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

UIBM

DOMANDA NUMERO	**101996900519484**
Data Deposito	**21/05/1996**
Data Pubblicazione	**21/11/1997**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

USO DI DERIVATI DEL P-AMMINOFENOLO PER PREPARARE COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE UTILI NEL TRATTAMENTO DI MALATTIE NEURODEGENERATIVE

DESCRIZIONE

Della Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal Titolo:

"Uso di derivati del p-amminofenolo per preparare composizioni farmaceutiche utili nel trattamento di malattie neurodegenerative"

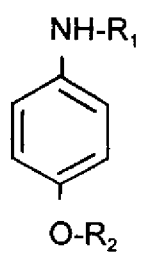
a nome : *ANGELINI RICERCHE S.P.A. SOCIETÀ CONSORTILE*

* * * * * * * * * * * * *

La presente invenzione riguarda l'uso di derivati del p-amminofenolo per preparare composizioni farmaceutiche utili nel trattamento di malattie neurodegenerative.

Più in particolare la presente invenzione riguarda l'uso di derivati del p-amminofenolo e dei loro prodrugs per preparare composizioni farmaceutiche utili nel trattamento di malattie neurodegenerative in cui è presente una componente infiammatoria con produzione *in loco* di proteine del complemento.

Ancor più in particolare, la presente invenzione riguarda l'uso di composti di formula



(I)

dove

R_1 è idrogeno od acile a basso peso molecolare, e

R_2 è idrogeno o alchile a basso peso molecolare

e di loro prodrugs.

21 MAG. 1996

MI 96 A 1013

Tipici esempi di tali composti sono la fenacetina ($R_1 = COCH_3$; $R_2 = C_2H_5$), nota anche come acetofenetidina, ed il paracetamolo ($R_1 = COCH_3$; $R_2 = H$), noto anche come acetaminofene od N-acetil-p-aminofenolo.

Tipico esempio di prodrug è il propacetamolo. Per quanto riguarda l'uso del termine prodrug si fa riferimento a "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Disscovery - Vol. I: Principles and Practice - 5th ed. - Ed. Manfred E. Wolff - pagg. 172-178"

E' noto che questi composti sono dotati di attività analgesica ed antipiretica paragonabili a quella dell'aspirina mentre, diversamente dall'acido acetilsalicilico, sono privi di una azione antinfiammatoria significativa (Insel A.P. In: "The Pharmacologic basis of therapeutics" Goodman Gilman A. et al. ed., pp. 656-659, Pergamon Press, 1990).

A causa della sua tossicità generale e dei suoi effetti collaterali, la fenacetina è attualmente poco utilizzata a scopo terapeutico.

Invece, il paracetamolo è ben tollerato e non presenta effetti collaterali significativi a dosi terapeutiche di 0,5 - 1g, 3 o 4 volte al giorno.

Il paracetamolo viene assorbito rapidamente e si distribuisce in modo uniforme nella maggior parte dei tessuti dell'organismo, compreso il cervello. La concentrazione plasmatica raggiunta entro pochi minuti dalla somministrazione di 1 g di paracetamolo per via orale è di circa 10 mg/l (66,2 μM) e scende a circa 1,5 mg/l dopo 6 ore. La concentrazione nei tessuti è sostanzialmente uguale a quella che si ritrova nel plasma (Prescott L.F., Br. J. Clin.Pharmacol. 10 (suppl. 2), 291-298S, 1980).

Il meccanismo d'azione del paracetamolo non è ancora ben noto. Tuttavia, è generalmente accettato che la sua attività dipenda dalla capacità di

inibire la produzione di prostaglandine, principalmente nel sistema nervoso centrale. Questa azione spiegherebbe gli effetti analgesici ed antipiretici del paracetamolo. L'assenza di attività sulla ciclossigenasi periferica sarebbe invece responsabile della carenza di azione antinfiammatoria (Clissold S.P. , Drugs 32 (suppl. 4), 46-59, 1986).

Il morbo di Alzheimer è una patologia caratterizzata da neurodegenerazione progressiva che porta alla demenza. L'esame autoptico rivela costantemente alcuni marker istologici tipici, quali placche dovute ad una eccessiva deposizione di β-amiloide, e perdita di neuroni e/o sinapsi (Selkoe D.J. et al., Neuron 6, 487-493, 1991).

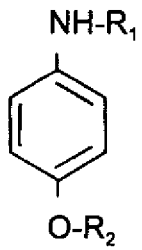
Negli ultimi anni è stata documentata con sempre maggior frequenza la presenza di marker dell'infiammazione in campioni cerebrali di soggetti affetti dal morbo di Alzheimer. Nelle placche amiloidee od intorno ad esse sono state infatti identificate proteine tipiche dei processi infiammatori, quali antigeni di istocompatibilità, alcune citochine ed i loro recettori, i recettori per Fc, alcune proteine di fase acuta e le proteine della via classica di attivazione del complemento con i loro recettori (Dickson D.W. et al., Glia 7, 75-83, 1993). E' stato anche dimostrato che tali proteine infiammatorie sono secrete *in loco* da cellule della glia e della microglia (Hugh Perry V. et al., Trends Neurol. Sci. 7, 268-273, 1993). E' stata inoltre evidenziata con sufficiente chiarezza una minore incidenza di questa patologia in soggetti affetti da malattie, quali l'artrite reumatoide, che richiedono l'assunzione di farmaci antinfiammatori per lunghi periodi di tempo (McGeer P.L. et al., Neurology 42, 447-449, 1992 ; Breitner J.S. et al., Neurology 44, 227-232, 1994; Rogers J. et al., Neurology 43, 1609-1611, 1993).

In particolare, uno studio condotto in doppio cieco su 44 pazienti affetti dal morbo di Alzheimer trattati con indometacina per 6 mesi ha mostrato un notevole rallentamento nella progressione della demenza rispetto ai controlli trattati con placebo (Schnabel J., Science 260, 1719-1720, 1993). Queste osservazioni indicano che i fenomeni "infiammatori cerebrali" tipici del morbo di Alzheimer non rappresentano una semplice reazione al fenomeno patologico già in atto ma divengono essi stessi un fattore patogenetico di primaria importanza.

Ora è stato inaspettatamente trovato che i composti di formula (I) ed i loro prodrugs sono utili nel trattamento di malattie neurodegenerative in cui è presente una componente infiammatoria con produzione *in loco* di proteine del complemento nonostante detti composti siano privi di attività antinfiammatoria.

In particolare, essi inibiscono la produzione di proteine del complemento da parte delle cellule gliali del cervello e consentono di ottenere una significativa riduzione dei fenomeni infiammatori tipicamente presenti nel cervello di soggetti affetti dal morbo di Alzheimer.

L'oggetto della presente invenzione è quindi costituito dall'uso di un composto di formula



(I)

dove

R_1 è idrogeno od acile a basso peso molecolare, e

R_2 è idrogeno o alchile a basso peso molecolare,

e dei loro prodrugs per preparare una composizione farmaceutica utile nel trattamento di malattie neurodegenerative in cui è presente una componente infiammatoria con produzione *in loco* di proteine del complemento.

Tipico esempio di tali malattie è il morbo di Alzheimer.

Nel corso della presente descrizione e delle rivendicazioni che seguono, l'espressione "proteine del complemento" indica un complesso di circa 20 proteine, che costituiscono il sistema del complemento, dotate di attività enzimatica di tipo catalitico a cascata. L'attivazione del sistema, che può avvenire attraverso due modalità, note come via diretta o alternativa di attivazione, porta, come risultato finale, alla lisi cellulare.

Alcuni dei fattori (proteine) del complemento sono designati con la lettera "C" seguita da un numero ed il componente più importante ed abbondante è il fattore noto come C3 (I.M. Roitt, in : Immunologia : fisiologia, patologia e clinica ; ed . italiana a cura di C. E. Grossi e D. Zarcone, pag. 7, Edi-Ermes, Milano, 1990). Pertanto, nelle sperimentazioni intese a valutare l'eventuale produzione di proteine del complemento si determina solo la C3 e la si considera indicativa dell'intero complesso di proteine del complemento.

La posologia giornaliera del composto di formula (I) può variare in un intervallo piuttosto ampio in funzione di fattori noti, quali il tipo e la gravità della malattia, il peso corporeo del paziente, la composizione farmaceutica usata, la via di somministrazione, il numero di somministrazioni giornaliere e l'efficacia del composto usato.

La posologia ottimale può, tuttavia, essere facilmente stabilita da una persona esperta dell'arte mediante procedimenti routinari.

In generale, la posologia giornaliera sarà compresa tra 0,01 e 200 mg/kg.

Nel caso particolare del paracetamolo la posologia giornaliera sarà preferibilmente compresa fra 10 e 100 mg/kg o, ancor più preferibilmente, fra 15 e 75 mg/kg.

Esempi di adatte vie di somministrazione sono: orale, rettale ed iniettabile.

A seconda della via di somministrazione prescelta, le composizioni farmaceutiche secondo la presente invenzione potranno essere solide quali, ad esempio, compresse, confetti, capsule e forme a rilascio controllato, o semisolide quali, ad esempio, supposte, o liquide quali, ad esempio, soluzioni sterili. Esempi di composizioni a rilascio controllato sono quelle che comprendono liposomi o vescicole (capaci di rilasciare il composto farmacologicamente attivo in modo controllato) e le compresse stratificate comprendenti strati a velocità di disintegrazione variabile.

Oltre agli usuali eccipienti, le composizioni possono contenere adatti additivi per uso farmaceutico quali conservanti, stabilizzanti, tensioattivi, emulsionanti, sali per regolare la pressione osmotica, tamponi, aromatizzanti, dolcificanti, coloranti e simili.

Se particolari terapie lo richiedono, le composizioni secondo la presente invenzione possono contenere altri ingredienti attivi compatibili la cui somministrazione contemporanea sia terapeuticamente utile. Tali composti includono agonisti dei recettori dell'acetilcolina, in particolare agonisti muscarinici e nicotinici, e farmaci capaci di agire sul sistema nervoso aumentando i livelli di acetilcolina a livello sinaptico (inibitori acetilcolinesterasi). Esempi di adatti composti attivi sul sistema colinergico sono la tacrina, la fisostigmina, la neostigmina, la eptastigmina, il donepezil (E-2020), il metrifonato e l'SDZ-ENA-713.

Le composizioni farmaceutiche secondo la presente invenzione possono essere prodotte secondo tecniche convenzionali del chimico farmaceutico che comprendono la miscelazione, la granulazione e la compressione, quando necessaria, o varie miscelazioni e dissoluzioni degli ingredienti secondo ciò che è più appropriato per ottenere il prodotto desiderato.

Valgano i seguenti esempi ad illustrare la presente invenzione senza, tuttavia, limitarla.

ESEMPIO 1

Attività del paracetamolo e dell'indometacina sulla produzione di complemento nella linea cellulare T98G

L'effetto del paracetamolo sulla produzione di fattori del complemento è stato studiato utilizzando la linea cellulare umana di glioblastoma T98G. Tale linea è infatti in grado di produrre costitutivamente il fattore 3 del complemento (C3) e tale sintesi è ulteriormente aumentata in presenza di diversi stimoli quali interleuchina 1 beta (IL-1β). Come farmaco di riferimento è stata utilizzata l'indometacina.

Le cellule ($2x10^6$/ml) sono state incubate per 48 ore in presenza di concentrazioni crescenti di paracetamolo (10-100-500-1000 μM) o indometacina (0,1-1-10 μM) sia in presenza che in assenza di IL-1β (50 U/ml). Al termine dell'incubazione è stato raccolto il terreno di cultura ed è stata misurata la quantità di C3 secreta dalle cellule nelle varie condizioni. Il C3 è stato dosato mediante un saggio immunoenzimatico "a sandwich" in cui sono stati utilizzati due anticorpi anti-C3 di specie diverse ed un antisiero marcato con fosfatasi alcalina specifico per uno dei due anticorpi anti-C3. La quantificazione del C3 secreto è stata fatta mediante una curva standard preparata con C3 purificato.

I risultati (Tabella 1) mostrano che il paracetamolo inibisce la secrezione di C3 con una IC_{50} di circa 1 mM sia quando le cellule sono stimolate con interleuchina 1 beta che in assenza di tale citochina. L'indometacina si è rivelata attiva nel ridurre la secrezione di complemento in questo saggio ma, a causa della sua tossicità nel sistema cellulare utilizzato, non è stato possibile aumentarne la concentrazione oltre le 10 μM, dose alla quale mostra una attività inibente del 35%.

Questi risultati indicano che sia il paracetamolo che l'indometacina sono in grado di ridurre la secrezione di fattori del complemento che si verifica nel cervello in condizioni patologiche.

Tali osservazioni depongono a favore dell'utilizzo del paracetamolo in patologie in cui vi sia una significativa produzione di fattori del complemento a livello del sistema nervoso centrale, quale ad esempio il morbo di Alzheimer.

TABELLA 1

Attività del paracetamolo e dell'indometacina sulla produzione di complemento nella linea cellulare T98G		
Cell. Stim. con IL-1β	dose	% di inibizione
Paracetamolo	1000 μM	47,5
	500 μM	39,8
	100 μM	23,6
	10 μM	0,1
Indometacina	10 μM	35,1
	1 μM	21,7
	0,1 μM	26,9
Cell. Non stim. con IL-1β		
Paracetamolo	1000 μM	60,8
	500 μM	37,4

Esempio 2

Attività del paracetamolo e dell'indometacina sulla produzione di prostaglandine nella linea cellulare T98G e J774.2

L'utilità del paracetamolo in patologie infiammatorie cerebrali è stata confermata da un'altra sperimentazione intesa a dimostrare che il paracetamolo ha una selettività di azione nei confronti delle cellule cerebrali che non si riscontra per altri farmaci antinfiammatori, quali l'indometacina.

Sono stati infatti condotti esperimenti paralleli in cui è stata valutata la capacità del paracetamolo e dell'indometacina di inibire la produzione di prostaglandine prodotte dalla linea cellulare di glioblastoma T98G e dalla linea cellulare macrofagica J774.2.

Il saggio con cellule T98G stimolate con IL-1β è stato condotto come descritto nel precedente Esempio 1. Al termine dell'incubazione è stato raccolto il terreno di coltura ed è stata misurata la quantità di prostaglandine E2 presenti. Le prostaglandine sono state dosate mediante un saggio immunoenzimatico disponibile commercialmente (AMERSHAM).

I risultati esposti in Tabella 2 dimostrano che paracetamolo ed indometacina sono entrambi capaci di inibire in maniera significativa la produzione di prostaglandine nelle cellule gliali del sistema nervoso centrale.

TABELLA 2

Attività del paracetamolo e dell'indometacina sulla produzione di prostaglandine nella linea cellulare T98G		
Cell. Stim. con IL-1β	dose	% di inibizione
Paracetamolo	1000 μM	99
	500 μM	96,9

	100 μM	88,5
	10 μM	26,7
Indometacina	10 μM	99,1
	1 μM	98,4
	0,1 μM	99,3

Parallelamente, cellule macrofagiche J774.2 (2 x 10^6/ml) sono state stimolate con LPS (1 μg/ml) per 12 ore. Dopo 3 lavaggi con soluzione fisiologica, le cellule sono state incubate per 45 minuti con concentrazioni crescenti di paracetamolo (0,1 - 100 μM) o indometacina (0,1 - 1 μM). Alla fine dell'incubazione sono stati raccolti i supernatanti ed il contenuto di prostaglandine E2 è stato misurato con il test descritto precedentemente.

I risultati esposti nella Tabella 3 indicano che il paracetamolo, al contrario dell'indometacina, ha scarsa attività inibente sulla produzione di prostaglandine in macrofagi, quindi in cellule che si trovano al di fuori del sistema nervoso centrale.

TABELLA 3

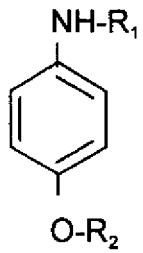
Attività del paracetamolo e dell'indometacina sulla produzione di prostaglandine nella linea cellulare J774.2		
Cell. stim. con LPS	dose	% di inibizione
Paracetamolo	100 μM	11,4
	10 μM	12,5
	1 μM	6,4
	0,1 μM	5,3
Indometacina	1 μM	87,4
	0,1 μM	61,1

	0,01 μM	35,8

L'insieme dei dati esposti nelle Tabelle 1, 2 e 3 dimostra che il paracemolo, al contrario dell'indometacina, è dotato di una peculiare selettività di azione sul sistema nervoso e ciò lo rende particolarmente utile nel trattamento del morbo di Alzheimer.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di un composto di formula



(I)

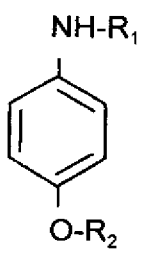
dove

R_1 è idrogeno od acile a basso peso molecolare, e

R_2 è idrogeno o alchile a basso peso molecolare,

o di un suo prodrug per preparare composizioni farmaceutiche utili nel trattamento di malattie neurodegenerative.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il composto di formula (I) è il paracetamolo.
3. Uso secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto che la malattia è il morbo di Alzheimer.
4. Un metodo terapeutico in cui un paziente sofferente di una malattia neurodegenerativa viene trattato con una quantità terapeuticamente utile di un composto di formula



(I)

dove

R_1 è idrogeno od acile a basso peso molecolare, e

R_2 è idrogeno o alchile a basso peso molecolare

o di un suo prodrug.

5. Un metodo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che la malattia neurodegenerativa è il morbo di Alzheimer.
6. Un metodo secondo la rivendicazione 4 o 5, caratterizzato dal fatto che il composto di formula (I) è il paracetamolo.
7. Un metodo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che il trattamento comprende la somministrazione giornaliera di 0,01-200 mg/kg di un composto di formula (I) o di una quantità equivalente di un prodrug del paracetamolo.
8. Un metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 6, caratterizzato dal fatto che il trattamento comprende la somministrazione giornaliera di 10-100 mg/kg di paracetamolo o di una quantità equivalente di un suo prodrug.
9. Un metodo secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che il trattamento comprende la somministrazione giornaliera di 15-75 mg/kg di paracetamolo o di una quantità equivalente di un suo prodrug.

Dr. Massimo MARCHI