



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

UTBM

DOMANDA NUMERO	101981900000209
Data Deposito	13/02/1981
Data Pubblicazione	13/08/1982

Priorità	55-16560
Nazione Priorità	JP
Data Deposito Priorità	15-FEB-80

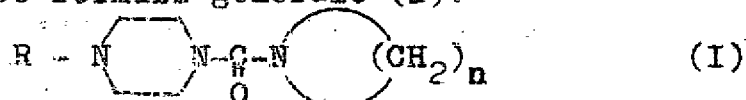
Titolo

COMPOSTI PIPERAZINICI PROCEDIMENTO PER PREPARARLI E LORO IMPIEGO.

Descrizione

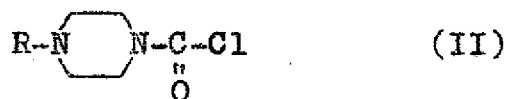
La presente invenzione si riferisce ad un nuovo composto di piperazina, ad un procedimento per la sua preparazione e ad una composizione medicinale che contiene questo nuovo composto di piperazina come ingrediente attivo.

Secondo la presente invenzione viene fornito un nuovo composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I):

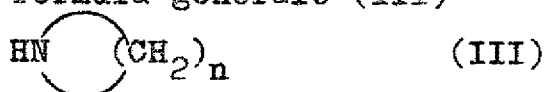


in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero del valore di 4 oppure 5.

Secondo la presente invenzione viene fornito anche un procedimento per la preparazione di nuovi composti di piperazina rappresentati dalla formula generale (I) di cui sopra, che comprende l'operazione di condensare una 4-cloro-carbonilpiperazina 1-sostituita rappresentata dalla seguente formula generale (II):

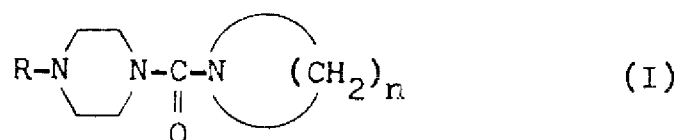


in cui R è come definito sopra con riguardo alla formula generale (I), con una ammina ciclica rappresentata dalla seguente formula generale (III)



in cui n è un numero del valore di 4 oppure 5.

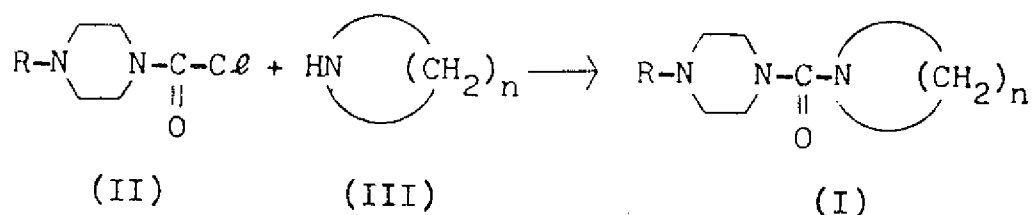
Inoltre, secondo la presente invenzione, viene fornito un agente immunoattivo che comprende, come ingrediente attivo, un nuovo composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I)



in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico, ed n è un numero del valore di 4 oppure 5.

Questo agente immunoattivo viene usato per la cura di reumatismo cronico e nella immunoterapia di cancro.

Il nuovo composto di piperazina viene ottenuto mediante la reazione rappresentata dalla seguente formula di reazione:



Più specificamente, il nuovo composto di piperazina della presente invenzione viene ottenuto condensando una 4-cloro-carbonilpiperazina 1-sostituita rappresentata dalla formula generale (II) di cui sopra

in cui R è come definito sopra con riguardo alla formula generale (I) con una ammina ciclica della formula generale (III) di cui sopra in cui n è un numero del valore di 4 oppure 5 (il composto in cui n è 4 sta per pirrolidina e quello in cui n è 5 sta per piperidina), se si desidera in un solvente inattivo per la reazione quale benzolo oppure toluolo. La reazione viene effettuata a circa 0 fino a circa 120°C ed è sostanzialmente completa in 1 fino a 5 ore.

Il composto della formula generale (I) ottenuto mediante la reazione di cui sopra, può venire isolato e purificato secondo un metodo usuale, per esempio un metodo in cui il miscuglio di reazione viene estratto con un acido diluito, l'estratto viene reso alcalino per mettere in libertà il composto desiderato e viene effettuata una distillazione sotto pressione ridotta. La base libera così ottenuta del composto desiderato può venire convertita ad un sale di acido secondo un procedimento usuale. Inoltre, può venire adottato un metodo in cui il prodotto viene purificato sotto forma di un sale di addizione con acido e questo viene poi trattato con un alcali appropriato per ottenere una base libera.

Il composto della formula generale (II) può venire preparato mediante un metodo noto, ad esempio

un metodo comprendente la reazione di una piperazina 1-sostituita con fougene.

Esempi specifici del nuovo composto di piperazina preparato secondo la presente invenzione sono come seguono:

1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-etil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-n-propil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-i-propil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-n-butil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-i-butil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-etil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-n-propil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-i-propil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-n-butil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina ed 1-i-butil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina.

Il composto della presente invenzione rappresentato dalla formula generale (I) di cui sopra possiede attività farmacologiche. Con grande sorpresa è stato trovato che il composto della presente invenzione ha un elevato effetto immunopotenziante. La tossicità del composto è molto bassa. Quindi, il composto della presente invenzione è molto pregevole come medicina.

Questo punto verrà ora descritto in dettaglio con riferimento alle prove.

Vari sistemi di prova impiegando animali sono stati proposti per determinare l'effetto immunopotenziante. Risultati della prova di rinforzo della ipersensibilità ritardata, che è una prova tipica fra queste prove, verranno ora descritti.

La ipersensibilità ritardata indotta quando picrilcloruro (2-cloro-1,3,5-trinitrobenzolo) venga applicata sulla pelle di un topo è nota come una immunità cellulare tipica e questo è uno dei sistemi di prova adottati ampiamente nel mondo [vedi Asherson, G.L. and Ptak, W: Contact and Delayed Hypersensitivity in the Mouse I, Active Sensitization and Passive Transfer, *Immunology*, 15, 405-416 (1968)].

Questo sistema viene usato per la prova di rinforzo della ipersensibilità ritardata.

Prova 1 (prova di rinforzo di ipersensibilità ritardata)

Procedimenti di prova:

Viene usato per la prova un gruppo di otto topi maschi ICR, ciascuno avente un peso corporeo di circa 30 g.

La sensibilizzazione viene effettuata applicando una soluzione al 7% di picril-cloruro in un miscu-

glio 4/1 di olio di olive ed acetone sull'addome rasata del topo.

Simultaneamente alla sensibilizzazione, una soluzione o sospensione del composto della presente invenzione in una soluzione a 0,2% di carbossimetilcellulosa in una soluzione salina fisiologica viene somministrata per via orale al topo ad una dose di 50 mg per kg del peso corporeo. Al gruppo di controllo viene somministrata in maniera simile una soluzione a 0,2% di carbossimetilcellulosa in una soluzione salina fisiologica.

La ipersensibilità ritardata viene eccitata

7 giorni dopo la sensibilizzazione stringendo l'orecchio del topo con una pinza avvolta con un feltro impregnato di una soluzione ad 1% di picrilcloruro in olio di olive e ricoprendo l'orecchio con la soluzione. Lo spessore dell'orecchia viene misurato prima della eccitazione e 24 ore dopo la eccitazione ed il rapporto di aumento dello spessore (valore medio di entrambe le orecchie in 8 topi più o meno la deviazione standard (viene ottenuto come mostrato nella tabella 1.

Per confronto, la prova viene eseguita in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole ed i risultati ottenuti sono mostrati in tabella 1. Ven

gono effettuate prove F.t. Il gruppo in cui il risultato di prova è importante ad un livello di $P < 0,05$ viene marcato con un asterisco (*), e il gruppo in cui il risultato di prova è importante ad un livello di $P < 0,01$ viene marcato con due asterischi (**).

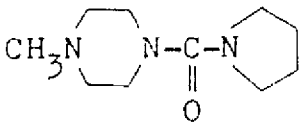
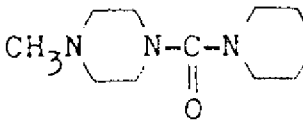
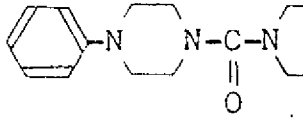
Risultati:

Quando il composto della presente invenzione venga somministrato simultaneamente alla sensibilizzazione, la ipersensibilità ritardata prodotta dalla eccitazione risulta rinforzata e l'effetto rinforzante è superiore a quello ottenuto mediante Levamisole.

Pertanto, si conferma che il composto della presente invenzione ha l'effetto di attivare la risposta di immunità cellulare (effetto immunopotenziante) in topi e questa attività è superiore a quella prodotta da Levamisole.

Tabella 1

Risultati di prova di rinforzo di ipersensibilità
ritardata

Composto	Rapporto di aumento di spessore di orecchia (valore medio $\pm$ varia- zione standard, %)
Controllo	29,6 $\pm$ 1,9
 · citrato	36,7 $\pm$ 2,5 *
 · citrato	43,5 $\pm$ 2,8 **
 · cloridrato	45,0 $\pm$ 4,6 **
cloridrato di Levamisole	35,6 $\pm$ 2,4

L'artrite da adiuvante in ratti prodotta mediante iniezione di un adiuvante di Mycobacterium tuberculosis viene spesso utilizzata per una prova modello di reumatismo cronico nell'uomo.

Il meccanismo di manifestazione di questa malattia non è stato completament chiarito ma è noto che la immunità cellulare svolge un ruolo importante. L'azione immunoattiva del composto della presente invenzione viene saggiata secondo questa prova

nota di artrite da adiuvante.

Prova 2 (prova di artrite da adiuvante, tabella 2)

Procedimenti di prova:

Viene impiegato per la prova un gruppo di 10 ratti maschi SD dell'età di 9 settimane. In 0,1 ml di paraffina fluida vengono sospesi 0,4 mg di cellule morte secche di *Mycobacterium tuberculosis* e la sospensione viene iniettata sotto la pelle del piede della zampa posteriore destra. Il composto della presente invenzione viene somministrato per via sottocutanea per 9 volte complessivamente prima e dopo la iniezione dell'adiuvante. Il composto di prova viene sciolto in una soluzione salina fisiologica e somministrato ad una dose di 5 mg per kg di peso corporeo. Il volume di gonfiore della zampa posteriore sinistra viene misurato durante il periodo a partire dal giorno della iniezione fino al giorno del completamento della prova e viene calcolato il rapporto di gonfiore. Per confronto, la prova viene effettuata in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 2. Prove F.t vengono effettuate sui risultati di prova ottenuti. Il gruppo in cui il risultato di prova è significativo ad un livello di $P < 0,05$ viene marcato con un asterisco ed il gruppo con il risultato di pro

va significativo ad un livello di $P < 0,01$ viene marcato con due asterischi.

Risultati:

L'infiammazione secondaria della artrite da adiuvante viene nettamente controllata dal composto della presente invenzione e l'effetto è statisticamente importante con riguardo al gruppo di controllo al quale non è stato somministrato alcun composto. L'effetto prodotto dal composto della presente invenzione è superiore a quello di Levamisole usato come composto di riferimento ma fra i due composti non vi è una differenza statisticamente significativa. Pertanto, si conferma che il composto della presente invenzione ha una attività immunomodulante e una attività antiartritica e questa attività sono superiori a quelle di Levamisole.

Tabella 2

Risultati di prova di artrite da adiuvante

Composto	Rapporto di gonfiore (valore medio $\pm$ variazione standard, %)		
	<u>15 gg.</u>	<u>18 gg.</u>	<u>21 gg.</u>
controllo	84,4 $\pm$ 9,0	103,2 $\pm$ 9,7	107,5 $\pm$ 13,3
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCC2)CC1</chem> · citrato	54,6 $\pm$ 11,3	61,7 $\pm$ 13,0*	73,3 $\pm$ 14,6
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCCC2)CC1</chem> · citrato	49,4 $\pm$ 10,3*	62,0 $\pm$ 12,5*	68,1 $\pm$ 14,0
<chem>c1ccccc1N2CCN(C(=O)N3CCCCC3)CC2</chem> · cloridrato	39,5 $\pm$ 11,7**	56,1 $\pm$ 10,8**	74,4 $\pm$ 13,9
Cloridrato di Levamisole	65,2 $\pm$ 5,9	69,3 $\pm$ 7,1*	80,7 $\pm$ 9,6

Come illustrato nelle prove 1 e 2, il composto della presente invenzione è molto efficace come immunopotenziatore e pertanto il composto della presente invenzione è efficace per la cura di malattie accompagnate da riduzione o cambiamento anormale delle funzioni immuni, per esempio malattie autoimmuni come artrite reumatoide cronica.

Per quanto riguarda la immunoterapia di cancro, può venire preso in considerazione un metodo in cui una funzione immunespecifica oppure non specifica ridotta dallo stato di presenza di cancro viene aumentata mediante una certa reazione od un'altra e all'organismo vivente viene fornita resistenza al cancro per la cura contro il cancro. La partecipazione di macrofagi in questa reazione è indispensabile. Più specificamente (1) il macrofago attivato ha una citotossicità mediata da cellule di cancro, (2) il macrofago è una delle cellule ad effetto influente per la citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpi e (3) quando venga determinata una immunità specifica a cellule di cancro e vengano indotte cellule T che uccidono, l'antigene del cancro sulle cellule di cancro dovrebbe trasferirsi alle cellule T e venire riconosciuto come antigene,

per questo scopo, le cellule di cancro mediate dalle reazioni (1) e (2) vengono fagocitate dal macrofago. Quindi, il macrofago è molto importante per la immunoterapia di cancro.

I risultati della prova dell'effetto dell'ingrediente attivo della presente invenzione sul macrofago verrà ora descritto con riferimento alla seguente prova 3. Più specificamente, il macrofago separato e cellula leucemica EL-4 vengono mescolati e coltivati e ad un terreno di coltura viene aggiunta ^3H -timidina e viene determinata la quantità di ^3H -timidina incorporata nella cellula EL-4 per esaminare la attività del macrofago. Quando il macrofago venga attivato mediante somministrazione dell'ingrediente attivo della presente invenzione, si osserva inibizione della crescita di cellula EL-4, cioè, fagocitosi della cellula di cancro da parte del macrofago. Quindi, se viene misurata la quantità di assorbimento di ^3H -timidina e questa quantità risulta ridotta, essa conferma che il macrofago è stato attivato.

Prova 3 (prova in vitro di inibizione di crescita di cellula di cancro da parte del macrofago)

Procedimento di prova

Ad un gruppo di tre topi femmine ddY (aventi un peso corporeo di 25 g) vengono somministrati per via intraperitoneale 0,5 ml di una sospensione di 2 mg dell'ingrediente attivo della presente invenzione in 5 ml di una soluzione salina fisiologica. La dose è di 8 mg per kg di peso corporeo. Al gruppo di controllo viene somministrata in maniera simile una soluzione salina fisiologica. Dopo trascorsi 4 giorni, cellule addominali essudate vengono raccolte e depositate su una scatola di Petri di plastica per raccogliere macrofagi.

Poi, 1×10^6 dei macrofagi così ottenuti ed 1×10^5 di cellule leucemiche EL-4 di topo BL/6J C57 vengono mescolate e coltivate in un terreno di coltura RPMI 1640 al quale è stato aggiunto 10% di siero di embrione bovino (a 37°C in presenza di 5% di CO₂) per 24 ore. Poi vengono aggiunti 0,1 μ Ci di ³H-timidina e la coltura viene effettuata ancora per 16 ore. Cellule vengono raccolte su una carta da filtro dal terreno di coltura e la quantità di ³H-timidina assorbita viene determinata mediante un contatore a scintillamento di liquido. Il rapporto di assorbimento (%) viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Rapporto di assorbimento (\%)} = \frac{\text{(Numero di conteggio nel caso di coltura mista)}}{\text{(Numero di conteggio di coltura singola di cellule EL-4)}} \times \frac{\text{(Numero di conteggio nel caso di coltura singola di macrofagi)}}{100}$$

Il valore medio (in %) in un solo gruppi di tre topi viene determinato per ottenere i risultati mostrati in tabella 3. Per confronto, la prova viene eseguita in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole.

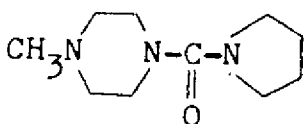
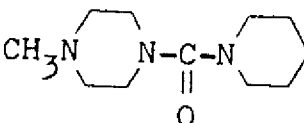
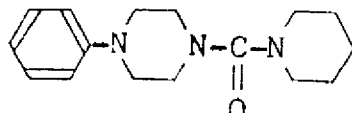
Risultati:

Si conferma che l'ingrediente attivo della presente invenzione inibisce spiccatamente l'assorbimento di ^3H -timidina da parte di cellule leucemiche EL-4 mentre cloridrato di Levamisole non inibisce tale azione.

Più specificamente, si conferma che l'ingrediente attivo della presente invenzione attiva il macrofago così da provocare fagocitosi di cellule di cancro mentre invece Levamisole mostra difficilmente tale effetto.

Tabella 3

Prova in vitro di inibizione di crescita di cellule
di cancro da parte di macrofagi

<u>Composto</u>	<u>Rapporto di assorbimen to (valore medio, %)</u>
controllo	80,2
 · citrato	25,7
 · citrato	22,6
 · cloridrato	21,9
cloridrato di Levamisole	49,0

I risultati della cura di cancro in animali mediante l'ingrediente attivo della presente invenzione verranno ora descritti con riferimento alle seguenti prove 4 e 5.

Prova 4 (prova di effetto antitumore per sarcoma 180
mediante somministrazione orale)

Procedimenti di prova:

Un gruppo di otto topi femmine ICR viene inoculato per via intradermica con 2×10^6 cellule di sarcoma 180 e, durante un periodo di 10 giorni dopo

trascorse 24 ore, viene somministrata per via orale una soluzione o sospensione dell'ingrediente attivo in una soluzione salina fisiologica ad una dose di 0,1 ml per 10 g di peso corporeo 1 volta al giorno. Al gruppo di controllo viene somministrata in maniera simile una soluzione salina fisiologica. La dose del composto è 100 mg per kg di peso corporeo. Il diametro D (mm) del tumore viene misurato e vengono determinati il valore medio ed il numero N di topi viventi per ottenere i risultati mostrati in tabella 4.

Risultati:

Le cellule di tumore inoculate si sono propagate e sono diventate tumori solidi. Tuttavia, se l'ingrediente attivo della presente invenzione viene somministrato per via orale ripetutamente, il tumore diminuisce di grandezza oppure scompare.

Per confronto, la prova viene effettuata in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole ma non si osserva alcuna notevole azione carcinostatica.

Tabella 4

Prova di effetto carcinostatico per sarcoma 180 mediante somministrazione orale

<u>Composto</u>	<u>Voce</u>	<u>Lasso di tempo (settimane)</u>					
		<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>
controllo	D	-	10,6	15,2	22,4	31,5	37,6
	N	6	6	6	6	5	1
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	7,7	6,3	5,5	4,7	0
	N	6	6	6	6	6	6
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	6,0	4,7	4,8	3,3	0
	N	6	6	6	6	6	6
<chem>c1ccc(cc1)N2CCN(C(=O)N3CCCCC3)CC2</chem> · cloridrato	D	-	6,2	3,8	4,4	5,3	0
	N	6	6	6	6	6	6
Cloridrato di Levamisole	D	-	10,2	16,2	20,7	29,6	28,1
	N	6	6	6	6	6	6

Nota:

D: diametro medio (mm) di tumore

N: numero di topi viventi

Prove (prova di effetto carcinostatico contro sarcoma
180 mediante somministrazione sottocutanea

Procedimenti di prova:

La prova viene effettuata nella medesima maniera descritta nella prova 4 eccetto che il composto attivo viene somministrato per via sottocutanea e la dose viene cambiata in 20 mg per kg di peso corporeo.

Risultati:

Viene osservato il cambiamento del diametro D (mm) del tumore e viene controllato il numero di topi viventi per ottenere risultati mostrati in tabella 5. Anche se la dose è 1/5 della dose adottata nel caso di somministrazione orale, può venire ottenuto il medesimo effetto ottenuto mediante la somministrazione orale. Al contrario, cloridrato di Levamisole non ha alcun effetto carcinostatico notevole.

Tabella 5

Prova di effetto carcinostatico contro sarcoma 180 mediante somministrazione sottocutanea

<u>Composto</u>	<u>Voce</u>	<u>Lasso di tempo (settimane)</u>					
		<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>
controllo	D	-	10,8	16,6	20,3	31,2	40,5
	N	6	6	6	6	4	1
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	2,2	3,6	6,1	1,2	0
	N	6	6	6	6	6	5
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	1,6	3,7	5,7	0,8	0
	N	6	6	6	6	6	6
<chem>c1ccccc1N2CCN(C(=O)N3CCCC3)CC2</chem> · cloridrato	D	-	2,4	3,9	5,2	0,2	0
	N	6	6	6	6	6	6
Cloridrato di Levamisole	D	-	7,7	14,8	14,4	30,2	31,6
	N	6	6	6	6	3	2

Nota:

D: diametro medio (mm) di tumore

N: numero di topi viventi

Quando i risultati ottenuti nelle prove 4 e 5 vengano presi in considerazione alla luce dei risultati ottenuti nelle tabelle 1 e 3 si osserva che l'ingrediente attivo della presente invenzione attiva la funzione immunizzante dell'ospite portatore di cancro e mostra pertanto un effetto carcinostatico. L'effetto carcinostatico del composto della presente invenzione è più potente di quello di Levamisole.

La tossicità del composto attivo della presente invenzione verrà ora descritta con riferimento alla prova 6 che segue.

Prova 6 (prova di tossicità acuta mediante somministrazione orale)

Procedimento di prova:

Una soluzione o sospensione del composto in una soluzione salina fisiologica viene somministrata per via orale ad un gruppo di tre topi maschi ddY e, dopo 7 giorni, viene determinato il valore della DL_{50} calcolato.

Risultati:

Il valore della DL_{50} calcolato dell'ingrediente attivo secondo la presente invenzione è nel campo da 600 a 1500 mg/kg che è molto superiore al valore della DL_{50} calcolato per cloridrato di Levamisole, che è nel campo da 150 a 200 mg/kg. Quindi, si confer

ma che la tossicità del composto della presente invenzione è molto bassa.

Quando il composto della presente invenzione venga usato come medicina, esso può venire impiegato sotto forma di una base libera. Tuttavia, in vista della stabilità e facilità di formulazione di un farmaco, si preferisce che il composto venga usato sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile quale un cloridrato, un citrato od un fosfato, specialmente quando venga richiesta solubilità in acqua come nel caso di una iniezione.

Il composto della presente invenzione può venire somministrato sotto forma di una formulazione usuale secondo un metodo usuale adottato per agenti immunopotenziatori o carcinostatici usuali. Per esempio, come preparato per la somministrazione orale può venire nominata una capsula, un granulo, una pastiglia, un granulo fine, una compressa ed uno sciroppo. Inoltre, per la somministrazione diretta nel retto è adatta una supposta. Inoltre, può venire usata una iniezione per la somministrazione endovenosa, somministrazione sottocutanea oppure somministrazione intramuscolare.

L'immunopotenziatore della presente invenzio

ne può venire usato per la cura di malattie accompa__gnate da riduzione o anormale cambiamento della fun__zione immunizzante, per esempio contro malattie au__toimmuni come artrite reumatoide cronica e miosite multipla, varie malattie infettive e vari tipi di cancro. Mediante somministrazione del composto del__la presente invenzione ci si può aspettare recupero o normalizzazione della funzione immunizzante di pa__zienti che soffrono di queste malattie. Per quanto riguarda tipi di cancro ai quali il composto della presente invenzione viene applicato appropriatamen__te possono venire nominati cancro dello stomaco, cancro del colon, cancro del retto, cancro della mammella, cancro del fegato, cancro uterino, altri tumori, reticolo-sarcoma, linfosarcomatosi, altri sarcomi e leucosi. Mediante somministrazione del composto della presente invenzione può venire pre__visto alleviamento di sintomi soggettivi e di sin__tomi oggettivi.

Il metodo di somministrazione e la forma di preparazione possono venire scelti in maniera appro__priata a seconda del tipo di malattia e della condi__zione del paziente. Nel caso di somministrazione orale, la dose del composto della presente invenzio__ne è 1 fino a 100 mg, preferibilmente 1 fino a 20 mg

per kg di peso corporeo per giorno. Nel caso di somministrazione al retto, la dose è preferibilmente 1 fino a 100 mg per kg di peso corporeo per giorno, nel caso di somministrazione endovenosa la dose è preferibilmente 1 fino a 10 mg per kg di peso corporeo per giorno e nel caso di somministrazione per via sottocutanea oppure intramuscolare la dose è preferibilmente 1 fino a 30 mg per kg di peso corporeo. Si preferisce che la dose venga regolata in maniera appropriata a seconda del tipo di malattie e della condizione del paziente. L'effetto del composto attivo della presente invenzione può venire aumentato impiegando altre medicine in combinazione appropriata a seconda del tipo della malattia e della condizione del paziente. Per esempio, quando vengano somministrati agenti chemioterapautici per cancro, quali antimetaboliti ed agenti alchilanti, che hanno un effetto secondario di ridurre la capacità immunizzanti di pazienti, se in combinazione viene usato il composto attivo della presente invenzione, viene impedita la manifestazione di tale effetto secondario e viene aumentato sinergicamente l'effetto curativo.

Medicine dal composto della presente invenzione possono venire preparate secondo la formula usua

le e metodo adottati per ordinari agenti immunopotenzianti oppure antitumore.

La presente invenzione verrà ora descritta in dettaglio con riferimento agli esempi che seguono.

Esempio 1

[1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina]

In 50 ml di toluolo vengono sciolti 8,1 g (0,05 moli) di 1-metil-4-clorocarbonilpiperazina a temperatura ambiente e nella soluzione di cui sopra viene fatta gocciolare a 0°C una soluzione di 10,7 g (0,15 moli) di pirrolidina in 50 ml di toluolo, entro un periodo di 30 minuti. Il miscuglio viene trattato a ricadere per 1 ora per completare la reazione. Il miscuglio di reazione viene raffreddato ed il cristallo giallo precipitato (cloridrato di pirrolidina) viene separato mediante filtrazione. Il filtrato viene essiccato su solfato di sodio anidro e toluolo come solvente viene eliminato mediante distillazione sotto pressione ridotta per ottenere 1-metil-4-(pirrolidinocarbonil)-piperazina grezza come residuo di distillazione. Il prodotto grezzo viene purificato mediante distillazione sotto pressione ridotta per ottenere 6,6 g di un prodotto puro avente un punto di ebollizione di 109,5 fino a 110,0°C a 0,5-0,6 mm di Hg assoluti. La resa è 66,9%. I valori dell'analisi elementa-

re sono come seguono:

trovato: C = 61,07%, H = 9,89 %, N = 21,20%

Analisi calcolata per: $C_{10}H_{19}N_3O$:

C = 60,87%, H = 9,73%, N = 21,30%

Esempio 2

[citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina]

In 20 ml di acetone vengono sciolti 2,0 g (0,01 moli) di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina a temperatura ambiente ed una soluzione di 1,9 g (0,01 moli) di anidride citrica in 30 ml di acetone viene fatta gocciolare nella soluzione di cui sopra a temperatura ambiente entro un periodo di circa 30 minuti. Il miscuglio viene agitato per un certo tempo alla medesima temperatura ed il cristallo precipitato viene ricavato mediante filtrazione e lavato con acetone. Il cristallo ricavato viene lavato in 50 ml di etilacetato a 50°C agitando per 3 ore. Il cristallo viene ricavato mediante filtrazione, lavato con etilacetato ed essiccato per ottenere 5,6 g di citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidino-carbonil)-piperazina avente un punto di fusione di 160 fino a 161°C. La resa è 71,9%. I valori dell'analisi elementare sono come seguono:

trovato: C = 49.21 %, H = 7.00 %, N = 11.00 %

Anal.calcol. per $C_{16}H_{27}N_3O_8$: C = 49.34 %, H = 7.00 %, N = 10.79 %

Esempio 3

[1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e suo citrato].

La reazione ed il post-trattamento vengono effettuati nella medesima maniera descritta nell'esempio 1 eccetto che invece di pirrolidina vengono impiegati 12,8 g (0,15 moli) di piperidina per ottenere 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina avente un punto di ebollizione di 151 fino a 153°C a 4-5 mm di Hg assoluti. I valori dell'analisi elementare sono come seguono:

trovato: C = 56.57 %, H = 9.49 %, N = 26.39%

Anal.calcol. per $C_{10}H_{20}N_4O$: C = 56.43 %, H = 9.72 %, N = 26.09 %

La reazione viene eseguita nella medesima maniera descritta nell'esempio 2 eccetto che la base libera così ottenuta viene usata per ottenere un citrato avente un punto di fusione di 115 fino a 120°C (decomposizione).

Esempio 4

[1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e suo cloridrato].

La reazione ed il post-trattamento vengono effettuati nella medesima maniera descritta nell'esempio 1 eccetto che in luogo di 1-metil-4-clorocarbonilpiperazina vengono impiegati 11,2 g (0,05 moli) di 1-fenil-4-clorocarbonilpiperazina e in luogo di pirrolidina vengono usati 12,8 g (0,15 moli) di piperidina per ottenere 1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina avente un punto di ebollizione di 106 fino a 114°C a 15 mm di Hg ed un punto di fusione di 63 fino a 66,5°C.

La base libera così ottenuta viene sciolta in cloroformio e la soluzione viene saturata con acido cloridrico gassoso ed agitata per un certo tempo. La soluzione viene trattata mediante l'usuale lavorazione ulteriore per ottenere cloridrato di 1-fenil-4-(N-piperidino-carbonil)-piperazina avente un punto di fusione di 186,5 fino a 189°C. I valori dell'analisi elementare sono come seguono:

trovato: C 62,04%, H 7,86%, N = 13,60%, Cl = 11,23%

Anal. calcol. per $C_{16}H_{24}N_3OCl$: C = 62,02%, H = 7,81%

N = 13,56%, Cl = 11,44%.

Esempio 5

[Comprimette contenenti citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 50 g di citrato di 1-metil-4-

(N-pirrolidino-carbonil)-piperazina, 38 g di lattosio, 35 g di amido di granoturco e 20 g di cellulosa cristallina viene agitato sufficientemente ed il miscuglio viene impastato e granulato con una soluzione di 5 g di idrossipropilcellulosa e 100 ml di acqua ed essiccato a 50°C per 4 ore. Il miscuglio granulato viene mescolato con 2 g di stearato di magnesio e modellato in compresse, ciascuna di un peso di 150 mg, mediante una macchina pastigliatrice.

Esempio 6

[Capsule contenenti citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo].

Un miscuglio di 100 g di citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 94 g di lattosio, 60 g di amido di granoturco, 40 g di cellulosa cristallina e 6 g di stearato di magnesio viene agitato sufficientemente ed introdotto in capsule dure in una quantità di 300 mg per capsule impiegando una macchina da incapsulamento per ottenere capsule.

Esempio 7

[granuli contenenti cloridrato di 1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 100 g di cloridrato di 1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 152 g di lattosio, 140 g di amido di granoturco ed 80 g di

cellulosa cristallina viene agitato sufficientemente ed il miscuglio viene impastato e granulato con una soluzione di 20 g di idrossipropilcellulosa in 400 ml di acqua ed essiccato a 50°C per 4 ore. I granuli vengono fatti passare attraverso un vaglio da 12 mesh per effettuare la classificazione ed i granuli vengono mescolati con 8 g di stearato di magnesio ed il miscuglio viene agitato sufficientemente per ottenere granuli.

Esempio 8

[Supposta contenente citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 10 g di citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e 90 g di Witepsol[®] W-35 (Dynamill Novel Chemicals, West Germany) vengono riscaldati e fusi a 60°C e la massa fusa viene colata in stampi in modo che il peso di ciascuna supposta sia 15 g oppure 3 g. La massa fusa colata viene raffreddata e solidificata per ottenerne supposte.

Esempio 9

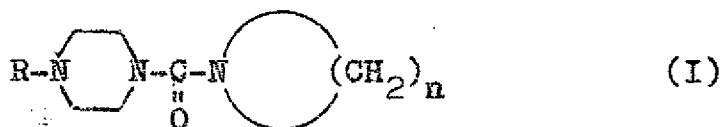
[Iniezioni contenenti citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 10 g di citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e 0,4 g di cloruro di sodio viene sciolto in una quantità appropriata

di acqua distillata per iniezioni in modo che la quantità totale sia 100 ml. La iniezione così formata è adatta per la somministrazione endovenosa.

- RIVENDICAZIONI -

1. Composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I) e suo sale di acido inorganico oppure organico:



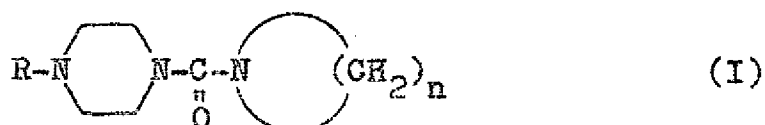
in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero del valore di 4 oppure 5.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R nella formula generale (I) è un gruppo metilico ed n è 4.

3. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R nella formula generale (I) è un gruppo metilico ed n è 5.

4. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R nella formula generale (I) è un gruppo fenilico ed n è 5.

5. Procedimento per la preparazione di composti di piperazina rappresentati dalla formula generale (I) che segue:



in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero del valore di 4 oppure 5, comprendente l'operazione di condensare una 4-clorocarbonil-piperazina 1-sostituita rappresentata dalla formula generale (II) che segue:

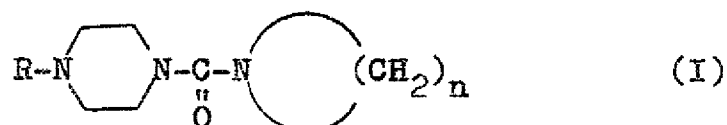


in cui R è come definito sopra, con un'ammina ciclica rappresentata dalla seguente formula generale (III):



in cui n è come definito sopra.

6. Immunopotenziatore comprendente, come ingrediente attivo, un composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I):



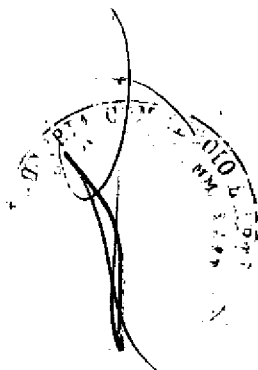
in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero del valore di 4 oppure 5 sotto forma di una base libera oppure di un sale di addizione con acido biologicamente accettabile.

7. Immunopotenziatore secondo la rivendicazione

6, il quale è nella forma di una base libera oppure di un sale biologicamente accettabile, combinato con un diluente o veicolo farmaceuticamente accettabile.

p.p. MITSUITOATSU CHEMICAL, INC.

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI S.p.A.



h7787A/81

UFFICIO BREVETTI

Governo Giapponese

Si certifica che l'annessa è una copia fedele della domanda come depositata in questo Ufficio.

Data della domanda: 15 febbraio 1980.

Numero della domanda: Sho. 55-16560

Richiedente: MITSUITOATSU CHEMICALS, INC.

f.

10 marzo 1981

F.to Haruki Shimada
Direttore Generale
dell'Ufficio Brevetti

Cert. shutu-Sho-Sho

Data:

.....

LEGGE SUI BREVETTI (1)

(Domanda soggetta alla regolamentazione della Norma
secondo l'art. 38 della Legge sui Brevetti)

15 febbraio 1980

Al: Direttore Generale dell'Ufficio Brevetti

1. Titolo dell'invenzione:

"Nuovi compostipiperazinici, procedimento per pre
pararli e loro impiego".

2. Numero delle invenzioni descritte nel contesto
della domanda di brevetto: 3

3. Inventori:

Indirizzo 2141, Togo, Mobara-shi, Chiba-ken Japan
Nome Yutaka OKAZAKI (e altri tre)

4. Richiedente del brevetto

Indirizzo 2-5, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo, Japan

Nome MITSUITOATSU CHEMICALS, INC.

Representante: Seiichi MATSUBAYA

5. Agente

Indirizzo Hogaku Building 503, 19-14, Toranomom,
1-chome, Tokyo, Japan

Procuratore(7577) Chikao TODA
Tel. 508-0333

6. Lista dei documenti annessi:

(1) descrizione	una copia
(2) copia della domanda	una copia.
(3) procura	una copia

7. Inventori congiunti:

Indirizzo:	2141, Togo, Mobara-shi, Chiba-ken, Japan
Nome	Hiroshi TOKUDA
Indirizzo	308, 2-chome, Kamishirakawa-machi, Oomuta-shi, Fukuoka-ken, Japan
Nome	Shiyoichiro MIYAHARA
Indirizzo	300, Hirabaru-machi, Oomuta-shi, Fukuoka-ken, Japan
Nome	Yoshitsugu YAMADA

specificazione

SIB-82352

~~MP 39-2355~~

Sho - 55-16560

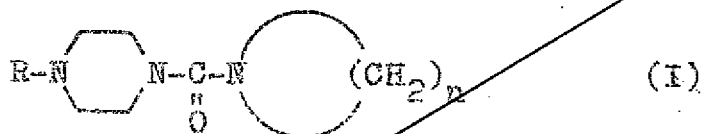
1. Titolo dell'invenzione

~~DESCRIZIONE dell'invenzione industriale del titolo:~~
^{NUOVI}
"COMPOSTI PIPERAZINICI, PROCEDIMENTO PER PREPARARLI
E LORO IMPIEGO"

~~della ditta giapponese MITSUBISHI, INC.,
con sede in TOKYO (Giappone)~~

Riassunto

~~La presente invenzione si riferisce ad un nuo-~~
vo composto di piperazina rappresentato dalla seguen-
te formula generale (I)



in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenili-
co, ed n è un numero del valore di 4 oppure 5.

Questo composto è pregevole come immunopo-
tenziatore per la cura di artrite reumatoide cronica,
~~e per la immunoterapia di cancro.~~

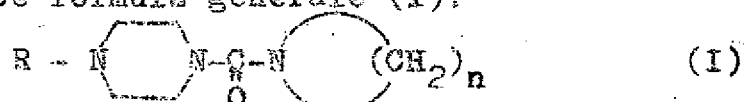
2. Ciò che si rivendica è:

(vedi pag. 32)

3. Rettig 1101a Descrizione dell'invenzione

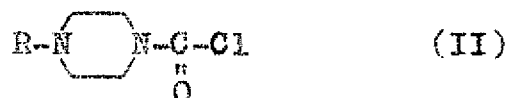
La presente invenzione si riferisce ad un nuovo composto di piperazina, ad un procedimento per la sua preparazione e ad una composizione medicinale che contiene questo nuovo composto di piperazina come ingrediente attivo.

Secondo la presente invenzione viene fornito un nuovo composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I):

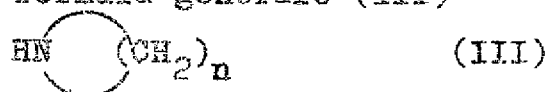


in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero ~~del valore~~ di 4 oppure 5.

Secondo la presente invenzione viene fornito anche un procedimento per la preparazione di nuovi composti di piperazina rappresentati dalla formula generale (I) di cui sopra, che comprende ~~l'operazione~~ ~~di~~ condensare una 4-cloro-carbonilpiperazina ~~i-so~~stituita rappresentata dalla seguente formula generale (II):

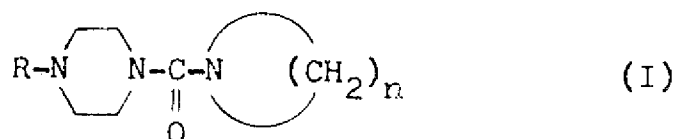


in cui R è come definito sopra con riguardo alla formula generale (I), con una ammina ciclica rappresentata dalla seguente formula generale (III)



in cui n è un numero ~~del valore~~ di 4 oppure 5.

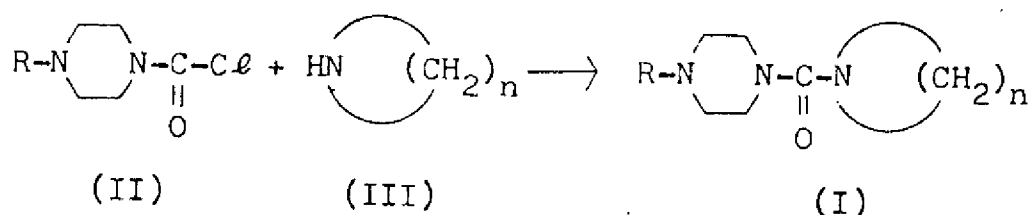
Inoltre, secondo la presente invenzione, viene fornito un agente immunoattivo che comprende, come ingrediente attivo, un nuovo composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I)



in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico, ed n è un numero ~~del valore~~ di 4 oppure 5.

Questo agente immunoattivo viene usato per la cura di reumatismo cronico e nella immunoterapia di cancro.

Il nuovo composto di piperazina viene ottenuto mediante la reazione rappresentata dalla seguente formula di reazione:



Più specificamente, il nuovo composto di piperazina della presente invenzione viene ottenuto condensando una 4-cloro-carbonilpiperazina 1-sostituita rappresentata dalla formula generale (II) di cui sopra

in cui R è come definito sopra con riguardo alla formula generale (I) con una ammina ciclica della formula generale (III) di cui sopra in cui n è un numero ~~del valore~~ di 4 oppure 5 (il composto in cui n è 4 sta per pirrolidina e quello in cui n è 5 sta per piperidina), se si desidera in un solvente inattivo per la reazione quale benzolo oppure toluolo. La reazione viene effettuata a circa 0 fino a circa 120°C ed è sostanzialmente completa in 1 fino a 5 ore.

Il composto della formula generale (I) ottenuto mediante la reazione di cui sopra, può venire isolato e purificato secondo un metodo usuale, per esempio un metodo in cui il miscuglio di reazione viene estratto con un acido diluito, l'estratto viene reso alcalino per mettere in libertà il composto desiderato e viene effettuata una distillazione sotto pressione ridotta. La base libera così ottenuta del composto desiderato può venire convertita ad un sale di acido secondo un procedimento usuale. Inoltre, può venire adottato un metodo in cui il prodotto viene purificato sotto forma di un sale di addizione con acido e questo viene poi trattato con un alcali appropriato per ottenere una base libera.

Il composto della formula generale (II) può venire preparato mediante un metodo noto, ad esempio

un metodo comprendente la reazione di una piperazina 1-sostituita con flogena.

Esempi specifici del nuovo composto di piperazina preparato secondo la presente invenzione sono come seguono:

1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-etil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-n-propil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-i-propil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-n-butil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-i-butil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-etil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-n-propil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-i-propil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 1-n-butil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina ed 1-i-butil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina.

Il composto della presente invenzione rappresentato dalla formula generale (I) di cui sopra possiede attività farmacologiche. Con ^{nostra} grande sorpresa è stato trovato che il composto della presente invenzione ha un elevato effetto immunopotenziante. La tossicità del composto è molto bassa. Quindi, il composto della presente invenzione è molto pregevole come medicina.

Questo punto verrà ora descritto in dettaglio con riferimento alle prove.

Vari sistemi di prova impiegando animali sono stati proposti per determinare l'effetto immunopotenziante. Risultati della prova di rinforzo della ipersensibilità ritardata, che è una prova tipica fra queste prove, verranno ora descritti.

La ipersensibilità ritardata indotta quando picrilcloruro (2-cloro-1,3,5-trinitrobenzolo) venga applicata sulla pelle di un topo è nota come una immunità cellulare tipica e questo è uno dei sistemi di prova adottati ampiamente nel mondo [vedi Asherson, G.L. and Ptak, W: Contact and Delayed Hypersensitivity in the Mouse I, Active Sensitization and Passive Transfer, *Immunology*, 15, 405-416 (1968)].

Questo sistema viene usato per la prova di rinforzo della ipersensibilità ritardata.

Prova 1 (prova di rinforzo di ipersensibilità ritardata)

Procedimenti di prova:

Viene usato per la prova un grappe di otto topi maschi ICR, ciascuno avente un peso corporeo di circa 30 g.

La sensibilizzazione viene effettuata applicando una soluzione al 7% di picril-cloruro in un miscu-

glio 4/1 di olio di olive ed acetone sull'addome rasata del topo.

Simultaneamente alla sensibilizzazione, una soluzione o sospensione del composto della presente invenzione in una soluzione a 0,2% di carbossimetilcellulosa in una soluzione salina fisiologica viene somministrata per via orale al topo ad una dose di 50 mg per kg del peso corporeo. Al gruppo di controllo viene somministrata in maniera simile una soluzione a 0,2% di carbossimetilcellulosa in una soluzione salina fisiologica.

La ipersensibilità ritardata viene eccitata 7 giorni dopo la sensibilizzazione stringendo l'orecchio del topo con una pinza avvolta con un feltro impregnato di una soluzione ad 1% di picrilcloruro in olio di olive e ricoprendo l'orecchio con la soluzione. Lo spessore dell'orecchia viene misurato prima della eccitazione e 24 ore dopo la eccitazione ed il rapporto di aumento dello spessore (valore medio di entrambe le orecchie in 8 topi più o meno la deviazione standard (viene ottenuto come mostrato nella tabella 1.

Per confronto, la prova viene eseguita in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole ed i risultati ottenuti sono mostrati in tabella 1. Ven

gono effettuate prove F.t. Il gruppo in cui il risultato di prova è importante ad un livello di $P < 0,05$ viene marcato con un asterisco(*), e il gruppo in cui il risultato di prova è importante ad un livello di $P < 0,01$ viene marcato con due asterischi(**).

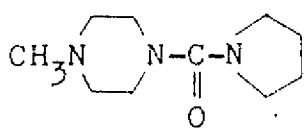
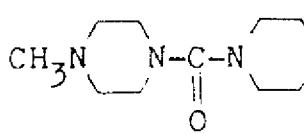
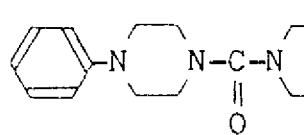
Risultati:

Quando il composto della presente invenzione venga somministrato simultaneamente alla sensibilizzazione, la ipersensibilità ritardata prodotta dalla ec citazione risulta rinforzata e l'effetto rinforzante è superiore a quello ottenuto mediante Levamisole.

Pertanto, si conferma che il composto della presente invenzione ha l'effetto di attivare la risposta di immunità cellulare (effetto immunopotenziante) in topi e questa attività è superiore a quella prodotta da Levamisole.

Tabella 1

Risultati di prova di rinforzo di ipersensibilità
ritardata

Composto	Rapporto di aumento di spessore di orecchia (valore medio $\pm$ varia- zione standard, %)
Controllo	29,6 $\pm$ 1,9
 · citrato	36,7 $\pm$ 2,5 *
 · citrato	43,5 $\pm$ 2,8 **
 · cloridrato	45,0 $\pm$ 4,6 **
cloridrato di Levamisole	35,6 $\pm$ 2,4

L'artrite da adiuvante in ratti prodotta mediante iniezione di un adiuvante di *Mycobacterium tuberculosis* viene spesso utilizzata per una prova modello di reumatismo cronico nell'uomo.

Il meccanismo di manifestazione di questa malattia non è stato completament chiarito ma è noto che la immunità cellulare svolge un ruolo importante. L'azione immunoattiva del composto della presente invenzione viene saggiata secondo questa prova

nota di artrite da adiuvante.

Prova 2 (prova di artrite da adiuvante, tabella 2)

Procedimenti di prova:

Viene impiegato per la prova un gruppo di 10 ratti maschi SD dell'età di 9 settimane. In 0,1 ml di paraffina fluida vengono sospesi 0,4 mg di cellule morte secche di *Mycobacterium tuberculosis* e la sospensione viene iniettata sotto la pelle del piede della zampa posteriore destra. Il composto della presente invenzione viene somministrato per via sottocutanea per 9 volte complessivamente prima e dopo la iniezione dell'adiuvante. Il composto di prova viene sciolto in una soluzione salina fisiologica e somministrato ad una dose di 5 mg per kg di peso corporeo. Il volume di gonfiore della zampa posteriore sinistra viene misurato durante il periodo a partire dal giorno della iniezione fino al giorno del completamento della prova e viene calcolato il rapporto di gonfiore. Per confronto, la prova viene effettuata in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 2. Prove F.t vengono effettuate sui risultati di prova ottenuti. Il gruppo in cui il risultato di prova è significativo ad un livello di $P < 0,05$ viene marcato con un asterisco ed il gruppo con il risultato di pro

va significativo ad un livello di $P < 0,01$ viene marcato con due asterischi.

Risultati:

L'infiammazione secondaria della artrite da adiuvante viene nettamente controllata dal composto della presente invenzione e l'effetto è statisticamente importante con riguardo al gruppo di controllo al quale non è stato somministrato alcun composto. L'effetto prodotto dal composto della presente invenzione è superiore a quello di Levamisole usato come composto di riferimento ma fra i due composti non vi è una differenza statisticamente significativa. Pertanto, si conferma che il composto della presente invenzione ha una attività immunomodulante e una attività antiartritica e questa attività sono superiori a quelle di Levamisole.

Tabella 2

Risultati di prova di artrite da adiuvante

Composto	Rapporto di gonfiore (valore medio $\pm$ variazione standard, %)		
	<u>15 gg.</u>	<u>18 gg.</u>	<u>21 gg.</u>
controllo	84,4 $\pm$ 9,0	103,2 $\pm$ 9,7	107,5 $\pm$ 13,3
<chem>CC1CCN(C1)C(=O)N2CCNCC2</chem> · citrato	54,6 $\pm$ 11,3	61,7 $\pm$ 13,0*	73,3 $\pm$ 14,6
<chem>CC1CCN(C1)C(=O)N2CCNCC2</chem> · citrato	49,4 $\pm$ 10,3*	62,0 $\pm$ 12,5*	68,1 $\pm$ 14,0
<chem>c1ccccc1N2CCN(C2)C(=O)N3CCNCC3</chem> · cloridrato	39,5 $\pm$ 11,7**	56,1 $\pm$ 10,8**	74,4 $\pm$ 13,9
Cloridrato di Levamisole	65,2 $\pm$ 5,9	69,3 $\pm$ 7,1*	80,7 $\pm$ 9,6

Come illustrato nelle prove 1 e 2, il composto della presente invenzione è molto efficace come immunopotenziatore e pertanto il composto della presente invenzione è efficace per la cura di malattie accompagnate da riduzione o cambiamento anormale delle funzioni immuni, per esempio malattie autoimmuni come artrite reumatoide cronica.

Per quanto riguarda la immunoterapia di cancro, può venire preso in considerazione un metodo in cui una funzione immunespecifica oppure non specifica ridotta dallo stato di ^{palimento} ~~presenza~~ di cancro viene aumentata mediante una certa reazione od un'altra e all'organismo vivente viene fornita resistenza al cancro per la cura contro il cancro. La partecipazione di macrofagi in questa reazione è indispensabile. Più specificamente (1) il macrofago attivato ha una citotossicità mediata da cellule di cancro, (2) il macrofago è una delle cellule ad effetto influente per la citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpi e (3) quando venga determinata una immunità specifica a cellule di cancro e vengano indotte cellule T che uccidono, l'antigene del cancro sulle cellule di cancro dovrebbe trasferirsi alle cellule T e venire riconosciuto come antigene,

per questo scopo, le cellule di cancro mediate dalle reazioni (1) e (2) vengono fagocitate dal macrofago. Quindi, il macrofago è molto importante per la immunoterapia di cancro.

I risultati della prova dell'effetto dell'ingrediente attivo della presente invenzione sul macrofago verrà ora descritto con riferimento alla seguente prova 3. Più specificamente, il macrofago separato e cellula leucemica EL-4 vengono mescolati e coltivati e ad un terreno di coltura viene aggiunta ^3H -timidina e viene determinata la quantità di ^3H -timidina incorporata nella cellula EL-4 per esaminare la attività del macrofago. Quando il macrofago venga attivato mediante somministrazione dell'ingrediente attivo della presente invenzione, si osserva inibizione della crescita di cellula EL-4, cioè, fagocitosi della cellula di cancro da parte del macrofago. Quindi, se viene misurata la quantità di assorbimento di ^3H -timidina e questa quantità risulta ridotta, essa conferma che il macrofago è stato attivato.

Prova 3 (prova in vitro di inibizione di crescita di cellula di cancro da parte del macrofago)

Procedimento di prova

Ad un gruppo di tre topi femmine ddY (aventi un peso corporeo di 25 g) vengono somministrati per via intraperitoneale 0,5 ml di una sospensione di 2 mg dell'ingrediente attivo della presente invenzione in 5 ml di una soluzione salina fisiologica. La dose è di 8 mg per kg di peso corporeo. Al gruppo di controllo viene somministrata in maniera simile una soluzione salina fisiologica. Dopo trascorsi 4 giorni, cellule addominali essudate vengono raccolte e depositate su una scatola di Petri di plastica per raccogliere macrofagi.

Poi, 1×10^6 dei macrofagi così ottenuti ed 1×10^5 di cellule leucemiche EL-4 di topo BL/6J C57 vengono mescolate e coltivate in un terreno di coltura RPMI 1640 al quale è stato aggiunto 10% di siero di embrione bovino (a 37°C in presenza di 5% di CO₂) per 24 ore. Poi vengono aggiunti 0,1 μ Ci di ³H-timidina e la coltura viene effettuata ancora per 16 ore. Cellule vengono raccolte su una carta da filtro dal terreno di coltura e la quantità di ³H-timidina assorbita viene determinata mediante un contatore a scintillamento di liquido. Il rapporto di assorbimento (%) viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Rapporto di assorbimento (\%)} = \frac{(\text{Numero di conteggio nel caso di coltura mista})}{(\text{Numero di conteggio di coltura singola di cellule EL-4})} \times \frac{(\text{Numero di conteggio nel caso di coltura singola di macrofagi})}{100}$$

Il valore medio (in %) in un solo gruppi di tre topi viene determinato per ottenere i risultati mostrati in tabella 3. Per confronto, la prova viene eseguita in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole.

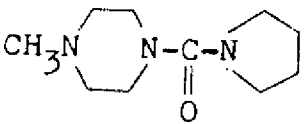
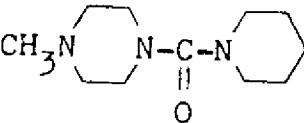
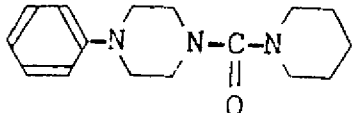
Risultati:

Si conferma che l'ingrediente attivo della presente invenzione inibisce spiccatamente l'assorbimento di ^3H -timidina da parte di cellule leucemiche EL-4 mentre cloridrato di Levamisole non inibisce tale azione.

Più specificamente, si conferma che l'ingrediente attivo della presente invenzione attiva il macrofago così da provocare fagocitosi di cellule di cancro mentre invece Levamisole mostra difficilmente tale effetto.

Tabella 3

Prova in vitro di inibizione di crescita di cellule
di cancro da parte di macrofagi

<u>Composto</u>	<u>Rapporto di assorbimen to (valore medio, %)</u>
controllo	80,2
 · citrato	25,7
 · citrato	22,6
 · cloridrato	21,9
cloridrato di Levamisole	49,0

I risultati della cura di cancro in animali mediante l'ingrediente attivo della presente invenzione verranno ora descritti con riferimento alle seguenti prove 4 e 5.

Prova 4 (prova di effetto antitumore per sarcoma 180
mediante somministrazione orale)

Procedimenti di prova:

Un gruppo di otto topi femmine ICR viene inoculato per via intradermica con 2×10^6 cellule di sarcoma 180 e, durante un periodo di 10 giorni dopo

trascorse 24 ore, viene somministrata per via orale una soluzione o sospensione dell'ingrediente attivo in una soluzione salina fisiologica ad una dose di 0,1 ml per 10 g di peso corporeo 1 volta al giorno. Al gruppo di controllo viene somministrata in maniera simile una soluzione salina fisiologica. La dose del composto è 100 mg per kg di peso corporeo. Il diametro D (mm) del tumore viene misurato e vengono determinati il valore medio ed il numero N di topi viventi per ottenere i risultati mostrati in tabella 4.

Risultati:

Le cellule di tumore inoculate si sono propagate e sono diventate tumori solidi. Tuttavia, se l'ingrediente attivo della presente invenzione viene somministrato per via orale ripetutamente, il tumore diminuisce di grandezza oppure scompare.

Per confronto, la prova viene effettuata in maniera simile impiegando cloridrato di Levamisole ma non si osserva alcuna notevole azione carcinostatica.

Tabella 4

Prova di effetto carcinostatico per sarcoma 180 mediante somministrazione orale

<u>Composto</u>	<u>Voce</u>	<u>Lasso di tempo (settimane)</u>					
		<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>
controllo	D	-	10,6	15,2	22,4	31,5	37,6
	N	6	6	6	6	5	1
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	7,7	6,3	5,5	4,7	0
	N	6	6	6	6	6	6
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	6,0	4,7	4,8	3,3	0
	N	6	6	6	6	6	6
<chem>c1ccc(cc1)N2CCN(C(=O)N3CCCCC3)CC2</chem> · cloridrato	D	-	6,2	3,8	4,4	5,3	0
	N	6	6	6	6	6	6
Cloridrato di Levamisole	D	-	10,2	16,2	20,7	29,6	28,1
	N	6	6	6	6	6	6

Nota:

D: diametro medio (mm) di tumore

N: numero di topi viventi

Prova (prova di effetto carcinostatico contro sarcoma
180 mediante somministrazione sottocutanea

Procedimenti di prova:

La prova viene effettuata nella medesima maniera descritta nella prova 4 eccetto che il composto attivo viene somministrato per via sottocutanea e la dose viene cambiata in 20 mg per kg di peso corporeo.

Risultati:

Viene osservato il cambiamento del diametro D (mm) del tumore e viene controllato il numero di topi viventi per ottenere risultati mostrati in tabella 5. Anche se la dose è 1/5 della dose adottata nel caso di somministrazione orale, può venire ottenuto il medesimo effetto ottenuto mediante la somministrazione orale. Al contrario, cloridrato di Levamisole non ha alcun effetto carcinostatico notevole.

Tabella 5

Prova di effetto carcinostatico contro sarcoma 180 mediante somministrazione sottocutanea

<u>Composto</u>	<u>Voce</u>	<u>Lasso di tempo (settimane)</u>					
		<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>10</u>
controllo	D	-	10,8	16,6	20,3	31,2	40,5
	N	6	6	6	6	4	1
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	2,2	3,6	6,1	1,2	0
	N	6	6	6	6	6	5
<chem>CCN1CCN(C(=O)N2CCCC2)CC1</chem> · citrato	D	-	1,6	3,7	5,7	0,8	0
	N	6	6	6	6	6	6
<chem>c1ccc(cc1)N2CCN(C(=O)N3CCCC3)CC2</chem> · cloridrato	D	-	2,4	3,9	5,2	0,2	0
	N	6	6	6	6	6	6
Cloridrato di Levamisole	D	-	7,7	14,8	14,4	30,2	31,6
	N	6	6	6	6	3	2

Nota:

D: diametro medio (mm) di tumore

N: numero di topi viventi

Quando i risultati ottenuti nelle prove 4 e 5 vengono presi in considerazione alla luce dei risultati ottenuti nelle tabelle 1 e 3 si osserva che l'ingrediente attivo della presente invenzione attiva la funzione immunizzante dell'ospite portatore di cancro e mostra pertanto un effetto carcinostatico. L'effetto carcinostatico del composto della presente invenzione è più potente di quello di Levamisole.

La tossicità del composto attivo della presente invenzione verrà ora descritta con riferimento alla prova 6 che segue.

Prova 6 (prova di tossicità acuta mediante somministrazione orale)

Procedimento di prova:

Una soluzione o sospensione del composto in una soluzione salina fisiologica viene somministrata per via orale ad un gruppo di tre topi maschi ddY e, dopo 7 giorni, viene determinato il valore della DL_{50} calcolato.

Risultati:

Il valore della DL_{50} calcolato dell'ingrediente attivo secondo la presente invenzione è nel campo da 600 a 1500 mg/kg che è molto superiore al valore della DL_{50} calcolato per cloridrato di Levamisole, che è nel campo da 150 a 200 mg/kg. Quindi, si confer

ma che la tossicità del composto della presente invenzione è molto bassa.

Quando il composto della presente invenzione venga usato come medicina, esso può venire impiegato sotto forma di una base libera. Tuttavia, in vista della stabilità e facilità di formulazione di un farmaco, si preferisce che il composto venga usato sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile quale un cloridrato, un citrato od un fosfato, specialmente quando venga richiesta solubilità in acqua come nel caso di una iniezione.

Il composto della presente invenzione può venire somministrato sotto forma di una formulazione usuale secondo un metodo usuale adottato per agenti immunopotenziatori o carcinostatici usuali. Per esempio, come preparato per la somministrazione orale può venire nominata una capsula, un granulo, una pastiglia, un granulo fine, una compressa ed uno sciroppo. Inoltre, per la somministrazione diretta nel retto è adatta una supposta. Inoltre, può venire usata una iniezione per la somministrazione endovenosa, somministrazione sottocutanea oppure somministrazione intramuscolare.

L'immunopotenziatore della presente invenzione

ne può venire usato per la cura di malattie accompa_gnate da riduzione o anormale cambiamento della fun_zione immunizzante, per esempio contro malattie au-toimmuni come artrite reumatoide cronica e miosite multipla, varie malattie infettive e vari ~~tipi di~~ cancro. Mediante somministrazione del composto del-la presente invenzione ci si può aspettare recupero o normalizzazione della funzione immunizzante di pa_zienti che soffrono di queste malattie. Per quanto riguarda ~~tipi di~~ cancro al quali il composto della presente invenzione viene applicato appropriatamen-te possono venire nominati cancro dello stomaco, cancro del colon, cancro del retto, cancro della mammella, cancro del fegato, cancro uterino, altri tumori, reticola-sarcoma, linfosarcomatosi, altri sarcomi e leucosi. Mediante somministrazione del composto della presente invenzione può venire pre_visto alleviamento di sintomi soggettivi e di sin_tomi oggettivi.

Il metodo di somministrazione e la forma di preparazione possono venire scelti in maniera appro_priata a seconda del tipo di malattia e della condi_zione del paziente. Nel caso di somministrazione orale, la dose del composto della presente invenzio-ne è 1 fino a 100 mg, preferibilmente 1 fino a 20 mg

per kg di peso corporeo per giorno. Nel caso di somministrazione al retto, la dose è preferibilmente 1 fino a 100 mg per kg di peso corporeo per giorno, nel caso di somministrazione endovenosa la dose è preferibilmente 1 fino a 10 mg per kg di peso corporeo per giorno e nel caso di somministrazione per via sottocutanea oppure intramuscolare la dose è preferibilmente 1 fino a 30 mg per kg di peso corporeo. Si preferisce che la dose venga regolata in maniera appropriata a seconda del tipo di malattie e della condizione del paziente. L'effetto del composto attivo della presente invenzione può venire aumentato impiegando altre medicine in combinazione appropriata a seconda del tipo della malattia e della condizione del paziente. Per esempio, quando vengano somministrati agenti chemioterapèutici per cancro, quali antimetaboliti ed agenti alchilanti, che hanno un effetto secondario di ridurre la capacità immunizzanti di pazienti, se in combinazione viene usato il composto attivo della presente invenzione, viene impedita la manifestazione di tale effetto secondario e viene aumentato sinergicamente l'effetto curativo.

Medicine dal composto della presente invenzione possono venire preparate secondo la formula usua...

le e metodo adottati per ordinari agenti immunopotenzianti oppure antitumore.

La presente invenzione verrà ora descritta in dettaglio con riferimento agli esempi che seguono.

Esempio 1

[1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina]

In 50 ml di toluolo vengono sciolti 8,1 g (0,05 moli) di 1-metil-4-clorocarbonilpiperazina a temperatura ambiente e nella soluzione di cui sopra viene fatta gocciolare a 0°C una soluzione di 10,7 g (0,15 moli) di pirrolidina in 50 ml di toluolo, entro un periodo di 30 minuti. Il miscuglio viene trattato a ricadere per 1 ora per completare la reazione. Il miscuglio di reazione viene raffreddato ed il cristallo giallo precipitato (cloridrato di pirrolidina) viene separato mediante filtrazione. Il filtrato viene essiccato su solfato di sodio anidro e toluolo come solvente viene eliminato mediante distillazione sotto pressione ridotta per ottenere 1-metil-4-(pirrolidinocarbonil)-piperazina grezza come residuo di distillazione. Il prodotto grezzo viene purificato mediante distillazione sotto pressione ridotta per ottenere 6,6 g di un prodotto puro avente un punto di ebollizione di 109,5 fino a 110,0°C a 0,5-0,6 mm di Hg assoluti. La resa è 66,9%. I valori dell'analisi elementa-

re sono come seguono:

trovato: C = 61,07%, H = 9,89 %, N = 21,20%

Analisi calcolata per: $C_{10}H_{19}N_3O$:

C = 60,87%, H = 9,73%, N = 21,30%

Esempio 2

[cittrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina]

In 20 ml di acetone vengono sciolti 2,0 g (0,01 moli) di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina a temperatura ambiente ed una soluzione di 1,9 g (0,01 moli) di anidride citrica in 30 ml di acetone viene fatta gocciolare nella soluzione di cui sopra a temperatura ambiente entro un periodo di circa 30 minuti. Il miscuglio viene agitato per un certo tempo alla medesima temperatura ed il cristallo precipitato viene ricavato mediante filtrazione e lavato con acetone. Il cristallo ricavato viene lavato in 50 ml di etilacetato a 50°C agitando per 3 ore. Il cristallo viene ricavato mediante filtrazione, lavato con etilacetato ed essiccato per ottenere 5,6 g di cittrato di 1-metil-4-(N-pirrolidino-carbonil)-piperazina avente un punto di fusione di 160 fino a 161°C. La resa è 71,9%. I valori dell'analisi elementare sono come seguono:

trovato: $C = 49.21 \%$, $H = 7.00 \%$, $N = 11.00 \%$

Anal.calcol. per $C_{16}H_{27}N_3O$: $C = 49.34 \%$, $H = 7.00 \%$,
 $N = 10.79 \%$

Esempio 3

[1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e suo citrato].

La reazione ed il post-trattamento vengono effettuati nella medesima maniera descritta nell'esempio 1 eccetto che invece di pirrolidina vengono impiegati 12,8 g (0,15 moli) di piperidina per ottenere 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina avente un punto di ebollizione di 151 fino a 153°C a 4-5 mm di Hg assoluti. I valori dell'analisi elementare sono come seguono:

trovato: $C = 56.57 \%$, $H = 9.49 \%$, $N = 26.39 \%$

Anal.calcol. per $C_{10}H_{20}N_4O$: $C = 56.43 \%$, $H = 9.72 \%$,
 $N = 26.09 \%$

La reazione viene eseguita nella medesima maniera descritta nell'esempio 2 eccetto che la base libera così ottenuta viene usata per ottenere un citrato avente un punto di fusione di 115 fino a 120°C (decomposizione).

Esempio 4

[1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e suo cloridrato].

La reazione ed il post-trattamento vengono effettuati nella medesima maniera descritta nell'esempio 1 eccetto che in luogo di 1-metil-4-clorocarbonilpiperazina vengono impiegati 11,2 g (0,05 moli) di 1-fenil-4-clorocarbonilpiperazina e in luogo di pirrolidina vengono usati 12,8 g (0,15 moli) di piperidina per ottenere 1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina avente un punto di ebollizione di 106 fino a 114°C a 15 mm di Hg ed un punto di fusione di 63 fino a 66,5°C.

La base libera così ottenuta viene sciolta in cloroformio e la soluzione viene saturata con acido cloridrico gassoso ed agitata per un certo tempo. La soluzione viene trattata mediante l'usuale lavorazione ulteriore per ottenere cloridrato di 1-fenil-4-(N-piperidino-carbonil)-piperazina avente un punto di fusione di 186,5 fino a 189°C. I valori dell'analisi elementare sono come seguono:

trovato: C 62,04%, H 7,86%, N = 13,60%, Cl = 11,23%

Anal. calcol. per $C_{16}H_{24}N_2OCl$: C = 62,02%, H = 7,81%

N = 13,56%, Cl = 11,44%.

Esempio 5

[Compresse contenenti citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 50 g di citrato di 1-metil-4-

(N-pirrolidino-carbonil)-piperazina, 38 g di lattosio, 35 g di amido di granoturco e 20 g di cellulosa cristallina viene agitato sufficientemente ed il miscuglio viene impastato e granulato con una soluzione di 5 g di idrossipropilcellulosa e 100 ml di acqua ed essiccato a 50°C per 4 ore. Il miscuglio granulato viene mescolato con 2 g di stearato di magnesio e modellato in compresse, ciascuna di un peso di 150 mg, mediante una macchina pastigliatrice.

Esempio 6

[Capsule contenenti citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo].

Un miscuglio di 100 g di citrato di 1-metil-4-(N-pirrolidinocarbonil)-piperazina, 94 g di lattosio, 60 g di amido di granoturco, 40 g di cellulosa cristallina e 6 g di stearato di magnesio viene agitato sufficientemente ed introdotto in capsule dure in una quantità di 300 mg per capsule impiegando una macchina da incapsulamento per ottenere capsule.

Esempio 7

[granuli contenenti cloridrato di 1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 100 g di cloridrato di 1-fenil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina, 152 g di lattosio, 140 g di amido di granoturco ed 80 g di

cellulosa cristallina viene agitato sufficientemente ed il miscuglio viene impastato e granulato con una soluzione di 20 g di idrossipropilcellulosa in 400 ml di acqua ed essiccato a 50°C per 4 ore. I granuli vengono fatti passare attraverso un vaglio da 12 mesh per effettuare la classificazione ed i granuli vengono mescolati con 8 g di stearato di magnesio ed il miscuglio viene agitato sufficientemente per ottenere granuli.

Esempio 8

[Supposta contenente citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 10 g di citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e 90 g di Witepsol® W-35 (Dynamill Novel Chemicals, West Germany) vengono riscaldati e fusi a 60°C e la massa fusa viene colata in stampi in modo che il peso di ciascuna supposta sia 15 g oppure 3 g. La massa fusa colata viene raffreddata e solidificata per ottenerne supposte.

Esempio 9

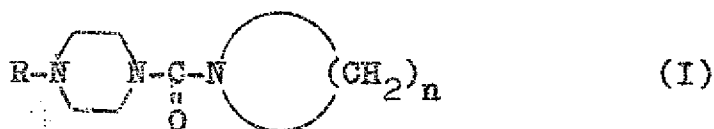
[Iniezioni contenenti citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina come ingrediente attivo]

Un miscuglio di 10 g di citrato di 1-metil-4-(N-piperidinocarbonil)-piperazina e 0,4 g di cloruro di sodio viene sciolto in una quantità appropriata

di acqua distillata per iniezioni in modo che la quantità totale sia 100 ml. La iniezione così formata è adatta per la somministrazione endovenosa.

CIO CHE SI - RIVENDICAZIONI 6: (dispos. 4)

1. ^{Nuovo} Composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I) e suo sale di acido inorganico oppure organico:



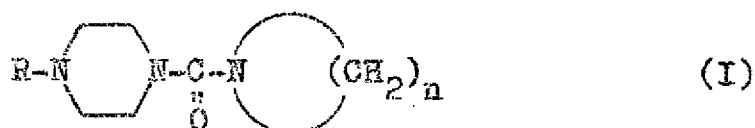
in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero del valore di 4 oppure 5.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R nella formula generale (I) è un gruppo metilico ed n è 4.

3. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R nella formula generale (I) è un gruppo metilico ed n è 5.

4. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R nella formula generale (I) è un gruppo fenilico ed n è 5.

5. ^{nuovi} Procedimento per la preparazione di composti di piperazina rappresentati dalla formula generale (I) che segue:



in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero ~~del valore~~ di 4 oppure 5, comprendente l'operazione di condensare una 4-clorocarbonil-piperazina 1-sostituita rappresentata dalla formula generale (II) che segue:

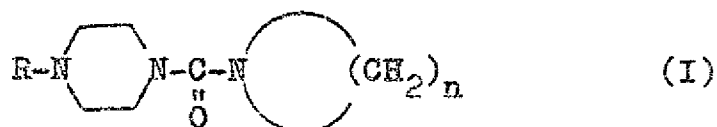


in cui R è come definito sopra, con un'ammina ciclica rappresentata dalla seguente formula generale (III):



in cui n è come definito sopra.

6. Immunopotenziatore comprendente, come ingrediente attivo, un composto di piperazina rappresentato dalla seguente formula generale (I):



in cui R sta per un gruppo alchilico oppure fenilico ed n è un numero ~~del valore~~ di 4 oppure 5 sotto forma di una base libera oppure di un sale di addizione con acido biologicamente accettabile.

7. Immunopotenziatore secondo la rivendicazione

6, il quale è nella forma di una base libera oppure di un sale biologicamente accettabile, combinato con un diluente o veicolo farmaceuticamente accettabile.

~~P.F. MITSUBISHI CHEMICAL, INC.~~

8. Immunopotenziatore secondo la rivendicazione 6, che è sotto forma di una base libera oppure di un sale biologicamente accettabile, combinato con un usato per medicina di artrite ^{reumatoide,} ~~reumatica~~ cronica.

9. Immunopotenziatore secondo la rivendicazione 6, che viene usato per immunoterapia di tumori. -

(Per introduzione conforme)



L'Ufficiale Brevetti

DOCUMENTAZIONE RILEGATA