



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900501432
Data Deposito	01/03/1996
Data Pubblicazione	01/09/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSTI SOLUBILI ANTAGONISTI DELLE TACHICHININE LORO PREPARAZIONE E LORO
USO IN COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE

4877 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

FM/sm "COMPOSTI SOLUBILI ANTAGONISTI DELLE TACHICHININE, LORO

PREPARAZIONE E LORO USO IN COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE"

a nome:

1 MAR. 1996

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA SUI PEPTIDI BIOATTIVI

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

con sede in: Napoli

MI 96 A 0401

* * *

La presente invenzione si riferisce a composti solubili antagonisti delle tachichinine, alla loro preparazione e a composizioni farmaceutiche che li contengono.

Numerosi composti antagonisti delle tachichinine sono noti in letteratura e fra questi sono particolarmente interessanti composti monociclici (A. T. McKnight et al., Br. J. Pharmacol. 1991, 41, 376) e biciclici (V. Pavone et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans 2, 1995, 987). I composti fino ad oggi sviluppati sono tutti caratterizzati da una elevata idrofobicità e sono quindi tutti insolubili in acqua. Infatti il brevetto WO 93/21227 descrive antagonisti biciclici delle tachichinine di natura peptidica, insolubili, in cui le strutture rivendicate sono tutte caratterizzate da amminoacidi con catene laterali idrofobiche o, se polari, funzionalizzate in modo da conferire idrofobicità al gruppo funzionale. L'insolubilità in acqua (non più di 15µg/mL) che inevitabilmente caratterizza questi composti fortemente idrofobici, di fatto ha impedito fino ad ora che queste molecole avessero una concreta applicazione come farmaci, nonostante la loro interessante attività biologica in vitro. E' altresì noto dalla letteratura (L. Quartara et

al., J. Med. Chem. 1994, 37, 3630) che un'aumento dell'idrofilicità di questa classe di molecole determina una progressiva diminuzione della loro attività biologica. Da questo quadro di riferimento emerge l'interesse dell'industria farmaceutica alla ricerca di nuove classi di antagonisti delle tachichinine di tipo idrosolubile, ma ad alta attività specifica.

La presente invenzione descrive antagonisti delle tachichinine che presentano contemporaneamente una elevata solubilità in acqua ed una elevata attività biologica. I composti dell'invenzione hanno la seguente formula generale (I) $\text{ciclo}[X_1^1-Z_1^2-X_2^3-X_3^4-Z_2^5-X_4^6]\text{ciclo}(2\beta-5\beta)$ in cui:
 $X_1 = (D \text{ o } L)\text{Cys}(Y) \text{ o } (D \text{ o } L)\text{SeCys}(Y)$, $Z_1 = \text{Asp}$ e $Z_2 = \text{Dap}$ o $Z_1 = \text{Dap}$ e $Z_2 = \text{Asp}$ e
 X_2, X_3 e $X_4 =$ amminoacidi naturali o di sintesi a carattere idrofobico, essendo Z_1, Z_2, X_2, X_3 e X_4 di uguale configurazione D o L; $Y =$ è un gruppo glicosidico scelto tra gli aldo e cheto esosi in forma furanosica o piranosica legato alla cisteina o alla selenocisteina con un legame α o β tio- o seleno-acetalico o un ciclitolo o un alcol polivinilico o PEG, costituiti da 5 a 10 unità monomeriche, legati alla cisteina o alla seleno cisteina rispettivamente con un legame tio- o seleno-eterico.

Sono preferiti in particolare i composti in cui $X_2 = \text{Trp}$ o 1-Nal;
 $X_3 = \text{Phe}$ e $X_4 = \text{Leu}$ o Cha.

I composti di formula (I) contengono molteplici centri chirali, e l'invenzione comprende pertanto i possibili enantiomeri.

I composti di formula (I) presentano caratteristiche strutturali uniche, che li differenziano dai prodotti noti. Infatti i composti

rivendicati, a differenza di quanto riportato fino ad oggi (A. T. McKnight et al., Br. J. Pharmacol. 1991, 41, 376; C. A. Maggi et al., J. Pharmacol. and Expt. Therapeutics, 1994, 271, 1489), contengono gruppi funzionali a carattere fortemente idrofilo, che conferiscono a questi composti una solubilità in acqua almeno 100 volte maggiore. L'elevata idrosolubilità e la forte attività farmacologica, maggiore di quella dei composti insolubili in precedenza sviluppati, rendono questa nuova classe di molecole ideale per lo sviluppo di una ampia gamma di formulazioni farmaceutiche. Per quanto concerne questi aspetti applicativi, i composti dell'invenzione si differenziano sostanzialmente dai derivati insolubili in precedenza studiati, perchè questi ultimi non consentono lo sviluppo di composizioni farmaceutiche suscettibili di impieghi in terapia.

In particolare, i composti di formula I, caratterizzati da un residuo di cisteina o di selenocisteina, il cui gruppo rispettivamente -SH o -SeH è impegnato in un legame tio- o seleno-glicosidico o tio- o seleno-eterico con un residuo di galattosio, glucosio, inositolo o PEG o polialcoli a basso peso molecolare, pur avendo elevate solubilità in acqua, presentano un'attività persino leggermente superiore ai migliori antagonisti di tipo insolubile, come il composto MEN 10627 (C. A. Maggi et al., J. Pharmacol. and Expt. Therapeutics, 1994, 271, 1489), che ha una solubilità di soli 15 µg/ml. Ciò è tanto più sorprendente quando si consideri che sino ad oggi, i dati disponibili in letteratura dimostravano che all'aumentare della idrosolubilità si accompagnava immancabilmente, in questo tipo di composti, una diminuzione

dell'attività farmacologica (L. Quartara et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 3630).

I composti di formula I si comportano in modo sorprendentemente opposto rispetto agli analoghi in cui la cisteina funzionalizzata con β -D-galattosio è stata sostituita con i seguenti residui:

Asn(β -D-gal): Gln(β -D-gal); Ser(β -D-gal); hSer(β -D-gal); hCys(β -D-gal).

In particolare, gli analoghi con Asn(β -D-gal) e Ser(β -D-gal) sono stati sintetizzati a scopo comparativo e i dati di solubilità ed attività biologica sono riportati nell'Esempio 2.

I composti di formula (I), oggetto della presente invenzione, possono essere sintetizzati con le varie tecniche che sono note dalla letteratura, si veda ad esempio Schroeder et al. "The Peptides" vol 1, Academic Press, 1965; Bodanszky et al. "Peptide Synthesis Interscience Publisher, 1966; Barany & Merrifield, "The peptides; Analysis, Synthesis, Biology", 2, Capitolo 1, Academic Press, 1980. Queste tecniche includono sintesi peptidica in fase solida, sintesi peptidica in soluzione, metodiche sintetiche di chimica organica, oppure una qualunque combinazione di esse. Lo schema di sintesi prescelto dipenderà naturalmente dalla composizione della particolare molecola. Di preferenza, essendo le molecole rivendicate interamente su base peptidica, sono utilizzate metodiche sintetiche basate su appropriate combinazioni di tecniche in fase solida e di metodi classici in soluzione, che comportano bassi costi produttivi in particolare su scala industriale. Nel dettaglio tali metodiche consistono nella:

i) Sintesi in soluzione di frammenti della catena peptidica attraverso l'accoppiamento successivo di amminoacidi N-protetti, opportunamente attivati, ad un amminoacido o ad una catena peptidica C-protetta, con isolamento degli intermedi, successiva deprotezione selettiva delle estremità N e C-terminali di detti frammenti ed accoppiamento di essi fino all'ottenimento del peptide desiderato. Infine si esegue la deprotezione selettiva dei gruppi coinvolti nelle ciclizzazioni, come ad esempio delle estremità N e C terminali o delle catene laterali e si procede quindi alla loro condensazione. Infine, ove necessario, si deproteggono le catene laterali.

ii) Sintesi in fase solida della catena peptidica dall'estremità C-terminale verso quella N-terminale su di un supporto polimerico insolubile, la ciclizzazione in fase solida tra le catene laterali previamente deprotette. Il peptide viene rimosso dalla resina per idrolisi con acido fluoridrico anidro o con acido trifluoroacetico in presenza degli opportuni scavengers e viene quindi effettuata la ciclizzazione del peptide monociclico in soluzione diluita. Si procede quindi alla deprotezione delle catene laterali.

Fmoc-Cys(β -D-Gal(Ac)₄)-OH, Fmoc-Ser(β -D-Gal(Ac)₄)-OH, Fmoc-Asn(β -D-Gal)-OH, possono essere ottenuti con i metodi noti in letteratura (M. Gerz, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1993, 32, 269; Kessler, H. et al. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4805; Kessler H. et al., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 7550). I seleno derivati sono ottenuti con analoghe procedure partendo dalla selenocisteina, adoperando le note tecniche di protezione della funzione amminica.

I composti di formula (I) come sopra indicati si sono rivelati antagonisti più potenti di altri antagonisti analoghi e quindi possono essere somministrati in dosi inferiori rispetto a quelle richieste dai prodotti noti.

Pertanto questi composti sono adatti per la somministrazione a fini terapeutici agli animali superiori ed all'uomo. Infatti la loro solubilità in acqua consente preparazioni farmaceutiche semplici ed a basso costo, idonee per somministrazione parenterale, orale, inalatoria e sublinguale, mentre la loro elevata attività biologica consente di raggiungere efficaci effetti farmacologici anche a bassi dosaggi. Esempi di opportune formulazioni comprendono capsule, compresse, sciroppi, soluzioni o liofilizzati sterili iniettabili, formulazioni aerosoliche.

I composti oggetto dell'invenzione possono essere somministrati a dosi da 0.01 mg/kg a 10 mg/kg per il trattamento di artrite, asma, infiammazioni, crescita tumorale, ipermotilità gastro-intestinale, malattia di Huntington, neuriti, neuralgia, emicrania, ipertensione, incontinenza urinaria, orticaria, sintomi da sindrome carcinoide, influenza e raffreddori.

I seguenti esempi, senza intenti limitativi illustrano ulteriormente i composti dell'invenzione.

Elenco delle abbreviazioni

Per la nomenclatura e le abbreviazioni degli aminoacidi si fa riferimento alle raccomandazioni della IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical nomenclature (Eur. J. Biochem. 1984, 138 :9); gli aminoacidi si intendono nella configurazione L se non altrimenti specificato. Le

altre abbreviazioni usate sono: NKA = neurochinina A; SP = sostanza P;
Dap = acido 2,3-diamminopropionico; SeCys = selenocisteina; PEG =
Polietilenglicole; 1-Nal = 1-Naftil-alanina; Cha = cicloesilalanina; gal
= galattosio; hSer = homoserina; hCys = homocisteina; Boc = tert-
butilossicarbonil; PAM = fenilacetamidometil; Fmoc = 9-
fluorenilmetilossicarbonil; PyBop = benzotriazol-1-il-
ossipirrolidinofosfonio esafluorofosfato; DIEA = diisopropiletilammina;
Fm = fluorenilmetil; DCC = dicicloesilcarbodiimmide; HOBT =
idrossibenzotriazolo; DMF = N-N' dimetilformamide; DCM = diclorometano;
i-PrOH = isopropanolo; Ac = acetil; DMS = dimetilsolfuro; MeOH =
metanolo; tr = tempo di ritenzione; FAB-MS = spettrometria di massa a
bombardamento di atomi veloci; HPLC = cromatografia liquida ad alta
pressione; HOBT = 1-idrossibenzotriazolo; TFA = acido trifluoroacetico.

Esempio 1

A) Preparazione del composto di formula generale I in cui $X_1 =$
Cys(β -D-Gal); $Z_1 =$ Asp; $X_2 =$ Trp; $X_3 =$ Phe; $Z_2 =$ Dap; $X_4 =$ Leu {ciclo[Cys¹(β -D-
Gal)-Asp²-Trp³-Phe⁴-Dap⁵-Leu⁶]ciclo(2 β -5 β)}.

Il peptide è stato assemblato in fase solida, mediante chimica Boc,
su una resina PAM funzionalizzata con la Boc-Leu, utilizzando un
sintetizzatore ABI 430A Applied Biosystem. I cicli di deprotezione e di
accoppiamento utilizzati sono stati quelli standard. A 0.651 g di Boc-
Leu-PAM resina (scala 0.5 mmol) furono accoppiati nell'ordine i seguenti
amminoacidi: Boc-Dap(Fmoc)-OH (1.5 mmol; PyBop 1.5 mmol, DIEA 3mmol);
Boc-Phe-OH, Boc-Trp(CHO)-OH e Boc-Asp(OHf)-OH (2 mmol e DCC/HOBT come
agente accoppiante). Prima di eseguire la ciclizzazione fra il carbonile

in β dell'Asp ed il gruppo amminico in β del Dap fu effettuata la deprotezione della catene laterali dei due amminoacidi utilizzando due cicli di deprotezione con una soluzione 20% piperidina in DMF rispettivamente di 3 e 7 minuti. Sono stati poi effettuati ripetuti lavaggi con i seguenti solventi DCM, DMF, DCM e i-PrOH. La ciclizzazione è stata effettuata aggiungendo, alla resina sospesa in 15 mL di DMF, il PyBop (1.5 mmol) e DIEA (3 mmol). La soluzione è stata lasciata a reagire per la notte. Successivamente sono stati eseguiti cicli di lavaggio utilizzando DMF e DCM. Dopo la deprotezione del gruppo amminico del Asp al peptide monociclico è stato accoppiato 1' Fmoc-Cys(β -D-Gal(Ac)4)-OH (1.5 mmol) utilizzando il PyBop (1.5 g, 2 mmol) come agente accoppiante e la DIEA (3 mmol) come base. La reazione è stata lasciata per la notte. La deprotezione del gruppo Fmoc della cisteina è stato effettuato analogamente a quanto descritto per le catene laterali del Dap e del Asp. Il distacco del peptide monociclico dalla resina è stato eseguito seguendo la procedura descritta da Tam & Merrifield (HF/DMS/p-tiocresolo/p-cresolo 2.5/6.5/0.5/0.5; 4 h a 0°C), seguito dalla procedura standard per il distacco con HF (p-cresolo). Sono stati recuperati 362 mg di prodotto grezzo (resa 67%), che purificati mediante HPLC preparativo, hanno fornito 100 mg di prodotto puro (resa 20%) per HPLC analitico (tr=17.7 min; area >99%). A 100 mg del peptide (3) (0.0926 mmol), solubilizzati in 93 mL di DMF (1 mM), sono stati aggiunti 48 mg di PyBop (1 eq.) e 46 mL di DIEA (3 eq.) pH 8 ~ 8.5. La soluzione è stata lasciata a reagire per una notte, la completezza della reazione è stata determinata mediante HPLC analitico. Dopo aver

allontanato la DMF, il campione è stato solubilizzato in CHCl_3 ed estratto due volte con una soluzione satura di NaHCO_3 e due volte con acqua. La fase neutra è stata disidratata, seccata e liofilizzata. Si sono ottenuti 85.1 mg (87%), HPLC ($R_t=19.9$ min; area >88%). Ad una soluzione contenente 80 mg di (4) (0.0753 mmol) in 64 mL di MeOH anidro (1.25 mg peptide/mL MeOH) è stato aggiunto CH_3ONa (1 eq.) prelevando 346 mL da una soluzione 5 mg/mL di Na in MeOH. La reazione è andata a completezza in 90 minuti e l'andamento è stato controllato mediante HPLC analitico. La soluzione è stata seccata ed il prodotto purificato mediante HPLC preparativo. Il prodotto grezzo mostrava un picco unico ($t_r=14.9$ min; area>80%). Dopo purificazione su HPLC preparativo si sono ottenuti 29.6 mg con $t_r=14.9$ min (area>94%). L'analisi FAB-MS mostra la presenza dello ione molecolare $\text{MH}^+=895$ amu, corrisponde al composto desiderato.

Esempio Comparativo 1

Preparazione del composto di formula generale I in cui $X_1=\text{Ser}(\beta\text{-D-Gal})$; $Z_1=\text{Asp}$; $X_2=\text{Trp}$; $X_3=\text{Phe}$; $Z_2=\text{Dap}$; $X_4=\text{Leu}$ (ciclo[$\text{Ser}^1(\beta\text{-D-Gal})\text{-Asp}^2\text{-Trp}^3\text{-Phe}^4\text{-Dap}^5\text{-Leu}^6$]ciclo(2 β -5b)).

Il peptide è stato assemblato in fase solida, mediante chimica Boc con una procedura identica a quella del composto ciclo[$\text{Cys}^1(\beta\text{-D-Gal})\text{-Asp}^2\text{-Trp}^3\text{-Phe}^4\text{-Dap}^5\text{-Leu}^6$]ciclo(2 β -5 β) adoperando Fmoc- $\text{Ser}^1(\beta\text{-D-Gal}(\text{Ac})_4)\text{-OH}$ al posto di Fmoc- $\text{Cys}^1(\beta\text{-D-Gal}(\text{Ac})_4)\text{-OH}$. Il prodotto grezzo biciclico mostrava un picco unico ($t_r=14.0$ min; area>85%). Dopo purificazione su HPLC preparativo si sono ottenuti 31 mg con $t_r=14.0$ min

(area>94%). L'analisi FAB-MS mostra la presenza dello ione molecolare $MH^+=879$ amu, corrisponde al composto desiderato.

Esempio Comparativo 2

Preparazione del composto di formula generale I in cui $X_1 = \text{Asn}(\beta\text{-D-Gal})$; $Z_1 = \text{Asp}$; $X_2 = \text{Trp}$; $X_3 = \text{Phe}$; $Z_2 = \text{Dap}$; $X_4 = \text{Leu}$ (ciclo[$\text{Asn}^1(\beta\text{-D-Gal})\text{-Asp}^2\text{-Trp}^3\text{-Phe}^4\text{-Dap}^5\text{-Leu}^6$]ciclo(2 β -5 β)).

Il peptide è stato assemblato in fase solida, mediante chimica Fmoc, su una resina Macrosorb SPR funzionalizzata con l'acido p-idrossimetilbenzoico, un linker base labile, utilizzando un sintetizzatore Milligen 9010 Waters. I cicli di deprotezione e di accoppiamento utilizzati sono stati quelli standard.

L'estereificazione del primo residuo è stata eseguita utilizzando 0.6 mmol (eccesso triplo) di (Fmoc-Leu)₂O in DMF. L'accoppiamento del Fmoc-Dap(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp-OH e Fmoc-Asp(OtBu)-OH è stato eseguito utilizzando 0.8 mmol di amminoacido e HOBT/DCC come agente attivante. Prima di eseguire la ciclizzazione fra il carbonile in β dell'Asp ed il gruppo amminico in β del Dap è stata effettuata la deprotezione delle catene laterali dei due amminoacidi utilizzando, una soluzione TFA/H₂O (90:10). La ciclizzazione è stata effettuata aggiungendo, alla resina sospesa in DMF, HOBT/DCC (1.6 mmol). La soluzione è stata lasciata a reagire per la notte. Dopo la deprotezione del gruppo amminico del Asp al peptide monociclico è stato accoppiato l'Fmoc-Asn(β -D-Gal)-OH (0.8 mmol) utilizzando il PyBop (0.8 mmol) come agente accoppiante e la DIEA (1.2 mmol) come base. La reazione è stata lasciata per la notte. Il distacco del peptide monociclico dalla resina

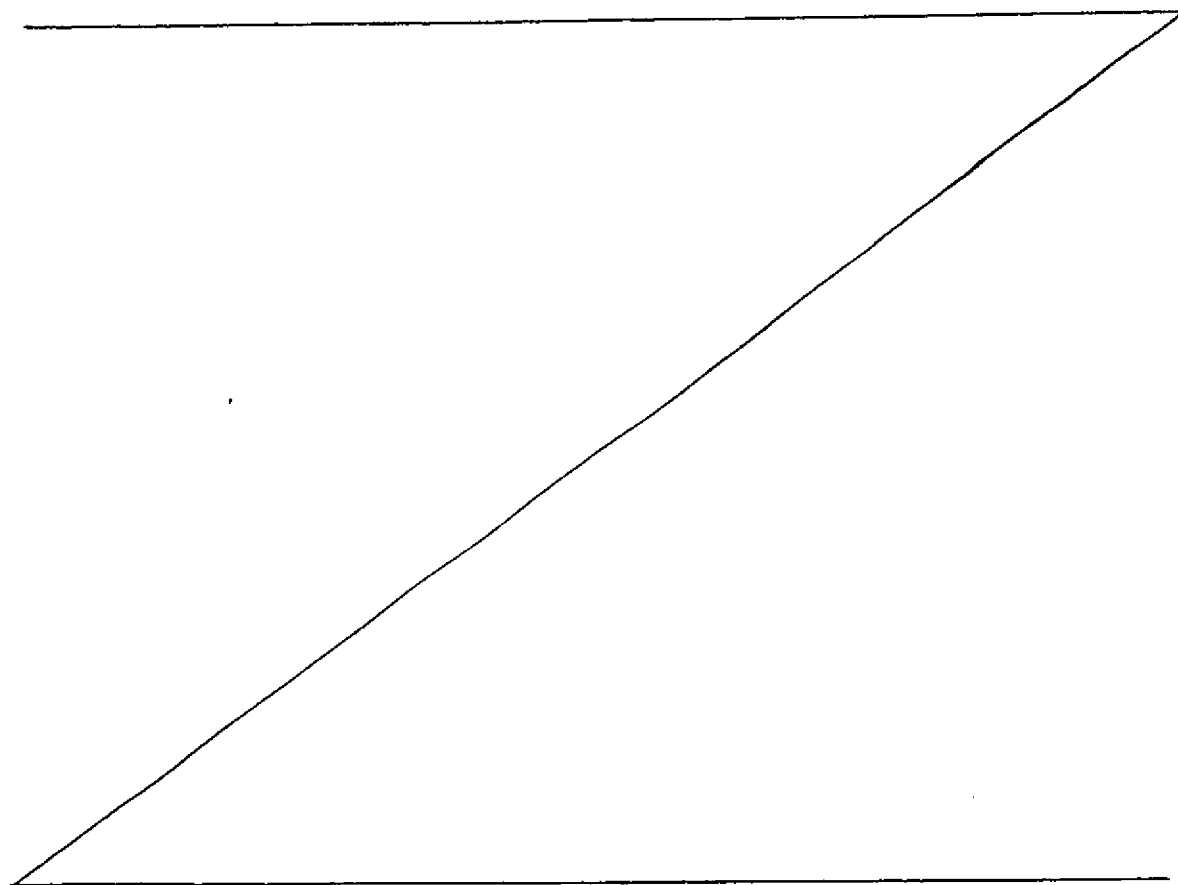
è stato eseguito aggiungendo ad un 1 g di peptidil-resina a 4°C 10 mL di una soluzione 1M di NaOH. La reazione è stata lasciata per 15 minuti a temperatura ambiente. La soluzione è stata filtrata, ed il filtrato è stato raccolto in un recipiente contenente 10 mL di una soluzione acquosa al 10% di acido acetico. La resina è stata lavata con acqua ed il pH del filtrato aggiustato a 7 con acido acetico. A 0.1 mmol del peptide (3), solubilizzati in 93 mL di DMF (1 mM), sono stati aggiunti 48 mg di PyBop (1 eq.) e 46 µL di DIEA (3 eq.) controllando che il pH restasse fra 8 e 8.5. La soluzione è stata lasciata a reagire per una notte, la completezza della reazione è stata determinata mediante HPLC analitico. La soluzione è stata seccata ed il prodotto purificato mediante HPLC preparativo. Il prodotto grezzo mostrava un picco unico (tr=13.5 min; area>80%). Dopo purificazione su HPLC preparativo si sono ottenuti 25 mg con tr=13.5 min (area>94%). L'analisi FAB-MS mostra la presenza dello ione molecolare $MH^+=992$ amu, corrisponde al composto desiderato.

Esempio 2: Attività biologica in vitro

La capacità dei prodotti descritti nella presente invenzione di interagire con il recettore della neurochinina A come antagonisti è stata valutata usando una preparazione nella quale la risposta biologica prodotta da tachichinine e peptidi correlati è determinata esclusivamente dal recettore della neurochinina A (recettore NK-2). Si è utilizzato come modello sperimentale il dotto deferente del ratto su cui le tachichinine producono una contrazione dose-dipendente. La determinazione dell'attività dei peptidi è stata effettuata utilizzando

una concentrazione di β -Ala⁸-NKA[4-10] (3 nM), come agonista, che produce una risposta pari al 45% della massimale. L'attività dei peptidi descritti nell'esempio 1 veniva valutata, in funzione della concentrazione, come inibizione della risposta all'agonista, ed in confronto con il composto insolubile MEN-10627 (V. Pavone et al., J. Peptide Science 1, 236). In tabella sono riportati i valori di pA₂ e la solubilità dei composti.

<u>Composto</u>	<u>pA₂</u>	<u>Solubilità</u> µg/mL
Esempio 1	8,4	1.800
Esempio Comparativo 1	6,2	2.020
Esempio Comparativo 2	5,8	1.980
MEN 10627	8,1	15



RIVENDICAZIONI

1. Composti di formula generale (I) ciclo[X₁¹-Z₁²-X₂³-X₃⁴-Z₂⁵-X₄⁶]ciclo(2β-5β) dove: X₁= (D o L)Cys(Y) o (D o L)SeCys(Y), Z₁=Asp e Z₂=Dap o Z₁=Dap e Z₂=Asp e X₂, X₃ e X₄ = amminoacidi naturali o di sintesi a carattere idrofobico, essendo Z₁, Z₂, X₂, X₃ e X₄ di uguale configurazione D o L; Y = è un gruppo glicosidico scelto tra gli aldo e cheto esosi in forma furanosica o piranosica legato alla cisteina con un legame α o β tioacetalico o un ciclitolo o un alcol polivinilico o PEG, costituiti da 5 a 10 unità monomeriche, legati alla cisteina con un legame tioetereo.

2. Composti secondo la rivendicazione 1 dove: X₁= (D o L)Cys(Y) o (D o L)SeCys(Y), Z₁=Asp e Z₂=Dap o Z₁=Dap e Z₂=Asp e X₂ = Trp o 1-Nal, X₃ = Phe e X₄ = Leu o Cha, essendo Z₁, Z₂, X₂, X₃ e X₄ di uguale configurazione D o L e Y = è come definito nella rivendicazione 1.

3. Composizioni farmaceutiche contenenti un composto delle rivendicazioni 1 o 2, in miscela con un veicolo opportuno.

4. Uso dei composti delle rivendicazioni 1 o 2 per la preparazione di medicinali per il trattamento di artrite, asma, infiammazioni, crescita tumorale, ipermotilità gastro intestinale, malattia di Huntington, neuriti, neuralgia, emicrania, ipertensione, incontinenza urinaria, orticaria, sintomi da sindrome carcinoide, influenza e raffreddori.

Milano, 1 marzo 1996

Il Mandatario
(Bianchetti Giuseppe)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

G. Bianchetti

