



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

# UIBM

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>101995900459539</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>07/08/1995</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>07/02/1997</b>

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	K		

Titolo

<b>METODO PER DETERMINARE L'ATTIVITA' TERAPEUTICA DI COMPOSTI INIBITORI DI METALLOPROTEINASI, NUOVI COMPOSTI INIBITORI, E LORO IMPIEGO TERAPEUTICO</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

RM 95 A 000557

SIB 90799

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"METODO PER DETERMINARE L'ATTIVITÀ TERAPEUTICA DI COMPOSTI INIBITORI DI METALLOPROTEINASI, NUOVI COMPOSTI INIBITORI, E LORO IMPIEGO TERAPEUTICO"

della ditta italiana POLIFARMA S.p.A. Roma con sede in ROMA (ITALIA)

#### DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un metodo che consente di determinare con elevato grado di attendibilità informazioni sulla attività terapeutica nei mammiferi incluso l'uomo di una classe di composti di carattere peptidomimetico che sono inibitori di enzimi metalloproteinasi presenti nel veleno di serpenti.

L'invenzione si riferisce inoltre a nuovi composti della classe sopra indicata, nonché al iloro impiego terapeutico in un gran numero di importanti malattie umane incluse l'invasione tumorale, l'artrite reumatoide, le periodontiti, le ulcere corneali, la sclerosi multipla, gli aneurismi dell'aorta, l'osteoporosi, la cicatrizzazione delle ferite, le dermatiti da contatto, l'aterosclerosi, lo shock settico,

l'invasione parassitaria, l'ipertensione, le allergie, i difetti della risposta immune, la malattia di Alzheimer, le bronco-polmoniti croniche, l'enfisema polmonare, la cirrosi epatica, la cardiomiopatia dilatativa e le disfunzioni dell'apparato riproduttivo.

I veleni di serpente sono miscele complesse, contenenti una gran varietà di enzimi proteolitici, aventi la funzione di digerire la preda o di alterarne le funzioni fisiologiche, specialmente a livello del sistema cardiocircolatorio. In effetti, è ben noto (vedi ad esempio *Critical Reviews in Toxicology* 21, 171-182, 1991) che i veleni dei serpenti appartenenti alle famiglie dei viperidi esercitano profondi effetti sui sistemi emostatico e fibrinolitico, manifestando attività pro-coagulante o, al contrario, anti-coagulante. Analogamente, sono stati riscontrati fattori che esercitano un potente effetto inibitore sull'aggregazione piastrinica, e altri che interferiscono sull'attivazione della protrombina o su quella della fibrina.

Una classe molto importante di enzimi rinvenuti nei veleni dei serpenti appartenenti alla famiglia

dei Crotalidi sono i cosiddetti Fattori Emorragici, o Emorragine. Essi sono strutturalmente funzionali al serpente, perchè inducono rapidamente estese emorragie interne nelle prede, provocando collasso circolatorio e impedendo alla vittima di sfuggire al suo destino. Il meccanismo dell'azione emorragica è dovuto alla particolare facilità con cui gli enzimi sono in grado di degradare un gran numero di proteine filiformi che tengono legate fra di loro le varie cellule dell'endotelio vasale, permettendo agli elementi del sangue di fuoriuscire dai vasi. Studi recenti (vedi ad es. *Pharmacology and Therapeutics* 62, 325-372, 1994) hanno permesso di accertare che i Fattori Emorragici, comprendenti un gran numero di enzimi isolati dai veleni, hanno peso molecolare molto vario (solitamente fra i 20 e i 90 KDa), e contengono spesso diverse sub-unità funzionali, delegate ad attività emorragica, anti-aggregante piastrinica e adesiva. Pur se molto diverse fra di loro per peso molecolare, tuttavia le Emorragine mantengono alcune caratteristiche fisse nel sito catalitico, nel modo in cui lo Zinco si lega ad alcuni aminoacidi della catena

proteica, e nel modo in cui aggrediscono le proteine della membrana basale dei vasi sanguigni.

La presenza dello Zinco nel sito attivo non è esclusiva delle Emorragine, ma caratterizza un esteso numero di enzimi proteolitici che esercitano importanti funzioni fisiologiche e patologiche nell'organismo degli animali, dai più piccoli e semplici a quelli maggiormente evoluti. Attraverso lo studio delle sequenze dei residui della catena proteica e degli aminoacidi coinvolti con il legame dello Zinco è stato possibile ricavare una specie di "albero genealogico" di questa famiglia di proteasi (vedi ad es. FEBS Letters 312, 110-114, 1992): si è visto, così, che enzimi appartenenti a esseri viventi molto distanti fra loro, come l'Astacina (estratta da un crostaceo fluviale), la Serratia (ricavata da un microorganismo), le Matrixine (presenti nell'organismo dei mammiferi, dove esplicano importanti effetti sulla migrazione delle cellule e nella ricostruzione dei tessuti danneggiati) e i Fattori Emorragici da veleni di serpente, differiscono in realtà solo per uno dei quattro aminoacidi che legano lo Zinco nel sito attivo, e possono perciò essere considerati in qualche modo

come lontani parenti fra di loro. Ciò non vuol dire, tuttavia, che le funzioni esercitate da questi enzimi siano analoghe: è stato infatti chiarito che gli enzimi proteolitici dei veleni di serpente non hanno alcuna somiglianza nè strutturale nè funzionale con alcuna altra proteina del mondo vegetale o animale, tranne che nel sito dello Zinco, mentre fra di loro sono molto simili, e appaiono tutti derivanti da un singolo gene ancestrale, tanto da poter definire una nuova famiglia di proteinasi: le metalloproteinasi da veleno di serpente (vedi ad es. Biol.Chem. Hoppe-Seyler 373, 381-385, 1992).

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE.

Nel programma di ricerca che ha portato alla presente invenzione sono stati inizialmente sintetizzati dei composti a potente attività inibitoria sulle metalloproteinasi da veleno di serpente: ciò allo scopo evidente di trovare delle sostanze potenzialmente utili per antagonizzare gli effetti tossici e letali in persone ferite da morsi di serpenti, ma anche per valutare eventuali nuove attività farmacologiche derivanti dalla somiglianza strutturale nel sito attivo fra i Fattori Emorragici dei veleni e altre

metalloproteinasasi Zinco-dipendenti (fra cui le Matrixine), presenti nelle cellule di mammifero.

Il punto di partenza del programma di ricerca è stato fornito dalla lunga esperienza della Richiedente sulla presenza e funzione di numerosi componenti trovati nei veleni dei serpenti, e dalla constatazione che, come pubblicato in (Biomed.Biochim.Acta 50, 769-773, 1991), i serpenti si proteggono dagli effetti tossici delle proprie metalloproteinasasi attraverso la produzione di due tripeptidi che funzionano da inibitori competitivi sull'enzima. Il primo passo è stato quello di effettuare la sintesi di una nuova famiglia di composti a carattere peptido-mimetico, aventi la particolarità che il tripeptide iniziale era sostituito da gruppi chimici in grado di migliorare l'affinità con il sito attivo dell'enzima. E' stata poi selezionata una Emorragina particolarmente sensibile al saggio proteolitico usato "in vitro", purificandola dal veleno di *Crotalus Adamanteus*: in questo modo si è ottenuto un modello soddisfacente su cui saggiare la potenza dei composti sintetizzati. Infine, sono stati testati farmacologicamente alcuni dei nuovi peptido-mimetici in modelli capaci di prevedere

una possibile utilizzazione terapeutica delle nuove sostanze.

I risultati ottenuti, che costituiscono la base della presente invenzione, sono del tutto innovativi, e permettono di affermare che, attraverso la sintesi di inibitori degli enzimi prodotti dai veleni di serpente con funzione emorragica, è possibile sviluppare un nuovo metodo per antagonizzare la letalità di alcune classi di veleno di serpente, e un nuovo sistema per ottenere informazioni altamente predittive su importanti attività terapeutiche nell'uomo, in un ampio ventaglio di malattie in cui è stato dimostrato l'intervento patogenetico di metalloproteinasi zinco-dipendenti, che va dall'invasione tumorale, all'artrite reumatoide, alle periodontiti, le ulcere corneali, la sclerosi multipla, gli aneurismi dell'aorta, l'osteoporosi, la cicatrizzazione delle ferite, le dermatiti da contatto, l'aterosclerosi, lo shock settico, l'invasione parassitaria, l'ipertensione, le allergie, i difetti della risposta immune, la malattia di Alzheimer, le bronco-polmoniti croniche, l'enfisema polmonare, la cirrosi

epatica, la cardiomiopatia dilatativa e le disfunzioni dell'apparato riproduttivo.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per determinare la attività terapeutica nei mammiferi di composti inibitori di metalloproteinasi zinco-dipendenti comprendente le operazioni di determinare il livello di attività di detti composti come inibitori di metalloproteinasi zinco-dipendenti estratte da veleno di serpente appartenente alle famiglie dei Crotalidi e dei Viperidi, selezionare detti composti in base alla superiorità di detto livello e verificare l'attività inibitoria di detti composti selezionati su metalloproteinasi presenti nell'organismo di mammiferi e che inducono situazioni patologiche nei detti mammiferi.

La presente invenzione ha inoltre per oggetto composti utilizzabili in terapia umana in una grande varietà di situazioni patologiche, che vanno dagli avvelenamenti per morso di serpenti all'invasione delle cellule tumorali, all'artrite reumatoide ed altre forme di infiammazione, alla sclerosi multipla, agli aneurismi dell'aorta, all'osteoporosi, all'aterosclerosi, allo shock settico, alla malattia di Alzheimer, alle allergie

ed altro; in ogni caso, cioè, in cui il predominante agente patologico sia una metalloproteinasi zinco-dipendente, sia prodotta da veleni di serpente che sintetizzata all'interno di cellule di mammiferi.

Caratteristica comune dei composti descritti nella presente invenzione è quella di essere buoni inibitori delle metalloproteinasi zinco-dipendenti prodotti in grande quantità dai serpenti appartenenti alle specie di viperidi e crotalidi, che costituiscono uno dei fattori più importanti di letalità a seguito del morso dei suddetti serpenti.

Come è noto da un lavoro pubblicato a cura dei ricercatori autori della presente invenzione (Biomedica Biochimica Acta 50, 769-773, 1991), i veleni di serpente producono in grande quantità dei piccoli peptidi, che hanno probabilmente il ruolo di inibire le metalloproteinasi, in modo che queste non danneggino i tessuti del serpente stesso. Tuttavia questi inibitori hanno un'attività molto blanda, perchè l'enzima deve essere liberato quando viene iniettato nella vittima. Il nostro scopo è stato perciò quello di effettuare sintesi di composti in qualche modo

simili ai peptidi trovati nei veleni, ma dotati di attività inibitoria molto più potente (circa 1000 volte, nei casi migliori), e che potessero essere somministrati per bocca, come avviene per i normali farmaci.

E' stato ora sorprendentemente trovato, e ciò costituisce il fondamento del nuovo metodo della presente invenzione, che esiste una stretta corrispondenza fra l'inibizione degli enzimi trovati nei veleni di serpente e i risultati farmacologici ottenuti in modelli animali in cui l'agente patologico si suppone essere una metalloproteinasi zinco-dipendente prodotta da tessuti dei mammiferi, per cui si può concludere che le metalloproteinasi zinco-dipendenti da veleno di serpente costituiscono un ottimo modello di screening primario, e che inibitori dei suddetti enzimi sono potenzialmente utilizzabili in tutte le situazioni patologiche indotte da metalloproteinasi zinco-dipendenti presenti nell'organismo dei mammiferi.

Come metalloproteinasi zinco-dipendenti adatte per essere utilizzate nel metodo della presente invenzione vengono qui indicate in particolare la emorragina da *Crotalus Adamanteus*,

la emorragina da *Crotalus Atrox*, la botropasina e emorragina da *Agkistrodon Bilneatus* e diverse emorragine da *Echis Carinatus* estratte dal veleno dei rispettivi serpenti.

L'operazione di determinazione del livello di attività inibitoria del composto inibitore sull'enzima metalloproteinasi può avvenire mediante un saggio volto a determinare la quantità di inibitore necessaria (IC50) per inibire l'attività dell'enzima.

Si ottiene così una valutazione numerica della attività dell'inibitore che ne consente una selezione sulla base del livello di attività.

Come detto in precedenza è stato sorprendentemente trovato che tale elevato livello di attività inibitoria è un indice altamente affidabile di attività inibitoria del composto in questione anche nei confronti di altre metalloproteinasi di origine endogena nei mammiferi la cui attività è responsabile di una vasta gamma di disturbi e malattie nell'uomo.

Il metodo della presente invenzione mette quindi a disposizione uno strumento per la produzione di nuovi farmaci in con un criterio di

selezione diretto e non casuale, con conseguente risparmio di costi.

Sulla base del metodo della invenzione sono stati così scoperti inoltre numerosi composti inibitori che presentano attività terapeutica.

Alcuni dei composti descritti nella presente invenzione non sono nuovi, ma sono oggetto di precedenti brevetti italiani n. 1.242.002 e 1.172.391 della stessa Richiedente. Tali composti già noti appartengono tutti alla classe dei composti peptidomimetici inibitori di metalloproteasi presente nel veleno di serpenti. In relazione a tali composti forma oggetto della invenzione il loro impiego come agenti farmaceuticamente attivi per la loro efficacia nella inibizione di metalloproteasi di origine endogena prodotte dall'organismo di mammiferi, incluso l'uomo, che provocano una serie di malattie.

I nuovi composti secondo l'invenzione possono essere descritti attraverso la seguente formula generale:

$$X-A-Cyt-Y$$

$$|$$

$$R_4$$

$$\text{formula (1)}$$

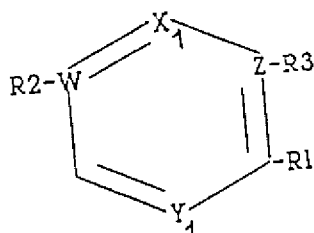
dove : A indica  $\text{NH-CH-CO ;}$   
 $\begin{array}{c} | \\ \text{CH}_2- \end{array}$

Y indica OH,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHOH}$ ,  $\text{N(CH}_3\text{)OH}$ , ed esteri;

R4 può essere  $\text{CH-(CH}_3\text{)}_2$ , Indol-3-il, Phenil,  
 Cicloesil,  $\text{CO-NH}_2$ ,  $\text{(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-Fmoc}$

X puo' essere Xa , Xb, Xc , 5-Metossi-1-  
 -indanone-3-acetil, Naftoil,  
 Homoseril,

dove Xa è



in cui

X1 puo' essere : CH, N, C-OMe

W puo' essere : C, N

Y1 puo' essere : CH, N

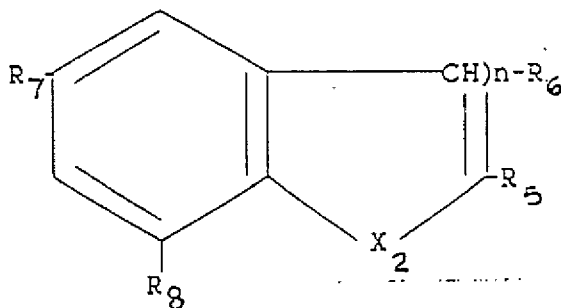
Z1 puo' essere : C, N

R1 puo' essere : CO,  $\text{(CH}_2\text{)}_2\text{-CO}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ ,  
 $\text{S-CH}_2\text{-CO}$

R2 puo' essere : OMe, H,  $\text{NO}_2$ , Cl, OEt,  $\text{CH}_3$

R3 puo' essere : OEt, H, OMe

Xb è



X<sub>2</sub> puo' essere : O, N, NH

n puo' essere : 1,2

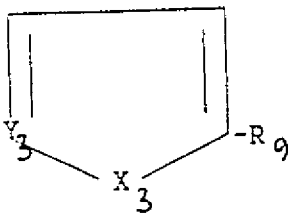
R<sub>6</sub> puo' essere : H

R<sub>7</sub> puo' essere : H, OH, OMe, Cl

R<sub>8</sub> puo' essere : H, OMe,

R<sub>5</sub> puo' essere : CO

X<sub>c</sub> è



X<sub>3</sub> puo' essere : O, CH

Y<sub>3</sub> puo' essere : O, CH

R<sub>9</sub> puo' essere : CO

oppure un sale, estere od ammido farmaceuticamente accettabile dei composti sopra definiti.

#### Descrizione della Sintesi Chimica dei Composti

Abbreviazioni usate per REATTIVI e SOLVENTI:

**HBTU**= O-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-

Tetrametiluronio esafluorofosfato

**TEA**= Trietilamina

**SOCl<sub>2</sub>**= Cloruro di Tionile

**DCHA** = Diccicloesilamina

**DMAP** = Dimetilaminopiridina

**DMF** = Dimetilformamide

**DCC** = Diccicloesilcarbodiimide

HOBt = 1-Idrossibenzotriazolo

TMSCl = Trimetilclorosilano

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = Diclorometano

CH<sub>3</sub>CN = Acetonitrile

(S)-Cyt-OH = acido (S)-1,2,3,4 tetraidro-9H-  
- pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilico

- Boc-(L)-Leu-OH = N-(tert-Butossicarbonil)-  
- (L)-Leu-OH
- Boc-(L)-Trp-OH = N-(tert-Butossicarbonil)-  
- (L)-Trp-OH
- Boc-(L)-Phe-OH = N-(tert-Butossicarbonil)-  
- (L)-Phe-OH
- Boc-(L)-Cha-OH = N-(tert-Butossicarbonil)-  
- (L)-β-cicloesil-Ala-OH
- Boc-(L)-Asn-OH = N-(tert-Butossicarbonil)-  
- (L)-Asn-OH
- Boc-(L)-Lys(Fmoc)-OH = Na-(tert-Butossicarbonil)-  
-Ne-(9-Fluorenilmetossi-  
-carbonil)- (L)-Lys-OH
- PIC = Picolinil
- 2-PMTA = (2-Pirimidiltio)acetil
- 4-PTA = (4-Piridiltio)acetil
- 3-APZC = (3-Amino-2pirazinil)carbonil
- 7-MBF = 7-Metossi-2-benzofuroil
- 4-MQC = (4-Metossi-2-quinolil)carbonil

- 5-HIC = (5-idrossi-indol-2-il)carbonil
- 5-MIC = (5-Metossi-indol-2-il)carbonil
- 2-FUR = 2-Furoil
- 3-FUR = 3-Furoil
- 2-BZF = 2-Benzofuroil
- 2-QIC = Quinaldil
- 2-PZC = Pirazinoil
- 2-MPA = 2-Metossiphenilacetil
- 2-EBZ = 2-Etossibenzoil
- 5-MPZ = (5-Metil-Pirazin-2-il)carbonil
- 6-MNC = 6-Metilnicotinoil
- 5-MIA = 5-Metossi-1-indanone-3-acetil
- 2,4-DMB = 2,4-Dimetossibenzoil
- 4-MBZ = 4-Metossibenzoil
- 4-NBZ = 4-Nitrobenzoil
- 4-CBZ = 4-Clorobenzoil
- 3-NIC = Nicotinoil
- 4-NIC = Isonicotinoil
- 3,4-DMB = 3,4-Dimetossibenzoil
- HDC = 3-Phenilpropionil
- BZS = Benzensulfonil
- 4-EBZ = 4-Etossibenzoil
- 1-NAF = 1-Naphtoil

Come composti inibitori che possono essere impiegati nel metodo della presente invenzione e

negli impieghi terapeutici che saranno descritti in appresso, vengono qui di seguito nominati i seguenti composti di formula (2) e di formula (3) che sono descritti e pubblicati rispettivamente nei brevetti italiani n. 1.242.002 e 1.172.391 già citati in precedenza.

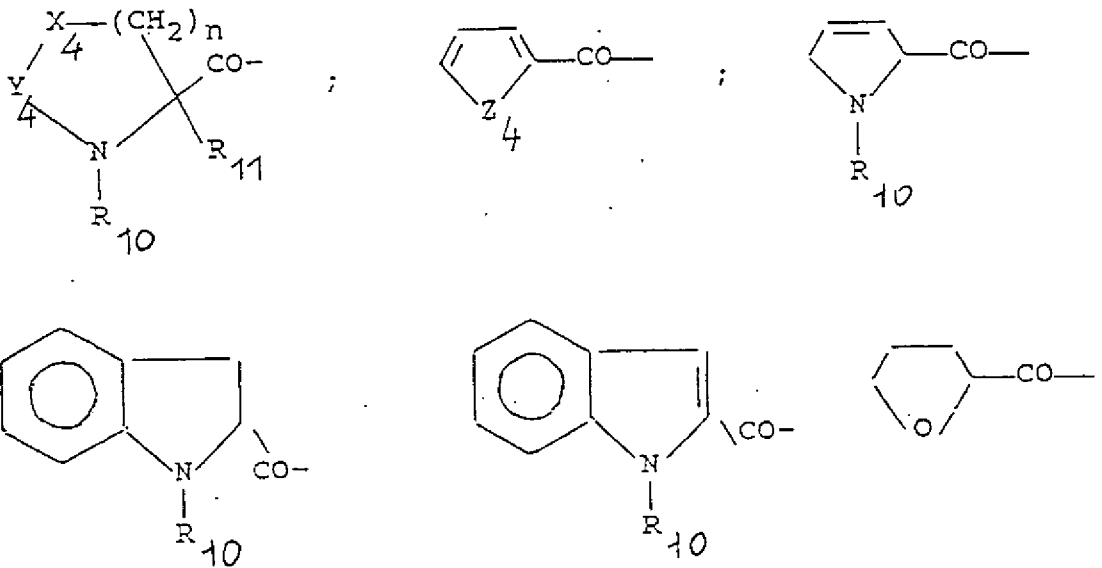
Composti di formula (2):

Q-B-T

formula (2)

in cui

Q è un radicale monovalente di una molecola ad anello scelta dal gruppo costituito da



in cui

X<sub>4</sub> può essere CH<sub>2</sub>, S oppure CHOH

n può essere 0, 1, oppure 2

R11 può essere H o CH<sub>3</sub>

R10 può essere H, CH<sub>3</sub>, oppure un gruppo generico che blocca l' atomo di azoto quale usato nella sintesi dei peptidi, come CBZ, BOC, Fmoc e acetile

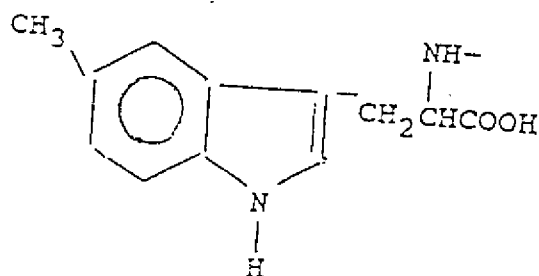
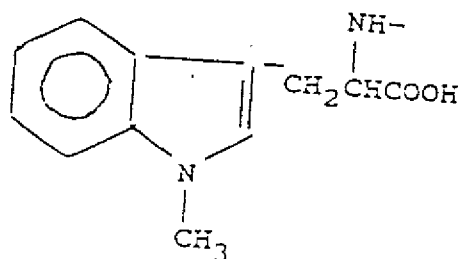
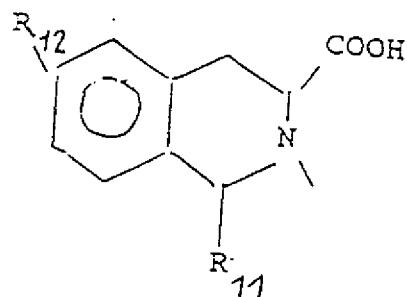
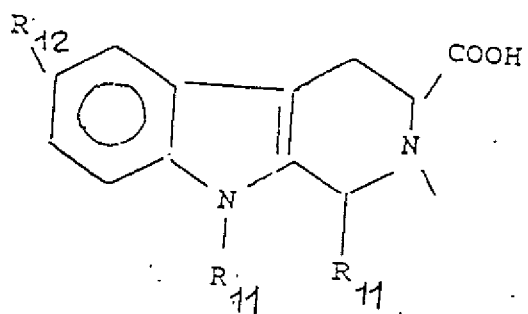
Y4 può essere CH<sub>2</sub> oppure CO

Z4 può essere NH, NCH<sub>3</sub>, O oppure S,

B è un radiale bivalente di un (L)-alfa-amminoacido scelto dal gruppo comprendente glicina, leucina, alanina o valina; e

T è il radicale monovalente di un (L)-amminoacido aromatico scelto dal gruppocomprendente triptofano, fenilalanina, fenilglicina, e loro sali esteri ed ammidi farmaceuticamente accettabili,

oppure uno dei composti qui di seguito indicati, o loro sali, esteri ed ammidi farmaceuticamente accettabili



in cui

R11 ha il significato sopra definito, e

R12 può essere H, OH, OCH3, oppure CH3.

Composti di formula (3):

E-X5-G

formula (3)

in cui

E indica p-GLU, PYR, PRO, Z-PRO

G indica TRP, PHE, TYR

X5 indica GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN,

ILE, LEU, PRO, LYS e ARG

e loro sali, esteri ed ammidi farmaceuticamente accettabili.

#### ESEMPIO 1

Procedimento generale di sintesi dei composti:

X-(L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-Y

Il procedimento generale di sintesi comprende un primo passaggio, in cui viene ottenuto l'intermedio: (L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-Y. A questo viene successivamente aggiunto il residuo X, utilizzando tre diversi metodi sintetici.

I. Sintesi dell'intermedio (L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-CytOMe.

(S)-CytOMe.HCl (1,0 eq) e Boc-A(R<sub>4</sub>)-OH (1,1 eq) vengono solubilizzati in CH<sub>3</sub>CN e raffreddati con bagno a ghiaccio. Si agita per pochi minuti, si aggiungono HBTU (1,2 eq) e TEA (2,2 eq) e si lascia sotto agitazione, lasciando che la temperatura raggiunga quella ambiente.

La reazione al termine viene concentrata su rotavapor ed addizionata con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Si lava con i normali trattamenti acidi-basici. Gli estratti organici sono messi su solfato di sodio anidro e poi raffreddati. Si portano a secco ed il prodotto ottenuto viene messo sotto vuoto su KOH per una notte.

Boc-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-CytOMe ( 1,0 eq) vengono ripresi con diossano anidro e la soluzione, sotto agitazione, viene poi raffreddata a 0 C e portata in atmosfera di argon. Stabilizzata la temperatura, HCl 4M (4 eq) in diossano anidro vengono aggiunti goccia a goccia, lasciando che la temperatura del sistema raggiunga la temperatura ambiente, mantenendo l'agitazione e in atmosfera di argon.

Il prodotto viene concentrato al rotavapor con etere etilico anidro e privo di perossidi. Il residuo viene ripreso con metanolo e poi si precipitata con etere etilico anidro privo di perossidi. Si lascia a temperatura ambiente sotto agitazione e poi in camera fredda.

Il precipitato viene filtrato su G4 e messo sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Si ottiene (L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-CytOMe

II. Metodo a) per la sintesi dei composti X-(L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OH.

Alla soluzione dell'acido X-OH (1,2 eq) in CH<sub>3</sub>CN anidro, raffreddata con bagno a ghiaccio e sotto agitazione, vengono aggiunti A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe.HCl (1,0 eq). Si aggiungono poi HBTU (1,2 eq) e TEA (2,2 eq).

La reazione viene mandata avanti sino a completamento. Si concentra e si aggiunge  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e si tratta con i normali lavaggi acidi-basici. Gli estratti organici sono messi su solfato di sodio anidro e poi raffreddati.

Il prodotto X-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe (1,0 eq) viene ripreso in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ed  $\text{H}_2\text{O}$ . La soluzione viene raffreddata con un bagno a ghiaccio sotto agitazione e si aggiunge NaOH 0,1 N (2,0 eq). La soluzione viene fatta reagire per alcune ore, lasciando che la temperatura raggiunga quella ambiente. Il prodotto di reazione viene purificato su SPE C18.

Si ottiene X-(L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OH

III. Metodo b) per la sintesi dei composti X-(L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OH.

Alla soluzione di acido X-OH sale di DCHA (1,0 eq) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro vengono aggiunti piridina (1,17 eq) e  $\text{SOCl}_2$  (1,165 eq) sotto flusso di argon e sotto agitazione. Dopo un minuto dall'aggiunta del cloruro di tionile vengono addizionati di (L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-CytOMe.HCl (0,604 eq) e DMAP (1,202 eq) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro. Al completamento della reazione si aggiunge AcOEt e la fase organica viene lavata con soluzione satura di NaCl e successivamente con

acido citrico al 10% e quindi con bicarbonato al 5%. Gli estratti organici vengono infine lavati con acqua soluzione satura di NaCl sino a pH neutro e poi sono messi su solfato di sodio anidro e raffreddati.

La soluzione organica, contenente X-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe, viene portata a secco e quindi idrolizzata.

L'estere X-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe (1,0 eq) viene ripreso in CH<sub>3</sub>CN ed H<sub>2</sub>O. La soluzione viene raffreddata con un bagno a ghiaccio sotto agitazione e si aggiunge NaOH 0,1 N (2,0 eq). La soluzione viene fatta reagire per alcune ore, lasciando che la temperatura raggiunga quella ambiente.

Il prodotto di reazione viene purificato su SPE C18.

Si ottiene X-(L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OH

IV. Metodo c) per la preparazione dei composti X-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OH.

-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-CytOMe.HCl (1,0 eq) e X-OH (1,1 eq) vengono solubilizzati in CH<sub>3</sub>CN e raffreddati con bagno a ghiaccio. Si agita per pochi minuti, si aggiungono HBTU (1,2 eq) e TEA ( 2,2 eq) e si

lascia sotto agitazione, lasciando che la temperatura raggiunga quella ambiente.

Al completamento della reazione si aggiunge AcOEt e la fase organica viene lavata con soluzione satura di NaCl e successivamente con acido citrico al 10% e quindi con bicarbonato al 5%. Gli estratti organici vengono infine lavati con acqua soluzione satura di NaCl sino a pH neutro e poi sono messi su solfato di sodio anidro e raffreddati.

La soluzione organica, contenente X-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe, viene portata a secco e quindi idrolizzata.

L'estere X-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe (1,0 eq) viene ripreso in CH<sub>3</sub>CN ed H<sub>2</sub>O. La soluzione viene raffreddata con un bagno a ghiaccio sotto agitazione e si aggiunge NaOH 0,1 N (2,0 eq). La soluzione viene fatta reagire per alcune ore, lasciando che la temperatura raggiunga quella ambiente.

Il prodotto di reazione viene purificato su SPE C18.

Si ottiene X-(L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OH

V. Casi particolari di sintesi.

Sintesi del composto Pic-(L)-Leu-(L)-Cyt-NHOH

Alla soluzione di mg 43 di Pic-Leu-Cyt-OH (1,0 eq) in ml 4 di metilene cloruro anidro, sotto agitazione ed a temperatura ambiente, vengono aggiunti mg 19 di HOBT (1,25 eq) e mg 20,5 di DCC (1,0 eq).

Dopo 60 minuti la soluzione viene filtrata ed al filtrato viene aggiunta una miscela in metilene cloruro ( ml 3) di 8,5 mg di idrossilamina cloridrato (1,02 eq) e 17 mcl di trietilamina (1,02 eq). Si agita per diciotto ore a temperatura ambiente e poi si concentra su rotavapor. Si aggiungono 20 ml di acqua e si acidifica con HCl 2N sino a pH 2. Si aggiungono 10 ml di soluzione satura di sodio cloruro, e si estrae due volte con 20 ml di etile acetato.

Gli estratti organici riuniti vengono lavati con soluzione satura di sodio cloruro sino a neutralità. La fase organica viene poi messa su sodio solfato anidro e raffreddata. Gli estratti organici, portati a secco, sono ripresi con 5 ml di metanolo. La soluzione così ottenuta viene acidificata con HCl 2 N per precipitare l'eccesso di composto di partenza. Si filtra la soluzione e si porta a secco, quindi si liofilizza. Si ottiene: Picolinil-(L)-Leu-(S)-Cyt-NHOH (in sigla

PIC-(L)-Leu-(S)-Cyt-NHOH (resa 50%). (Composto con peso molecolare 449.49; formula bruta  $C_{24}H_{27}N_5O_4$ ; Punto di fusione 130 C; Composizione elementare: C=64.23 (teor.64.13), H=6.11 (teor.6.05), N=15.47 (teor.15.58).

Con la stessa procedura usata per la sintesi di PIC-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-NHOH, dove A-(R<sub>4</sub>) uguale a (L)-Leu e PIC uguale a Picolinil si e' preparato il prodotto:

PIC-(L)-Leu-(S)-Cyt-N-(CH<sub>3</sub>)-OH (Composto con peso molecolare 463.51, Formula bruta  $C_{25}H_{29}N_5O_4$ ; Punto di fusione 145 C; Composizione elementare: C=64.81 (teor.64.78), H=6.35 (teor.6.31), N=15.08 (teor.15.11).

#### **Esempio 2**

##### **SINTESI del composto 5-MIC-(L)-Cha-(S)-Cyt-OH**

I. Sintesi dell'intermedio: Metil -(S)-1,2,3,4 tetraidro-9H-pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilato.

10g (1,0 eq) di (L)-Trp-OH e 6,1 ml di aldeide formica al 40% (1,8 eq) vengono addizionati a 120 ml di una miscela di acqua-acido solforico 0,1N (v/v 2:1) e la miscela viene lasciata sotto agitazione per 16 ore ed a temperatura ambiente. Al termine di tale periodo il precipitato ottenuto viene filtrato su G4 e lavato con

acqua fredda ed essiccato sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per una notte. Il prodotto (S)-1,2,3,4 tetraidro-9H-pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilico in sigla (S)-CytOH.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (resa 80%), così ottenuto, viene usato per lo step successivo.

(S)-CytOH.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pari ad 8 grammi (1,0 eq), e 18,6ml di clorotrimetilsilano (in Sigla TMSCl, 4,0 eq) vengono aggiunti a ml 90 di metanolo assoluto. La reazione viene condotta sotto argon a temperatura ambiente per 30 min. dall'aggiunta del TMSCl e poi si porta la temperatura a 55 C a ricadere per una notte, sempre sotto argon.

La reazione viene concentrata sotto vuoto per tre volte con etere, anidro e privo di perossidi. Il residuo viene ripreso con ml 5 di metanolo e viene precipitato con etere anidro.

Si raffredda e si filtra su G4. Il prodotto viene essiccato su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per una notte. Si ottiene (S)-Cyt-OMe.HCl (resa 87%).

II. Sintesi dell'intermedio: (L)-Cha-(S)-CytOMe.

(S)-CytOMe.HCl pari a 128 mg (1,0 eq) e N-(tert-Butossicarbonil)-L-β-cicloesil-Ala-OH (in sigla Boc-Cha) 108 mg (1,1 eq) vengono aggiunti a ml 10 di acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) raffreddati con bagno a ghiaccio, si agita per pochi minuti e si

aggiungono mg 181 di O-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluorofosfato (in sigla HBTU) (1,2 eq) e mcl 122 di Trietilamina (d=0,726, 2,2 eq) e si lascia sotto agitazione per 4 ore lasciando che la temperatura raggiunga quella ambiente.

La reazione al termine viene concentrata su rotavapor sino al volume di ml 8 ed addizionata di 90 ml di diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Si lava con 80 ml di salamoia, si lava per 2 volte con ml 80 di solfato acido di potassio al 4%. Si lava per 3 volte con ml 80 di salamoia sino alla neutralita' e si lava per 2 volte con 90 ml di bicarbonato al 5 % .Si lava sino a pH neutro con soluzione satura di sale. Gli estratti organici sono messi su solfato di sodio anidro e poi raffreddati.

Si portano a secco ed il foam, ottenuto, viene messo sotto vuoto su KOH per una notte.

Il residuo Boc-Cha-(S)-CytOMe viene ripreso con 8 ml di diossano anidro e la soluzione, sotto agitazione, viene poi raffreddata a 0 C e portata in atmosfera di argon. Stabilizzata la temperatura, ml 3,1 di HCl 4M in diossano anidro vengono aggiunti goccia a goccia, lasciando che la

temperatura del sistema raggiunga la temperatura ambiente, mantenendo l'agitazione e l'argon per 4 ore.

Il prodotto viene concentrato al rotavapor per tre volte con etere privo di perossidi anidro.

Il residuo viene ripreso con 3 ml di metanolo e poi si precipitata con 500 ml di etere anidro privo di perossidi.

Si lascia per un'ora a temperatura ambiente sotto agitazione e poi tre ore in camera fredda.

Il precipitato viene filtrato su G4 e messo sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Con la stessa procedura usata per la sintesi di (L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe, dove A-(R<sub>4</sub>) uguale a (L)-Cha si sono preparati i seguenti prodotti :

HCl. (L) -Trp- (S) -Cyt-OMe

HCl. (L) -Phe- (S) -Cyt-OMe

HCl. (L) -Leu- (S) -Cyt-OMe

HCl. (L) -Asn- (S) -Cyt-OMe

HCl. (L) -Lys(Fmoc) - (S) -Cyt-OMe

III. Sintesi del composto 5-MIC-Cha-(S)-Cyt-OH secondo il Metodo a).

Alla soluzione di mg 100 di acido 5-Metossi-2-indolcarbossilico (Aldrich) (1,1 eq, in sigla 5-MIC) in ml 15 di Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN ) anidro,

raffreddata con bagno a ghiaccio e sotto agitazione, vengono aggiunti mg 200 di Cha-(S)-Cyt-OMe.HCl (1,2 eq). Si aggiungono poi mg 217 di HBTU (Aldrich) (1,2 eq) e mcl 150 di Trietilamina ( $d=0,726$ , 2,2 eq).

La reazione viene mandata avanti per tre ore. Al termine di tale periodo viene concentrata e si aggiungono ml 90 di metilene cloruro, poi trattata con i normali lavaggi acidi -basici.

Gli estratti organici sono messi su solfato di sodio anidro e poi raffreddati.

mg 260 di prodotto 5-MIC-Cha-Cyt-OMe (1,0 eq) vengono ripresi in 10 ml di acetonitrile e 0,7 ml di acqua. La soluzione viene raffreddata con un bagno a ghiaccio sotto agitazione e si aggiungono quindi 9,3 ml di NaOH 0,1 N (2,0 eq). La soluzione viene agitata per 12 ore, lasciandola andare a temperatura ambiente. La reazione viene trattata nel modo che segue:

1) purificazione dall'estere non idrolizzato

La soluzione di reazione viene caricata su una colonna SPE (Backer) C18 da 1 g, precedentemente tamponata con solvente di reazione. L'eluato che contiene solo il prodotto 5-MIC-Cha-(S)-CytOH, viene reso acido con aggiunta

di HCl 1N ed addizionato con acqua sino ad intorbidimento della soluzione.

2) Purificazione dell'acido

La soluzione contenente il prodotto viene caricata successivamente su 2 colonne di SPE (Backer) condizionate con eluente acido del campione. L'eluato viene eliminato e le colonnine SPE vengono eluite con metanolo.

Le fasi organiche riunite vengono concentrate sino ad un volume di tre ml e precipitato con 500 ml di HCl 0,1N.

Il precipitato dopo un raffreddamento in camera fredda viene filtrato su G4 e sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (resa 60%).

Si ottiene il composto 5-MIC-Cha-(S)-Cyt-OH (Composto 1).

**ESEMPIO 3**

Con la stessa procedura usata per la sintesi di 5-MIC-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OH, dove A-(R<sub>4</sub>) uguale a (L)-Cha e 5-MIC uguale a (5-Metossi-indol-2-il)carbonil si sono preparati i seguenti prodotti:

2-PMTA-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 2)

4-PTA-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 3)

3-APZC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 4)

7-MBF-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 5)

- 4-MQC- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH (Composto 6)  
 5-HIC- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH (Composto 7)  
 5-MIC- (L) -Phe- (S) -Cyt-OH (Composto 8)  
 PIC- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH (Composto 9)  
 2-FUR- (L) -Cha- (S) -Cyt-OH (Composto 10)  
 2-FUR- (L) -Phe- (S) -Cyt-OH (Composto 11)  
 (L) -HomoSer- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH (Composto 12)

TABELLA 1.

Caratteristiche chimico-fisiche dei composti  
 sintetizzati col metodo descritto.

N.	Peso mol.	Formula bruta	Carbonio %		Idrogeno %		Azoto %		P.F. (°C)
			Trov.	Teor.	Trov.	Teor.	Trov.	Teor.	
1	542.61	C <sub>31</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	68.69	68.61	6.38	6.32	10.38	10.33	151
2	481.49	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	60.11	59.86	5.71	5.65	14.1	14.55	90
3	480.50	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	62.52	62.49	5.91	5.87	11.61	11.66	153
4	450.48	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	61.41	61.32	5.88	5.82	18.61	18.66	149
5	503.54	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	66.84	66.78	5.87	5.80	8.29	8.35	161
6	514.55	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	67.76	67.69	5.92	5.88	10.76	10.89	163
7	488.52	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	66.42	66.38	5.82	5.78	11.38	11.47	166
8	536.56	C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	69.45	69.39	5.32	5.26	10.36	10.44	136
9	434.47	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	66.44	66.34	6.09	6.03	12.73	12.90	128
10	463.51	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	67.43	67.37	6.39	6.31	8.98	9.07	136
11	457.46	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	68.34	68.26	5.16	5.07	9.01	9.19	150
12	430.48	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	61.42	61.38	7.04	7.02	12.98	13.01	163

**Esempio 4**

Sintesi del composto **3-Fur-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH** secondo il Metodo b)

Alla soluzione di mg 120 di acido 3-Furoico sale di DCHA (1,0 eq) in ml 5 di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro vengono aggiunti ml 39 di piridina (su potassa) (1,17 eq) e ml 35 di SOCl<sub>2</sub> (1,165 eq) sotto flusso di argon e sotto agitazione. Dopo un minuto dall'aggiunta del cloruro di tionile vengono addizionati mg 100 di (L)-Leu-(S)-CytOMe.HCl (0,604 eq) e 64 mg di DMAP (1,202 eq) in 3 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro.

Dopo un'ora si aggiungono 80 ml di etile acetato e la fase organica viene lavata con soluzione satura di NaCl e successivamente con acido citrico al 10% (80\*2ml) e quindi con bicarbonato al 5% (80\*2ml). Gli estratti organici vengono infine lavati con acqua soluzione satura di NaCl (80\*3ml) sino a pH neutro e poi sono messi su solfato di sodio anidro e raffreddati.

La soluzione organica, contenente 3-Furoil-(L)-Leu-(S)-Cyt-OMe, viene portata a secco e quindi idrolizzata.

mg 118 di prodotto 3-Furoil-Leu-(S)-Cyt-OMe (1,0 eq) vengono ripresi in 10 ml di CH<sub>3</sub>CN e 4,8 ml di H<sub>2</sub>O. La soluzione viene raffreddata con un bagno a

ghiaccio sotto agitazione e si aggiungono quindi 5,2 ml di NaOH 0,1 N ( 2,0 eq). La soluzione viene agitata per 12 ore e si lascia andare a temperatura ambiente.

La reazione viene trattata nel modo che segue:

1) Purificazione dall'estere non idrolizzato

La soluzione di reazione viene caricata su una colonna SPE (Backer) C18 da 1 g, precedentemente tamponata con solvente di reazione. L'eluato, che contiene solo il prodotto 3-Furoil-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH, viene reso acido con aggiunta di HCl 1N ed addizionato di acqua sino ad intorbidimento della soluzione.

2) Purificazione dell'acido

La soluzione contenente il prodotto viene caricata successivamente su 2 colonne di SPE (Backer) condizionate con eluente acido del campione. L'eluato viene eliminato e le colonnine SPE vengono eluite con metanolo.

Le fasi organiche riunite vengono concentrate sino ad un volume di 3 ml e precipitato con 500 ml di HCl 0,1N.

Il precipitato dopo raffreddamento in camera fredda viene filtrato su G4 e posto sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Si ottiene 3-Furoil-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (in sigla 3-FUR-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (resa 60%) (Composto 13).

#### Esempio 5

Con la stessa procedura usata per la sintesi di 3-FUR-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe, dove A-(R<sub>4</sub>) uguale a (L)-Leu e 3-FUR uguale a 3-Furoil si sono preparati i seguenti prodotti :

5-MIC-(L)-Trp-(S)-Cyt-OH (Composto 14)

2-BZF-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 15)

2-QIC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 16)

5-MIC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 17)

2-PZC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 18)

2-MPA-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 19)

2-EBZ-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 20)

5-MPZ-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 21)

6-MNC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 22)

5-MIA-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 23)

TABELLA 2

Caratteristiche chimico-fisiche dei composti  
sintetizzati col metodo descritto.

N.	Peso mol.	Formula bruta	Carbonio %		Idrogeno %		Azoto %		P.F. (°C)
			Trov.	Teor.	Trov.	Teor.	Trov.	Teor.	
13	423.45	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	65.31	65.23	6.0	5.95	9.89	9.92	130
14	575.59	C <sub>33</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	68.91	68.86	5.12	5.08	12.11	12.17	174
15	473.50	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	68.52	68.48	5.79	5.75	8.81	8.87	155
16	484.53	C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	69.51	69.40	5.85	5.82	11.44	11.56	161
17	502.54	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	67.03	66.92	6.06	6.02	11.08	11.15	158
18	435.46	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	63.50	63.43	5.81	5.79	16.10	16.08	132
19	477.54	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	67.91	67.90	6.60	6.49	8.76	8.80	133
20	477.54	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	67.98	67.90	6.59	6.49	8.75	8.79	128
21	449.49	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	64.21	64.13	6.10	6.05	15.48	15.58	151
22	448.50	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	67.02	66.95	6.34	6.29	12.39	12.49	159
23	530.57	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	67.98	67.91	6.12	6.08	7.87	7.92	147

## Esempio 6

Sintesi del composto 2,4-DMB-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH secondo il Metodo c)

mg 63,4 di cloruro dell'acido 2,4-Dimetossibenzoico (Aldrich) (1,2eq) vengono aggiunti a ml 15 di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> secco e privo di perossidi, si agita e si aggiungono mg 100 di Leu-(S)-Cyt-OMe.HCl (1,0 eq) e si aggiungono 81 mcl di TEA (2,2 eq). La soluzione viene posta su bagno a ghiaccio sotto agitazione per 2,5 ore e poi si aggiungono ml 90 di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Si lava con 80 ml di soluzione satura di NaCl e successivamente con 50

ml di HCl 0,1N e poi per tre volte con 80 ml di soluzione satura di NaCl sino a pH neutro.

Gli estratti organici sono messi su sodio solfato anidro ed in camera fredda.

La soluzione organica, contenente 2,4-Dimetossibenzoil-Leu-(S)-Cyt-OMe viene portata a secco (resa 95%) e quindi idrolizzata .

mg 133 di estere (1,0 eq) viene ripreso con 19 ml di CH<sub>3</sub>CN e 11,5 ml di H<sub>2</sub>O e la soluzione viene raffreddata con bagno a ghiaccio e quindi addizionata con 5,23 ml di NaOH 0,1 N (2,0 eq).

La soluzione viene agitata per sei ore lasciando andare la temperatura ad ambiente.

Al termine la reazione viene trattata nel modo che segue:

1) Purificazione dall'estere non idrolizzato

La soluzione di reazione viene caricata su una colonna SPE (Backer) C18 da 1 g, precedentemente tamponata con solvente di reazione. L'eluato, che contiene solo il prodotto 2,4-Dimetossibenzoil-Leu-(S)-Cyt-OMe, viene reso acido con aggiunta di HCl 1N ed addizionato di acqua sino ad intorbidimento della soluzione.

2) Purificazione dell'acido

La soluzione contenente il prodotto viene caricata successivamente su 2 colonne di SPE (Backer) condizionate con eluente acido del campione. L'eluato viene eliminato e le colonnine SPE vengono eluite con metanolo.

Le fasi organiche riunite vengono concentrate sino ad un volume di 3 ml e precipitato con 500 ml di HCl 0,1N.

Il precipitato dopo raffreddamento in camera fredda viene filtrato su G4 e posto sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Si ottiene 2,4-Dimetossibenzoil-(L)-Leu-(S)-CytOH (in sigla 2,4-DMB-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (resa 74%) (Composto 24).

#### Esempio 7

Con la stessa procedura usata per la sintesi di 2,4- DMB-(L)-A-(R<sub>4</sub>)-(S)-Cyt-OMe, dove A-(R<sub>4</sub>) uguale a (L)-Leu e 2,4-DMB uguale a 2,4-Dimetossibenzoil si sono preparati i seguenti prodotti :

- 4-MBZ-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 25)
- 4-NBZ-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 26)
- 4-CBZ-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 27)
- 3-NIC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 28)
- 4-NIC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH (Composto 29)

3,4-DMB- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH	(Composto 30)
HDC- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH	(Composto 31)
BZS- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH	(Composto 32)
4-EBZ- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH	(Composto 33)
2-FUR- (L) -Trp- (S) -Cyt-OH	(Composto 34)
2-FUR- (L) -Asn- (S) -Cyt-OH	(Composto 35)
2-FUR- (L) -Lys(Fmoc) - (S) -Cyt-OH	(Composto 36)
1-NAF- (L) -Leu- (S) -Cyt-OH	(Composto 37)

TABELLA 3

Caratteristiche chimico-fisiche dei composti sintetizzati col metodo descritto.

N.	Peso mol.	Formula bruta	Carbonio %		Idrogeno %		Azoto %		P.F.(°C)
			Trov.	Teor.	Trov.	Teor.	Trov.	Teor.	
24	493.54	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	65.81	65.70	6.36	6.33	8.48	8.51	103
25	463.51	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	67.41	67.37	6.32	6.31	9.01	9.07	110
26	478.48	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	62.81	62.75	5.51	5.48	11.66	11.71	167
27	467.93	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Cl	64.22	64.17	5.69	5.60	8.89	8.98	175
28	434.47	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	66.54	66.34	6.12	6.03	12.55	12.90	187
29	434.47	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	66.57	66.34	6.13	6.03	12.65	12.90	170
30	493.54	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	65.83	65.70	6.38	6.33	8.47	8.51	154
31	461.54	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	70.35	70.26	6.81	6.77	9.0	9.10	103
32	469.53	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	61.52	61.39	5.84	5.80	8.91	8.95	142
33	477.54	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	68.01	67.90	6.59	6.54	8.72	8.80	148
34	496.50	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	67.83	67.73	4.91	4.87	11.22	11.28	152
35	424.39	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	59.48	59.43	4.82	4.75	13.10	13.20	188
36	660.69	C <sub>38</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	69.14	69.08	5.54	5.49	8.38	8.48	177
37	483.54	C <sub>29</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	71.67	72.03	6.15	6.04	8.65	8.69	151

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITA' BIOCHIMICA DEI  
COMPOSTI.

Esempio 8

Inibizione dei composti sulle metalloproteinasasi prodotte da veleno di serpente.

I composti della presente invenzione sono stati saggiati su diverse metalloproteinasasi zinco-dipendenti estratte da veleni di serpenti, appartenenti sia ai Crotalidi che ai Viperidi (per esempio, Emorragina e da *Crotalus Atrox*, Botropasina, Emorragina da *Agkistrodon Bilineatus*, Emorragine diverse da *Echis Carinatus*). Qui di seguito viene descritta la purificazione dell'Emorragina da *Crotalus Adamanteus*, usata di preferenza nelle prove di screening per la sua maneggevolezza.

Un grammo di veleno liofilizzato (ottenuto dalla ditta USA Sigma Chemical) è stato disciolto in tampone Tris-HCl a pH 8.0 e caricato su colonna cromatografica contenente resina DEAE Sephadex A-50. Usando per eluente un gradiente del tampone, contenente NaCl in concentrazione da 0 a 1 M, si ottengono 4 picchi principali delle frazioni proteiche presenti nel veleno. Queste sono state concentrate e desalificate, e quindi saggiate per

la presenza di metalloproteinasasi, usando la metodica in seguito descritta. La frazione I, contenente la maggior parte dell'attività metalloproteinasica, è stata quindi passata su colonna cromatografica contenente resina Sephadex G-150, ed eluita con tampone Tris-HCl pH 7.5. Si ottengono due picchi principali, e nel primo di questi viene identificata l'attività metalloproteinasica. Un'ulteriore purificazione, per allontanare materiale estraneo, viene effettuata usando resina Sephadex G-75. L'enzima così purificato viene liofilizzato e conservato in freezer fino alla sua utilizzazione.

L'attività metalloproteinasica è stata saggiata al fluorimetro (Perkin Elmer LS 50B), usando come substrato il composto fluorigenico della ditta Bachem 2-Aminobenzoil-Alanil-Glicil-Leucil-Alanil-p-Nitrobenzilamide. Diverse quantità dei composti sintetizzati venivano aggiunti a 5 microgrammi di enzima, in un sistema termostato a 30 gradi, con agitazione. Si seguiva per 30 minuti la formazione di composti fluorescenti (eccitazione: 320 nm; emissione: 420 nm), e la curva veniva confrontata con la linea di base, ottenuta senza l'aggiunta dei composti.

TABELLA 4

Attività inibitoria dei composti della presente invenzione sull'enzima purificato da veleno di *Crotalus Adamanteus*.

Composto n.	IC <sub>50</sub>	Composto n.	IC <sub>50</sub>	Composto n.	IC <sub>50</sub>
1	2.9x10 <sup>-8</sup>	14	4.7x10 <sup>-8</sup>	27	1.0x10 <sup>-7</sup>
2	2.3x10 <sup>-7</sup>	15	4.0x10 <sup>-8</sup>	28	1.0x10 <sup>-7</sup>
3	3.6x10 <sup>-7</sup>	16	2.8x10 <sup>-8</sup>	29	4.0x10 <sup>-7</sup>
4	6.7x10 <sup>-8</sup>	17	2.3x10 <sup>-8</sup>	30	3.8x10 <sup>-7</sup>
5	9.4x10 <sup>-8</sup>	18	2.1x10 <sup>-7</sup>	31	2.1x10 <sup>-7</sup>
6	5.0x10 <sup>-8</sup>	19	2.6x10 <sup>-7</sup>	32	2.0x10 <sup>-6</sup>
7	2.3x10 <sup>-8</sup>	20	1.3x10 <sup>-7</sup>	33	7.0x10 <sup>-8</sup>
8	1.0x10 <sup>-7</sup>	21	4.4x10 <sup>-8</sup>	34	5.0x10 <sup>-7</sup>
9	2.7x10 <sup>-8</sup>	22	1.1x10 <sup>-7</sup>	35	8.0x10 <sup>-6</sup>
10	2.5x10 <sup>-8</sup>	23	7.5x10 <sup>-8</sup>	36	1.0x10 <sup>-7</sup>
11	5.3x10 <sup>-8</sup>	24	9.8x10 <sup>-8</sup>	37	2.1x10 <sup>-7</sup>
12	5.0x10 <sup>-6</sup>	25	5.4x10 <sup>-8</sup>		
13	4.0x10 <sup>-7</sup>	26	9.5x10 <sup>-8</sup>		

## Esempio 9

Con la stessa tecnica qui descritta sono stati saggiati i composti chimici di formula (2) descritti nel brevetto italiano 1.242.002 cui viene fatto riferimento per la identificazione dei composti indicati nella seguente tabella 5. Tutti i composti risultano essere buoni inibitori dell'enzima, con una IC<sub>50</sub> compresa fra 1x10<sup>-5</sup> e 1x10<sup>-7</sup> M.

TABELLA 5

Attività di alcuni dei composti sintetizzati su diverse metalloproteinasi purificate da veleno di serpente.

Composto n.	IC50			
	Crotalus Adamanteus	Echis Carinatus	Bothrops Atox	Bothrops Jararaca
3	$3.6 \times 10^{-7}$	$2.4 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$6.5 \times 10^{-6}$
5	$9.4 \times 10^{-8}$	$8.9 \times 10^{-6}$	$4.1 \times 10^{-6}$	$3.7 \times 10^{-6}$
9	$2.7 \times 10^{-8}$	$3.5 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-6}$	$1.3 \times 10^{-6}$
15	$4.0 \times 10^{-8}$	$2.0 \times 10^{-6}$	$8.2 \times 10^{-6}$	$1.4 \times 10^{-5}$
18	$2.1 \times 10^{-7}$	$7.0 \times 10^{-6}$	$5.2 \times 10^{-6}$	$8.4 \times 10^{-6}$
22	$1.1 \times 10^{-7}$	$1.4 \times 10^{-5}$	$3.2 \times 10^{-6}$	$2.1 \times 10^{-5}$
31	$2.1 \times 10^{-7}$	$1.8 \times 10^{-5}$	$2.6 \times 10^{-5}$	$4.2 \times 10^{-6}$
33	$7.0 \times 10^{-8}$	$9.0 \times 10^{-7}$	$7.8 \times 10^{-6}$	$5.0 \times 10^{-6}$

I risultati espressi nelle Tabelle 4 e 5 testimoniano che i composti descritti nella presente domanda, e nel brevetto italiano n. 1.242.00290, sono tutti molto attivi nell'inibire l'enzima purificato da veleno di Crotalus Adamanteus, e mostrano anche una discreta attività inibitoria nei confronti di altre metalloproteinasi purificate da altri veleni di Crotalidi e Viperidi, per cui possono essere considerati inibitori dell'intera classe di metalloproteinasi da veleno di serpente.

**DESCRIZIONE DELL'ATTIVITA' FARMACOLOGICA DEI COMPOSTI.**

**Esempio 10****Attività "in vitro" sul Tumour Necrosis Factor (TNF).**

E' ampiamente noto che il TNF gioca un ruolo fondamentale in alcune risposte fisiologiche di difesa, ma d'altra parte causa danni severi quando viene rilasciato in circolazione in quantità eccessive o per periodi prolungati. Recentemente, è stato dimostrato che il TNF viene prodotto in forma attiva sulla superficie cellulare ad opera di una metalloproteinasi zinco-dipendente. Si è voluto perciò vedere se alcuni composti, scelti fra quelli descritti nella presente domanda e nel brevetto italiano n. 1.242.002, fossero in grado di bloccare il rilascio di TNF attivo in terreni di coltura di cellule umane (Jurkat). Le cellule venivano incubate in presenza o assenza di inibitore di metalloproteinasi per 72 ore; si stimolava quindi il rilascio di TNF mediante attivatori (PMA e calcio ionoforo), e il Fattore veniva dosato nel terreno di coltura mediante test Elisa (ditta Genzyme).

I composti 9, 10 e 25 della presente invenzione hanno dimostrato tutti di avere un effetto inibitorio dose-dipendente sul rilascio di TNF da

parte delle cellule, anche se in misura diversa (il composto 9 mostrava una IC<sub>50</sub> intorno a 8 mcg/ml; il composto 10 intorno a 200 mcg/ml; e il composto 25 intorno a 0.7 mcg/ml). Inoltre, anche il composto Z-PRO-LEU-Cyt (descritto nell'esempio 1 del brevetto italiano n.1.242.002) si è dimostrato attivo, con IC<sub>50</sub> intorno a 5 mcg/ml. Questo composto è stato anche sottoposto ad un altro test, per valutare il rilascio di TNF da un altro ceppo di cellule umane in coltura (clone T): anche in questo caso, si è osservata attività inibitoria (IC<sub>50</sub> inferiore a 1 mcg/ml).

Questi risultati dimostrano che inibitori di metalloproteinasi da veleno di serpente sono in grado di bloccare il rilascio di TNF da cellule umane, e quindi sono potenzialmente utilizzabili in terapia in numerose situazioni patologiche, che vanno dall'artrite reumatoide (ed altre forme di artrite) allo shock settico, alla sclerosi multipla, all'immunodeficienza da infezioni virali.

#### **Esempio 11**

##### **Attività "in vivo" sul TNF.**

Gli stessi composti utilizzati nei saggi "in vitro" sono stati anche sottoposti a test per

vedere se erano in grado di bloccare la mortalità indotta nei topi di ceppo Balb/c da dosi letali di LPS (un agente batterico che stimola il rilascio di TNF). Tutti i composti si sono dimostrati in grado di preservare i topi da morte, con una IC<sub>50</sub> che variava fra 0.5 e 5 mcg/topo (iniezione i.p.). Questi risultati confermano la potenziale utilizzazione degli inibitori delle metalloproteinasi da veleno di serpente in tutte le situazioni patologiche originate da TNF.

#### Esempio 12

##### Attività sulla collagenasi umana.

I composti descritti nella presente domanda, e quelli del brevetto italiano n.1.242.002, sono stati saggiati sull'enzima collagenasi purificato da neutrofili umani. Oltre la metà dei composti si è mostrata in grado di inibire potentemente l'enzima, che è noto essere direttamente collegato con la risposta infiammatoria (artrite reumatoide, osteoartrosi, ecc.), con l'invasione tumorale, la cicatrizzazione delle ferite, la periodontite, le ulcere corneali, ecc.

Perciò, si può affermare che il test di inibizione sulle metalloproteinasi da veleno di serpente è altamente predittivo di un'attività inibitoria

sulla collagenasi prodotta da cellule umane, e permette di ipotizzare importanti attività terapeutiche connesse con l'inibizione stessa.

#### Esempio 13

**Inibizione delle emorragie indotte da veleno di serpente.**

Il composto Fur-LEU-TRP (descritto come esempio 8 nel brevetto italiano n.1.242.002), ottimo inibitore "in vitro" della metalloproteinasi purificata da veleno di *Crotalus Adamanteus*, è stato sottoposto a test "in vivo" su topi, per saggiare la sua capacità di antagonizzare le emorragie e la letalità indotte da veleni di serpente. I risultati hanno dimostrato che il composto, incubato con i fattori emorragici di diversi veleni di serpente, è capace di neutralizzarne gli effetti tossici. Inoltre, alla dose di 33 mcg/topo il composto è in grado di proteggere i topi da mortalità da iniezione di veleno, anche quando la sua somministrazione è posteriore all'avvelenamento (fino a 30 minuti). Altri composti, del sopra citato brevetto italiano e della presente domanda, sono in grado di antagonizzare gli effetti tossici e la letalità di

veleni di serpenti (crotalidi e viperidi), anche se con potenza inferiore.

Si può perciò affermare che gli inibitori delle metalloproteinasi da veleno di serpente costituiscono una nuova classe di antiveleni sintetici, per avvelenamenti da crotalidi e da viperidi.

#### **Esempio 14**

**Effetti su microemorragie indotte da istamina.**

Il composto Z-PRO-LEU-Cyt, descritto nell'esempio 1 del brevetto italiano n. 1.242.002, è stato sottoposto ad estese indagini nel modello di variazione di permeabilità capillare indotta nel criceto a seguito di somministrazione di istamina. Tale modello è utile in genere per osservare composti a potenziale attività sulla microcircolazione e sui fenomeni dell'aterosclerosi. Inoltre, poichè la somministrazione di istamina induce delle microemorragie a livello delle arteriole, analogamente a quanto succede per somministrazione di fattori emorragici da veleno di serpente, con questo modello si può valutare se i composti in studio sono in grado di interagire con

metalloproteinasasi endogene nei mammiferi, responsabili degli effetti dell'istamina.

I risultati hanno evidenziato che il composto è estremamente potente nel bloccare le microemorragie indotte da istamina, sia quando iniettato in vena, che quando somministrato per bocca. In entrambi i casi, la dose capace di bloccare gli effetti al 50% si aggirava intorno ai 50 mcg/Kg.

Anche altri composti, descritti nella presente domanda e nel sopra citato brevetto italiano, si sono dimostrati in grado di inibire le microemorragie indotte da istamina nel criceto, anche se a concentrazioni leggermente superiori. Si può perciò concludere che gli inibitori delle metalloproteinasasi da veleno di serpente sono in grado di antagonizzare i processi patologici che portano a microemorragie interne, e quindi sono potenzialmente utilizzabili nell'aterosclerosi e in numerose altre condizioni patologiche derivanti da lesioni del tessuto vascolare.

#### Esempio 15

Effetti su infiltrazioni nel tessuto broncopolmonare.

Poichè le metalloproteinasi prodotte da cellule di mammiferi sono fondamentali per permettere alle cellule di migrare da un tessuto all'altro dell'organismo, i composti 9, 18, 25 e 31 descritti nella presente domanda, insieme ai composti Z-PRO-LEU-Cyt (esempio n.1) e FUR-LEU-Cyt (descritto nell'esempio n.8 del brevetto italiano n.1.242.002 ) 90, sono stati saggiati nel test di ipereosinofilia indotta nel ratto da resina Sephadex G-200. I risultati ottenuti dimostrano che tutti i composti, anche se in misura diversa, interferiscono sulla quantità di cellule del sangue che migrano verso il sito infiammato, inibendo la motilità di una o più delle classi di cellule analizzate (linfociti, neutrofili, eosinofili, macrofagi).

Si può perciò concludere che gli inibitori delle metalloproteinasi da veleno di serpente sono in grado di agire sulla motilità delle cellule coinvolte con la risposta infiammatoria a livello bronco-polmonare, e possono essere di utilità terapeutica nelle numerose affezioni bronco-polmonari causate da metalloproteinasi, incluse l'enfisema polmonare, la sindrome da difficoltà respiratoria dell'adulto (ARDS), la fibrosi

interstiziale, la malattia granulomatosa, il tumore polmonare e la malattia pleurica.

**Effetti immunologici.**

Molti dei composti descritti nella presente Domanda sono stati saggiati in test sulla risposta immunitaria, per verificare se erano in grado di influenzarne il decorso. I risultati ottenuti dimostrano che tutti i composti sono in grado di stimolare, in modo più o meno marcato, la risposta immunitaria, espressa come proliferazione dei linfociti T. Inoltre, molti dei composti dimostravano di incrementare la risposta al virus influenzale, determinata come presenza degli anticorpi specifici al virus. Infine, nel test di sensibilità da contatto (correlata con la risposta allergica) si riscontrava che molti dei composti erano potenti inibitori della risposta.

Si conclude perciò che gli inibitori delle metalloproteinasi da veleno di serpente sono in grado di influenzare significativamente le risposte immunitarie dei mammiferi, sia incrementando la proliferazione dei linfociti T che aumentando la produzione di anticorpi. Inoltre, essi possono ostacolare le risposte di tipo allergico.

*Abbonelli*  
 ✓ **Gilberto Tonon**  
 (Iscr. Albo n. 83)



RM 95 A 000557

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per determinare la attività terapeutica nei mammiferi di composti inibitori di metalloproteinasi zinco-dipendenti comprendente le operazioni di determinare il livello di attività di detti composti come inibitori di metalloproteinasi zinco-dipendenti estratte da veleno di serpente appartenente alle famiglie dei Crotalidi e dei Viperidi, selezionare detti composti in base alla superiorità di detto livello e verificare l'attività inibitoria di detti composti selezionati su metalloproteinasi presenti nell'organismo di mammiferi e che inducono situazioni patologiche nei detti mammiferi per riconoscere e produrre un farmaco attivo nella terapia umana e animale.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta metalloproteinasi zinco-dipendente estratta da veleno di serpente è scelta dal gruppo comprendente emorragina da *Crotalus Adamanteus*, emorragina da *Crotalus Atrox*, botropasina e emorragina da *Agkistrodon Bilneatus*, emorragine diverse da *Echis Carinatus*.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 oppure 2, in cui detti composti inibitori di metallo-proteinasi sono scelti dal gruppo comprendente:

composti di formula



$$|$$

$$\text{R4}$$

dove : A indica  $\text{NH-CH-CO}$  ;

$$|$$

$$\text{CH}_2-$$

Y indica  $\text{OH, NH}_2, \text{NHOH, N(CH}_3\text{)OH, ed esteri;}$

R4 può essere  $\text{CH-(CH}_3\text{)}_2, \text{Indol-3-il, Phenil,}$

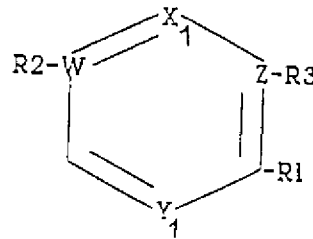
$\text{Cicloesil, CO-NH}_2, (\text{CH}_2\text{)}_3\text{-NH-Fmoc}$

X puo' essere  $\text{Xa, Xb, Xc, 5-Metossi-1-}$

$\text{-indanone-3-acetil, Naftoil,}$

$\text{Homoseril,}$

dove Xa è



in cui

X<sub>1</sub> puo' essere :  $\text{CH, N, C-OMe}$

W puo' essere :  $\text{C, N}$

Y<sub>1</sub> puo' essere :  $\text{CH, N}$

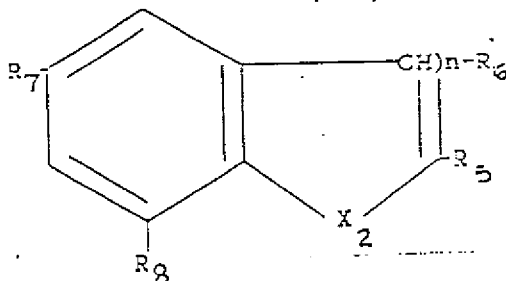
Z<sub>1</sub> puo' essere :  $\text{C, N}$

R<sub>1</sub> puo' essere : CO, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO, SO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CO,  
S-CH<sub>2</sub>-CO

R<sub>2</sub> puo' essere : OMe, H, NO<sub>2</sub>, Cl, OEt, CH<sub>3</sub>

R<sub>3</sub> puo' essere : OEt, H, OMe

Xb è



X<sub>2</sub> puo' essere : O, N, NH

n puo' essere : 1, 2

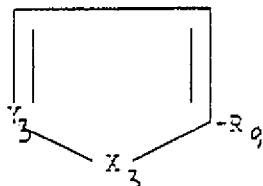
R<sub>6</sub> puo' essere : H

R<sub>7</sub> puo' essere : H, OH, OMe, Cl

R<sub>8</sub> puo' essere : H, OMe,

R<sub>5</sub> puo' essere : CO

Xc è



X<sub>3</sub> puo' essere : O, CH

Y<sub>3</sub> puo' essere : O, CH

R<sub>9</sub> puo' essere : CO

oppure un sale, estere od amide farmaceuticamente  
accettabile dei composti sopra definiti.

oppure

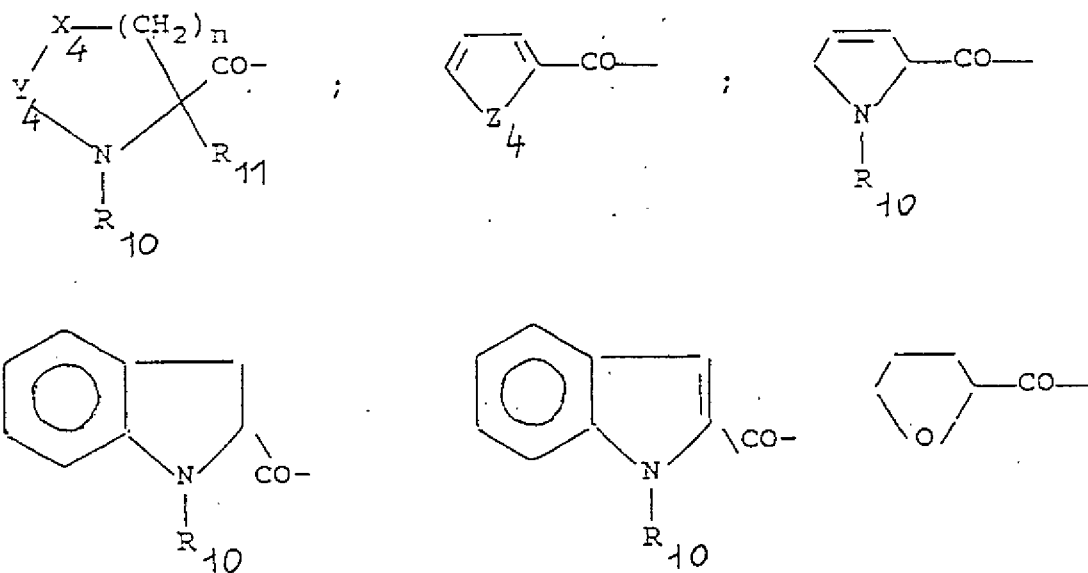
composti di formula

Q-B-T

formula (2)

in cui

Q è un radicale monovalente di una molecola ad anello scelta dal gruppo costituito da



in cui

X4 può essere CH<sub>2</sub>, S oppure CHOH

n può essere 0, 1, oppure 2

R<sub>11</sub> può essere H o CH<sub>3</sub>

R<sub>10</sub> può essere H, CH<sub>3</sub>, oppure un gruppo generico che blocca l' atomo di azoto quale usato nella sintesi dei peptidi, come CBZ, BOC, Fmoc e acetile

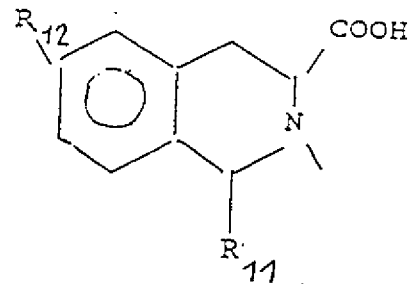
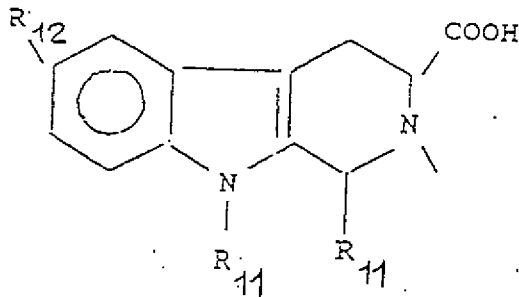
Y<sub>4</sub> può essere CH<sub>2</sub> oppure CO

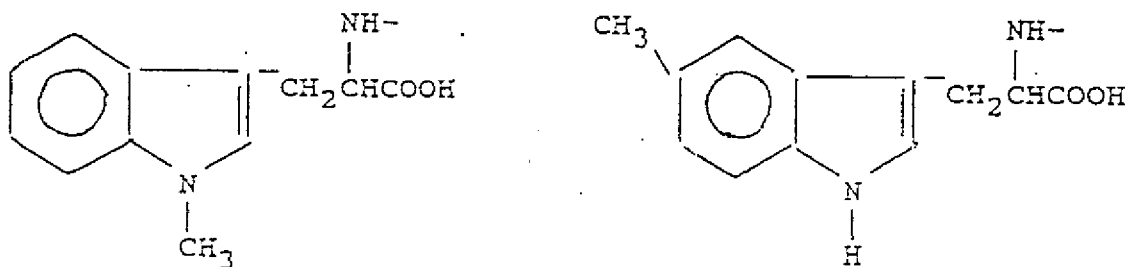
Z4 può essere NH, NCH<sub>3</sub>, O oppure S,

B è un radicale bivalente di un (L)-alfa-amminoacido scelto dal gruppo comprendente glicina, leucina, alanina o valina; e

T è il radicale monovalente di un (L)-amminoacido aromatico scelto dal gruppocomprendente triptofano, fenilalanina, fenilglicina, e loro sali esteri ed ammidi farmaceuticamente accettabili,

oppure uno dei composti qui di seguito indicati, o loro sali, esteri ed ammidi farmaceuticamente accettabili





in cui

R11 ha il significato sopra definito, e

R12 può essere H, OH, OCH<sub>3</sub>, oppure CH<sub>3</sub>.

oppure

composti di formula

E-X5-G

formula (3)

in cui

E indica p-GLU, PYR, PRO, Z-PRO

G indica TRP, PHE, TYR

X5 indica GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN,  
ILE, LEU, PRO, LYS e ARG

e loro sali, esteri ed ammidi farmaceuticamente  
accettabili.

4. Nuovi composti di formula

X-A-Cyt-Y

|

R<sub>4</sub>

formula (1)

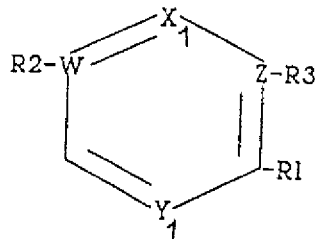
dove : A indica  $\text{NH-CH-CO}$  ;  
 |  
 $\text{CH}_2\text{-}$

Y indica  $\text{OH, NH}_2, \text{NHOH, N(CH}_3\text{)OH, ed esteri}$ ;

R4 può essere  $\text{CH-(CH}_3\text{)}_2, \text{Indol-3-il, Phenil,}$   
 $\text{Cicloesil, CO-NH}_2, (\text{CH}_2\text{)}_3\text{-NH-Fmoc}$

X puo' essere  $\text{Xa, Xb, Xc, 5-Metossi-1-}$   
 $\text{-indanone-3-acetil, Naftoil,}$   
 $\text{Homoseril,}$

dove Xa è



in cui

X1 puo' essere :  $\text{CH, N, C-OMe}$

W puo' essere :  $\text{C, N}$

Y1 puo' essere :  $\text{CH, N}$

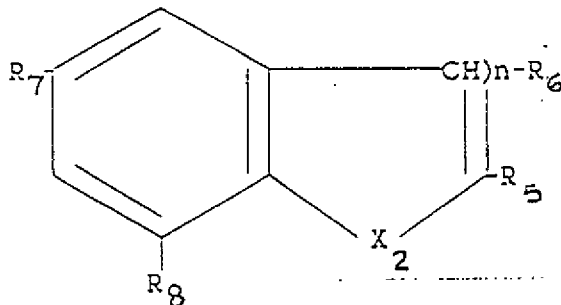
Z1 puo' essere :  $\text{C, N}$

R1 puo' essere :  $\text{CO, (CH}_2\text{)}_2\text{-CO, SO}_2, \text{CH}_2\text{-CO,}$   
 $\text{S-CH}_2\text{-CO}$

R2 puo' essere :  $\text{OMe, H, NO}_2, \text{Cl, OEt, CH}_3$

R3 puo' essere :  $\text{OEt, H, OMe}$

Xb è



X<sub>2</sub> puo' essere : O, N, NH

n puo' essere : 1,2

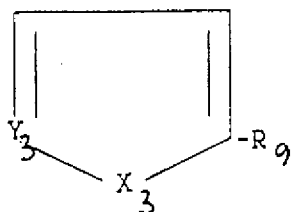
R<sub>6</sub> puo' essere : H

R<sub>7</sub> puo' essere : H, OH, OMe, Cl

R<sub>8</sub> puo' essere : H, OMe,

R<sub>5</sub> puo' essere : CO

X<sub>c</sub> è



X<sub>3</sub> puo' essere : O, CH

Y<sub>3</sub> puo' essere : O, CH

R<sub>9</sub> puo' essere : CO

oppure un sale, estere od amide farmaceuticamente accettabile dei composti sopra definiti.

5. Nuovi composti come prodotti intermedi per la produzione dei composti della formula (1) quali definiti nella rivendicazione (4) aventi la formula (L)-A(R<sub>4</sub>)-(S)-CytOMe, in cui A ed R<sub>4</sub> hanno il significato indicato nella rivendicazione 4.

6. Agente terapeuticamente attivo comprendente un composto quale rivendicato nella rivendicazione 4.

7. Agente terapeuticamente attivo per il trattamento di patologie connesse con l'

attivazione di metalloproteinasi endogene nei tessuti di mammiferi. comprendente un composto quale rivendicato nella rivendicazione 4.

8. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 7 per l'inibizione del rilascio di Tumor Necrosis Factor da parte di cellule di mammiferi incluso l'uomo comprendente un composto di formula (1) quale rivendicato nella rivendicazione 4:

9. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 8, per il trattamento di artrite, artrite reumatoide, shock settico, sclerosi multipla, immunodeficienza da infezioni virali.

10. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 8 o 9, in cui detto composto è PIC-(L)-LEU-(S)-Cyt-OH.

11. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 8 o 9, in cui detto composto è 2-FUR-(L)-Cha-(S)-Cyt-OH.

12. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 8 o 9, in cui detto composto è 4-MBZ-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH..

13. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 7, per l'inibizione della collagenasi prodotta da cellule umane comprendente

un composto quale rivendicato nella rivendicazione 4.

14. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 13, per il trattamento di risposta infiammatoria, artrite reumatoide, osteoartrosi, invasione tumorale, cicatrizzazione delle ferite, periodontite, ulcere corneali.

15. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 6, per antagonizzare gli effetti tossici e la letalità di veleni di serpenti comprendente un composto quale rivendicato nella rivendicazione 4.

16. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 15 in cui detti serpenti appartengono alle famiglie dei crotalidi e dei viperidi.

17. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 7, per antagonizzare i processi patologici che portano a micro emorragie interne comprendente un composto quale rivendicato nella rivendicazione 4.

18. Agente secondo la rivendicazione 17, per il trattamento di aterosclerosi e altre condizioni patologiche derivanti da lesioni del tessuto muscolare.

19. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 7, per inibire la motilità delle cellule coinvolte con la risposta infiammatoria a livello broncopolmonare.

20. Agente secondo la rivendicazione 19, per il trattamento enfisema polmonare, sindrome da difficoltà respiratoria nell' adulto, fibrosi interstiziale, malattia granulomatosa, tumore polmonare e malattia pleurica.

21. Agente secondo la rivendicazione 19 o 20 in cui detto composto è PIC-(L)-Leu-(S)-Cyt-OH.

22. Agente secondo la rivendicazione 19 o 20 in cui detto composto è 2-PCZ-(L)Leu-(S)-Cyt-OH

23. Agente secondo la rivendicazione 19 o 20 in cui detto composto è 4-MBZ-(Leu)-(S)-Cyt-OH.

24. Agente secondo la rivendicazione 19 o 20 in cui detto composto è HDC-(L)-Leu-(S)Cyt-OH.

25. Agente terapeuticamente attivo secondo la rivendicazione 7 per influenzare la risposta immunitaria di mammiferi comprendente un composto quale rivendicato nella rivendicazione 4.

26. Agente secondo la rivendicazione 25, per incrementare la proliferazione di linfociti T e la produzione di anticorpi.

27. Agente secondo la rivendicazione 25 per ostacolare le risposte di tipo allergico.

28. Uso di un composto della formula (2) oppure (3) quali definite nella rivendicazione 3, per la fabbricazione di un medicamento per il trattamento di patologie connesse con l'attivazione di metalloproteinasi endogene nei tessuti di mammiferi..

29. Uso secondo la rivendicazione 28 di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la fabbricazione di un medicamento per l'inibizione del rilascio di Tumor Necrosis Factor da parte di cellule di mammiferi incluso l'uomo.:

30. Uso di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la fabbricazione di un medicamento secondo la rivendicazione 29, per il trattamento di artrite, artrite reumatoide, shock settico, sclerosi multipla, immunodeficienza da infezioni virali.

31. Uso secondo la rivendicazione 29 o 30 in cui detto composto è Z-PRO-LEU-Cyt.

32.. Uso secondo la rivendicazione 28 di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la

fabbricazione di un medicamento per l'inibizione della collagenasi prodotta da cellule umane

33 . Uso di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la fabbricazione di un medicamento secondo la rivendicazione 32, per il trattamento di risposta infiammatoria, artrite reumatoide, osteoartrosi, invasione tumorale, cicatrizzazione delle ferite, periodontite, ulcere corneali.

34. Uso di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la fabbricazione di un medicamento per antagonizzare gli effetti tossici e la letalità di veleni di serpenti

35. Uso di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la fabbricazione di un medicamento secondo la rivendicazione 34 in cui detti serpenti appartengono alle famiglie dei crotalidi e dei viperidi.

36. Uso secondo la rivendicazione 34 o 35 in cui detto composto è. FUR-LEU-TRP.

37. Uso secondo la rivendicazione 28 di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la

fabbricazione di un medicamento per antagonizzare i processi patologici che portano a micro emorragie interne.

38. Uso secondo la rivendicazione 36 per il trattamento di aterosclerosi e altre condizioni patologiche derivanti da lesioni del tessuto muscolare.

39. Uso secondo la rivendicazione 37 o 38 in cui detto composto è Z-PRO-LEU-Cyt.

40. Uso secondo la rivendicazione 28 di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la fabbricazione di un medicamento per inibire la motilità delle cellule coinvolte con la risposta infiammatoria a livello broncopolmonare.

41. Uso secondo la rivendicazione 40 per il trattamento enfisema polmonare, sindrome da difficoltà respiratoria nell' adulto, fibrosi interstiziale, malattia granulomatosa, tumore polmonare e malattia pleurica.

42. Uso secondo la rivendicazione 40 o 41 in cui detto composto è Z-PRO-LEU-Cyt.

43.. Uso secondo la rivendicazione 40 o 41 in cui detto composto è FUR-LEU-Cyt.

44. Uso secondo la rivendicazione 28 di un composto della formula (2) oppure (3) quale definita nella rivendicazione 3 per la fabbricazione di un medicamento per influenzare la risposta immunitaria di mammiferi.

45. Uso secondo la rivendicazione 44, per incrementare la proliferazione di linfociti T e la produzione di anticorpi.

46. Uso secondo la rivendicazione 44 per antagonizzare le risposte di tipo allergico.

p.p. Polifarma S.P.A.

*F* *Bianchi*  
**Olberto Tonon**  
(Iscr. Albo n. 83)

