti a 37°C da soluzioni di ialuronidasi, tripsina e collagenasi dando luogo, dopo filtrazione su garza sterile e centrifugazione a 600 x g ed opportuna diluizione con DMEM-FCS 10%, ad una concentrazione per pozzetto di circa $1x10^5$ cellule. Le cellule sono state mantenute in queste condizioni fino a confluenza (circa 15 giorni), cambiando il terreno ogni 3 giorni. A questo punto ad ogni provetta si sono aggiunti i prodotti in esame sciolti nel medium e dopo 20 minuti si sono aggiunti IL-1β, 350 μl, per avere una concentrazione finale di 1 ng/ml. La stimolazione ha una durata di 48 h a 37°C (incubazione aria-CO_2 7%). Successi-

JACOBACCI & PERANI S.p.A.

vamente sul surnatante cellulare si è effettuato il dosaggio dei nitriti secondo quanto descritto da Green et al. [Anal. Biochem. 126, 131-138 (1982)] e delle PGE_2 mediante dosaggio RIA. Il dosaggio delle proteasi neutre è stato fatto sul surnatante cellulare contenente l'attivatore p-aminophenylmercurio acetato (APMA) utilizzando azocoll come substrato ed incubando a 37°C per 17 h secondo quanto descritto da Chavira et al. [Anal. Biochem. 136, 446-450 (1984)]. Per valutare l'effetto inibitorio diretto dei composti in esame sull'attività idrolitica del surnatante cellulare, essi sono stati aggiunti al surnatante contenente le proteasi indotte da IL-1β e già attivate da AMPA.

I risultati ottenuti sono mostrati in Tabella 3 in cui viene riportata, per alcuni dei composti oggetto dell'invenzione e già esemplificati in Tabella 2, la IC_{50}, cioè la concentrazione (micromolare) di antagonista capace di inibire del 50% la formazione di nitriti, PGE_2 e rispettivamente proteasi neutre rispetto al gruppo controllo, cioè alle cellule stimolate con IL-1β ma senza aggiunta di antagonisti.

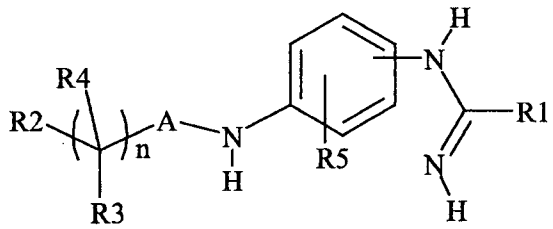
Tabella 3: Composti di formula (I)



(I)

							Condrociti articolari di coniglio		
	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	NO	PGE2	MP
							IC_{50} ($x10^{-6}M$)		
	I-1	CH_3	CH_3	-	0	NH-CS	IN	IN	30
	I-2	CH_3	CH_3	H	2	NH-CS	IN	IN	30
	I-3	CH_3	CH_3	H	3	NH-CS	190	250	13.3
	I-4	CH_3	CH_3	H	4	NH-CS	6.6	3.3	6.6
	I-5	CH_3	CH_3	H	5	NH-CS	10.0	10.0	3.3
	I-6	CH_3	CH_3	H	6	NH-CS	30.0	20.0	20.0
	I-7	CH_3	Isopropil	H	2	NH-CS	3.3	6.6	13.3
	I-8	CH_3	CH_3	CH_3	1	NH-CS	30.0	3.3	3.3
	I-9	CH_3	C_2H_5	CH_3	1	NH-CS	10.0	10.0	6.6

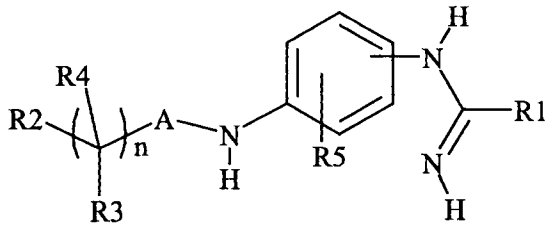
Tabella 3: Composti di formula (I)



(I)

							Condrociti articolari di coniglio		
	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	NO	PGE2	MP
							IC_{50} ($x10^{-6}M$)		
	I-10	CH_3	CH_3-O	H	3	NH-CS	50.0	50.0	6.6
	I-11	CH_3	Cicloesil	-	0	NH-CS	110	16.6	30
	I-12	Etil	Cicloesil	-	0	NH-CS	IN	13.3	100
	I-13	CH_3	Fenil	H	0	NH-CS	100	10	6.6
	I-14	CH_3	Fenil	H	2	NH-CS	100	33	6.6
	I-15	CH_3	Fenil	H	3	NH-CS	33	16.6	6.6
	I-16	CH_3	4-F-Fenil	H	2	NH-CS	13.3	26.6	6.6
	I-17	CH_3	4-Cl-Fenil	H	2	NH-CS	10.0	10	10
	I-18	CH_3	2,6-diF-Fenil	H	2	NH-CS	IN	6.6	6.6

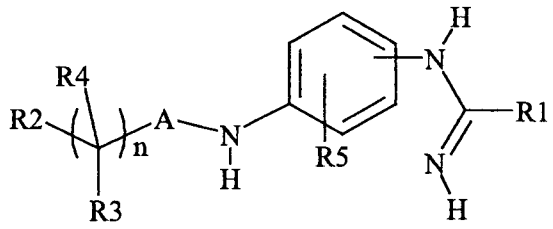
Tabella 3: Composti di formula (I)



(I)

							Condrociti articolari di coniglio		
	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	NO	PGE2	MP
							IC_{50} ($x10^{-6}M$)		
	I-19	CH_3	2-Piridil	H	1	NH-CS	300	IN	13.3
	I-20	CH_3	2-Piridil	H	2	NH-CS	16.6	16.6	6.6
	I-21	CH_3	5-CH_3-2-Tiazolil	-	0	NH-CS	66.6	IN	IN
	I-22	CH_3	CH_3	H	4	NH-CS	16.6	10.0	20.0
	I-23	CH_3	CH_3	H	4	CO	100	IN	IN
	I-24	CH_3	Cicloesil	-	0	CO	33.3	33.3	IN
	I-25	CH_3	1-Adamantil	-	0	CO	IN	16.6	IN
	I-26	CH_3	2-Indolil	-	0	CO	300	IN	IN
	I-27	CH_3	3-Indolil	H	1	CO	10	IN	IN

Tabella 3: Composti di formula (I)



(I)

							Condrociti articolari di coniglio		
	Composto	R_1	R_2	R_3	n	A	NO	PGE2	MP
							IC_{50} ($x10^{-6}M$)		
	I-28	CH_3	1-CH_3-2-Indolil	-	0	CO	IN	100	IN
	I-29	CH_3	Cicloesil	-	0	NH-CO	25.0	6.6	25.0
	I-30	NH_2	Cicloesil	-	0	NH-CS	6.6	10	13.3
	I-31	NO_2-NH	Cicloesil	-	0	NH-CS	46.6	30	6.6
	I-32	CH_3	Cicloesil	-	0	NH-CS	300	300	IN
L-NAME	-	-	-	-	-	-	IN	3(mM)	IN

Nota: a) per l'identificazione strutturale vedi le note a, b e c di tabella 2

b) NO determinato come nitriti

c) MP: metallo proteasi

Dai dati riportati in Tabella 3 si evince che alcuni dei composti testati ed oggetto dell'invenzione esplicano un potente effetto inibitorio, a livello micromolare, sulla produzione di nitriti, PGE_2 e metallo proteasi indotta dalla citochina IL-1β in colture di condrociti di coniglio. I composti migliori sono quelli in cui R_1 è CH_3, R_3 ed R_4 sono H, R_2 è CH_3 se n è 4 oppure 5, oppure isopropile se n è 2, oppure il gruppo 2,6-difluoro-fenile se n è 2 ed in cui A è uguale a NH-CS (composti I-4, I-5, I-7 e I-18, rispettivamente). Parimenti molto attivo è anche il composto I-31 in cui R_1 è il gruppo $NH-NO_2$, R_2 è cicloesile ed A è il gruppo NH-CS. E' interessante notare che l'attività inibitoria sulle metallo proteasi è esplicata solamente dai composti in cui A è il gruppo NH-CS. E' da notare inoltre che il composto di riferimento inibitore delle NO Sintasi L-NAME esplica in generale un'attività circa 30-100 volte meno potente dei composti migliori oggetto dell'invenzione come il composto I-4, ed è del tutto inattivo nell'inibire le metallo proteasi.

b) Alcuni dei composti oggetto dell'invenzione, come i composti I-4, I-11 e I-31 sono stati valutati in vivo su una serie di modelli sperimentali di

stravaso nei quali si è iniettato nell'orecchio di topo per via intradermica 5 μl dell'agente flogogeno prescelto disciolto in fisiologica in accordo con quanto descritto da Erdo et al. con lievi modifiche [Agents and Actions 39, 137-142 (1993)].

I prodotti in esame sono stati somministrati per via orale 1 ora prima del challenge, mentre 30 minuti prima del challenge si è iniettato per via endovenosa il colorante Evans Blu alla dose di 100 mg/kg. Gli animali sono stati sacrificati ad un tempo prefissato a seconda del test, 30 min - 2 ore dopo il challenge. Lo stravaso è stato valutato determinando la quantità di colorante presente nell'orecchio estratto dopo omogeneizzazione del tessuto in 2 ml di formamide ed incubando a 50°C per 2 ore. Dopo centrifugazione si è determinato la quantità di colorante misurando l'assorbimento a 620 nm. Il % di effetto massimo (% MPE) è calcolato con la seguente formula:

$$\% \text{ MPE} = \frac{(E_V - E_D)}{E_V - E_B} \times 100$$

dove E_V è l'assorbimento medio osservato nel gruppo animali trattati solamente con l'agente flogogeno, E_D il gruppo trattato con l'agente flogogeno ed il farmaco, mentre E_B è il valore basale, cioè il va-

MADDALENI & PERANI S.p.A.

lore degli animali iniettati con la sola fisiologica.

Come agenti flogogeni si sono usati:

Acido arachidonico (sciolto in EtOH); (1mg/topo; sacrificio + 30 min); Istamina (3 nmoli/topo; sacrificio + 30 min); PAF (30 pmoli/topo; sacrificio + 60 min); Zymosano (10 μg/topo; sacrificio + 120 min); Bradichinina (0.6 nmoli/topo; sacrificio + 30 min).

I risultati ottenuti con il Composto I-4 sono riassunti in Tabella 4.

Tabella 4: Attività del Composto I-4 sullo stravaso
indotto da agenti algogeni nell=orecchio di topo
Effetti % di inibizione

Dose mg/kg (OS)	Acido Arachidonico	Istamina	PAF	Zymosano	Bradichinina
Durata	30 min	30 min	1 h	2 h	30 min
2.5 mg/kg	-	-	41.9	40.0	-
5 mg/kg	37.8	17.8	49.9	66.6	30.1
10 mg/kg	40.0	27.7	55.1	65.8	30.7
20 mg/kg	52.6	38.8	56.4	83.9	49.1
40 mg/kg	55.5	52.5	66.2	89.8	51.3
80 mg/kg	-	-	-	95.5	-

Il composto I-4 si è dimostrato particolarmente efficace nello stravaso indotto da Zymosano, (ED_{50} 3.1 mg/kg); tuttavia anche negli altri modelli di stravaso studiati, già la dose di 5 mg/kg ha prodotto un effetto medio inibitorio di circa il 35%. Come farmaci di confronto si sono utilizzati un inibitore non selettivo della NO Sintasi, la N-nitro-L-arginina metil estere (L-NAME), un COX_1 inibitore (Piroxicam) ed un COX_2 inibitore (Nimesulide).

I risultati ottenuti sono riportati nella seguente Tabella 5.

Tabella 5: Inibizione dello stravaso nell'orecchio di topo indotto da agenti algogeni (ED_{50} mg/kg OS)

	AA	Istamina	PAF	Zymosano	Bradichinina
Composto I-4	20.5	37.0	6.1	3.1	32.6
Composto I-31	30.5	-	10.8	10.5	-
L-NAME	55.1	36.4	40.0	IN (>100)	39.4
Piroxicam	-	-	21.2	6.1	-
Nimesulide	41.0	-	IN (>40)	-	-

Note: AA = Acido arachidonico (-): non testato

In generale il Composto I-4 è risultato essere il più attivo tra i composti studiati. Infatti tra i composti di riferimento L-NAME è circa attivo come il Composto I-4 sullo stravaso indotta da ista-

mina e bradichinina ma è 2 volte meno attivo nello stravaso da AA ed è molto meno attivo nell'antagonizzare il PAF ed è del tutto inattivo nello stravaso indotto da Zymosano.

Piroxicam è 2-3 volte meno attivo del Composto I-4 nei modelli in cui si sono usati PAF e Zymosano, mentre la nimesulide è meno attiva (2 volte) nell'antagonizzare l'AA mentre è inattiva nell'antagonizzare il PAF. Il composto I-31 presenta un profilo di attività simile a quello del composto I-4, ma è generalmente 2-3 volte meno attivo.

c) Si è valutata l'attività immunosoppressiva del composto I-4 in un test in vivo nel ratto in cui un lipopolisaccaride (LPS) di origine batterica iniettato per via i.p. alla dose di 6 mg/kg induce uno shock caratterizzato da una diarrea imponente, accompagnata da un forte aumento della concentrazione plasmatica del TNFα.

Agli animali sacrificati 90 minuti dopo il challenge veniva prelevato il sangue, sul cui plasma si è determinato la concentrazione di TNFα mediante Elisa (Kit Amersham cod. RPN2734). I risultati così ottenuti sono riportati in tabella 6.

Tabella 6: Effetti del Composto I-4 sulla concen-

trazione di TNFα plasmatica di ratto dopo stimolo con LPS (6 mg/kg/ I.P.)

	TNFα (ng/ml±SD)		Inibizione (%)
Controllo (SHAM)	<1	(n=4)	-
Controllo LPS	61±13.4	(n=8)	-
Composto I-4 (50 μg/kg ICV) + LPS	2.3±1.2	(n=6)	96.2
Composto I-4 (10 mg/kg IV) + LPS	12.9±7.2	(n=6)	78.9
Composto I-4 (20 mg/kg OS) + LPS	30.6±1.0	(n=6)	49.8

Dai dati sopra riportati, si evince che il composto I-4 è molto attivo nell'inibire l'aumento di TNFα plasmatico nel corso di shock endotossico indotto da LPS. Ad esempio la dose di 20 mg/kg per via orale inibisce di circa il 50% l'effetto del LPS.

d) attività anti-infiammatoria intestinale

JACOBACCI & PERANI S.p.A.

TNFα è una citochina implicata nella patogenesi di una varietà di malattie infiammatorie su base immunologica tra cui l'infiammazione dell'intestino. E' stato dimostrato [(Bertrand et al. Br. J. Pharmacol. 124, 1385-1394 (1998)] che l'induzione di una sovrapproduzione di TNFα indotta da farmaci anti-infiammatori di tipo COX_1 produce l'attivazione dei neutrofili e l'aumento della produzione di nitriti dovuti all'attivazione della iNOS tissutale che assieme contribuiscono agli affetti tossico-ulcerativi sulla mucosa intestinale.

La capacità combinata di alcuni dei composti oggetto l'invenzione di inibire sia l'iNOS che la sintesi di TNFα ha indotto a verificarne l'attività su un modello di colite sperimentale provocato da un aptene chimico, l'acido trinitrobenzensolfonico (TNBS), capace di legarsi alle proteine tissutali e di stimolare l'immunità cellulo-mediata. La somministrazione di TNBS intrarettale in associazione con etanolo provoca un'infiammazione acuta caratterizzata da estese ulcerazioni e necrosi.

Una colite distale è stata pertanto indotta nel ratto mediante instillazione intrarettale di TNBS (40 mg/kg) sciolto in etanolo al 50% (0.5 ml/rat-

MADAUS & PERRIGO S.p.A.

to). I farmaci sono stati somministrati per via orale 2 volte al giorno ai giorni -2; -1; 0; +1 e gli animali sono stati sacrificati dopo 48 della somministrazione di TNBS.

I parametri esaminati sono stati: peso totale del colon (g), "score" macroscopico del danno tissutale, dosaggio dell'attività mieloperossidasica tissutale (MPO) che è un marker dell'infiltrazione dei neutrofili e dosaggio dell'attività iNOS (pmoli/g tessuto/min).

Lo score macroscopico (MDS) è stato effettuato su circa 10 cm di colon secondo la seguente scala arbitraria:

0	Nessun danno	4	Due siti di ulcerazione
1	Iperemia (no ulcere)	5	Più di due siti di ulcerazione o 1 ulcera > 1 cm
2	1 piccola ulcera od erosione	6-10	Se il danno è > di 2 cm, si aumenta il punteggio di 1 per ogni cm
3	1 ulcera con infiammazione		

Il dosaggio MPO tissutale è stato effettuato

secondo Velgara et al., JPET 1994. Il dosaggio dei nitriti tissutali è stato effettuato applicando sul sopranatante dell'omogenato tissutale il metodo descritto precedentemente per i condrociti.

Sono stati esaminati somministrandoli per via orale il composto I-4 somministrato alle dosi di 5, 10 e 20 mg/kg ed il composto I-11 in confronto con sulfasalazina (250 mg/kg) ed acido 5-amminosalicilico (5-ASA) (100 mg/kg), 2 farmaci largamente impiegati nella terapia della colite ulcerativa.

I risultati così ottenuti sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 7: Effetti del composto I-4, I-11, sulfasalazina e 5-ASA sulla colite indotta da TNBS nel ratto

Gruppi di trattamento [mg/kg; numerosità (n)]	Peso del colon (g)	Danno macroscopico (MDS)	Attività mielopeossidasica (UMPO/g/min)	Attività iNOS (pmoli/g/min)
Controllo (SHAM) (n=6)	1.5±0.2	-	0.9±0.3	6.6±4.4
Controllo (TNBS) (n=8)	2.4±0.3	7.4±1.4	7.7±1.1	190.9±98.6
I-4 (5 mg/kg; n=8)	2.2±0.2	5.0±0.9	5.5±1.4	131.7±91.9
I-4 (10 mg/kg; n=8)	2.1±0.3	4.4±0.8(*)	5.0±1.7(*)	98.6±60.0
I-4 (20 mg/kg; n=8)	2.0±0.2(*)	3.5±0.8(*)	5.1±1.2(*)	61.5±31.4(*)
I-11 (20 mg/kg; n=7)	2.2±0.3	4.3±0.9(*)	6.5±1.8	90.6±45.6(*)
5-ASA (100 mg/kg; n=7)	2.4±0.4	6.9±1.1	7.9±2.3	167.3±106.5
Sulfasalazina (250 mg/kg; n=7)	2.5±0.3	6.0±2.9	7.5±5.5	100.8±86.8

I valori riportati sono medie ± Deviazione Standard

(*) valore significativamente differente dal gruppo TNBS controllo (Duncan's test)

Dai dati riportati in tabella si evince che il composto I-4 ha un forte effetto protettivo sul modello sperimentale di colite nel ratto indotto da TNBS. I-4 infatti riduce in modo dose dipendente e significativo alla dose media ed alta (10 e 20 mg/kg) sia il danno macroscopico che tutti gli altri parametri infiammatori presi in considerazione. In particolare esso riduce l'aumento del peso del colon indotto dal trattamento con TNBS, riduce alle dosi 10 e 20 mg/kg di circa il 50% il danno macroscopico ed alle stesse dosi riduce l'aumento dell'attività MPO tissutale e della iNOS indotta da TNBS del 40% e del 50%, rispettivamente. Al contrario, dei due farmaci di riferimento selezionati il 5-ASA (100 mg/kg) è risultato inattivo su tutti i parametri, mentre la sulfasalazina alla dose molto elevata di 250 mg/kg è risultata leggermente attiva e non in modo statisticamente significativo solamente sul danno macroscopico (circa 20% di effetto) e sull'attività iNOS (circa 50% di effetto). L'altro composto oggetto dell'invenzione esaminato (Composto I-11) alla dose di 20 mg/kg è risultato parimenti attivo, anche se gli effetti di riduzione del danno sui parametri aumento del peso del colon ed attività MPO erano meno evidenti di quelli

JACOBACCI & PERANI S.p.A.

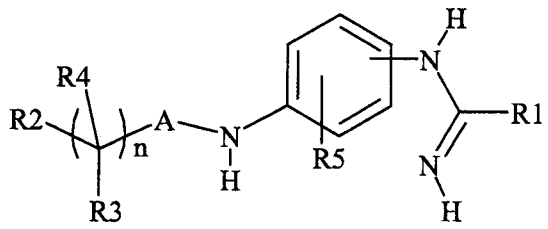
esplicati dal composto I-4.

In definitiva, su un modello di colite sperimentale nel ratto che imita il più possibile uno stato patologico correlabile alla colite ulcerativa nell'uomo [Morris et al. Gastroenterology 96, 795-803, (1989)] alcuni dei composti oggetto dell'invenzione esplicano un effetto protettivo molto superiore ed a dosi inferiori di quello esplicato dalla sulfasalazina un farmaco largamente impiegato nella terapia della colite ulcerativa ed il morbo di Crohn.

JACOBUS PHARM S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Composti che possono essere rappresentati dalla formula generale (I) sotto indicata ed in cui:



(I)

- A è scelto indipendentemente tra il gruppo carbossamido, il gruppo tiocarbossammido, il gruppo carbonile;
- R_1 è scelto tra un gruppo alchile avente da 1 a 3 atomi di carbonio ed il gruppo ammino semplice o sostituito con il gruppo nitro o metile;
- R_2 è scelto indipendentemente tra idrogeno, un gruppo alchile avente da 1 a 4 atomi di carbonio, il gruppo metossi, etossi, propossi, un residuo cicloalcanico mono, bi o triciclico avente da 5 a 12 atomi di carbonio, il gruppo adamantilico, un gruppo arile, naftile o eterociclico semplice o sostituito con gruppi metile, metossi, idrossi, ammino o alogeno;
- R_3 ed R_4 sono scelti indipendentemente tra idrogeno ed un gruppo alchile avente da 1 a 3 atomi di carbonio;

- R_5 è scelto indipendentemente tra idrogeno, ed i gruppi metile, metossile ed ossidrile;
- n è un numero intero da 0 a 6;
- il gruppo amidinico è in posizione para o meta al gruppo "-A-NH-".

2. Composti secondo la rivendicazione 1 di formula generale (I) in cui A è il gruppo tiocarbossammido; R1 è un gruppo alchile avente da 1 a 3 atomi di carbonio; R_2 è metile od un gruppo cicloalcanico mono, bi o triciclico avente da 5 a 12 atomi di carbonio; R_3, R_4 ed R_5 sono idrogeno; n è un numero intero tra 0 e 6; il gruppo amidinico è in posizione para al gruppo "-A-NH-".

3. Composti secondo la rivendicazione 2 in cui A è scelto indipendentemente tra il gruppo carbossamido o il gruppo carbonile al posto del gruppo tiocarbossammido.

4. Composti secondo la rivendicazione 2 in cui R_1 è scelto tra il gruppo ammino semplice o sostituito con il gruppo nitro o metile al posto di un gruppo alchile avente da 1 a 3 atomi di carbonio.

5. Composti secondo la rivendicazione 2 in cui R_2 è scelto tra un gruppo arile semplice o sostituito con gruppi alogeno al posto del gruppo metile o di un gruppo cicloalcanico mono, bi o triciclico.

6. Composti secondo la rivendicazione 1 di formula generale (I) in cui A è il gruppo tiocarbossammido; R_1 è scelto indipendentemente tra il gruppo metile, il gruppo ammino o il gruppo nitro-ammino; R_2, R_3, R_4 ed R_5 sono idrogeno; n è 5; il gruppo amidinico è in posizione para al gruppo tiocarbossammido.

7. Uso de composti secondo la rivendicazione 1 o di un loro sale farmaceuticamente accettabile come medicamento per la terapia di situazioni patologiche legate a fenomeni infiammatori od autoimmuni.

8. Preparato farmaceutico comprendente, come sostanza attiva almeno uno dei composti secondo la rivendicazione 1 o un loro sale farmaceuticamente accettabile.

9. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 8 per l'impiego nel trattamento terapeutico di situazioni patologiche legate a fenomeni infiammatori ed autoimmuni.

10. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 8 per l'impiego nel trattamento terapeutico di controllo e prevenzione di malattie articolari degenerative come l'artrite reumatoide e l'osteoartrosi.

11. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 8 per l'impiego nel trattamento terapeutico di

malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale come la colite ulcerosa, il colon irritabile ed il morbo di Crohn.

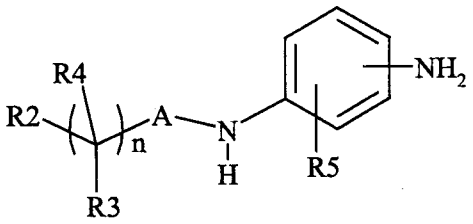
12. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 8 per l'impiego nel trattamento terapeutico di controllo antiproliferativo di forme tumorali solide.

13. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 8 comprendente inoltre ingredienti inattivi farmaceuticamente accettabili, scelti dal gruppo che consiste di veicoli, leganti, aromatizzanti, edulcoranti, disgreganti, conservanti, umettanti e miscele di questi, o ingredienti che facilitano l'assorbimento rettale, transdermico o transmucosale o che permettano il rilascio controllato nel tempo della sostanza attiva.

14. Procedimento per la preparazione di un derivato di formula generale (I) in cui A, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 ed n hanno il significato riportato nella rivendicazione 1 che comprende le operazioni di:

a) far reagire la 1,3 oppure la 1,4 fenilendiammina di formula (IV) in cui R_5 ha il significato sopra riportato, con l'isotiocianato di formula (V A) oppure con il cloruro acilico di formula (V B) o con l'isocianato di formula (V C) in cui R_2, R_3 ed

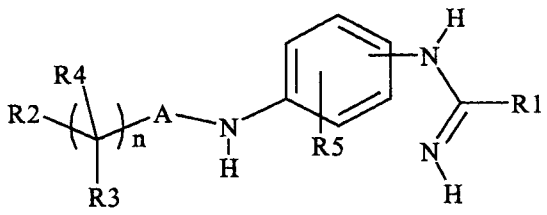
n hanno il significato sopra riportato, in eccesso di fenilendiammina, in un solvente neutro ed ad una temperatura compresa tra 4°C e quella di riflusso del solvente, a dare le aniline corrispondenti di formula (III):



(III)

in cui R_2, R_3, R_4, A ed n hanno il significato sopra riportato ed in cui il gruppo amminico è in posizione meta o para alla catena con il gruppo "A-NH";

b) far reagire le aniline di formula (III) con l'opportuno immidato cloridrato di formula II in cui R_1 ha il significato sopra riportato, in presenza di un eccesso di II e della corrispondente quantità stechiometrica di una base terziaria come trietilammina, in un solvente inerte anidro, ad una temperatura compresa tra 4°C e quella di ebollizione del solvente, a dare i corrispondenti derivati di formula (I)



(I)

in cui A, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 ed n hanno il significato sopra riportato ed in cui il gruppo amidinico è in posizione para o meta al gruppo "A-NH". I composti di formula (I) vengono recuperati dalla massa di reazione, come tali oppure come sali farmaceuticamente accettabili e purificati con metodi convenzionali;

c) alternativamente nel caso in cui R_1 è NH_2 oppure $NH-NO_2$, i corrispondenti derivati di formula generale I in cui A, R_2, R_3, R_4 R_5 ed n hanno il significato sopra riportato sono preparati facendo reagire le aniline di formula (III) rispettivamente con il benzotriazolo-1-carbossamidinio tosilato o con la N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina.

Ing. Angelo GERBINO
N. Iscriz. ALBO 488
(In proprio e per gli altri)