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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	**102018000005987**
Data Deposito	**04/06/2018**
Data Pubblicazione	**04/12/2019**

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	D	213	06

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	27	02

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	444

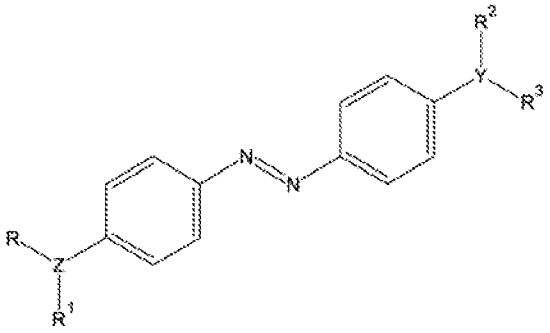
Titolo

Composti fotocromici

Titolo: "Composti fotocromici"

Descrizione

Formano oggetto della presente invenzione composti di formula (1)



(1)

dove Y e Z sono indipendentemente O, N, P;

R, R1, R2, R3, laddove presenti, sono indipendentemente H, C1-C12 alchile facoltativamente sostituito, O, oppure R e R1 e/o R2 e R3 formano, insieme all'atomo Y e/o Z a cui sono attaccati, un anello a 3-14 membri, facoltativamente contenente uno o più ulteriori eteroatomi scelti tra O, N, e S, facoltativamente sostituito.

Forma ulteriore oggetto della presente invenzione una composizione che comprende almeno uno di detti composti.

Si rivendica altresì l'uso medico di detti composti.

Stato dell'arte

Le distrofie della retina, ereditarie o dovute all'età, quali ad esempio la retinite pigmentosa (RP) e la degenerazione maculare senile (AMD), sono tra le prevalenti cause di cecità. Queste malattie coinvolgono

la degenerazione dei fotorecettori che causa una progressiva e severa perdita della capacità visiva.

La RP è causata da mutazioni dominanti, recessive o legate al cromosoma X, che coinvolgono geni deputati alla fototrasduzione. Le mutazioni di questi geni compromettono la sopravvivenza dei bastoncelli. Di conseguenza, nella RP la visione scotopica è precocemente colpita. Nelle fasi successive vengono coinvolti i coni fino a determinare la cecità totale.

L'AMD consiste in una degenerazione selettiva dei coni foveali e colpisce fino al 20% della popolazione al di sopra dei 75 anni di età. Nell'AMD, la compromissione dei fotorecettori foveali determina una perdita di visione ad alta risoluzione nell'area centrale del campo visivo.

Nonostante i numerosi sforzi, un trattamento farmacologico riconosciuto per prevenire la degenerazione dei fotorecettori non è stato ancora individuato. Data la relativa conservazione della retina interna, sono stati fatti tentativi per ripristinare la visione attraverso la fotostimolazione di quest'ultima.

Bianco A et al. (*Control of optical properties through photochromism: a promising approach to photonics.* Laser Photonics Rev 2011; 1-26) descrivono molecole fotocromiche per la fotoattivazione della retina interna. Tipicamente, la porzione fotoisomerizzabile della

molecola è un azobenzene che espone un gruppo attivo cambiando tra uno stato di buio e di luce, con isomerizzazione da trans (E) a cis (Z).

Le proprietà legate all'isomerizzazione dei derivati azobenzenici sono state ampiamente studiate, ad esempio per applicazioni legate ai canali ionici, voltaggio o ligando dipendenti. Si veda Gorostiza P e Isacoff E (*Optical switches and triggers for the manipulation of ion channels and pores.* Mol Biosyst 2007; 3, 686-704).

Sono stati altresì descritti "photoswitchable affinity labels" (PAL) per indurre cambiamenti conformazionali dipendenti dalla luce in proteine bersaglio in assenza di ingegnerizzazione ed espressione di geni esogeni (Fortin DL et al. *Photochemical control of endogenous ion channels and cellular excitability.* Nat Methods 2008; 5, 331-338). Tra questi, Polosukhina A et al. (*Photochemical restoration of visual responses in blind mice.* Neuron 2012; 75, 271-282) hanno descritto composti che legano covalentemente a un'estremità dell'azobenzene un gruppo ammonio quaternario (QA) che lega e blocca i canali K^+ e, all'altra estremità, un gruppo polare, come ad esempio acrilammide, che interagisce con la struttura del canale. Detti composti sono stati in grado di recuperare l'attività visiva in topi geneticamente ciechi. L'effetto riscontrato, dopo

somministrazione intravitreale del composto, è stato di breve durata ed ha richiesto illuminazione UV per promuovere l'isomerizzazione da E a Z. Lo svantaggio è legato alla necessità di eccitazione nella regione UV, dannosa per il tessuto e che difficilmente raggiunge la retina. L'esigenza di disporre di nuovi photoswitch azobenzenici sostituiti con ammonio quaternario, che possano essere attivati dalla luce visibile e mostrare un'emivita più lunga, ha portato a descrivere il DENAQ e il BENAQ (Tochitsky I et al. *Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells.* Neuron 2014; 81, 800-813. Tochitsky I et al. *Restoring visual function to the blind retina with a potent, safe and long-lasting photoswitch.* Sci Rep 2017; 7, 45487).

Nonostante i numerosi sforzi fatti sinora nel campo della stimolazione ottica di cellule eccitabili, vi è ancora una forte necessità di nuovi composti fotocromici che siano allo stesso tempo biocompatibili, attivabili con luce visibile, dotati di maggiore emivita e che non interferiscano con l'attività fisiologica naturale dei canali di membrana.

Descrizione dell'invenzione

Sono qui descritti composti fotocromici che si localizzano all'interno della membrana cellulare in corrispondenza dei *lipid rafts*.

Formano ulteriore oggetto della presente invenzione detti composti per l'uso nel trattamento di patologie degenerative della retina.

Descrizione delle figure

Figura 1: (a) schema del processo di isomerizzazione di un composto secondo la presente invenzione. Spettri di assorbimento (b) ed emissione (c) del composto Ziapin 2 25 μM in DMSO. (d) dinamica di photoswitching di Ziapin 2 in acqua, DMSO e in cellule HEK293. (e,f) assorbimento e fotoluminescenza di Ziapin 1 25 μM in DMSO (e) ed evoluzione del picco di assorbimento a 470 nm illuminando con un diodo a 450 nm (f).

Figura 2: Simulazioni di dinamica molecolare di Ziapin 2 nel modello di membrana, (a) nella conformazione E e (b) in quella Z. (c) dipendenza temporale della distanza tra il centro di massa (COM) di Ziapin 2 e il centro del doppio strato in tre diverse simulazioni di una singola molecola di Ziapin 2 (E) in acqua e nell'ambiente di membrana (modello lipidico POPC); la linea tratteggiata indica approssimativamente l'interfaccia tra acqua e le teste polari dei gruppi fosfolipidici.

Figura 3: Simulazioni di dinamica molecolare di Ziapin 1 nel modello di membrana POPC, nella conformazione E (a) e in quella Z (b).

Figura 4: immagini di microscopia confocale che evidenziano la localizzazione della molecola Ziapin 2 in prossimità delle membrane plasmatiche (a) e nei *lipid rafts* (b) di neuroni primari. Il grafico (c) mostra che circa il 70% di Ziapin 2 si localizza in egual misura nelle membrane plasmatiche e nei *lipid rafts* (in alto) e che questo porta a una copertura di circa il 20% della superficie cellulare (in basso).

Figura 5: immagini di microscopia confocale che evidenziano la localizzazione della molecola Ziapin 1 in prossimità delle membrane plasmatiche (a) e nei *lipid rafts* (b) di neuroni primari. Il grafico (c) mostra che meno del 50% di Ziapin 1 si localizza nelle membrane plasmatiche e nei *lipid rafts* (in alto), coprendo circa il 20% della superficie cellulare (in basso).

Figura 6: elettrofisiologia condotta su cellule HEK293 (a, b), neuroni primari in assenza (c, d) o in presenza di bloccanti sinaptici (e, f) trattati con Ziapin 2 e sotto illuminazione. (a) Tracce medie rappresentative di current-clamp registrate da cellule HEK293 incubate con DMSO 0,25% (v/v) (Ctrl; linea nera) o 25 µM Ziapin 2 in DMSO (linea grigia) e fotostimolate per 20 ms (in alto) o 200 ms (in basso) (lunghezza d'onda 470 nm, densità di

potenza luminosa di 47 mW/mm^2, aree ombreggiate in grigio). (b) Iperpolarizzazione media e successiva depolarizzazione in cellule HEK293. (c, d) Tracce rappresentative di current-clamp di risposte passive (iperpolarizzazione/depolarizzazione, sinistra) e attive (potenziali d'azione, destra) registrate da neuroni incubati in DMSO 0,25% (v/v) (Ctrl; linea nera) o con 5 µM Ziapin 2 in DMSO (linea grigia) in assenza (c) o presenza (e) di bloccanti sinaptici. La durata della stimolazione della luce (20 e 200 ms, rispettivamente) viene indicata come un'area ombreggiata (lunghezza d'onda 470 nm, densità di potenza luminosa di 20 mW/mm^2). (d, f) Quantificazione del picco di iperpolarizzazione (a sinistra) e depolarizzazione (a destra) in neuroni primari esposti a DMSO o Ziapin 2 in assenza (d) o presenza (f) di bloccanti sinaptici e sottoposti a 20 o 200 ms di stimolazione luminosa.

Figura 7: Modulazione della capacità e della conduttanza di membrana in neuroni primari in seguito a stimolazione luminosa. Tracce rappresentative di capacità (a) e conduttanza (b) registrate in current-clamp da neuroni primari incubati con 0,25% (v/v) DMSO (Ctrl; linea nera) o 5 µM Ziapin 2 in DMSO (linea grigia) in presenza di bloccanti sinaptici e fotostimolati con 20 ms (sinistra) o 200 ms (destra) (lunghezza d'onda 470 nm, densità di potenza luminosa di 20 mW/mm^2, aree ombreggiate). (c, d)

Quantificazione delle variazioni di capacità (c) e conduttanza (d) di picco evocate da stimoli luminosi di 20 e 200 ms.

Figura 8: Effetto di Ziapin 1 sulle proprietà di membrana passive e attive in neuroni ippocampali primari. I neuroni primari sono stati incubati con DMSO (0,25% v/v) o Ziapin 1 (5 µM in DMSO) e successivamente registrati in presenza (SB) o assenza (Ctrl) di bloccanti sinaptici in risposta a stimolazione luminosa di 20 o 200 ms. (a) Quantificazione dell'iperpolarizzazione (sinistra) e della depolarizzazione (destra) in risposta alla stimolazione luminosa per 20/200 ms. (b, c) Modulazione della capacità di picco (sinistra) e di plateau (destra) (b) e della dinamica temporale di variazione (c) evocati sotto stimolazione luminosa in neuroni esposti a DMSO o Ziapin 1 in presenza di bloccanti sinaptici. (d) Scariche rappresentative di potenziali d'azione (firing) in neuroni primari in DMSO (linea nera) o Ziapin 1 (linea grigia) in assenza (Ctrl) o presenza di bloccanti sinaptici (SB). (e, f) Quantificazione della modulazione del firing indotto dalla luce in neuroni in DMSO (in nero) o Ziapin 1 (in grigio) registrati in risposta a stimolazione della luce per 20 ms (e) o 200 ms (f).

Figura 9: Risposte corticali evocate dalla luce in vivo nella corteccia somatosensoriale di topi esposti a Ziapin 2. (a) Rappresentazione schematica dell'iniezione

stereotassica di Ziapin 2 (200 mM in 1 µl di 10% DMSO) nella corteccia somatosensoriale (S1ShNc, 2 mm anteriore a lambda, 2 mm lateralmente alla linea mediana e - 723 µm ventrale alla superficie cerebrale) e dell'impianto a 16 microelettrodi accoppiati a fibra ottica per registrazioni di fotostimolazione e potenziali di campo (LFP). (b) Registrazioni rappresentative di LFP evocate nella corteccia somatosensoriale con stimolazione luminosa di 20 e 200 ms (43 mW/mm^2) in topi iniettati con DMSO (linea nera) o Ziapin 2 (linea grigia). Le aree ombreggiate rappresentano la stimolazione della luce. (c) Analisi dose-risposta degli LFP in topi iniettati DMSO (linea nera) o Ziapin 2 (linea grigia) in funzione della potenza e durata della fotostimolazione. Le stimolazioni a 25 e 43 mW/mm^2 innescano una risposta negli animali iniettati con Ziapin 2 che è significativamente diversa dagli animali trattati con DMSO e a 4 mW/mm^2 nel caso di un'illuminazione di 20 ms. Densità di potenza più elevate suscitano una risposta che, parzialmente guidata dalla temperatura, è significativamente più alta in presenza di Ziapin 2. Non sono stati osservati cambiamenti significativi rispetto al solo DMSO in assenza dello stimolo luminoso e con la potenza più elevata utilizzata (160 mW/mm^2).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; U-test di Mann Whitney (N = 3 topi per entrambi i gruppi sperimentali).

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Se non definiti diversamente, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati qui hanno lo stesso significato com'è inteso comunemente da parte di un esperto nell'arte a cui l'argomento rivendicato appartiene. Nel caso in cui vi sia una pluralità di definizioni per i termini, prevalgono quelle in questa sezione.

In questa domanda, l'uso del singolare include il plurale a meno che non sia specificamente indicato diversamente. Deve essere indicato che, come utilizzate nella descrizione e nelle rivendicazioni allegate, le forme singolari "un", "una" ed "il" includono i riferimenti plurali a meno che il contesto non imponga chiaramente diversamente.

Il termine "facoltativo" o "facoltativamente" significa che l'evento o la circostanza descritti successivamente possono presentarsi oppure no e che la descrizione include esempi dove i suddetti evento o circostanza avvengono ed esempi in cui essi non avvengono. Per esempio, "alchile facoltativamente sostituito" significa "alchile" o "alchile sostituito". Inoltre, un gruppo facoltativamente sostituito può essere non sostituito (per esempio, $-CH_2CH_3$), completamente sostituito (per esempio, $-CF_2CF_3$), monosostituito (per esempio, $-CH_2CH_2F$) o sostituito ad un livello dovunque nel mezzo completamente sostituito e

monosostituito (per esempio, $-CH_2CHF_2$, $-CH_2CF_3$, $-CF_2CH_3$, $-CFHCHF_2$, ecc.).

Come utilizzato qui, C1-Cx include C1-C2, C1-C3 ... C1-Cx. Solo a titolo di esempio, "C1-C4" indica che vi sono da uno a quattro atomi di carbonio nel gruppo funzionale, cioè gruppi contenenti 1 atomo di carbonio, 2 atomi di carbonio, 3 atomi di carbonio o 4 atomi di carbonio, così come gli intervalli C1-C2 e C1-C3. Così, solo a titolo di esempio, "C1-C4 alchile" indica che vi sono da uno a quattro atomi di carbonio nel gruppo alchile, cioè, il gruppo alchile viene scelto tra metile, etile, propile, isopropile, n-butile, isobutile, sec-butile e t-butile. Tutte le volte che appare qui, un intervallo numerico, quale "da 1 a 10", si riferisce a ciascun numero intero nel dato intervallo; per esempio, "da 1 a 10 atomi di carbonio" significa che il gruppo può avere 1 atomo di carbonio, 2 atomi di carbonio, 3 atomi di carbonio, 4 atomi di carbonio, 5 atomi di carbonio, 6 atomi di carbonio, 7 atomi di carbonio, 8 atomi di carbonio, 9 atomi di carbonio, o 10 atomi di carbonio.

I termini "anello" ed "anello a termini" come utilizzati qui, da soli o in combinazione, si riferiscono a qualsiasi struttura chiusa covalentemente, compresi sistemi ad anello fusi o non fusi eteroaromatici e policiclici, aliciclici, eterociclici, aromatici, come descritti qui. Gli anelli possono essere facoltativamente sostituiti.

Gli anelli possono far parte di un sistema ad anello fuso. Il termine “a termini” è inteso per indicare il numero di atomi scheletrici che costituiscono l’anello.

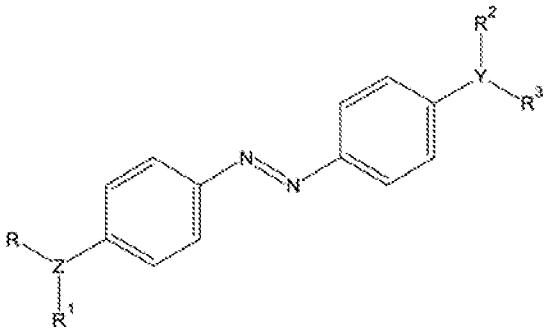
Il termine “fuso” come utilizzato qui, da solo o in combinazione, si riferisce a strutture cicliche in cui due o più anelli condividono uno o più legami.

Con il termine “sostituito”, si intende sostituito con uno o più sostituenti selezionati indipendentemente tra alogeno, alchile, idrossi, alcossi.

Nella presente invenzione, il termine "eterociclo a 3-14-membri" indica un gruppo ciclico derivato da un idrocarburo rimuovendo un atomo di idrogeno. A titolo di esempio, il termine include eterocicli monociclici a 3-8 membri e eterocicli fusi a 6-14 membri.

Con il termine "eterociclo monociclico a 3-8 membri" si intendono eterocicli monociclici saturi a 3-8 membri e eterocicli monociclici parzialmente saturi. Il termine "eterociclo monociclico saturo a 3-8 membri" significa che l'anello monociclico è un anello completamente saturo. Il termine "eterociclo monociclico parzialmente saturo a 3-8 elementi" significa che l'anello monociclico è un anello parzialmente saturo.

In una prima forma di realizzazione, formano oggetto della presente invenzione composti di formula (1)



(1)

dove Y e Z sono indipendentemente O, N, P;

R, R1, R2, R3, laddove presenti, sono indipendentemente H, C1-C12 alchile facoltativamente sostituito, preferibilmente C1-C6 alchile facoltativamente sostituito, O, oppure R e R1 e/o R2 e R3 formano, insieme all'atomo Y e/o Z a cui sono attaccati, un anello a 3-14 membri, facoltativamente contenente uno o più ulteriori eteroatomi scelti tra O, N, e S, facoltativamente sostituito.

Preferibilmente, detto C1-C6 alchile è un idrocarburo saturo a catena lineare facoltativamente sostituita o a catena ramificata facoltativamente sostituita.

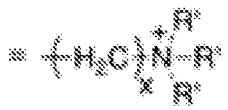
Ancora più preferibilmente, detto C1-C6 alchile è sostituito al C terminale con un gruppo carico positivamente, preferibilmente con un gruppo amminico terziario o con un'ammina aromatica.

In una forma preferita, R, R1, R2 e/o R3 sono indipendentemente



dove X = Br, I e x è compreso tra 2 e 12;

oppure R, R1, R2 e/o R3 sono indipendentemente



dove X = Br, I, x è compreso tra 2 e 12 e R' è C1-C4 alchile, preferibilmente R' = CH_3, CH_2CH_3.

Laddove Y e/o Z sono O, detto R o R1 e/o detto R2 o R3 sono opzionalmente assenti.

In una forma preferita, detti gruppi YRR_1 e/o ZR_2R_3 sono NO_2.

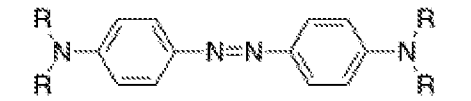
In un'ulteriore forma preferita, detti gruppi YRR_1 e/o ZR_2R_3 sono OCH_3.

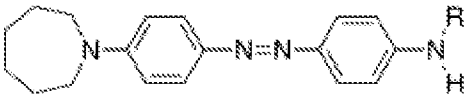
Detto anello è un anello saturo, insaturo o aromatico. Laddove sostituito, è sostituito con uno o più sostituenti selezionati indipendentemente tra metile, etile, propile, isopropile, tert-butile, ciclopropile, ciclobutile, CF_3, OH, OCH_3, etossi, SH, SCH_3, SCH_2CH_3, CH_2OH, $C(CH_3)_2OH$, Cl, F, CN, COOH, COOR5, $CONH_2$, CONHR5 o SO_2NH_2; in cui R5 è H o C1-C3 alchile.

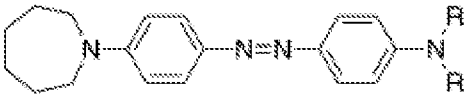
In una forma preferita, detto anello comprende atomi di carbonio, eccetto l'atomo Y o Z. In una forma ancor più preferita, detto anello è un azepano.

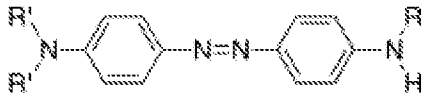
I composti di cui alla tabella 1 sono particolarmente preferiti:

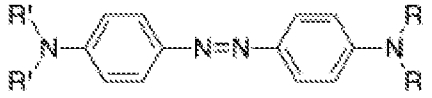
Tabella 1

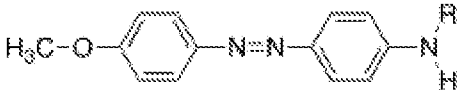


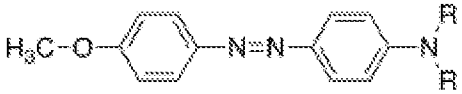


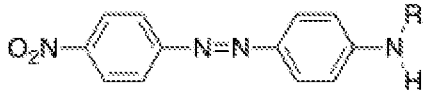


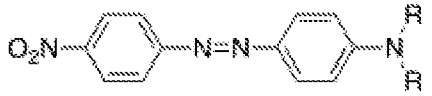




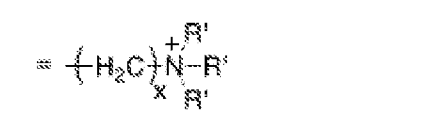












Formano ulteriore oggetto della presente invenzione i composti qui descritti per l'uso medico.

In una forma di realizzazione preferita, detto uso medico è nel trattamento di patologie dell'occhio.

Ancor più preferibilmente, dette patologie dell'occhio sono distrofie della retina, ad esempio retinite pigmentosa e degenerazione maculare senile.

In un'ulteriore forma di realizzazione, si rivendica una composizione che comprende almeno uno dei composti secondo la presente invenzione, opzionalmente uno o più ulteriori principi attivi ed eccipienti farmacologicamente accettabili.

Le composizioni farmaceutiche per l'uso in conformità con la presente invenzione possono essere formulate in modo convenzionale usando uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili compresi carrier, diluenti o liposomi che agevolano il processamento dei composti attivi in preparazioni che possono essere usate fisiologicamente per il preparato microiniettabile.

Nella forma di realizzazione preferita, i composti dell'invenzione vengono forniti come composizioni farmaceutiche sotto forma di composizioni liquide. In varie forme di realizzazione, la composizione farmaceutica contiene almeno uno di detti composti disperso in un eccipiente liquido idoneo. Eccipienti liquidi idonei sono noti nella tecnica; si veda, per esempio, Pharmaceutical Sciences di Remington.

In una forma particolarmente preferita, detta formulazione è per microiniezione intravitreale o sottoretinica.

Si descrive altresì un metodo per il trattamento di patologie degenerative dei fotorecettori che comprende la somministrazione mediante microiniezione intravitreale o sottoretinica in corrispondenza della regione maculare di quantitativo opportuno di almeno uno dei composti secondo la presente invenzione. La somministrazione può essere ripetuta in seguito all'eventuale attenuazione della fotosensibilita'.

Il termine "microiniezione" si riferisce alla somministrazione del preparato utilizzando una microsiringa in modo da iniettare lentamente e regolarmente volumi nell'ordine di microlitri a livello locale.

I composti o la composizione secondo la presente invenzione sono somministrati a livello subretinico mediante microiniezione attraverso la sclera o attraverso la camera vitrea. Secondo una forma di realizzazione preferita, i composti o la composizione secondo la presente invenzione sono somministrati / applicati / iniettati mediante microiniezione nello spazio sottoretinico. Preferibilmente, detti composti o composizione sono somministrati con uno dei metodi che seguono.

(i) Eseguire un'incisione sulla congiuntiva dell'occhio da trattare, preferibilmente con le forbici a 1,5 mm dal limbus per circa 2 ore di orologio nei quadranti superiori; e / o (ii) Incidere la sclera e la coroide (circa 0,6 mm), preferibilmente 1 mm dal limbo; e / o (iii) Separare la retina dall'epitelio pigmentato della retina mediante iniezione di una piccola quantità di materiale viscoelastico nello spazio sottoretinico, come il sale di sodio dell'acido ialuronico ad alto peso molecolare (ad esempio, IAL-F, Fidia Farmaceutici S.p.A., Italia); e / o (iv) Iniettare uno o più dei composti o la composizione secondo la presente invenzione, preferibilmente attraverso la sclera nello spazio sottoretinico; (vi) Coagulazione dell'incisione sclerale con diatermia e riposizionamento della congiuntiva sulla ferita sclerale.

In una forma di realizzazione, uno o più dei composti o la composizione secondo la presente invenzione sono somministrati mediante microiniezione nella regione sottoretinica preferenzialmente in corrispondenza della macula dopo penetrazione attraverso sclera e coroide.

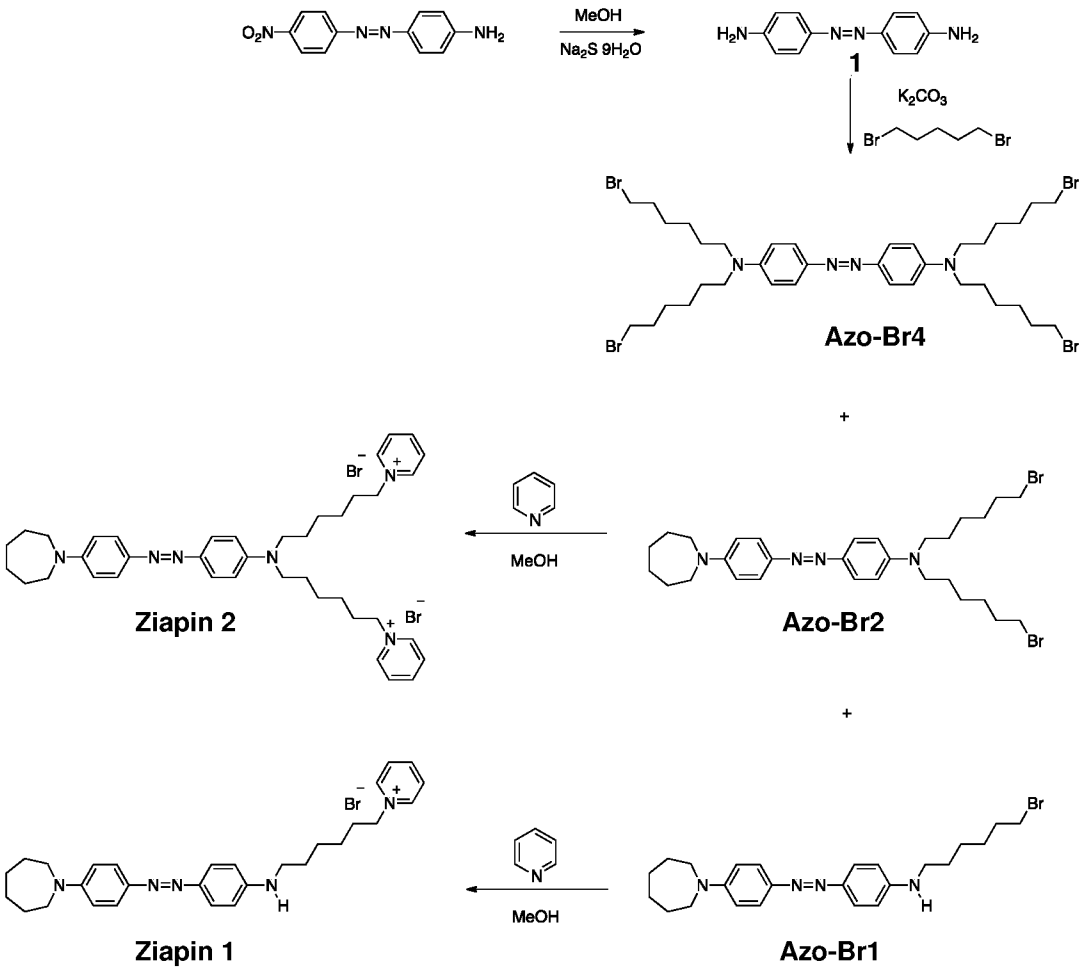
In una forma di realizzazione preferita, uno o più dei composti o la composizione secondo la presente invenzione sono somministrati mediante microiniezione nella regione subretinica. Secondo una forma di realizzazione preferita, l'iniezione viene eseguita aprendo la

congiuntiva, incidendo la sclera e la coroide, separando la sclera e l'epitelio pigmentato della retina, iniettando un materiale viscoelastico nella retina e infine iniettando uno o più dei composti o la composizione secondo la presente invenzione regione subretinica. Secondo un'ulteriore forma di realizzazione preferita, uno o più dei composti o la composizione secondo la presente invenzione sono iniettati tangenzialmente alla sclera, al fine di prevenire qualsiasi danno della retina e della coroide. Il flusso sub-retinico tangenziale originatosi iniettando con l'ago in questa posizione è molto efficace nel promuovere un completo distacco della retina e una conseguente distribuzione uniforme del composto. Detta composizione è preferibilmente una composizione farmaceutica oftalmica iniettabile. La composizione oftalmica della presente invenzione è caratterizzata da un pH generalmente accettabile per applicazioni oftalmiche. Preferibilmente, il valore del pH della composizione varia tra 7,0 e 7,5. Inoltre, la composizione è caratterizzata da una pressione osmotica generalmente accettabile per applicazioni oftalmiche. Preferibilmente, il valore di pressione osmotica della composizione varia tra 290 e 300 mOsm/L.

Esempi

Strategia di sintesi:

Si riporta qui di seguito la via sintetica di due dei composti secondo la presente invenzione, denominati Ziapin 1 e Ziapin 2. L'esperto del settore sa come modificare la strategia sintetica qui riportata per ottenere gli ulteriori composti qui descritti.



A meno che non sia specificato diversamente, tutti i reagenti e solventi sono commercialmente disponibili ed utilizzati senza ulteriore purificazione. Le reazioni di reagenti e intermedi sensibili all'aria e all'acqua sono

state svolte in vetreria essiccata e sotto atmosfera di argon. Se necessario, i solventi sono stati anidrificati per mezzo del metodo convenzionale e conservati sotto argon.

1,0 g di 4,4'-diaminoazobenzene, sintetizzato secondo la procedura riportata in L. Hamryszak et al, J. Mol. Liq., 2012, 165, 12, è stato tenuto in agitazione in 130 ml di acetonitrile precedentemente degasato. 2,60 g di K_2CO_3 e 7,5 ml di 1,6-dibromoesano sono stati aggiunti in porzioni alla miscela di reazione e mantenuta a riflusso per 120 ore, mentre veniva monitorata con TLC. La miscela di reazione è stata filtrata e il solido è stato lavato tre volte con dietil etere, etilacetato e diclorometano. L'eccesso di dibromoesano è stato rimosso a pressione ridotta (3 10^{-1} mbar) a 60°C. Il materiale grezzo è purificato per mezzo di cromatografia flash con gel di silice per ottenere 30 mg di Azo-Br4. Dalla cromatografia flash, sono anche stati recuperati 100 mg di Azo-Br1 e Azo-Br2.

Ziapin 1

12 mg di Azo-Br1 sono stati dissolti in 3 ml di piridina e mantenuti in agitazione a temperatura ambiente per 42 ore. In seguito, 3 ml di metanolo sono stati aggiunti e successivamente agitati per 60 ore. L'eccesso di piridina e metanolo sono stati rimossi dalla miscela di reazione

sotto pressione ridotta per dare un solido il quale è stato lavato con piccole porzioni di esano.

Ziapin 2

12 mg of Azo-Br2 sono stati disciolti in 3 ml di piridina e mantenuti in agitazione a temperatura ambiente per 42 ore. In seguito, 3 ml di metanolo sono stati aggiunti e successivamente agitati per 60 ore. L'eccesso di piridina e metanolo sono stati rimossi dalla miscela di reazione sotto pressione ridotta per dare un solido il quale è stato lavato con piccole porzioni di esano.

La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata eseguita utilizzando gel di silice su foglio di alluminio (Sigma Aldrich). Gli spettri NMR sono stati ottenuti con uno strumento Bruker ARX400. La spettrometria di massa è stata eseguita con uno strumento Bruker Equire 3000 plus.

Caratterizzazione fotofisica:

La molecola Ziapin 2 (Figura 1a) in DMSO presenta un forte picco di assorbimento centrato a 470 nm (Fig. 1b) e un picco a 330nm, attribuiti rispettivamente alle transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ dell'isomero E. L'irraggiamento con luce blu (450nm) porta all'isomerizzazione E→Z, come si può vedere dall'indebolimento dell'assorbimento dell'isomero E accompagnato dal concomitante aumento dell'assorbimento del conformero Z a 350-380 nm e 520-60nm. La fluorescenza dell'azobenzene è anche uno strumento ideale per monitorare il comportamento di

switch dei materiali fotoreponsivi, così come la localizzazione e fotodinamica nelle cellule viventi. La diminuzione della fluorescenza dipendente dal tempo di Ziapin 2 in seguito ad esposizione alla luce blu in soluzione di DMSO (Fig. 1c) è correlata all'indebolimento della fotoluminescenza del conformero E dovuta alla reazione di fotoisomerizzazione. Le misure di fluorescenza dipendenti dal tempo (Fig. 1d) indicano una chiara dinamica di "photo-switching" dell'azobenzene in cellule HEK293 vive, con gradi di isomerizzazione/rilassamento stimati di 0,01 cm^2J^{-1} e 0,0085s^{-1}. Tali valori suggeriscono che l'abilità di "photoswitching" di Ziapin 2 in membrane cellulari è lievemente minore di quella in DMSO, probabilmente a causa della ristretta libertà conformazionale incontrata dalla molecola quando internalizzata nella struttura a doppio strato. Una caratterizzazione analoga è stata effettuata con la molecola Ziapin 1 (Fig. 1 e,f).

Test di localizzazione dei composti:

Le molecole tendono a localizzarsi nelle membrane cellulari e a modificarne la conformazione. La specifica affinità per l'ambiente idrofobico della membrana è stata studiata mediante simulazioni di dinamica molecolare degli isomeri E e Z della molecola Ziapin 2 (Fig. 2a) e ha rivelato una significativa tendenza all'incorporazione nella membrana se il composto viene aggiunto

nell'ambiente extracellulare in un tempo variabile tra 50 e 100 ns (Fig. 2b). La molecola Ziapin 1 ha dimostrato anch'essa una tendenza all'inserimento in membrana, mostrando però una minore deformazione della stessa (Fig. 3 a,b). Il targeting di entrambe le molecole a livello di membrana plasmatica è stato analizzato in colture di neuroni primari mediante specifici markers per la membrana cellulare (Cell Mask, Fig. 4a, Fig. 5a rispettivamente) o per i *lipid rafts*, aree di membrana ricche di colesterolo e canali ionici (Vybrant, Fig. 4b, Fig. 5b rispettivamente). A seguito di una esposizione delle colture neuronali al composto, la percentuale di localizzazione delle molecole in corrispondenza dei *lipid rafts* è molto elevata, suggerendo una spiccata affinità per le aree di membrana ricche di colesterolo e canali ionici (Fig. 4c). Questo effetto è notevolmente più marcato per la molecola Ziapin 2 rispetto alla Ziapin 1 (Fig. 5c).

Attività delle molecole:

In seguito all'eccitazione ottica con luce visibile, la forma E isomerizza in forma Z a maggior ingombro sterico. In seguito a questa variazione conformazionale, la linea cellulare HEK293 risponde con un'iperpolarizzazione del potenziale di membrana (Fig. 6a e b), interpretata come la conseguenza della deformazione del doppio strato

lipidico che può influenzare capacità e resistenza della membrana.

Nel caso di tessuti eccitabili dotati di un ampio corredo di conduttanze voltaggio-dipendenti come i neuroni primari, l'iperpolarizzazione è seguita da una depolarizzazione che porta al raggiungimento della soglia per il potenziale d'azione, con conseguente firing in risposta allo stimolo luminoso (Fig. 6c). La modulazione del potenziale di membrana non è dipendente dalla durata dello stimolo luminoso, mentre le ampiezze dell'iperpolarizzazione e successiva depolarizzazione sono significativamente differenti dai potenziali di membrana registrati in presenza del solo vettore (DMSO) (Fig. 6d). L'effetto bifasico sul potenziale di membrana e di firing dei composti si confermano anche a livello di singolo neurone in presenza di bloccanti dell'attività sinaptica inibitoria ed eccitatoria (Fig. 6e e f).

L'interazione del composto con la membrana è dimostrato anche dalla modulazione sotto stimolazione luminosa delle proprietà passive di membrana (Fig. 7a e b). La capacità e la conducibilità di membrana infatti mostrano entrambe una diminuzione significativa rispetto ai valori al buio (Fig. 7c e d), corroborando l'ipotesi di una modulazione dell'attività neuronale legata alla deformazione del doppio strato lipidico. Le proprietà passive e attive di membrana sono state testate anche in neuroni primari

trattati con la molecola Ziapin 1, mostrando in generale un effetto di modulazione in seguito a stimolazione luminosa inferiore rispetto a quello ottenuto con Ziapin 2 (Fig. 8).

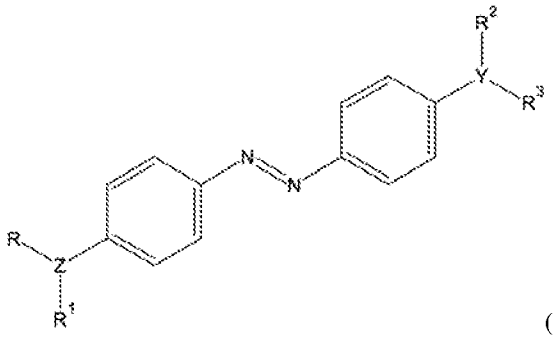
L'efficacia dei composti secondo la presente invenzione è stata dimostrata in vivo tramite la somministrazione di 1 μl di Ziapin 2 nella corteccia somatosensoriale di animali adulti. L'obiettivo era indagare se la modulazione luce-dipendente dell'attività neuronale osservata in vitro si verificasse anche in vivo. Le registrazioni elettrofisiologiche sono state ottenute tramite l'impianto di un array di 16 microelettrodi accoppiato ad una fibra ottica per la fotostimolazione. Le analisi di fluorescenza hanno rivelato che l'area di diffusione e assorbimento della molecola da parte delle cellule corticali occupava un diametro di circa 1 mm (Fig. 9a e b). La stimolazione ottica per 20 e 200 ms con un laser da 472 nm, a diverse intensità, ha indotto un'attivazione significativa dell'attività corticale valutata in termini di potenziali di campo (LFP). Tale risultato non è stato osservato negli animali trattati con il veicolo (DMSO). La risposta ha raggiunto un picco a circa 200 ms a seguito dello stimolo luminoso (Fig. 9c e d).

Vantaggi

L'attività dei composti qui descritti non è legata ai canali K^+, pertanto all'uso dei composti secondo la presente invenzione non è associato il rischio di ipereccitabilità legato al blocco dei canali K^+ che inevitabilmente accompagna il trattamento con le molecole fotocromiche di arte nota.

RIVENDICAZIONI

1. Composti di formula (1)

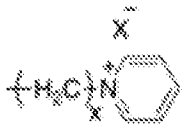


(1)

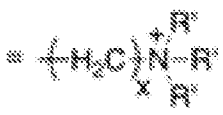
dove Y e Z sono indipendentemente O, N, P;

R, R1, R2, R3, laddove presenti, sono indipendentemente H, C1-C12 alchile facoltativamente sostituito, O, oppure R e R1 e/o R2 e R3 formano, insieme all'atomo Y e/o Z a cui sono attaccati, un anello a 3-14 membri, facoltativamente contenente uno o più ulteriori eteroatomi scelti tra O, N, e S, facoltativamente sostituito.

2. Composti secondo la rivendicazione 1, dove detti R, R1, R2 e/o R3 sono indipendentemente

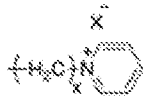


oppure



dove X = Br o I, x è compreso tra 2 e 12 e R' è C1-C4 alchile.

3. Composti secondo la rivendicazione 2, dove detto R' è selezionato tra CH_3, CH_2CH_3.
4. Composti secondo la rivendicazione 1, dove YRR_1 e/o ZR_2R_3 sono NO_2.
5. Composti secondo la rivendicazione 1, dove YRR_1 e/o ZR_2R_3 sono OCH_3.
6. Composti secondo la rivendicazione 1, dove YRR_1 e/o ZR_2R_3 sono OCH_3.
7. Composti secondo la rivendicazione 1, dove detto anello è un eterociclo monociclico a 3-8 membri.
8. Composti secondo la rivendicazione 7, dove detto anello è un azepano.
9. Composti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 8, dove Z è N e detti R2 e R3 sono indipendentemente H e/o



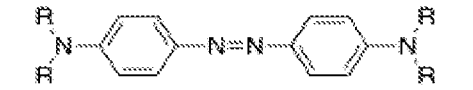
dove X = Br o I e x è compreso tra 2 e 12.

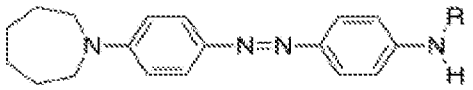
10. Composti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 9, dove Z è N e detti R2 e R3 sono entrambi

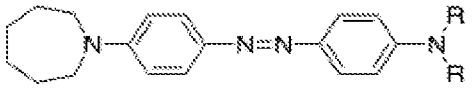


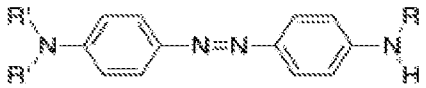
dove X = Br o I e x è compreso tra 2 e 12.

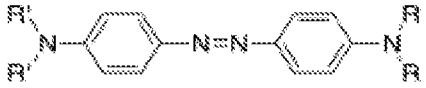
11. Composti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 11 selezionati nel gruppo che comprende:

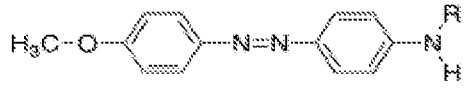


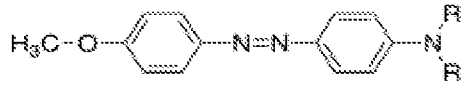


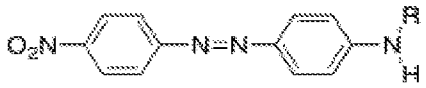


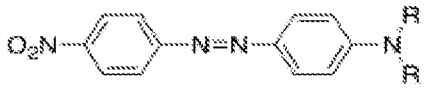


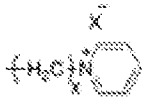
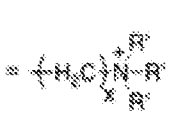










dove R è  o 

X è Br o I, x è compreso tra 2 e 12, R' = CH_3, CH_2CH_3.

12. Composti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 11 per uso medico.

13. Composti per l'uso secondo la rivendicazione 12, dove detto uso è nel trattamento di patologie degenerative della retina.

14. Composti per l'uso secondo la rivendicazione 13, dove dette patologie sono patologie degenerative della retina selezionate nel gruppo che comprende retinite pigmentosa, degenerazione maculare senile.
15. Composizione che comprende almeno uno dei composti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 11, eccipienti farmaceuticamente accettabili e, opzionalmente, uno o più ulteriori principi attivi.
16. La composizione secondo la rivendicazione 15 che è formulata in forma di soluzione iniettabile intraoculare.

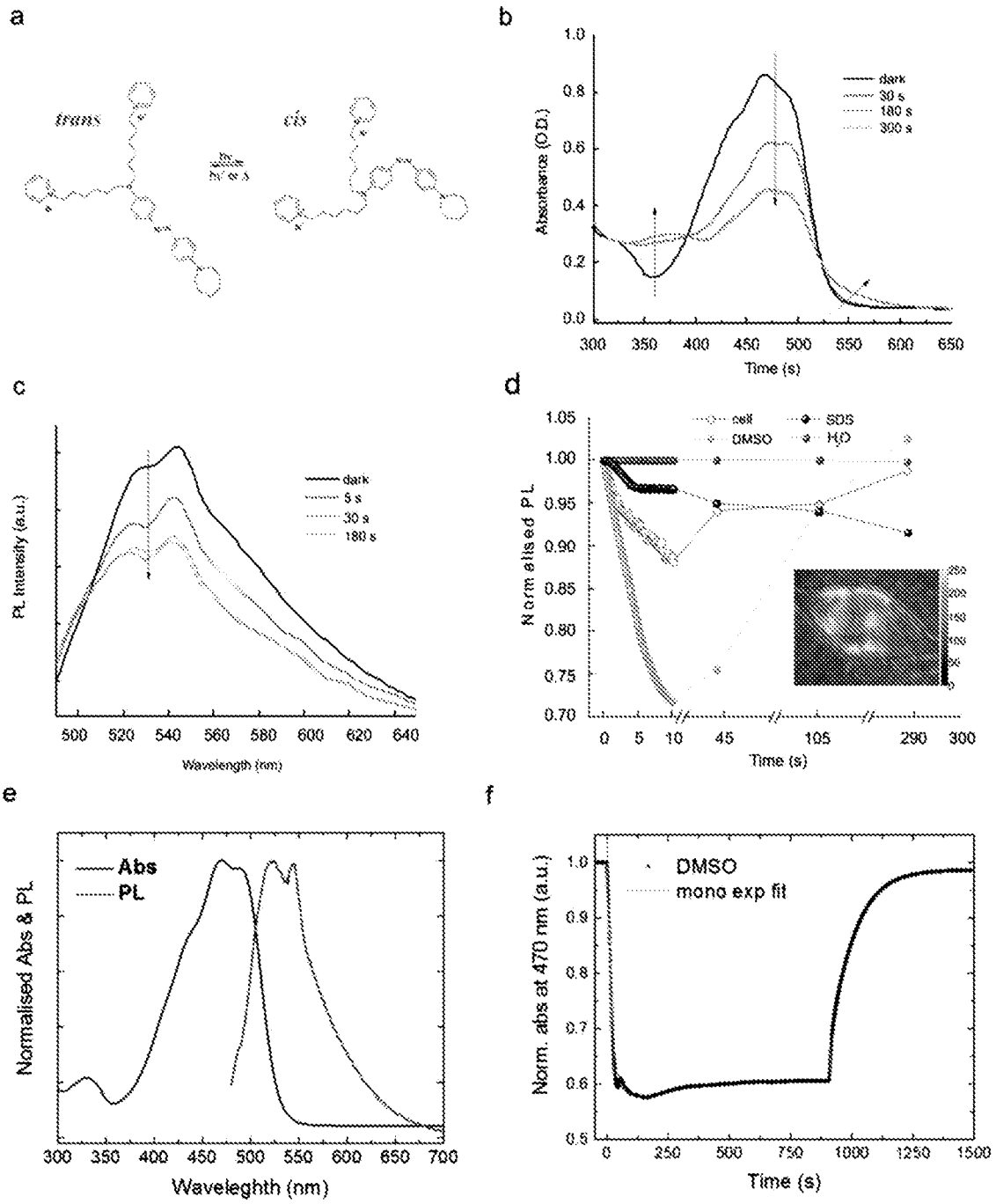

a
trans
cis
b
Absorbance (O.D.)
Time (s)
dark
30 s
180 s
300 s
c
PL Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
dark
5 s
30 s
180 s
d
Normalised PL
Time (s)
cell
SDS
DMSO
H2O
e
Normalised Abs & PL
Abs
PL
Waveleghth (nm)
f
Norm. abs at 470 nm (a.u.)
Time (s)
DMSO
mono exp fit

FIG. 1

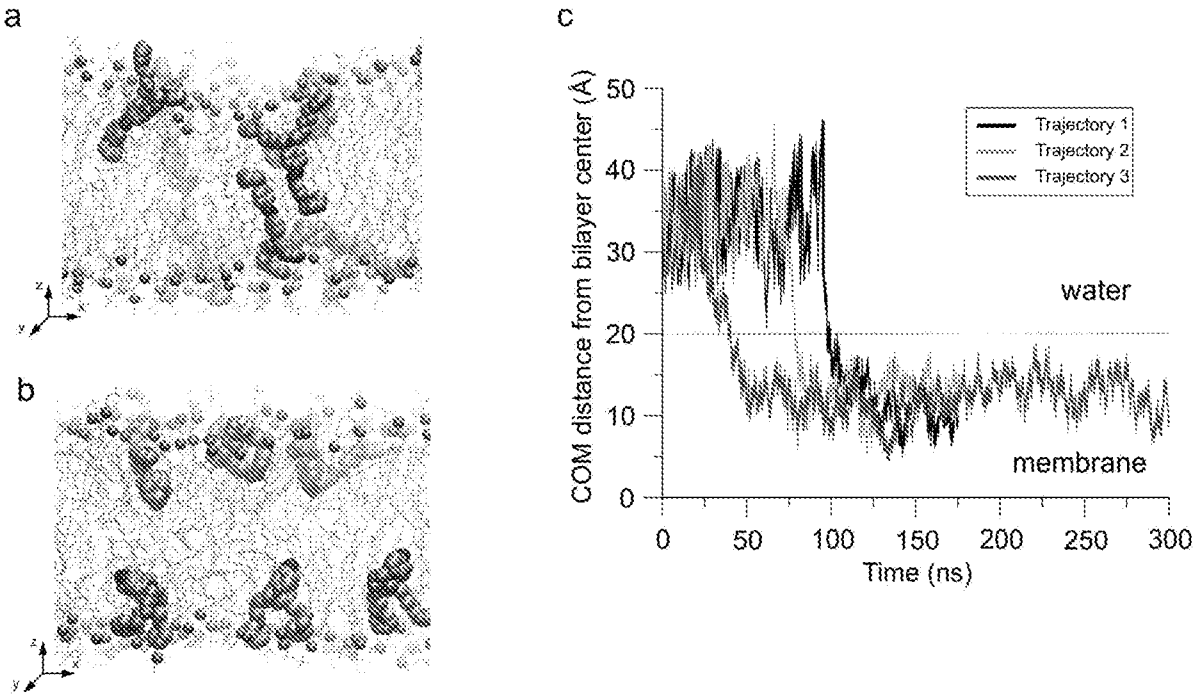

a
b
c
COM distance from bilayer center (Å)
Time (ns)
Trajectory 1
Trajectory 2
Trajectory 3
water
membrane
0
10
20
30
40
50
0
50
100
150
200
250
300

FIG. 2

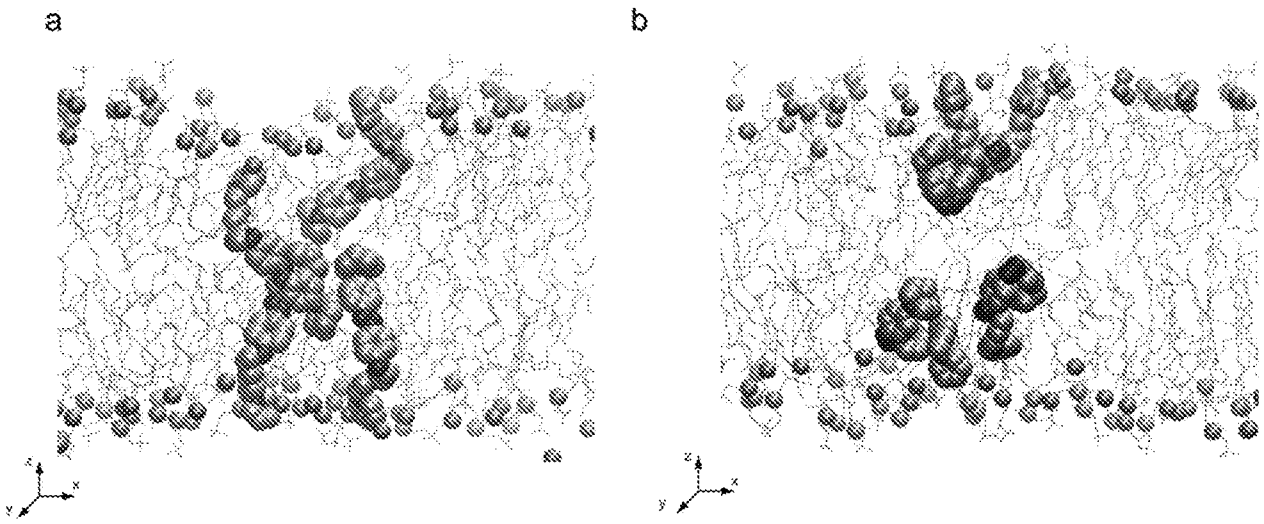


FIG. 3

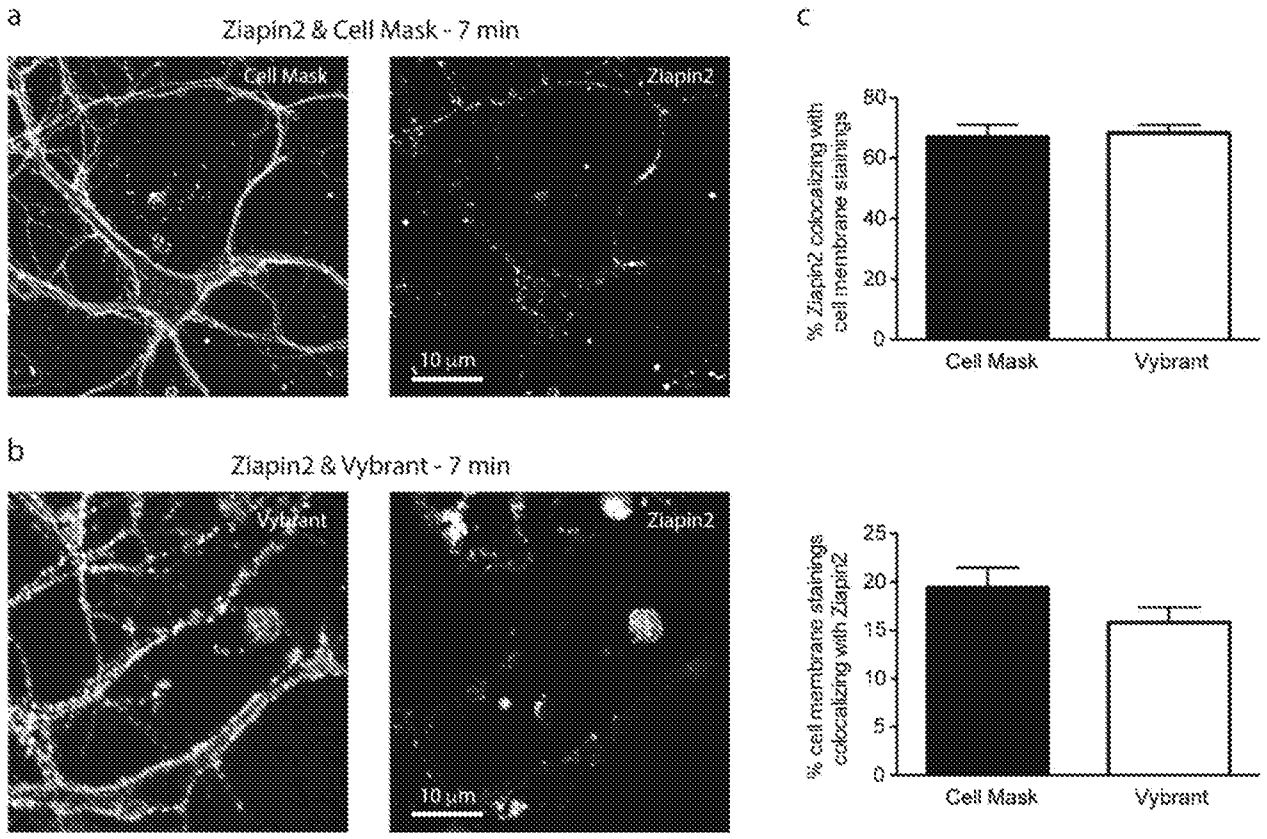

a
Ziapin2 & Cell Mask - 7 min
Cell Mask
Ziapin2
10 µm
b
Ziapin2 & Vybrant - 7 min
Vybrant
Ziapin2
10 µm
c
% Ziapin2 colocalizing with cell membrane stainings
80
60
40
20
0
Cell Mask
Vybrant
% cell membrane stainings colocalizing with Ziapin2
25
20
15
10
5
0
Cell Mask
Vybrant

FIG. 4

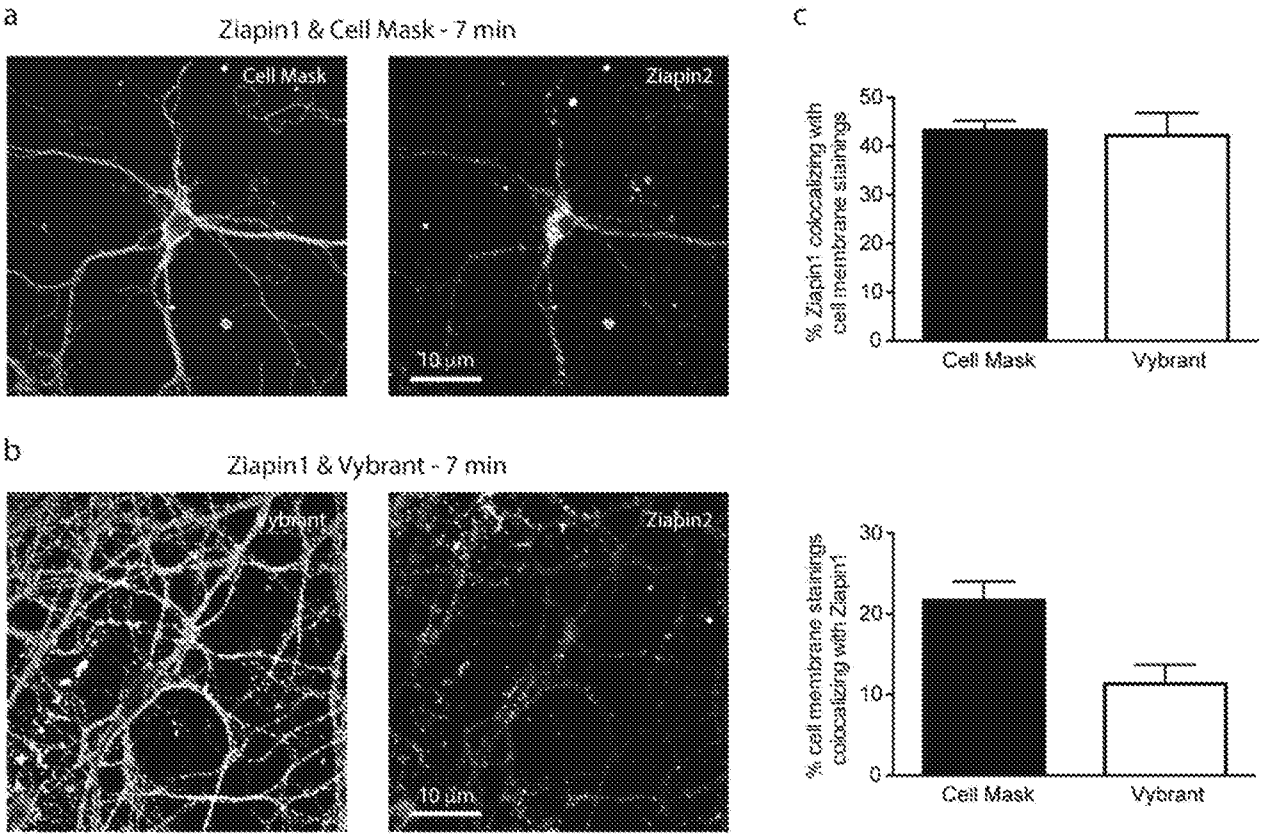

a
Ziapin1 & Cell Mask - 7 min
Cell Mask
Ziapin2
10 µm
b
Ziapin1 & Vybrant - 7 min
Vybrant
Ziapin2
10 µm
c
% Ziapin1 colocalizing with cell membrane stainings
50
40
30
20
10
0
Cell Mask
Vybrant
% cell membrane stainings colocalizing with Ziapin1
30
20
10
0
Cell Mask
Vybrant

FIG. 5

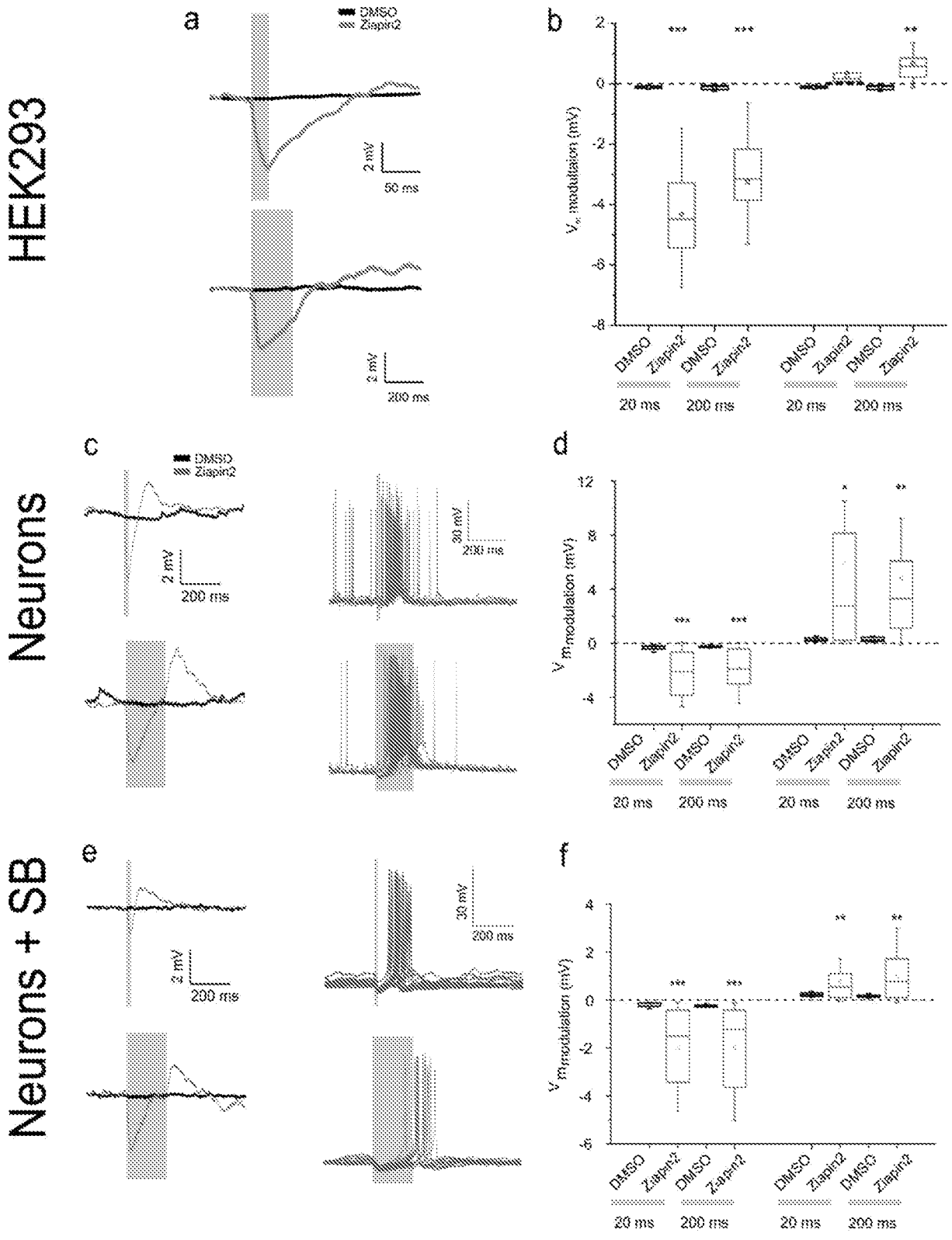

HEK293
Neurons
Neurons + SB
a
DMSO
Ziapin2
2 mV
50 ms
2 mV
200 ms
b
***
***
**
V_m modulation (mV)
DMSO
Ziapin2
20 ms
200 ms
c
DMSO
Ziapin2
2 mV
200 ms
30 mV
200 ms
d
V_m modulation (mV)
e
f

FIG. 6

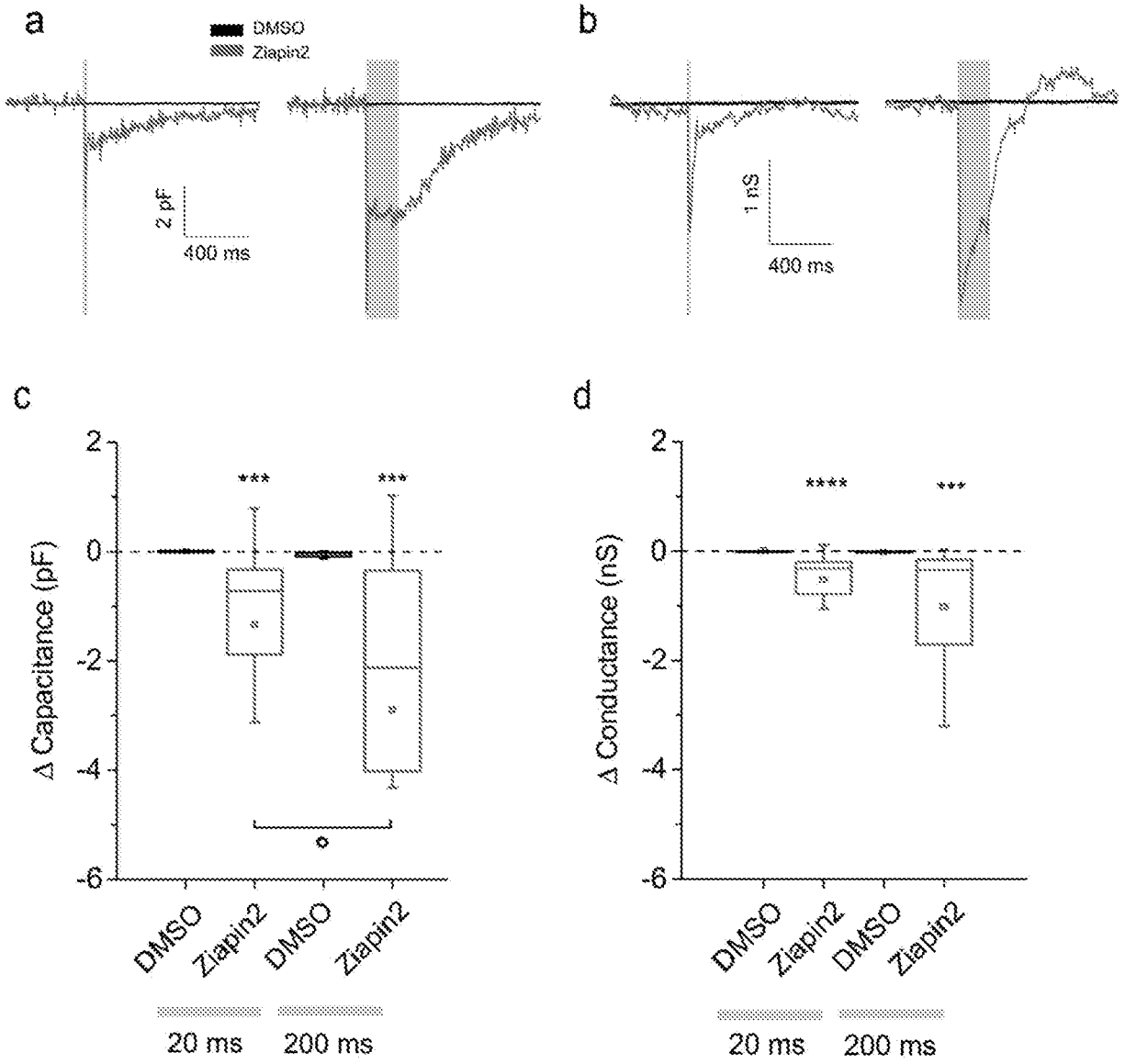

a
DMSO
Ziapin2
2 pF
400 ms
b
1 nS
400 ms
c
Δ Capacitance (pF)
2
0
-2
-4
-6
***
***
DMSO
Ziapin2
DMSO
Ziapin2
20 ms
200 ms
d
Δ Conductance (nS)
2
0
-2
-4
-6
****
***
DMSO
Ziapin2
DMSO
Ziapin2
20 ms
200 ms

FIG. 7

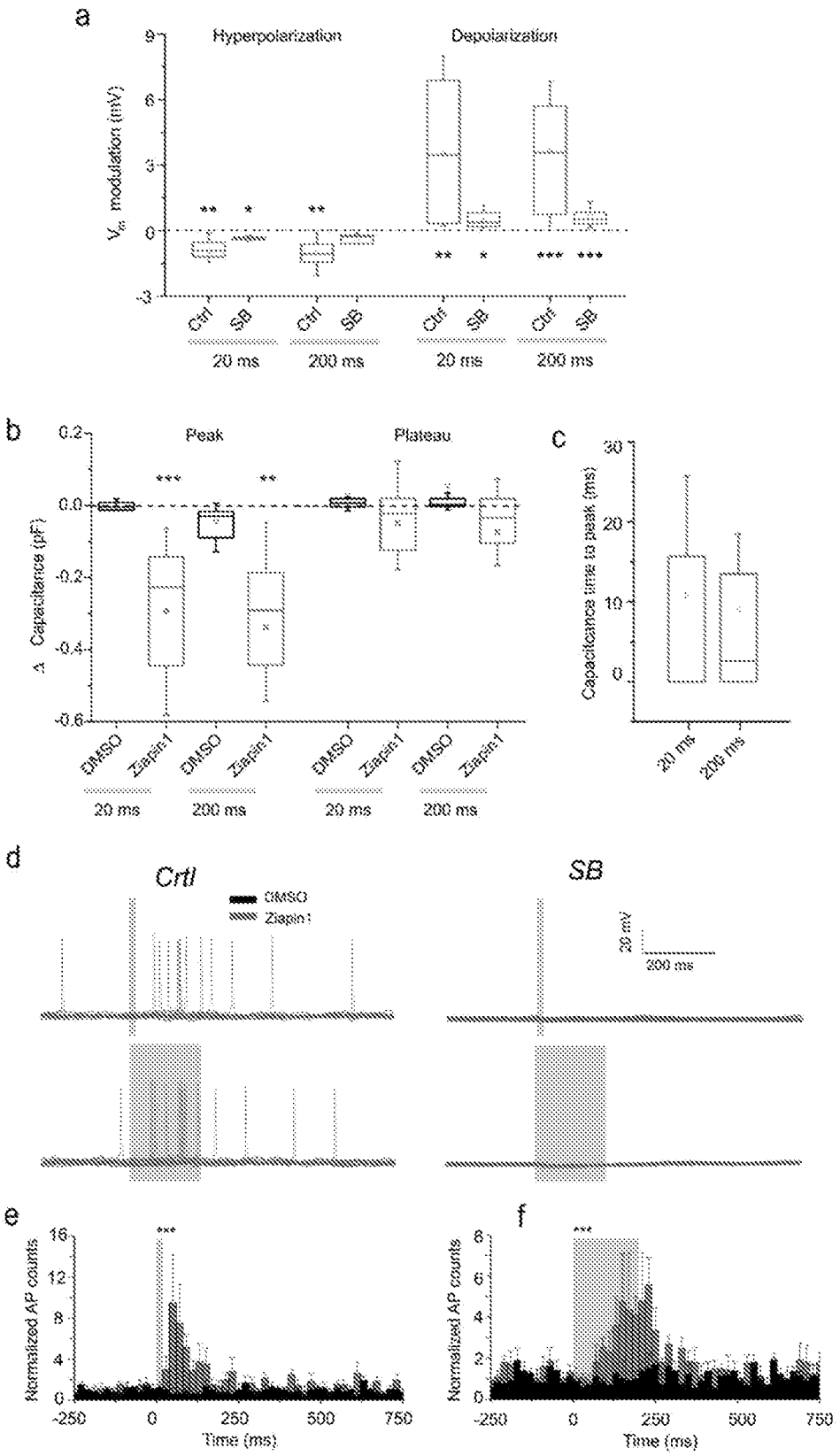

a
Hyperpolarization
Depolarization
V_m modulation (mV)
Ctrl
SB
20 ms
200 ms
b
Peak
Plateau
Δ Capacitance (pF)
DMSO
Zapin-1
c
Capacitance time to peak (ms)
d
Crtl
SB
DMSO
Zapin-1
20 mV
300 ms
e
f
Normalized AP counts
Time (ms)

FIG. 8

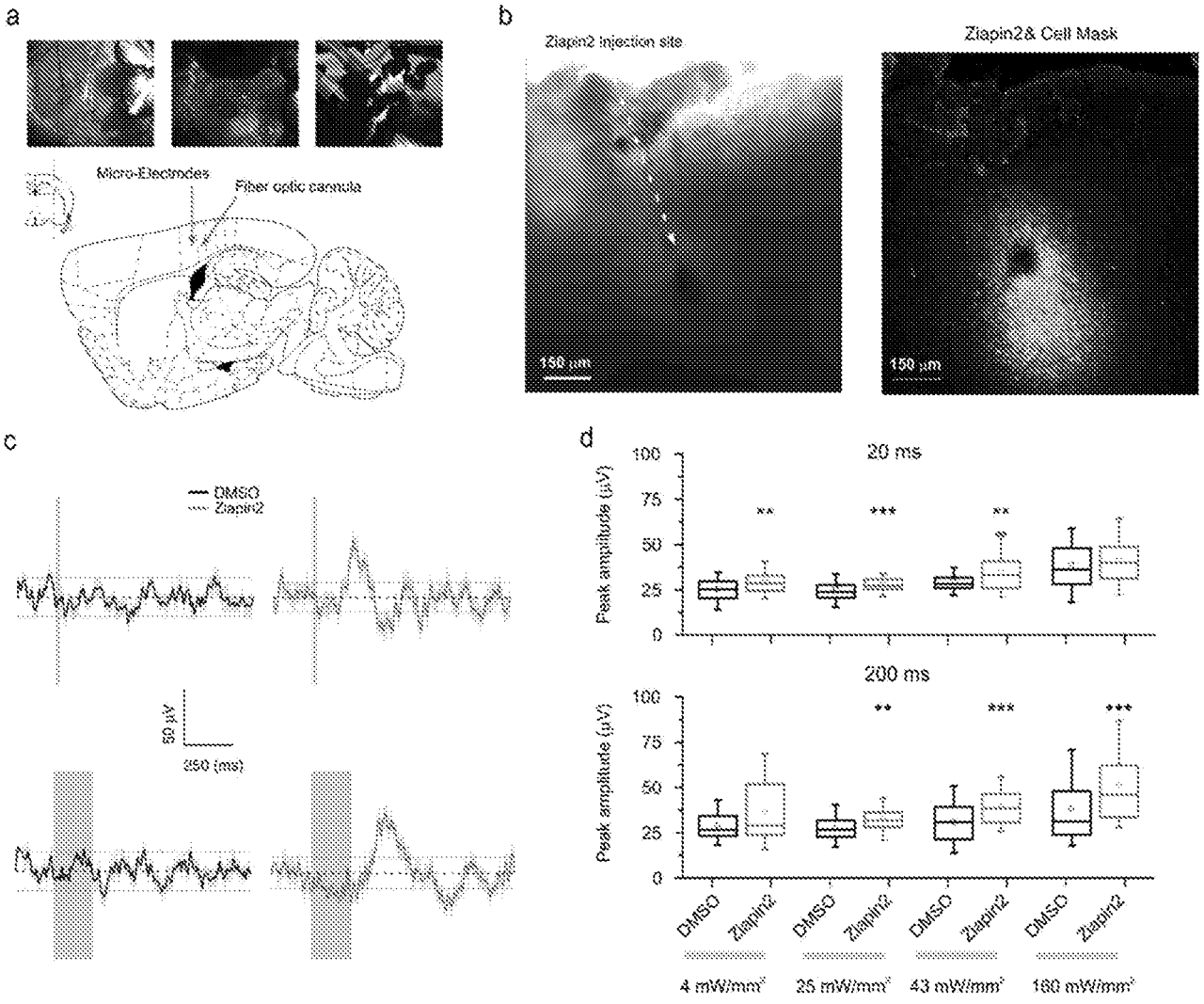

a
Micro-Electrodes
Fiber optic cannula
b
Ziapin2 injection site
Ziapin2& Cell Mask
150 µm
150 µm
c
DMSO
Ziapin2
50 µV
250 (ms)
d
20 ms
200 ms
Peak amplitude (µV)
100
75
50
25
0
**
***
**
**
***
***
DMSO
Ziapin2
4 mW/mm²
25 mW/mm²
43 mW/mm²
160 mW/mm²

FIG. 9