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

UIBM

DOMANDA NUMERO	**101997900588780**
Data Deposito	**11/04/1997**
Data Pubblicazione	**11/10/1998**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C		

Titolo

DERIVATI DELLA COLCHICINA E DELLA TIOCOLCHICINA AD ATTIVITA' ANTINFIAMMATORIA E MIORILASSANTE

5169 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/rt **"DERIVATI DELLA COLCHICINA E DELLA TIOCOLCHICINA AD ATTIVITA' ANTIINFIAMMATORIA E MIORILASSANTE"**

a nome : **INDENA S.p.A.**

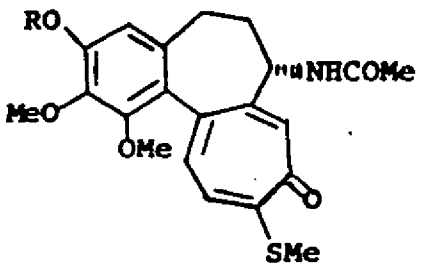
MI 97 A 0845

con sede in: Milano

* * *

La presente invenzione si riferisce a derivati della 3-demetil-tiocolchicina aventi formula generale (I):

11 APR. 1997



(I)

in cui R può essere $CH_2 - \underset{O}{CH} - CH_2 -$, $HOCH_2-CHOH-CH_2-$, $H_2NCH_2CHOHCH_2-$, $HOOCCH_2-$, $OH-CH_2-CHCl-CH_2-$, (di seguito verranno chiamati rispettivamente composto I, II, III, IV e V), a un metodo per la loro preparazione, a composizioni farmaceutiche che li contengono ed al loro uso in campo reumatologico-ortopedico, per la preparazione di medicamenti ad attività miorilassante e antiinfiammatoria.

I farmaci miorilassanti hanno in comune la proprietà di ridurre il tono muscolare, per esempio nelle contratture muscolari.

La contrattura muscolare è un aspetto che caratterizza molte patologie dell'apparato locomotore ed è uno dei principali fattori responsabili della persistenza dello stato doloroso ad esse associato. La contrattura muscolare si manifesta anche in patologie ortopediche di

tipo infiammatorio-reumatico e degenerativo; quando colpisce un'articolazione, oltre al dolore, provoca una rigidità che limita la mobilità reciproca dei capi articolari e di conseguenza la funzionalità della parte interessata. Per queste ragioni lo studio di molecole caratterizzate da notevoli proprietà miorilassanti e decontratturanti continua a destare notevole interesse dal punto di vista clinico.

Com'è noto la colchicina è uno pseudoalcaloide largamente e da moltissimo tempo usato in terapia per il trattamento della gotta. Altrettanto diffuso in terapia è l'uso del glucoside della 3-demetil-tiocolchicina, tiocolchicoside, come decontratturante e nei processi infiammatori a carico della muscolatura scheletrica (Ortopedia e Traumatologia Oggi XII, n. 4, 1992). E' stato recentemente dimostrato che l'attività del tiocolchicoside è correlabile alla sua capacità di interagire con i recettori della glicina stricnino-sensibile e che pertanto composti dotati di attività glicino mimetica possono essere utilizzati in campo reumatologico-ortopedico per le loro caratteristiche miorilassanti.

Si è ora trovato che i derivati della tiocolchicina di formula generale (I) sono in grado di esercitare una efficace azione miorilassante, valutata tramite studi sia in vitro che in vivo, a dosi decisamente vantaggiose rispetto a quelle comunemente impiegate per sostanze analoghe note.

In saggi di binding i composti dell'invenzione hanno mostrato una maggiore affinità per i recettori della glicina (Tabella I), rispetto al composto strutturalmente vicino tiocolchicoside.

TABELLA I

Composto	Concentrazione µM	Spiazzamento %
Tiocolchicoside	0.1	20
	0.5	45
	1	70
Composto I	0.1	40
	1	85
Composto II	0.1	35
	1	65
Composto III	0.1	50
	1	75

L'interazione con i recettori è stata valutata secondo il metodo di A.B. Young e S.H. Snyder riportato in Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 71, 4002, 1974.

Per le prove in vivo è stata studiata l'inibizione dei riflessi polisinaptici indotti da stricnina nel coniglio.

Usando questo modello, si è visto che i composti dell'invenzione, iniettati in dosi di 1 mg/kg per via intramuscolare, sono in grado di ridurre i riflessi polisinaptici del 50% (composto I), del 60% (composto II) e del 65% (composto III), e di abolire del tutto il potenziamento dei riflessi indotti da stricnina alle stesse dosi; per ottenere effetti comparabili la molecola di riferimento tiocolchisoside è stata impiegata a dosi minime di 5 mg/kg.

I composti di formula (I) risultano inoltre possedere una tossicità acuta significativamente inferiore rispetto a quella del tiocolchicoside. Infatti la DL_{50} dei composti I-III risulta essere superiore a 30 mg/kg i.v. nel topo. La DL_{50} del tiocolchicoside è di 7,5 mg/kg.

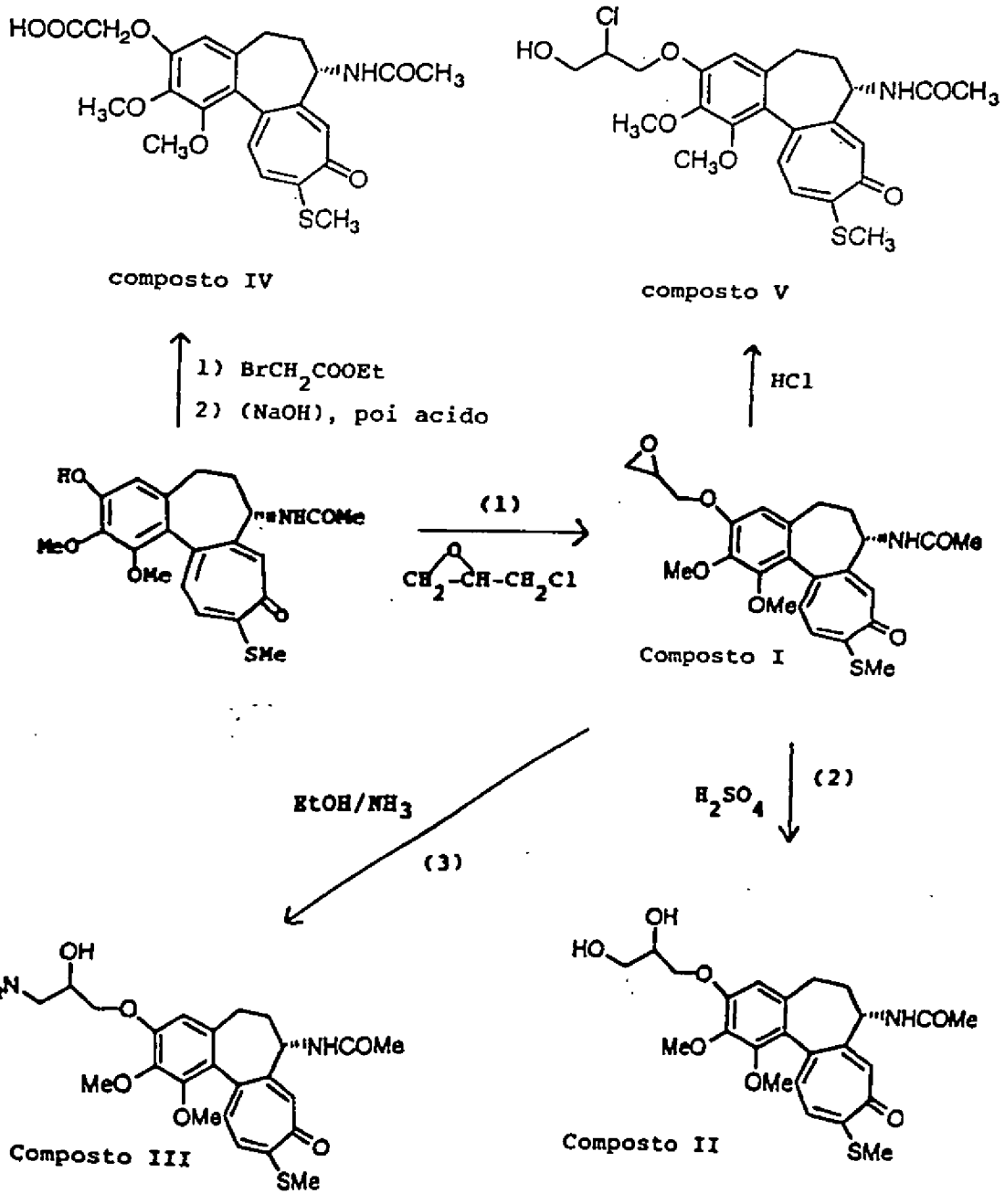
Anche le prove di citotossicità in vitro su cellule di carcinoma della mammella e di altri tumori hanno dimostrato che i prodotti oggetto dell'invenzione non sono citotossici fino a concentrazioni superiori a

5000 nM, mentre la tiocolchicina da cui derivano risulta citotossica già alla concentrazione di 0,6 nM.

In definitiva i prodotti dell'invenzione appaiono sicuri e terapeuticamente vantaggiosi.

I composti I-V possono essere preparati a partire da 3-demetiltiocolchicina, secondo il seguente schema di reazione generale, impiegando reagenti e procedure sintetiche convenzionali.

Schema 1



Per l'uso in terapia, i composti I-V possono essere opportunamente formulati utilizzando eccipienti e veicoli farmaceuticamente accettabili, in forme quali, per esempio, capsule, compresse, granulati, supposte, creme, soluzioni per iniettabili, pomate, gel ed altri, più in generale secondo tecniche convenzionali quali ad esempio quelle descritte in "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", Mack Publishing Company, New York, U.S.A., 17th Ed., 1985.

La presente invenzione è pertanto rivolta anche alle composizioni farmaceutiche contenenti un composto di formula generale I, che verranno opportunamente usate come miorilassanti, decontratturanti, antiinfiammatori, antigotta, più in generale nel campo reumatologico-ortopedico.

I seguenti esempi servono a chiarire meglio l'invenzione.

Esempio I

Sintesi di 3-demetil-3-glicidiltiocolchicina

La 3-demetiltiocolchicina (200 mg, 0,5 mmol) viene sospesa in CH_3CN (10 ml). Si scalda a riflusso e si aggiunge l'1,8-diazobiciclo-[5.4.0]undec-7-ene (DBU, 153 µl, 1 mmol). Immediatamente il prodotto si solubilizza e la soluzione scurisce. Terminata l'aggiunta si aggiunge (±)-epicloridrina (3 mmol, 190 µl). La reazione viene monitorata *via* TLC (CCH_2Cl_2-MeOH 9-1). Dopo 7 ore il prodotto di partenza ha reagito completamente. Si evapora il solvente e il grezzo di reazione viene purificato per cromatografia gravimetrica su gel di silice eluendo con una miscela CH_2Cl_2-MeOH 100-2. Il prodotto ottenuto come olio (160 mg, 0,35 mmol, resa: 70%) viene cristallizzato da acetone e viene

identificato sulla base degli spettri ^{1}H-^{13}C-NMR, COSY e NOESY.

Il prodotto che si forma è una miscela dei due diastereoisomeri (2'R, 7S, aS) e (2'S, 7S, aS).

p.f.: 241-241,5°C.

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$) 7,84-7,79 (m, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,31 (d, 1H, *J* 10,3), 7,08 (d, 1H, *J* 10,3), 6,57, 6,56 (2s, 1H), 4,66-4,61 (m, 1H), 4,37-4,28 (m, 1H), 4,10-3,98 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,44-3,37 (m, 1H), 2,96-2,91 (m, 1H), 2,82-2,76 (m, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,48-1,85 (m, 4H), 1,97 (s, 3H).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$) 162,5, 170,2, 158,4, 152,7, 152,0, 151,4, 142,3, 138,6, 135,0, 134,5, 128,4, 126,8, 126,7, 109,6, 109,5, 70,4, 70,1, 61,7, 61,5, 52,4, 50,3, 44,7, 36,4, 29,9, 22,9, 15,2.

Esempio II

Sintesi di 3-demetil-3-(2,3-diidrossipropil)tiocolchina

La 3-demetil-3-glicidiltiocolchicina (300 mg, 0,67 mmol) viene sciolta in una miscela diossano-H_2O (1-1,5 ml) e trattata con una catalisi di H_2SO_4 0,2 N. Si scalda a riflusso. La reazione viene monitorata tramite TLC (CH_2CL_2-MeOH 9-1). Dopo 5 ore si evapora il solvente e si purifica il grezzo di reazione per cromatografa gravimetrica su gel di silice eluendo con una miscela CH_2Cl_2-MeOH 100-3. Si ottiene il prodotto desiderato (identificato sulla base delle sue proprietà spettroscopiche: ^{1}H-^{13}C-NMR e COSY) con una resa del 73% (228 mg, 0,48 mmol) come miscela dei due diastetreoisomeri (2'R, 7S, aS) e (2'S, 7S, aS).

p.f.: 149-150°C, dec.

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$) 7,28 (d, 1H, *J* 9,8), 7,26 (s, 1H), 7,06 (d, 1H, *J* 9,8), 6,58 (s, 1H), 6,48 (d, 1H, *J* 8,5), 4,71-4,60 (m, 1H), 4,20-4,11 (m, 4H), 3,94 (s, 3H), 3,85-3,82 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,60-1,92 (m, 4H), 2,44 (s, 3H), 1,99 (s, 3H).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$) 182,5, 170,0, 158,5, 152,6, 151,5, 142,2, 138,2, 134,8, 134,7, 128,4, 126,8, 126,7, 109,6, 92,5, 71,7, 70,2, 63,8, 61,7, 52,3, 36,6, 29,9, 23,0, 15,3.

Esempio III

Sintesi di 3-demetil-3-(3-ammino-2-idrossipropil)tiocolchicina

La 3-demetil-3-glicidiltiocolchicina (300 mg, 0,67 mmol) viene sciolta in EtOH saturo di ammoniaca. Si scalda a 60°C. Dopo 1 ora la reazione è andata a completezza, e per semplice evaporazione del solvente di reazione il prodotto, ottenuto allo stato puro con una resa dell'83% (261 mg, 0,55 mmol) e come miscela dei due diastereoisomeri (2'R, 7S, aS) e (2'S, 7S, aS) e identificato sulla base delle sue proprietà spettroscopiche: ^{1}H-NMR.

p.f.: 144,8-145,5°C, dec.

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$) 7,28 (d, 1H, *J* 10,6), 7,26 (s, 1H), 7,06 (d, 1H, *J* 10,6), 4,72-4,58 (m, 1H), 4,12-3,90 (m, 4H), 3,94 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,05-1,5 (m, 5H), 2,44 (s, 3H), 1,99 (s, 3H).

Esempio IV

Sintesi dell'acido 2-(3-demetiltiocolchicin)acetico

A temperatura ambiente la 3-demetiltiocolchicina (401 mg, 1 mmol) viene sospesa in CH_3CN anidro (10 ml). Si gocciola l'1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (192 ml, 1,3 mmol): la miscela si

solubilizza e scurisce. Terminato il gocciolamento si aggiunge il bromoacetato di etile (161 ml, 1,3 mmol) e lentamente la soluzione schiarisce. Dopo circa 2 ore vengono ulteriormente aggiunti 60 ml di DBU e 70 ml di estere. La miscela di reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 10 ore. TLC: CH_2Cl_2-MeOH=9/1.

Si evapora il solvente a pressione ridotta e il grezzo così ottenuto viene purificato per cromatografia gravimetrica in gradiente di polarità eluendo con la miscela CH_2Cl_2-MeOH. Si ottiene l'estere atteso (410 mg) con la resa dell'84%. Il prodotto viene identificato in base alle sue proprietà spettroscopiche.

p.f.: 115°C

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1,31 (t, *J*7,1, 3H, Me), 1,97 (s, 3H, *Me*CO), 1,8-2,5 (m, 4H, H-5, H-6), 2,43 (s, 3H, SMe), 3,66, 3,98 (due s, 6H, come), 4,25 (q, *J*7,1, 2H, O*CH*$_2$Me), 4,58-4,70 (m, 1H, H-7), 4,72 (s, 2H, OCH_2), 6,46 (s, 1H, H-4), 7,08 (d, *J*10,6, 1H, H-11), 7,29 (d, *J*10,6, 1H, H-12), 7,27 (s, 1H, H-8), 7,85 (d, *J*6,9, 1H, NH).

NaOH in pastiglie (32 mg, 0,8 mmol) viene sciolta in EtOH acquoso al 5% (10 ml). Si aggiunge il 2-(3-demetiltiocolchicin)acetato di etile (300 mg, 0,62 mmol), e la reazione viene lasciata a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica. Dopo 1 ora, (TLC: CH_2Cl_2-MeOH=9/1) il solvente viene evaporato e il residuo ripreso con una soluzione acquosa diluita di HCl. Si ha la precipitazione di un prodotto giallo, che viene ulteriormente purificato per cromatografia su gel di silice eluendo con la miscela CH_2Cl_2-MeOH=9/1. L'acido 2-(3-demetiltiocolchcin)acetico (260 mg) viene ottenuto con la resa del 92%.

p.f.: 189-190 dec.°C (acetone)

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1,95 (s, 3H, *Me*CO), 1,75-2,58 (m, 4H, H-5, H-6), 2,44 (s, 3H, SMe), 3,03 (s, 1H, COOH) 3,64, 3,97 (due s, 6H, come), 4,51-4,70 (m, 1H, H-7), 4,73 (s, 2H, OCH_2), 6,61 (s, 1H, H-4), 7,12 (d, J10,7, 1H, H-11), 7,31 (d, J10,7, 1H, H-12 e NH), 7,50 (s, 1H, H-8).

In maniera analoga agli esempi descritti sopra è stato ottenuto il 3-demetil-3-(2-cloro-3-idrossipropil)tiocolchicina.

p.f.: 118-119 dec. (acetone *i*-Pr_2O)

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1,99 (s, 3H, *Me*CO), 1,75-2,58 (m, 4H, H-5, H-6), 2,44 (s, 3H, SMe), 3,07 (t, 1H, OH, deuterabile), 3,66, 3,94 (due s, 6H, come), 3,77-3,87, 4,15-4,32 (due m, 2+3H, CH_2CHCH_2), 4,57-4,70 (m, 1H, H-7), 6,58 (s, 1H, H-4), 7,14 (d, J10,6, 1H, H-11), 7,29 (d, J10,6, H-12), 7,35 (m, 1H, NH), 7,37 (s, 1H, H-8).

Esempio V

Esempio di formulazione dei composti di formula (I) in forma di fiale.

Fiale

Composto II		5	mg
Sodio cloruro		15,8	mg
Acqua per preparazioni iniettabili	q.b. a	2	ml

Esempio VI

Esempio di formulazione dei composti di formula (I) in forma di capsule.

Capsule di gelatina dura

Composto II	10	mg

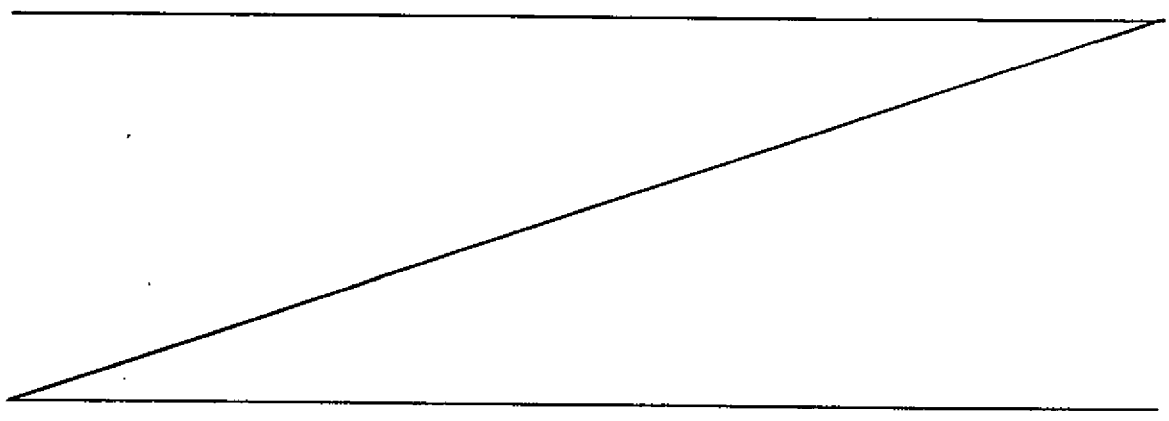
Lattosio	212,3 mg
Amido	1,3 mg
Magnesio stearato	2,4 mg

Esempio VII

Esempio di formulazione dei composti di formula (I) in forma di crema.

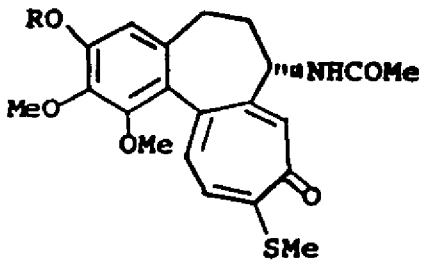
Crema

Composto II		0,5	g
Metile p-idrossibenzoato		0,14	g
Etile p-idrossibenzoato		0,035	g
Poliossietilen-20-sorbitano monooleato		5	g
Sodio laurilsolfato		2	g
Spermaceti		5	g
Alcol cetilico		7	g
Lanolina idrogenata		12,5	g
Acido sterico		8	g
Sodio alginato		0,5	g
Olio di lavanda		1	g
Acqua purificata	q.b.	100	g.



RIVENDICAZIONI

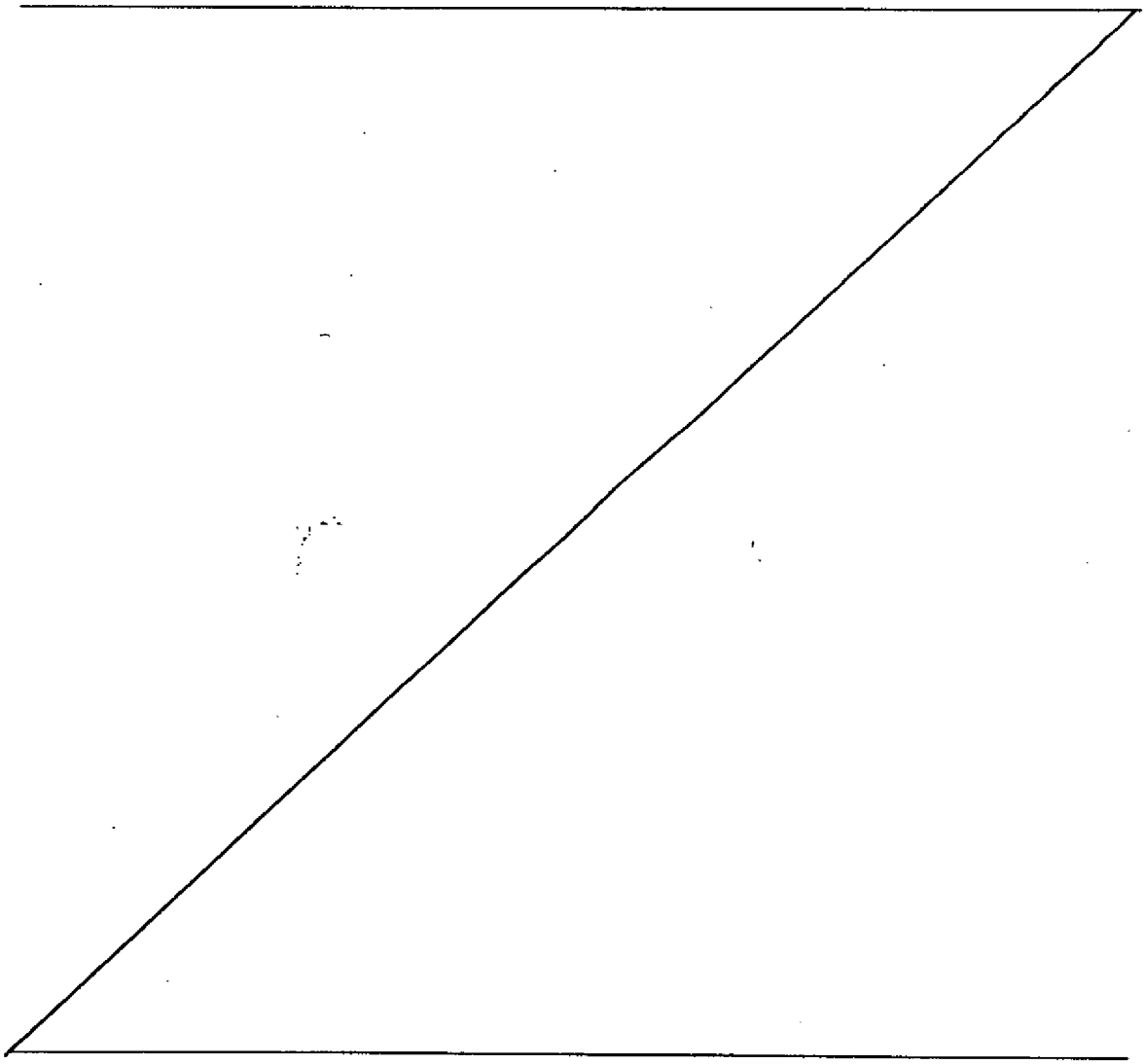
1. Composti di formula generale (I)

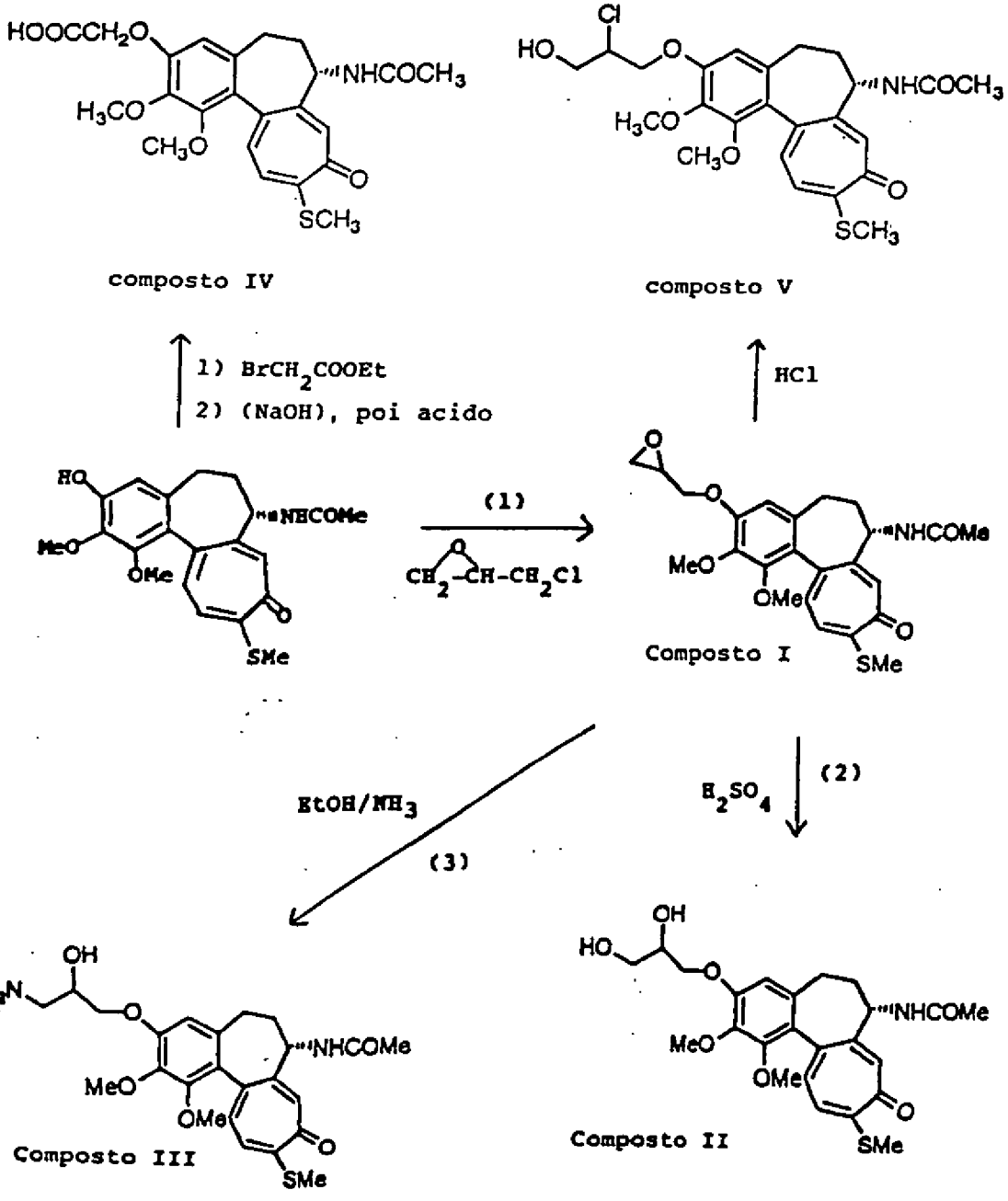


(I)

in cui R può essere $CH_2 - CH - CH_2 -$, $HOCH_2-CHOH-CH_2-$, $H_2NCH_2CHOHCH_2-$, $HOOCCH_2-$, $OH-CH_2-CHCl-CH_2-$.

2. Procedimento per la preparazione dei composti della rivendicazione 1 secondo il seguente schema 1:





3. Uso dei composti della rivendicazione 1 per la preparazione di medicamenti utili come miorilassanti, antiinfiammatori, decontratturanti, antigotta.

4. Composizioni farmaceutiche contenenti un composto della rivendicazione 1 in qualità di principio attivo, in miscela con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.

5. Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 4 in forma di

capsule, compresse, granulati, supposte, creme, soluzioni per iniettabili, pomate e gel.

Milano, 11 aprile 1997

Il Mandatario
(Spadaro Marco)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.



