

(11) Número de Publicação: **PT 1881826 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/404 (2007.10) **A61P 25/28** (2007.10)
A61P 29/00 (2007.10) **A61P 35/00** (2007.10)
A61P 19/02 (2007.10) **A61P 9/10** (2007.10)
A61P 25/16 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.05.03**

(30) Prioridade(s): **2005.05.19 IT MI20050909**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.01.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.07.14**
150/2010

(73) Titular(es):

AZIENDE CHIMICHE RIUNITE ANGELINI
FRANCESCO A.C.R.A.F. S.P.A.
VIALE AMELIA, 70 I-00181 ROMA

IT

(72) Inventor(es):

LORENZO POLENZANI
NICOLA CAZZOLLA
GUIDO FURLOTTI
MARIA ALESSANDRA ALISI
GIORGINA MANGANO

IT
IT
IT
IT
IT

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE UM DERIVADO BENZOIL DE 3-AMINOCARBAZOL PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA ASSOCIADA COM A PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2)**

(57) Resumo:

RESUMO

**"UTILIZAÇÃO DE UM DERIVADO BENZOIL DE 3-AMINOCARBAZOL PARA
O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA ASSOCIADA COM A PRODUÇÃO DE
PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) "**

Utilização de um derivado benzoil de 3-aminocarbazol para produzir um fármaco para o tratamento preventivo ou terapêutico de uma doença seleccionada do grupo compreendendo processos inflamatórios, dor, febre, tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose. Método para o tratamento preventivo ou terapêutico de uma doença seleccionada do grupo compreendendo processos inflamatórios, dor, febre, tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose, no qual uma quantidade terapeuticamente eficaz de um derivado benzoil de 3-aminocarbazol de acordo com a invenção é administrada a um indivíduo.

DESCRIÇÃO

" UTILIZAÇÃO DE UM DERIVADO BENZOIL DE 3-AMINOCARBAZOL PARA O TRATAMENTO DE UMA DOENÇA ASSOCIADA COM A PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA E₂ (PGE₂) "

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se à utilização de um derivado benzoil de 3-aminocarbazol na Tabela 1 a seguir para a produção de um fármaco, o qual é útil no tratamento de doenças associadas com a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) tais como, por exemplo, processos inflamatórios, dor, febre, tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose, de acordo com as reivindicações.

ESTADO DA TÉCNICA

O interesse nas prostaglandinas E₂ (PGE₂) surge do papel destas como bioreguladores, juntamente com outros prostanóides produzidos pela via do metabolismo do ácido araquidónico, e como mediadores de inflamação.

Tal como é sabido, os prostanóides constituem uma classe de compostos que inclui as prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclinas. Os prostanóides são mediadores lipídicos os quais actuam como hormonas locais nas células adjacentes ao local da sua libertação. Os prostanóides são produzidos principalmente a partir do ácido araquidónico através de oxidação enzimática activada por ciclooxigenase. Ciclooxigenases (prostaglandina G/H sintases) catalisam a formação sequencial de PGG₂ e PGH₂ a partir de ácido araquidónico. PGH₂ é depois convertida nos vários prostanóides através de enzimas específicas. As prostaglandinas D₂ (PGD₂), prostaglandinas E₂ (PGE₂),

prostaglandinas $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaglandinas I_2 (PGI_2) e tromboxanos A_2 (TXA_2) são formados desta forma.

Os prostanóides não se acumulam, excepto no fluido seminal. A seguir a vários estímulos (estímulos inflamatórios, imunológicos, hormonais, luz ultravioleta, agentes tumorais e também agitação mecânica), eles são sintetizados e libertados para o espaço extracelular, do qual passam para o plasma, urina e outros fluidos biológicos.

Os prostanóides desempenham um papel importante nos mecanismos que defendem a função dos órgãos e integridade do corpo. Tal é demonstrado pela sua função citoprotectora no tracto gastrointestinal, a sua regulação da função dos rins e microcirculação, a sua regulação da agregação das plaquetas e coagulação do sangue, o seu envolvimento na diferenciação de células do sistema imunitário e na cicatrização, no metabolismo ósseo e na ovulação.

Devem ser particularmente enfatizadas a acção vasoprotectora da PGI_2 , a qual é essencial para a manutenção da tonificação vascular e para a prevenção de tromboembolismo e aterosclerose a nível endotelial, e a acção anti-inflamatória e anti-proliferativa da PGD_2 , cujo metabolito, $15d-PGJ_2$, é capaz de exercer efeitos anti-inflamatórios através da activação de PPAR γ nuclear (receptor gamma activado pelo proliferador de peroxisoma) (Inoue et al., "Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma", J. Biol. Chem. 2000, 275 (36): 28028-28032).

Os prostanóides são portanto bioreguladores, mas também são importantes mediadores de inflamação e outras doenças.

Em particular, as PGE₂ são abundantes em locais onde ocorre inflamação e são responsáveis pelos vários aspectos patológicos da inflamação crónica e aguda, tais como edema, a formação de eritema, dor inflamatória, inflamação das articulações e febre. As PGE₂ são, na realidade, poderosos agentes pró-inflamatórios e algogénicos. Anticorpos anti-PGE₂ apresentam actividade anti-inflamatória e animais desprovidos de receptores para as PGE₂ demonstram uma resposta reduzida a estímulos inflamatórios (Portanova et al., "Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo", J. Exp. Med. 1996, 184(3):883; Ueno et al., "Major roles of prostanoid receptors IP and EP (3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception", Biochem. Pharmacol. 2001, 62(2):157-160) e a ausência de resposta febril a estímulos pirogénicos (Ushikubi et al., "Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3", Nature 1998, 395:281-284). Devido à sua acção inibidora nas ciclooxigenases 1 e 2 (Fitzgerald e Patrono, "The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2", N. Engl. J. Med. 2001, 345(6):433-442), os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAI) e fármacos selectivos para COX-2 correntemente em uso reduzem os sintomas associados com inflamação através de inibição não selectiva da produção de eicosanóides (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂).

Em particular, os fármacos selectivos para COX-2 actualmente disponíveis no mercado apresentam reduzida toxicidade gastrointestinal em comparação com os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAI) convencionais. Contudo, estes fármacos selectivos para COX-2 reduzem a produção de prostaciclina vascular (PGI₂, a qual é produzida principalmente a partir de COX-2), alterando o equilíbrio normal entre eicosanóides pró-trombóticos e

anti-trombóticos a favor dos pró-trombóticos (TXA₂, o qual é principalmente produzido a partir de COX-1), e dão origem a um risco aumentado de eventos vasculares trombóticos (S. Malhotra, MD, DM; N. Shafiq, MD; P. Pandhi, MD; Medscape General Medicine 6(1), 2004; D. Mukherjee e E. J. Topol, Cardiovascular risk and COX-2 inhibitors, Arthritis Res. Ther. 2003, 5:8-11-2002).

Os pedidos de patente WO 01/07409 A1 e WO 02/096902 A1 referem-se a inúmeros derivados de carbazol representados por uma fórmula geral extensiva compreendendo o grupo base 3-aminocarbazol substituído em qualquer posição, incluindo o átomo nitrogénio, com um ou mais grupos ou resíduos orgânicos alifáticos e/ou aromáticos. De acordo com estes documentos, os referidos derivados de carbazol são capazes de se ligar selectivamente ao receptor Y5 humano e modular a sua actividade. Como consequência disto, estes derivados de carbazol podem portanto ser úteis no tratamento da fome e doenças metabólicas tais como obesidade, bulimia nervosa, anorexia nervosa, distúrbios de sono, dependência de morfina e ataques epilépticos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foi agora surpreendentemente descoberto que alguns derivados benzois de 3-aminocarbazol são capazes de inibir selectivamente a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂).

Os compostos úteis de acordo com esta invenção são capazes de reduzir a produção de PGE₂ e são por isso activos em todas as condições patológicas em que a PGE₂ actua como um mediador (por exemplo, febre, dor e resposta inflamatória).

Os compostos úteis de acordo com esta invenção inibem selectivamente a síntese de PGE₂. A inibição selectiva de PGE₂ tem a vantagem de inibir um potente mediador de

inflamação, dor e febre, mantendo ao mesmo tempo inalterada a produção de outros prostanóides que são produzidos em cadeia a partir do ácido araquistônico, tais como PGF_{2α}, TXA₂, PGI₂ e PGD₂. Todos os mecanismos para a defesa das funções dos órgãos e a integridade do corpo, os quais são típicos das actividades dos outros prostanóides, não são, por isso, afectados.

De um modo semelhante aos anti-inflamatórios não esteróides convencionais, os compostos úteis de acordo com esta invenção apresentam propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas, e são por isso activos em doenças tais como inflamação, dor, febre, artrite reumatóide e artrose. Adicionalmente, uma vez que os efeitos da PGE2 em tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose são conhecidos da literatura, os compostos úteis de acordo com esta invenção também podem ter aplicação na prevenção e tratamento destas doenças.

Vantajosamente, os compostos úteis de acordo com esta invenção têm contudo menos efeitos adversos em comparação com os NSAIs e os fármacos selectivos para COX-2, os quais, ao inibir a ciclooxigenase, não discriminam entre os vários prostanóides. Em particular, os compostos úteis de acordo com esta invenção apresentam toxicidade gastrointestinal, renal e vascular reduzida.

DESCRICAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Num primeiro aspecto, esta invenção refere-se por conseguinte, ao uso de um composto seleccionado do grupo compreendendo os derivados benzoil de 3-aminocarbazol na Tabela 1, para a produção de um fármaco para o tratamento preventivo ou terapêutico de uma doença seleccionada do grupo compreendendo processos inflamatórios, de acordo com

as reivindicações, dor, febre, tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose.

Adicionalmente, num segundo aspecto, esta invenção refere-se a uma composição para o tratamento preventivo ou terapêutico de uma doença seleccionada do grupo consistindo em processos inflamatórios de acordo com as reivindicações, dor, febre, tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose, nos quais é administrada a um indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto seleccionado do grupo compreendendo os derivados benzoil de 3-aminocarbazol na Tabela 1 abaixo.

Os processos inflamatórios, aos quais esta invenção pode trazer benefícios são os seguintes: edema, eritema, inflamação das articulações, artrite reumatóide e artrose.

Exemplos típicos de tumores que podem beneficiar desta invenção são carcinomas e adenocarcinomas colorectais e dos pulmões.

Tipicamente, os derivados benzoil de 3-aminocarbazol de acordo com esta invenção são administrados a um mamífero. Eles são preferencialmente administrados ao homem.

O composto útil de acordo com esta invenção é seleccionado do grupo compreendendo os derivados benzoil de 3-aminocarbazol de fórmula (I) indicados na Tabela 1 abaixo:

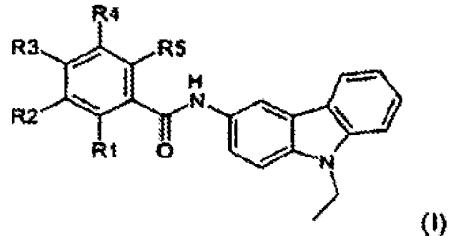


Tabela 1

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	Cl	H	H	H	H
2	CH ₃	H	H	H	H
3	Br	H	H	H	H
4	I	H	H	H	H
5	NO ₂	H	H	H	H
6	Cl	H	H	H	Cl
7	Cl	H	H	NO ₂	H
8	Cl	H	H	Cl	H

Os compostos úteis de acordo com a invenção podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos da literatura, por exemplo como descrito no pedido de patente WO 02/096902 A1.

De preferência, o fármaco de acordo com a invenção é preparado na forma de formas de dosagem adequadas.

Exemplos de formas de dosagem adequadas são comprimidos, cápsulas, comprimidos revestidos, grânulos, soluções e xaropes para administração oral, cremes, ungüentos e emplastros medicados para administração tópica, supositórios para administração rectal, e soluções estéreis para administração por injecção, aerossol ou administração oftálmica.

Estas formas de dosagem são formuladas, de forma vantajosa, numa forma tal que assegure a libertação controlada de um composto da Tabela 1 ao longo do tempo. Na realidade, dependendo da natureza do tratamento, o tempo de libertação necessário pode ser muito curto, normal ou demorado.

As formas de dosagem também podem conter outros ingredientes convencionais, tais como preservativos, estabilizantes, surfactantes, tampões, sais para regular a

pressão osmótica, emulsionantes, adoçantes, agentes corantes, aromatizantes e afins.

Se necessário, em tratamentos específicos, as formas de dosagem de acordo com esta invenção também podem incluir outros ingredientes farmacologicamente activos, os quais seja útil administrar em simultâneo.

A quantidade de composto de acordo com esta invenção nas formas de dosagem anteriormente mencionadas pode variar num largo espectro, dependendo de factores conhecidos tais como, por exemplo, o tipo de doença que tem de ser tratada, a gravidade da doença, o peso corporal do doente, a forma de dosagem, a via de administração escolhida, o número de administrações por dia e a eficácia do composto seleccionado. Quantidades óptimas podem, contudo, ser normalmente facilmente determinadas pelos peritos na especialidade.

Tipicamente, a quantidade de composto nas formas de dosagem de acordo com esta invenção é tal, que deve assegurar um nível de administração que varia entre 0,0001 e 100 mg/Kg/dia. Ainda mais preferencialmente entre 0,01 e 10 mg/Kg/dia.

As formas de dosagem da composição farmacêutica de acordo com esta invenção podem ser preparadas recorrendo a técnicas que são bem conhecidas dos químicos farmacêuticos, as quais incluem mistura, granulação, compressão, dissolução, esterilização e afins.

A seguinte parte experimental irá ilustrar a invenção mais detalhadamente.

Parte Experimental

Teste de actividade in vitro

Este teste é utilizado para avaliar a capacidade de inibir a produção de PGE₂ e a selectividade relativamente à produção de PGF_{2α} para cada um dos compostos estudados.

Foi utilizada a linha celular A549, derivada de um adenocarcinoma do pulmão humano, a qual é particularmente sensível a estimulação com citoquinas pró-inflamatórias, tais como IL-1_β e, em resposta a esta estimulação, particularmente activas na produção e libertação de dois prostanóides: PGE₂ e PGF_{2α} (Thoren S., Jakobsson P. J. "Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4", Eur. J. Biochem. 2000, 267(21):6428-6434).

As células foram estimuladas com IL-1_β (1 ng/mL) e ao mesmo tempo tratadas com os compostos a testar, durante 18 horas, no meio de cultura apropriado (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido com 5% de soro fetal bovino e L-glutamina (4 mM final), numa incubadora a 37°C e com uma concentração de CO₂ de 5%.

Após incubação, as quantidades de PGE₂ e PGF_{2α} produzidas e libertadas para o sobrenadante foram determinadas usando um kit EIA (fabricado e comercializado por Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA).

Indometacina (Sigma-Aldrich), um anti-inflamatório não esteróide que demonstrou a mesma inibição em ambos os prostanóides medidos, foi utilizada como composto referência.

Os compostos A, B e C, com a mesma fórmula geral (I) descrita acima e os substituintes indicados na Tabela 2

foram usados como compostos de comparação. A preparação destes compostos de comparação é idêntica à dos compostos de acordo com a invenção.

Tabela 2

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	OCH ₃	H	H	H	H
B	H	H	H	H	H
C	H	H	CH ₃	H	H

Os resultados apresentados na Tabela 3 são expressos como percentagens de inibição da produção de PGE₂ e PGF_{2α}, a uma concentração de 10 μM.

Tabela 3

Composto	% inibição a 10 μM	
	PGE ₂	PGF _{2α}
1	82	16
2	83	44
3	81	0
4	84	0
5	27	0
6	89	51
7	70	0
8	93	37
A	98	95
B	46	40
C	43	49
Indometacina	100	100

A título de exemplo, a Tabela 4 mostra os valores de pIC₅₀ para alguns dos compostos de acordo com a invenção, em que pIC₅₀ representa o inverso do logaritmo de IC₅₀, o qual por sua vez representa a concentração de composto que inibe 50% da produção de PGE₂ e PGF_{2α} em células estimuladas, as quais não foram, contudo, estimuladas com aquele composto.

Tabela 4

Composto	pIC_{50}	
	PGE_2	$\text{PGF}_{2\alpha}$
1	5,7	4,1
2	5,3	4,3
3	5,5	<4
4	5,4	<4
Indometacina	8,3	8,6

Teste de actividade in vivo

Este teste torna possível avaliar a actividade dos compostos de acordo com esta invenção num teste nociceptivo de origem inflamatória. O Composto 1 foi usado para este propósito num modelo experimental que provoca comportamento de dor induzido por ácido acético em ratinhos (Stock, J. L. et al., J. Clin. Inv. 2001, 107:325-331). Ratinhos fêmea CD-1 pesando entre 25 e 30 g foram usados para o teste.

Os animais foram tratados oralmente com o composto 1 (30 mg/Kg) ressuspensido em metilcelulose (MTC). Os animais controlo foram tratados apenas com o veículo (MTC), por via oral.

Uma hora depois do tratamento, ácido acético (0,7% v/v em solução fisiológica, 16 $\mu\text{L/g}$ do peso corporal) foi injectado nos animais intraperitonealmente para induzir dor inflamatória e estudar os efeitos do tratamento na resposta nociceptiva.

O número de estiramentos, o qual representa o parâmetro de avaliação para a resposta nociceptiva, foi medido imediatamente após a administração de ácido acético e durante os 20 minutos seguintes. Os resultados obtidos (média \pm DP) são apresentados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5

Composto	Nr. estiramentos em 20 min.
MTC	58 ± 5
MTC + Composto 1	40 ± 5

Teste em células endoteliais primárias humanas (HUVEC)

Este teste é usado para avaliar a capacidade dos compostos na Tabela 2 para inibir a produção de PGI₂.

A ausência de actividade inibidora nestes prostanóides pode assegurar que a acção vasoprotectora de PGI₂ é mantida, e fornece informação farmacológica útil acerca de efeitos adversos no endotélio.

O composto 1 foi usado no teste.

A acção do composto testado foi avaliada em células HUVEC em condições basais e com estimulação (J. Immunol. 1989 1 de Junho; 142(11):3993-9).

Os resultados são apresentados na Tabela 6 e são expressos como percentagem de inibição, em comparação com a actividade enzimática controlo.

A indometacina foi usada como composto referência.

Tabela 6

Composto (10 µM)	Teste para a secreção de PGI ₂	% de inibição
1	Basal (HUVEC)	0
1	Com estimulação (HUVEC)	0
Indometacina	Com estimulação (HUVEC)	100

REIVINDICAÇÕES

1. O uso de um composto seleccionado do grupo consistindo em derivados benzoil de 3-aminocarbazol de fórmula (I), indicados na Tabela 1 abaixo

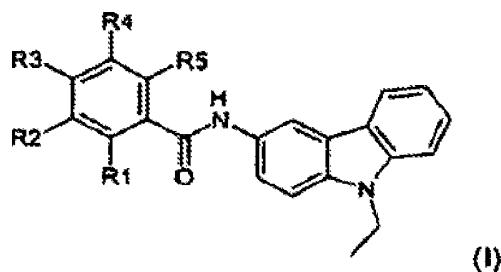


Tabela 1

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	Cl	H	H	H	H
2	CH ₃	H	H	H	H
3	Br	H	H	H	H
4	I	H	H	H	H
5	NO ₂	H	H	H	H
6	Cl	H	H	H	Cl
7	Cl	H	H	NO ₂	H
8	Cl	H	H	Cl	H

para a produção de um fármaco para o tratamento preventivo ou terapêutico de uma doença seleccionada do grupo consistindo em edema, eritema, inflamação das articulações, artrite reumatóide, artrose, dor, febre, tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose.

2. O uso de acordo com a reivindicação 1, no qual o tumor é seleccionado do grupo consistindo em carcinomas e adenocarcinomas colorectais e dos pulmões.

3. Um derivado benzoil de 3-aminocarbazol de fórmula (I) indicado na Tabela 1 abaixo

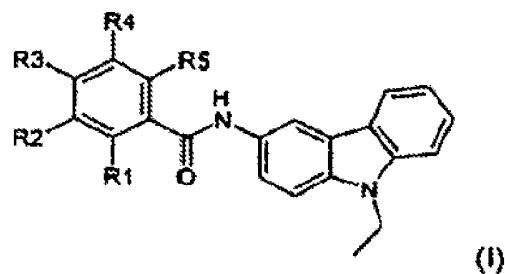


Tabela 1

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	Cl	H	H	H	H
2	CH ₃	H	H	H	H
3	Br	H	H	H	H
4	I	H	H	H	H
5	NO ₂	H	H	H	H
6	Cl	H	H	H	Cl
7	Cl	H	H	NO ₂	H
8	Cl	H	H	Cl	H

para uso no tratamento preventivo ou terapêutico de uma doença seleccionada do grupo consistindo em edema, eritema, inflamação das articulações, artrite reumatóide, artrose, dor, febre, tumores, doença de Alzheimer e aterosclerose.

4. O derivado benzoil de 3-aminocarbazol de acordo com a reivindicação 3, para o uso no tratamento preventivo ou terapêutico de um tumor seleccionado do grupo consistindo em carcinomas e adenocarcinomas colorectais e dos pulmões.

Lisboa, 29 de Julho de 2010