



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	102000900881031
Data Deposito	12/10/2000
Data Pubblicazione	12/04/2002

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

FARMACI PER IL DIABETE.

Descrizione dell'invenzione industriale a nome:

NICOX S.A., di nazionalità francese, con sede in 1900 Route des Crêtes, 06560 Valbonne Sophia Antipolis - Francia.

* * * * *

MI 2000 A 00 2 2 0 1

La presente invenzione riguarda specifiche classi di composti e il loro uso per il trattamento del diabete.

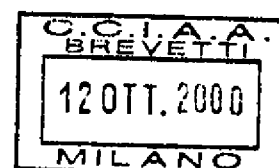
Più in particolare si riferisce al trattamento del diabete di tipo 2.

Come è ben noto, convenzionalmente si usa suddividere il diabete in due tipi: diabete di tipo 1, che si manifesta principalmente nei soggetti di età giovanile, e diabete di tipo 2, che colpisce soggetti in età matura.

Il diabete di tipo 1 viene trattato con successo con insulina; mentre il diabete di tipo 2 risponde solo parzialmente alla terapia insulinica. Il diabete di tipo 2 è quello più frequente, particolarmente nell'anziano. Si calcola che circa il 18-20% della popolazione sopra i 65 anni ne sia affetta (National Diabetes Data Group "Diabetes in America" 2nd ed. Harris M. Ed. Bethesda, National Institutes of Health, 1995). In considerazione del progressivo invecchiamento della popolazione (gli ultrasessantacinquenni rappresentano ormai oltre il 15% della popolazione) è evidente che il trattamento di questa malattia rappresenta una esigenza medica e sociale prioritaria.

Esistono anche forme di diabete in cui il tipo 1 ed il tipo 2 sono presenti contemporaneamente.

(HF 2326/061)



La resistenza insulinica assume un'importanza clinica rilevante (Trends in Pharm. Sci. 21, 259-265, 2000) sia in relazione alla malattia primaria che alle sue complicazioni (malattie vascolari, retinopatia, polineuropatia, gastroenteropatia, nefropatia, etc.) (Martindale, The Extra Pharmacopoeia p.342,1996).

Come viene specificato anche in una recente pubblicazione (Trends in Pharm. Sci. 21, 259-265, 2000) l'esigenza sopra indicata risulta ancora insoddisfatta in quanto nessun farmaco è in grado di fronteggiare efficacemente la malattia e le sue complicanze.

I farmaci usati nella terapia del diabete appartengono alle seguenti classi terapeutiche, definite in base al ruolo patogenetico della resistenza insulinica (Trends in Pharm. Sci. 21, 259-265 2000) : insulina, sulfaniluree, metformina, inibitori della alfa-glicosidasi (acarbosio) e tiazolidinedioni (troglitazone).

L'insulina è il farmaco più noto ed è quello di riferimento. La terapia insulinica presenta i seguenti inconvenienti:

- il farmaco è somministrabile solo per via parenterale,
- è necessario controllare costantemente i livelli di glicemia,
- possono insorgere reazioni locali allergiche,
- la resistenza insulinica costringe ad aumentare significativamente il dosaggio del farmaco nel tempo,

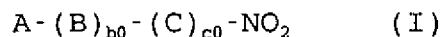
- la tollerabilità locale è scarsa.

Anche gli altri approcci terapeutici non sono esenti da inconvenienti, talora anche rilevanti. Ad esempio le sulfaniluree, che vengono somministrate da sole o in combinazione con insulina o con altri farmaci orali ipoglicemizzanti, possono provocare ipoglicemia. La metformina che viene usata da sola od in combinazione con la sulfanilurea, è controindicata in presenza di malattie renali ed epatiche, e può indurre uno stato di acidosi lattica. L'acarbosio è usato da solo od in combinazione con la sulfanilurea per diminuire i livelli glicemici postprandiali ma frequentemente induce effetti collaterali a livello del sistema gastrointestinale. Il troglitazone, che viene usato solamente in combinazione con insulina, può indurre effetti epatotossici.

Era sentita l'esigenza di avere a disposizione farmaci che potessero venire somministrati a pazienti diabetici, anche in trattamento con farmaci ipoglicemizzanti, preferibilmente insulina, e che fossero in grado di potenziarne l'effetto antidiabetico diretto, cioè a livello pancreatico, e di ridurre le complicanze del diabete, in particolare le malattie vascolari, le retinopatie, neuropatie, gastroenteropatie, nefropatie, etc.

E' stato ora sorprendentemente e inaspettatamente trovato che questo problema tecnico può essere risolto con la classe di farmaci che viene sotto descritta.

Costituisce un oggetto dell'invenzione l'uso nel trattamento del diabete, preferibilmente di tipo 2, di composti o loro sali, aventi la seguente formula generale:



in cui:

c_0 è un intero ed è 0 oppure 1;

b_0 è un intero ed è 0 oppure 1; con la condizione che almeno uno fra c_0 e b_0 è diverso da zero;

$A = R-T_1-$, in cui

R è il radicale di un farmaco e

$T_1 = (CO)_t$ oppure $(X)_{t'}$, dove $X = O, S, NR_{1c}, R_{1c}$ è H oppure un alchile lineare o ramificato, avente da 1 a 5 atomi di carbonio, t e t' sono interi ed uguali a zero oppure 1, con la condizione che $t = 1$ quando $t' = 0$; $t = 0$ quando $t' = 1$;

$B = -T_B-X_2-T_{BI}-$ in cui

T_B e T_{BI} sono uguali o diversi;

$T_B = (CO)$ quando la funzione reattiva nel farmaco precursore è $-OH$ oppure $-NH_2$; $T_B = X$, come sopra definito, quando la funzione reattiva nel farmaco precursore è $-COOH$;

$T_{BI} = (CO)_{tx}$ oppure $(X)_{txx}$, in cui tx e txx hanno il valore di 0 oppure 1; con la condizione che $tx = 1$ quando $txx = 0$, $tx = 0$ quando $txx = 1$; X è come sopra definito;

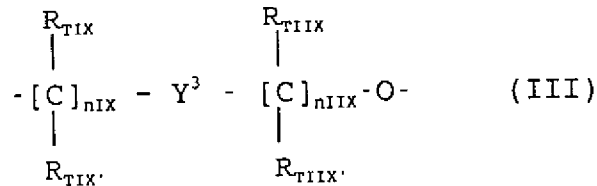
X_2 è un pontante bivalente come sotto definito;

C é il radicale bivalente $-T_c-Y-$ in cui

$T_c = (CO)$ quando $tx = 0$, $T_c = X$ quando $txx = 0$, essendo X come sopra definito;

Y é:

Y_p :



in cui:

nIX é un intero compreso tra 0 e 3, preferibilmente

1;

$nIIX$ é un intero compreso tra 1 e 3, preferibilmente

1;

R_{TIX} , $R_{TIX'}$, R_{TIIIX} , $R_{TIIIX'}$, uguali o diversi tra loro sono H oppure alchile lineare o ramificato C_1-C_4 ; preferibilmente R_{TIX} , $R_{TIX'}$, R_{TIIIX} , $R_{TIIIX'}$ sono H.

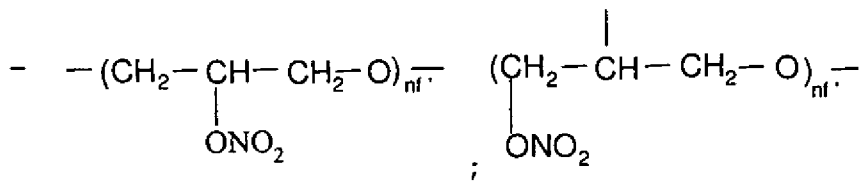
Y^3 é un anello eterociclico contenente uno o due atomi di azoto, saturo, insaturo o aromatico, a 5 o 6 atomi,

oppure Y può essere:

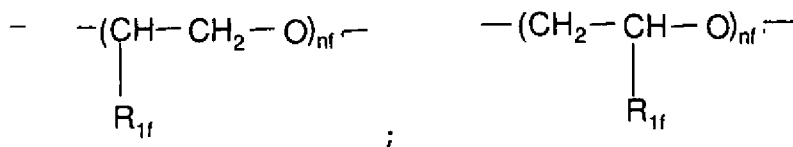
Y_0 , scelto tra i seguenti:

- un gruppo alchilenossi $R'O$ in cui R' é C_1-C_{20} lineare o ramificato quando possibile, avente preferibilmente da 2 a 6 atomi di carbonio, oppure un cicloalchilene avente da 5 a 7 atomi di carbonio, nell'anello cicloalchilenico uno o più atomi di carbonio

possono essere sostituiti da eteroatomi, l'anello può avere catene laterali di tipo R', essendo R' come sopra definito; oppure uno dei seguenti gruppi:

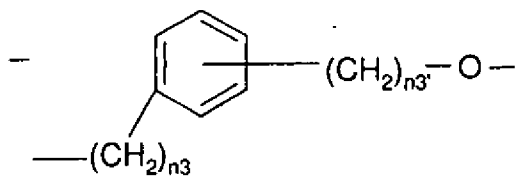


in cui n_f' è un intero da 1 a 6 preferibilmente da 1 a 4;

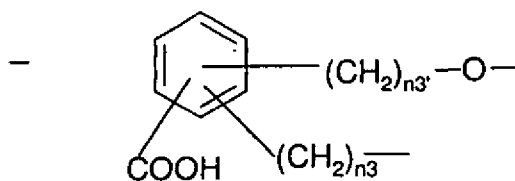


in cui $\text{R}_{1f} = \text{H}, \text{CH}_3$ e n_f è un intero da 1 a 6; preferibilmente da 1 a 4;

oppure Y è Y_{Ar} ed è scelto tra i seguenti:



in cui n_3 è un intero da 0 a 3 ed n_3' è un intero da 1 a 3;



in cui n_3 ed n_3' hanno il significato sopra indicato

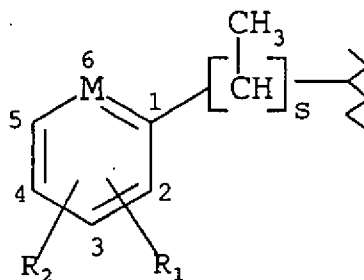
- X_2 , radicale bivalente, é tale che il corrispondente precursore di B, $-T_B-X_2-T_{BI}-$ in cui le valenze libere di T_B e di T_{BI} sono saturate ciascuna con OZ, con Z oppure con $N(Z^I)(Z^{II})$, in cui $Z = H, C_1-C_{10}$, preferibilmente C_1-C_5 alchile lineare o ramificato quando possibile, Z^I, Z^{II} uguali o diversi hanno i valori di Z come sopra definito, a seconda che T_B e/o $T_{BI} = CO$ oppure X, in funzione dei valori di t, t', tx e txx;

quando nella formula (I) $b_0 = 1$

- se il precursore di B come sopra definito soddisfa il test 4a e non soddisfa il test 5 come sotto descritti, allora $c_0 = 0$;
- se il precursore di B soddisfa entrambi i test 4a e 5, ma non soddisfa il test 4 come sotto descritto, allora $c_0 = 0$ oppure 1, e Y preferibilmente è Y_0 ;
- se il precursore di B soddisfa il test 4, allora $c_0 = 1$ e Y è preferibilmente Y_0 ;

quando nella formula (I) $b_0 = 0, c_0 = 1$ e $Y = Y_p$ o Y_{Ar} ;

R è il radicale di un farmaco precursore avente la seguente formula:



(AII)

in cui:

s è un intero ed è zero oppure 1;

R_1 è H, $COOR_3$, $OCOR_3$, essendo R_3 metile, etile o alchile C_3 - C_5 lineare o ramificato; un anello aromatico a 5 o 6 atomi di carbonio, preferibilmente a 6 atomi, che può essere sostituito in posizione orto, meta o para con uno o più gruppi R_2 , preferibilmente con gruppi ossidrile a. acetilossi in posizione 2 ed acetilammino in posizione 4; $CONHCOR_3$; o il residuo di un eterociclo ad un solo anello avente 5 o 6 atomi che può essere aromatico, parzialmente o totalmente idrogenato, contenente uno o più eteroatomi scelti indipendentemente fra O, N e S;

R_2 = H, OH, alogeno preferibilmente bromo, alchile da 1 a 4 atomi di carbonio R_4 , lineare o ramificato quando possibile, $-OR_4$; $-COR_4$; un perfluoroalchile da 1 a 4 atomi di carbonio, lineare o ramificato quando possibile, ad esempio trifluorometile; nitro, $-NH_2$, $-NHR_4$, $-N(R_4)_2$, in cui R_4 è come sopra definito, $-OSO_3H$, acetilammino; $-CONH_2$;

con la condizione che R_1 e R_2 non possono essere contemporaneamente idrogeno;

M è un atomo di carbonio oppure di azoto;

in cui il test 4A che deve essere soddisfatto dal composto precursore di B, è un test in vitro in cui eritrociti isolati con tecniche standard da ratti maschi Wister, sono sospesi a 4°C per 4 giorni in una soluzione fisiologica tamponata a pH 7,4 con tampone fosfato; al termine, dopo aver centrifugato

a 1000 giri al minuto per 5 minuti un'aliquota di sospensione, si diluiscono 0,1 ml degli eritrociti centrifugati a 50 ml con tampone sodio fosfato pH 7,4, da cui vengono prelevate aliquote (n. 5 campioni) di 3,5 ml che sono incubate a 37°C in presenza di cumene idroperossido (270 µM in etanolo), che lissando le cellule provoca nella sospensione un aumento della torbidità, che viene determinata a 710 nm a intervalli di 30 minuti per stabilire il tempo (Tmax) a cui si ha il massimo di emolisi o massima torbidità (100% di emolisi); soluzioni etanoliche 2mM dei precursori di B vengono preincubate per 30 minuti con aliquote da 3,5 ml della sospensione diluita di eritrociti preparata dopo centrifugazione (prove eseguita su 5 campioni per ogni precursore di B), aggiungendo poi cumene idroperossido, e al tempo Tmax misurando la percentuale di emolisi nel campione, espressa come rapporto tra l'assorbanza della sospensione del campione e quella della sospensione contenente solo cumene idroperossido; i precursori di B superano il test 4A se inibiscono l'emolisi indotta da cumene idroperossido in percentuale >15%;

- in cui il test 5 é il seguente: é una determinazione analitica eseguita aggiungendo aliquote di soluzioni metanoliche di concentrazione 10^{-4} M del precursore di B a una soluzione contenente aliquote di 2 mM desossiribosio in acqua, 100 mM di tampone fosfato e 1 mM del sale misto $Fe^{II}(NH_4)_2(SO_4)_2$; dopo aver condizionato la soluzione a 37°C per un'ora si aggiun-

gono, nell'ordine, aliquote di acido tricloroacetico 2,8% e di acido tiobarbiturico 0,5 M, si scalda a 100°C per 15 minuti e si legge l'assorbanza della soluzione in esame a 532 nm; poi si determina la percentuale di inibizione del precursore di B verso la produzione di radicali attraverso la formula :

$$(1 - A_s/A_c) \times 100$$

in cui A_s e A_c sono rispettivamente i valori di assorbanza della soluzione contenente il composto in esame e il sale di ferro e quella della soluzione contenente solo il sale di ferro, il composto soddisfa il test 5 quando la percentuale di inibizione come sopra definita del precursore di B é maggiore o uguale del 50%.

- in cui il test 4 é il seguente: é una determinazione analitica eseguita aggiungendo aliquote di soluzioni metanoliche di concentrazione 10^{-4} M del precursore di B a una soluzione metanolica di DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl); dopo aver conservato la soluzione a temperatura ambiente e al riparo dalla luce per 30 minuti, si legge l'assorbanza della soluzione in esame e di una soluzione contenente solamente DPPH nella stessa quantità, alla lunghezza d'onda di 517 nm; poi si determina la percentuale di inibizione del precursore di B verso la produzione di radicali indotta da DPPH attraverso la formula :

$$(1 - A_s/A_c) \times 100$$

in cui A_s e A_c sono rispettivamente i valori di assorbanza della soluzione contenente il composto in esame e DPPH e quello della soluzione contenente solo DPPH,

il criterio di accettazione dei composti secondo questo test é il seguente : il test 4 é soddisfatto dai composti precursori di B se la percentuale di inibizione come sopra definita é maggiore o uguale del 50%.

I composti preferiti della formula (AII) quando $s = 0$ sono i seguenti:

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è idrogeno, ed R_2 è un gruppo ossidrilico in posizione 2 e la valenza libera è saturata con il gruppo COOH. il composto è noto come Acido salicilico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è idrogeno, R_1 è $CH_3CONHCO-$ ed è in posizione 2 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo OH, il composto è noto come Salacetamide;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è $CONH_2$ ed è in posizione 2 dell'anello, R_1 è H e la valenza libera è saturata con un gruppo OH, il composto è noto come Salicilamide;

quando nella formula (AII) M è azoto, R_1 è idrogeno, R_2 è metile in posizione 3 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo NH_2 , il composto è noto come 2-Amminopicolina;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è idrogeno, R_2 è un gruppo $-\text{OSO}_3\text{H}$ in posizione 2 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo COOH , il composto è noto come acido Salicilsolforico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è idrogeno, R_1 è un gruppo $-\text{OCOR}_3$ con $R_3 =$ metile, in posizione 2 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo $-\text{COOH}$, il composto è noto come Acido acetilsalicilico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è un atomo di bromo in posizione 5, R_1 è un gruppo $-\text{OCOR}_3$ con $R_3 = \text{CH}_3$ in posizione 2 e la valenza libera è saturata con $-\text{COOH}$, il composto è noto come Acido 5-bromosalicilico acetato;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è idrogeno, R_1 è in posizione 2 ed è un gruppo $-\text{OCOR}_3$ con R_3 uguale a 2-(acetilossi)fenile e la valenza libera del radicale fenile della formula (AII) è saturata con un gruppo COOH il composto è noto come Acido acetilsalicilsalicilico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è in posizione 2 ed è il residuo $-\text{OCOR}_3$ dove R_3 è 2-(idrossi)fenile, R_2 è idrogeno e la valenza libera è saturata con un gruppo COOH , il composto è noto come Salsalato;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è in posizione 2 ed è il residuo $-\text{COOR}_3$ essendo R_3 fenile, R_2 è idrogeno e la valenza libera è saturata con un gruppo OH , il composto è noto come Fenilsalicilato;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è in posizione 2 ed è il residuo $-COOR_3$, essendo R_3 il gruppo 4-(acetilammino)fenile, R_2 è idrogeno e la valenza libera è saturata con il gruppo OH, il composto è noto come Acetaminosalol.

Quando nella formula (AII) $s = 1$, $R_1 = H$, $R_2 = -CH_2CH(CH_3)_2$ in posizione 4 dell'anello, M è atomo di carbonio e la valenza libera è saturata con COOH il composto è noto come Ibuprofen.

Il composto precursore di B (precursore del radicale X_2 nella formula (I)) che soddisfa il test 4 è scelto preferibilmente nelle seguenti classi di composti:

- Aminoacidi, scelti tra i seguenti: L-carnosina, anserina, selenocisteina, selenometionina, penicilamina, N-acetilpenicilamina, cisteina, N-acetilcistena, glutatione o suoi esteri, preferibilmente estere etilico o isopropilico;
- idrossiacidi, scelti tra i seguenti : acido gallico, acido ferulico, acido gentisico, acido citrico, acido caffeico, acido p-cumarico, acido vanillico;
- Mono- e polialcooli aromatici ed eterociclici, scelti tra i seguenti: acido nordiidroguaiaretico, quercetina, catechina, kaempferolo, sulfuretina, acido ascorbico, acido isoascorbico, idrochinone, gossypol, acido reductico, metossiidrochinone, idrossiidrochinone, propil gallato, saccarosio, 3,5-di-tertbutil-4-idrossibenziltio glicollato, alcool p-cumarico, 4-idrossi-feniletalcolool, alcool coniferilico;

- composti contenenti almeno una funzione acida libera, scelti tra i seguenti: acido 3,3'-tiodipropionico, acido fumarico, acido diidrossimaleico, acido tioctico, acido edetico, bilirubina.

Preferibilmente il composto precursore di B che soddisfa il test 5, é scelto tra i seguenti composti:

- aminoacidi: acido aspartico, istidina, 5-idrossi triptofano, acido 4-tiazolidincarbossilico, acido 2-oxo-4-tiazolidin carbossilico;
- mono e polialcool o tioli: 2-tiouracile, 2-mercaptoetanolo, esperidina, secalciferolo, 1- α -OH vitamina D2, flocalcetriolo, 22-oxacalcetriolo, 24,28-metilene-1 α -idrossivitamina D2;
- acido succinico.

Nella formula (I) i composti precursori di B che soddisfano il test 4A e non soddisfano il test 5 sono ad esempio i seguenti: 1,4-butandiolo, acido 6-idrossiesanoico, acido 4-idrossibutirrico, N-metildietanolammina, dietilenglicole, tiodietilenglicole, 1,4-diossan-2,6-dimetanolo, tetraidropirano-2,6-dimetanolo, 4H pirano-1,4-2,6-dimetanolo, tetraidrotiopirano-2,6-dimetanolo, 1,4-ditiano-2,6-dimetanolo, cicloesene-1,5-dimetanolo, tiazol-2,5-dimetanolo, tiofene-2,5-dimetanolo, ossazol-2,5-dimetanolo, preferibilmente N-metildietanolammina, dietilenglicole, tiodietilenglicole.

I composti precursori di B dei gruppi sopra indicati vengono preparati secondo i metodi noti in letteratura e descritti, ad esempio, nel "The Merck Index, 12a Ed. (1996), qui integralmente incorporato per riferimento. Quando disponibili, si possono impiegare i corrispondenti isomeri e isomeri ottici. 24,28-metilene-1 α -idrossivitamina D2 viene preparato secondo EP 578494.

Più in particolare, i test sopra riportati sono i seguenti:

Il test 4 é un saggio colorimetrico che consente di stabilire se i precursori di B sono in grado di inibire la produzione di radicali da parte di DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (M.S. Nenseter et Al., Atheroscler. Thromb. 15, 1338-1344, 1995). Vengono preparate soluzioni 100 μ M in metanolo delle sostanze in esame, ed una aliquota di esse viene aggiunta a una soluzione 0,1 M metanolica di DPPH. Dopo aver conservato le soluzioni a temperatura ambiente e al riparo dalla luce per 30 minuti si legge l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 517 nm. Si determina la diminuzione di assorbanza rispetto a quella della soluzione che contiene la stessa concentrazione di DPPH. La capacità del composto in esame di inibire la produzione di radicali viene espressa attraverso la seguente formula :

$$(1 - A_s/A_c) \times 100$$

in cui A_s e A_c sono rispettivamente i valori di assorbanza della soluzione contenente il composto in esame assieme a DPPH e della soluzione contenente solo DPPH.

Il precursore di B soddisfa il test 4 se la capacità di inibire la produzione di radicali, come sopra definita, è uguale o maggiore del 50% alla concentrazione indicata (10^{-4} M).

Il test 5 è un saggio colorimetrico in cui aliquote da 0,1 ml di soluzioni in metanolo dei precursori di B a concentrazione finale 10^{-4} M vengono aggiunte a una soluzione formata da 0,2 ml di 2 mM desossiribosio, 0,4 ml di tampone fosfato pH 7,4 100 mM e 0,1 ml di 1 mM $Fe^{II}(NH_4)_2(SO_4)_2$ in 2mM HCl. Le provette contenenti le miscele di reazione vengono quindi conservate a 37°C per un'ora. Vengono poi aggiunti in ogni provetta, nell'ordine, 0,5 ml di una soluzione 2,8% in acqua di acido tricloroacetico e 0,5 ml di una soluzione acquosa 0,1 M di acido tiobarbiturico. Viene costituito un bianco in cui si aggiunge la stessa aliquota di 0,1 ml di metanolo senza i composti in esame. Si chiudono le provette e si scalda in bagno di olio a 100°C per 15 minuti. Si sviluppa una colorazione rosa la cui intensità è proporzionale alla degradazione ossidativa del desossiribosio. Si raffredda a temperatura ambiente e si determina l'assorbanza delle soluzioni a 532 nm. La percentuale di inibizione del precursore di B verso la produzione di radicali viene calcolata attraverso la formula :

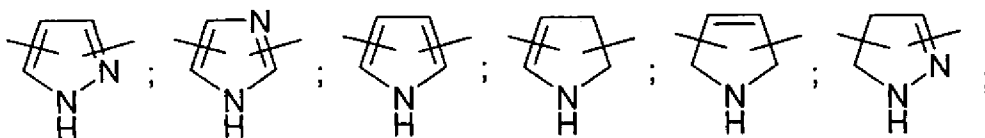
$$(1 - A_s/A_c) \times 100$$

in cui A_s e A_c sono rispettivamente i valori di assorbanza della soluzione contenente il composto in esame e il sale di ferro e quella della soluzione contenente solo il sale di ferro, il composto soddisfa il test 5 quando la percentuale di inibizione di produzione di radicali come sopra definita da parte del precursore di B é maggiore o uguale del 50%;

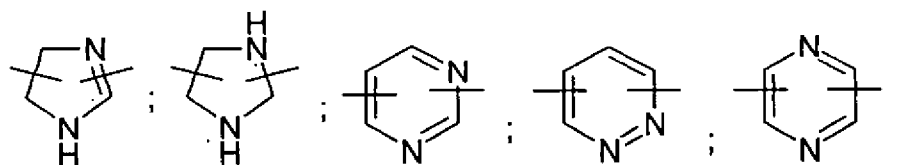
Il test 4A viene eseguito secondo il metodo descritto da R. Maffei Facino, M. Carini G. Aldini, M.T. Calloni, Drugs Exptl. Clin. Res. XXIII (5/8) 157-165 1997. Il test 4A è un test in vitro in cui eritrociti isolati con tecniche standard da ratti maschi Wister (Charles River), sono sospesi per 4 giorni in soluzione fisiologica a 4°C tamponata a pH 7,4 con tampone fosfato. Dopo questo periodo si preleva un'aliquota di sospensione, si centrifuga a 1000 giri al minuto per 5 minuti e 0,1 ml degli eritrociti centrifugati vengono diluiti a 50 ml con tampone sodio fosfato ottenendo una sospensione di eritrociti allo 0,2% in volume. 5 aliquote da 3,5 ml della sospensione diluita vengono incubate a 37°C in presenza di cumene idroperossido (270 µM in etanolo). Questa sostanza provoca la lisi delle cellule, che si manifesta con un aumento della torbidità della sospensione; l'andamento della lisi cellulare può essere seguito per turbidimetria a 710 nm, effettuando le misurazioni a intervalli di 30 minuti in modo da determinare il tempo (Tmax) a cui si ha il massimo di emolisi o massima tor-

bidità. Il Tmax così determinato viene assunto come tempo corrispondente al 100% di lisi degli eritrociti. Per la determinazione della inibizione dell'emolisi indotta da cumene idroperossido, soluzioni etanoliche 2mM dei precursori di B vengono preincubate per 30 minuti con aliquote da 3,5 ml della sospensione di eritrociti come sopra preparata (n. 5 campioni per ogni composto precursore di B), si aggiunge cumene idroperossido nelle stesse quantità sopra indicate e si misura la percentuale di emolisi nel campione al tempo Tmax come rapporto tra l'assorbanza della sospensione del campione e quella della sospensione contenente solo cumene idroperossido; i precursori di B superano il test se inibiscono l'emolisi indotta da cumene idroperossido in una percentuale >15%;

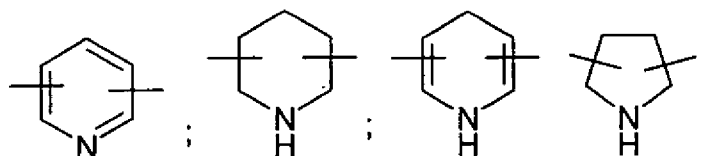
Preferibilmente Y³ é scelto tra i seguenti:



(Y1) (Y2) (Y3) (Y4) (Y5) (Y6)



(Y7) (Y8) (Y9) (Y10) (Y11)



(Y12) (Y13) (Y14) (Y15)

Preferibilmente Y^3 è un anello aromatico a 6 atomi, contenente un atomo di azoto, detto anello aromatico avente le due valenze libere rispettivamente nelle posizioni 2 e 6, o 2 e 3 oppure 2 e 5 rispetto all'eteroatomo.

Il preferito di Y^3 è Y_{12} (piridile) sostituito come sopra indicato. I legami possono trovarsi anche in posizione non simmetrica, ad es. Y_{12} (piridile) può essere sostituito anche in posizione 2 e 3; Y_1 (pirazolo) può essere 3,5-disostituito.

I composti di formula (I) possono essere trasformati nei corrispondenti sali. Ad esempio un modo per preparare i sali è il seguente: se è presente nella molecola un atomo di azoto sufficientemente basico da poter essere salificato, si fa reagire il composto di formula (I) in solvente organico, come ad es. acetonitrile, tetraidrofurano, con una quantità equimolecolare del corrispondente acido, organico o inorganico.

Esempi di acidi organici sono: acido ossalico, tartarico, maleico, succinico, citrico.

Esempi di acidi inorganici sono: acido nitrico, cloridrico, solforico, fosforico. Preferiti sono i cloridrati ed i nitrati.

Quando nella formula (I) $c_0 = 0$ e $b_0 = 1$ i composti preferiti sono quelli in cui nel radicale R di formula (AII) $s = 0$, $R_1 = H$, R_2 è in posizione 2 dell'anello aromatico ed è OH o acetilossi, B è un residuo di un polialcool aromatico, preferibilmente di un idrossimetilfenolo; quando nella formula (I)

$c_0 = 1$ e $b_0 = 0$ i composti preferiti sono quelli in cui nel radicale R di formula (AII) $s = 0$, $R_1 = H$, R_2 è in posizione 2 dell'anello aromatico ed è OH o acetilossi, C è Y_p dove Y_p è preferibilmente il residuo di bis(idrossimetil)piridina; quando nella formula (I) $c_0 = 1$ e $b_0 = 1$ i composti preferiti sono quelli in cui nel radicale R di formula (AII) e quando:

- $s = 0$, $R_1 = H$, R_2 è in posizione 2 dell'anello aromatico ed è OH o acetilossi, B è il residuo dell'acido ferulico e Y è Y_0 . preferibilmente un alchilene C_4 .
- $s = 1$ $R_1 = H$, R_2 è in posizione 4 dell'anello aromatico ed è $CH_2CH(CH_3)_2$, B è il residuo di N-acetilcisteina e Y è Y_0 preferibilmente un alchilene C_4 .

I composti preferiti secondo la presente invenzione sono quelli in cui il farmaco ha formula (AII) ed i composti di formula (I) sono i seguenti: acido 2-acetilossibenzoico 6-(nitrossimetil)-2-metilpiridinil estere cloridrato o nitrato, acido 2-acetilossibenzoico 3-nitrossi metilfenil estere, acido 2-acetilossibenzoico 4-(nitrossimetil) fenil estere, acido 2-acetilossibenzoico 5-(nitrossimetil)-2-metilpiridinil estere cloridrato o nitrato, acido 2-(acetilossi)benzoico 3-(nitrossimetil)-2-metil piridinil estere cloridrato o nitrato.

Come detto, i nitroderivati dell'invenzione vengono somministrati a pazienti affetti da diabete sia di tipo 1 che di tipo 2, o nei casi in cui siano presenti entrambi (le cosiddette forme intermedie di diabete). I composti dell'invenzione possono anche essere somministrati a pazienti già in tratta-

mento con farmaci ipoglicemizzanti, preferibilmente insulina. I composti dell'invenzione sono in grado di potenziare l'effetto antidiabetico diretto, cioè a livello pancreatico, e di ridurre una o più complicanze del diabete, in particolare le complicanze vascolari ed anche le retinopatie, neuropatie, gastroenteropatie, nefropatie, etc.

I composti dell'invenzione sono particolarmente efficaci nel trattamento del diabete di tipo 2, per i quali nessun prodotto commerciale è stato trovato completamente soddisfacente.

I composti dell'invenzione vengono sintetizzati con i metodi di sintesi qui sotto indicati.

La scelta delle reazioni per ciascun metodo dipende dal gruppo reattivo presente nella molecola del farmaco, nel composto precursore di B, e nel composto precursore di C.

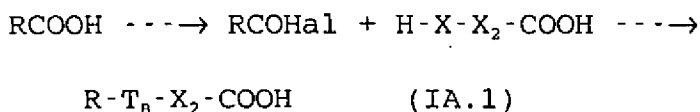
Le reazioni vengono effettuate con metodi ben noti nell'arte, che consentono di ottenere i legami tra il farmaco, il composto precursore di B e il composto precursore di C come sopra definiti.

Qualora la funzione reattiva del farmaco (ad es. -COOH, -OH) sia impegnata in un legame di tipo covalente, ad es. del tipo estere, ammido, etere, detta funzione può venire ripristinata con i metodi ben noti nell'arte.

Si riportano qui di seguito alcuni schemi di sintesi per ottenere i composti dell'invenzione.

A) Sintesi dei composti di formula (I).

1. Sintesi del composto ottenuto per reazione tra il farmaco ed il composto precursore di B.
- 1a. Se la molecola del farmaco contiene una funzione carbossilica (formula generale: R-COOH) e il gruppo funzionale del composto precursore di B che si lega alla funzione carbossilica ha formula XZ, essendo X come sopra definito e Z = H, le reazioni che si effettuano dipendono dalla natura del secondo gruppo reattivo presente nel composto precursore di B.
- 1a.1 Se il secondo gruppo reattivo presente nel composto precursore di B é un gruppo carbossilico, lo schema generale della sintesi prevede la formazione iniziale dell'acil alogenuro del farmaco R-COHal (Hal = Cl, Br) e la successiva reazione con il gruppo HX del composto precursore di B:



X₂, T_b essendo come sopra definiti.

Se nei due composti sono presenti altri gruppi funzionali COOH e/o HX, essi devono venire protetti prima della reazione secondo i metodi noti nell'arte; ad esempio come descritto nel volume di Th. W. Greene : "Protective groups in organic synthesis", Harvard University Press, 1980.

L'acilalogenuro RCOHal viene preparato secondo i metodi noti nell'arte, ad es. mediante tionil o ossalil cloruro,

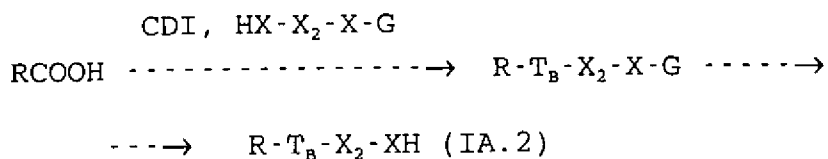
alogenuri di P^{III} o P^V in solventi inerti nelle condizioni di reazione, come ad es. toluene, cloroformio, DMF, ecc.

In particolare, se il gruppo HX del composto precursore di B é NH₂, oppure OH o SH, il farmaco di formula R-COOH viene prima convertito nel corrispondente acil alogenuro RCOHal, come sopra indicato, e poi fatto reagire con il gruppo HX del composto precursore di B in presenza di una base organica, come trietilammina, piridina, ecc. impiegando un solvente inerte nelle condizioni di reazione come toluene, tetraidrofurano, ecc. a una temperatura compresa tra 0°C e 25°C.

In alternativa alla sintesi precedente, il farmaco di formula R-COOH può essere trattato con un agente attivante il carbossile scelto tra N,N'-carbonildiimidazolo (CDI), N-idrossibenzotriazolo e dicicloesilcarbodiimide in solvente come ad es. DMF, THF, cloroformio ecc. a una temperatura compresa tra -5°C e 50°C e il composto ottenuto fatto reagire in situ con la funzione reattiva del composto precursore di B per ottenere il composto di formula (IA.1).

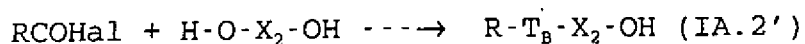
1a.2 Se il composto precursore di B contiene due gruppi funzionali XZ, uguali o diversi tra loro, essendo X come sopra definito e Z = H, il farmaco di formula R-COOH viene prima trattato con un agente attivante il carbossile, come sopra descritto in 1a.1, e poi con il composto pre-

cursore di B, dopo aver protetto uno dei due gruppi reattivi HX, ad es. con acetile oppure ter-butilossicarbonile, ripristinando la funzione iniziale alla fine della sintesi. Lo schema é il seguente:



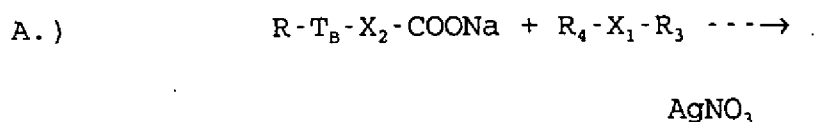
in cui X, T_B, X₂ sono come sopra definiti e G é un gruppo protettivo della funzione HX.

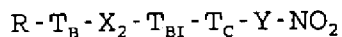
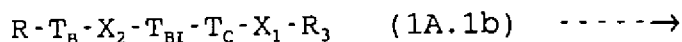
In alternativa quando i due gruppi funzionali di B sono due gruppi ossidrilici, lo schema di sintesi prevede la formazione iniziale dell'acilalogenuro del farmaco e la successiva reazione con il composto precursore di B in presenza di una base, in un solvente organico inerte nelle condizioni di reazione secondo lo schema sotto riportato :



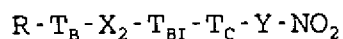
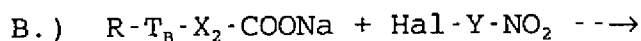
2. Sintesi del nitrossiderivato.

2a.1 Se il composto che si ottiene alla fine del precedente passaggio 1a. ha formula (IA.1), si può convertire l'acido nel corrispondente sale sodico e seguire poi metodi noti nell'arte per preparare il composto finale, ad esempio secondo uno degli schemi di sintesi seguenti:

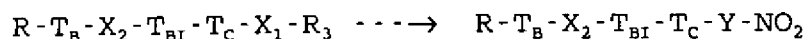
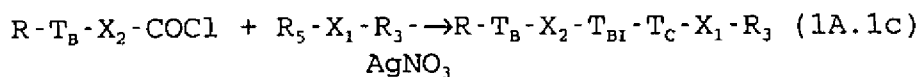




in cui T_B , X_2 , T_{BI} , T_C sono come sopra definiti, R_4 é scelto tra Cl, Br, Y é come sopra definito, X_1 é il radicale Y privo dell'atomo di ossigeno, R_3 é Cl, Br, Iodio, OH. Se $R_3 = OH$ il composto di formula (1A.1b) viene sottoposto ad alogenazione, ad es. con PBr_3 , PCl_5 , $SOCl_2$, $PPh_3 + I_2$, e poi fatto reagire con $AgNO_3$ in solvente organico come acetonitrile, tetraidrofurano. Se R_3 é Cl, Br, Iodio, il composto di formula (1A.1b) viene fatto reagire direttamente con $AgNO_3$ come sopra indicato.



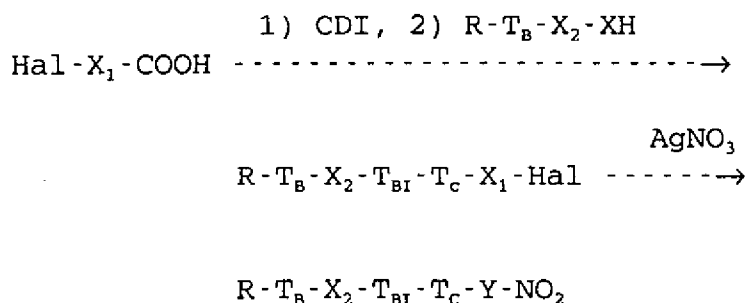
C.)



in cui $R_5 = OH$ oppure NHR_{1c} , essendo R_{1c} , R_3 e gli altri simboli come sopra definiti.

Se X_1 é un alchile lineare C_4 , si fa reagire il corrispondente acido $R-T_B-X_2-COOH$ con trifenilfosfina in presenza di un agente alogenante come CBr_4 oppure N-bromosuccinimide in tetraidrofurano ottenendo il composto (1A.1c) in cui $R_3 = Br$.

2a.2 Se il composto ottenuto alla fine del passaggio precedente 1a. ha formula (IA.2), il nitrossiderivato corrispondente viene ottenuto trattando un acido alogeno-carbossilico di formula Hal-X₁-COOH, essendo X₁ come sopra definito, dapprima con un agente attivante il carbossile come descritto in 1A.1, e poi con il composto di formula (Ia.2), ottenendo un alogeno derivato, che viene isolato e poi sciolto in solvente organico, (rif. il paragrafo 2a.1), e trattato con nitrato d'argento. Lo schema di reazione complessivo é il seguente :



in cui T_B, X₂, T_{BI}, T_C, Y sono come sopra definiti.

In alternativa, si può usare l'alogenuro Hal-X₁-COCl in cui Hal é preferibilmente bromo, che viene fatto reagire con il composto di formula (IA.2).

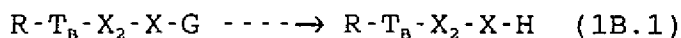
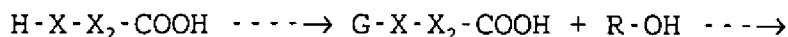
2a.3 Se il composto ottenuto alla fine del passaggio 1a.1 ha formula (IA2'), il nitrossiderivato corrispondente può essere ottenuto anche trattando con acido nitrico fumante in condizioni anidre e in atmosfera inerte, in presenza di un acido inorganico diverso dall'acido nitrico, o con

un acido organico, oppure di una anidride di uno o due acidi organici

1b. Se la funzione reattiva del farmaco é -OH (formula generale: R-OH), i due gruppi funzionali presenti sul composto precursore di B possono essere i seguenti:

1b.1 Un gruppo carbossilico, che reagisce con la funzione OH del farmaco, ed un gruppo HX, essendo quest'ultimo gruppo reattivo del composto precursore di B uguale o diverso dal gruppo funzionale del farmaco. La formula del composto precursore di B é del tipo $H-X-X_2-COOH$, in cui X e X_2 sono come sopra definiti.

La funzione H-X- del composto precursore di B viene protetta secondo i metodi noti nell'arte e il carbossile viene fatto reagire, come sopra indicato, secondo il seguente schema :



Alla fine della reazione si ripristina la funzione HX del composto precursore di B.

1b.2 Se il composto precursore di B contiene due gruppi carbossilici, viene trattato con una quantità equimolare di un agente attivante il carbossile nelle condizioni in precedenza descritte in 1a.1, e poi fatto reagire con la funzione reattiva OH della molecola del farmaco. Eventuali altre funzioni reattive di tipo HX presenti nei due

composti devono essere adeguatamente protette come in precedenza indicato. Si ottiene alla fine un composto di formula $R-T_B-X_2-COOH$ (1B.2).

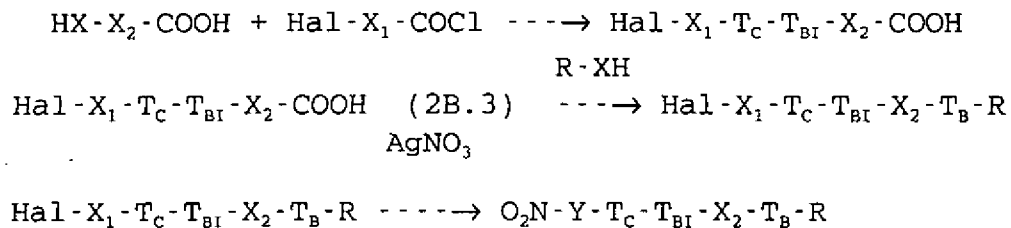
2b. Sintesi del nitrossiderivato

2b.1 Per ottenere il nitrossiderivato finale partendo dal composto di formula $R-T_B-X_2-X-H$ (1B.1), ottenuto alla fine della sintesi descritta in 1b.1, si fa reagire il composto (1B.1) con un alogenoacido di formula $Hal-X_1-COOH$ che sia stato trattato come descritto in precedenza nel paragrafo 1a.1, oppure con il corrispondente cloruro dell'alogenoacido, il composto risultante viene sciolto in solvente organico, ad es. acetonitrile o tetraidrofurano, e si fa reagire con nitrato di argento.

2b.2 Per ottenere il nitrossiderivato finale partendo dal composto di formula $R-T_B-X_2-COOH$ (1B.2), ottenuto alla fine della sintesi descritta in 1b.2, si trasforma l'acido nel corrispondente sale sodico, si fa reagire con un composto $R_4-X_1-R_3$, in precedenza definito nella schema di reazione A. del paragrafo 2a.1, ottenendo secondo il medesimo procedimento ivi indicato il nitrossiderivato finale. In alternativa, se X_1 é un alchile lineare C_4 , si fa reagire l'acido (1B.2) con trifenilfosfina in presenza di un agente alogenante come CBR_4 o N-bromosuccinimide in tetraidrofurano e il composto risultante sciolto in sol-

vente organico ad es. acetonitrile, tetraidrofurano, si fa reagire con argento nitrato.

2b.3 In alternativa al procedimento di sintesi secondo 1b.1 e 2b.1, é possibile far reagire in un primo passaggio la funzione HX- del composto precursore di B HX-X₂-COOH con il cloruro acilico di un alogenoacido di formula Hal-X₁-COCl, in cui Hal é preferibilmente Br, e successivamente la funzione carbossilica del composto così ottenuto, con il farmaco di formula R-OH. Nel terzo ed ultimo passaggio il gruppo -Hal viene sostituito con -ONO₂ secondo il procedimento descritto in 2b.1. Lo schema di reazione é il seguente :



In cui T_C, T_{BI}, T_B, X₂, X₁, Y sono come sopra definiti.

Nel precedente schema la nitratura può essere in alternativa effettuata sul composto acido di formula (2B.3).

I composti oggetto della presente invenzione sono formulati nelle corrispondenti composizioni farmaceutiche per uso parenterale, orale e topico secondo le tecniche ben note nel ramo, unitamente agli usuali eccipienti; si veda ad es. il volume "Remington's Pharmaceutical Sciences 15a Ed."

La quantità su base molare del principio attivo in queste formulazioni é la medesima, o inferiore, rispetto a quella

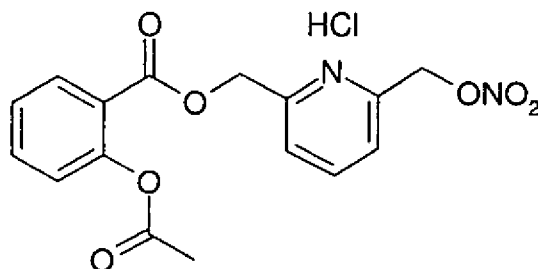
usata come antiinfiammatorio e/o analgesico del corrispon-
dente farmaco precursore.

Le dosi giornaliere somministrabili sono quelle dei farmaci antiinfiammatori e/o analgesici precursori, o eventualmente inferiori. Le dosi giornaliere si possono trovare nelle pubblicazioni del ramo, come ad es. nel "Physician's Desk reference".

Gli esempi che seguono hanno lo scopo di illustrare l'invenzione e non devono essere intesi come limitativi della medesima.

ESEMPIO 1

Sintesi di acido 2-acetossibenzoico 6-(nitrossimetil)-2-metilpiridinil estere cloridrato di formula:



A) Sintesi di 2,6-bis-(clorometil)piridina

A tionile cloruro (11,6 ml, 158 mmoli), raffreddato a 0°C, si aggiunge molto lentamente 2,6-bis-(idrossimetil)piridina (4 g, 28 mmoli). La soluzione ottenuta si lascia sotto agitazione per 2 ore a temperatura ambiente, quindi si evapora a pressione ridotta il tionil cloruro in eccesso. Il residuo ottenuto si riprende con cloroformio e si evapora nuovamente a pressione ridotta per eliminare i residui di cloruro di tio-

nile. Il grezzo si riprende con cloroformio e si lava con acqua. La fase organica si anidrifica su sodio solfato e si porta a secco ottenendo 4.81 g del prodotto come solido bianco avente p.f. 76-78°C.

B) Sintesi di acido 2-acetilossibenzoico 6-(clorometil)-2-metilpiridinil estere

A una soluzione di acido acetilsalicilico (1,6g, 8,88 mmoli) in N,N'-dimetilformamide (20 ml) e sotto agitazione si aggiunge sodio etilato (0,64 g, 8,88 mmoli). Dopo 30 minuti la soluzione ottenuta viene aggiunta a una soluzione di 2,6-bis-(clorometil)piridina (4,72 g, 26,81 mmoli) in N,N'-dimetilformamide (20 ml). La soluzione si lascia a temperatura ambiente per 7 giorni, sotto agitazione, quindi si diluisce con etere etilico e si lava con acqua. Le fasi organiche separate si anidrificano su sodio solfato e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il grezzo di reazione si purifica mediante cromatografia su gel di silice eluendo con n-esano/etile acetato 7/3. Si ottengono 1.7 g del prodotto come olio giallo.

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz)(CDCl_3): 8,10 (1H,d); 7,74 (1H,t); 7,57 (1H,t); 7,42 (1H,d); 7,33 (2H,m); 7,11 (1H,d); 5,42 (2H,s); 4,67 (2H,s); 2,41(3H,s).

C) Sintesi di acido 2-acetilossibenzoico 6-(nitroossimetil)-2-metilpiridinil estere

A una soluzione di acido 2-acetilossibenzoico 6-(cloro metil)-2- metilpiridinil estere (1,5 g, 4,7 mmoli) in acetoni-

trile (20 ml) tenuta sotto agitazione si aggiunge argento nitrato (1,3 g, 7,65m moli). La soluzione si scalda a 80°C, mantenendola al riparo dalla luce, sotto agitazione per 30 ore. Si filtra l'argento cloruro formatosi, si evapora il solvente. Il grezzo di reazione si purifica per cromatografia su gel di silice eluendo con n-esano/etil acetato 7/3. Si ottengono 1,2 g di prodotto come olio giallo.

¹H-NMR (200MHz)(CDCl₃): 8,10 (1H,d); 7,74 (1H,t); 7,57 (1H,t); 7,42 (1H,d); 7,33 (2H,m); 7,11(1H, d); 5,60(2H, s); 5,42 (2H, s); 2,41 (3H, s).

D) Sintesi di acido 2-acetilossibenzoico 6-(nitroossimetil)-2-metilpiridinil estere cloridrato

A una soluzione di acido 2-acetilossibenzoico 6-(nitroossimetil)-2- metilpiridinil estere (1 g, 2,88 mmoli) in etile acetato (20 ml) raffreddata a 0°C, si aggiunge sotto agitazione gocciolando una soluzione di etil acetato/HCl 5M. Si lascia per 1 ora a 0°C, quindi si fa rinvenire la temperatura fino a valori ambientali. Il precipitato formatosi si filtra e si lava con etere etilico. Si ottengono 900 mg di prodotto solido.

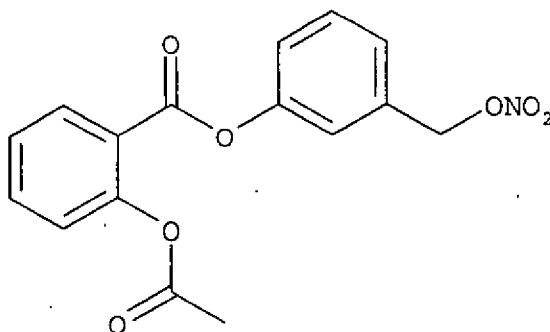
Analisi elementare

Calcolato	C 50,21%	H 3,95%	N 7,31%	Cl 9,26%
Trovato	C 50,23%	H 3,97%	N 7,29%	Cl 9,20%

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz)(CDCl_3): 8,10 (2H,m); 7,7 (1H,t); 7,56 (2H,d); 7,48(1H,t); 7,30 (1H,d); 5,74 (2H,s); 5,43 (2H,s); 2,20 (3H,s).

ESEMPIO 2

Sintesi di 3-nitrossimetilfenil estere dell'acido 2-acetossi-benzoico



A) Preparazione di 3-idrossimetilfenil estere dell'acido 2-acetossibenzoico

3-idrossimetilfenolo (10 g, 0,08 moli) viene sciolto in toluene (50 ml) contenente trietilammina (9,8 g, 0,1 moli). Alla soluzione così ottenuta si aggiunge, alla temperatura di 5-10°C, sotto agitazione, una soluzione del cloruro dell'acido acetilsalicilico (16 g, 0,08 moli) in toluene (50 ml). La miscela viene mantenuta a una temperatura compresa nell'intervallo sopra indicato, sotto agitazione per 2 ore, poi versata in acqua e quindi estratta con diclorometano (2 x 100 ml). La fase organica viene separata, lavata in successione con una soluzione di potassio carbonato al 25% p/v, con acqua, con una soluzione di acido cloridrico 3%, ed infine di nuovo con acqua, poi anidrificata su sodio solfato

ed il solvente evaporato sotto vuoto. Il residuo viene cristallizzato da isopropanolo. Si ottiene il 3-idrossimetilfenil estere dell'acido 2-acetossibenzoico (45,8 g, 0,16 moli, resa 80%).

P.f. 79-81°C

^1H NMR(CDCl₃) δ (ppm): 2,29 (s,3H); 4,71 (s,2H); 7,07-8,2 (m, aromatici,8H).

B) Nitrazione di 3-idrossimetilfenil estere dell'acido 2-acetossibenzoico

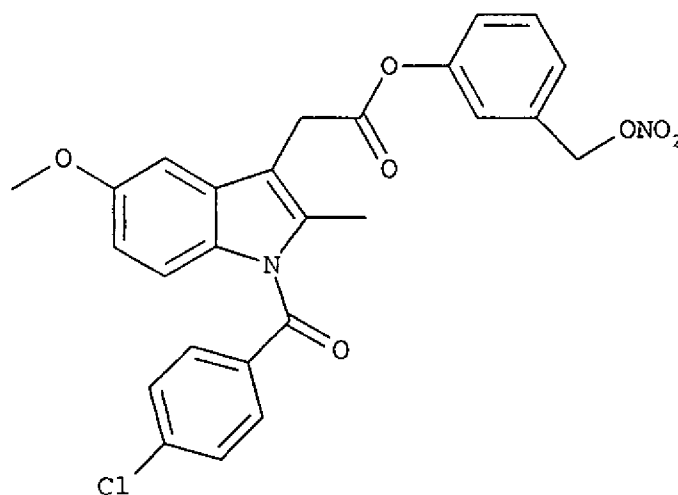
Una soluzione di acido nitrico fumante (3,92 g, 62,2 mmoli, 3 moli rispetto alle moli dell'idrossiestere in reazione) e acido solforico 96% (6,10 g, 62,2 mmoli, 3 moli rispetto alle moli dell'idrossiestere in reazione) in diclorometano (25 ml) viene raffreddata a 0°C ed addizionata nel periodo di 1 ora, sotto agitazione e in atmosfera di azoto, di una soluzione di 3-idrossimetilfenil estere dell'acido 2-acetossibenzoico (6 g, 20,7 mmoli) in 25 ml di diclorometano. La miscela viene poi diluita con diclorometano (50 ml) e versata in acqua e ghiaccio (100 g). La fase organica viene separata, lavata con acqua, anidrificata su sodio solfato ed il solvente evaporato sotto vuoto. Il residuo viene cristallizzato da isopropanolo ottenendo il 3-nitrossimetilfenil estere dell'acido 2-acetossibenzoico (5,6 g, 17 mmoli, resa 82%).

P.f. 61-62°C

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ (ppm): 2,31 (s,3H); 5,44 (s,2H); 7,16-8,22 (m, aromatici,8H).

ESEMPIO 3 confronto

Sintesi dell'acido 1-(4-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(nitroossimetil)fenil estere



A) Sintesi dell'acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-formilfenil estere.

Ad una soluzione di 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico (20,08 g, 56,12 mmoli) in cloroformio (200 ml) e dimetilforamide (20 ml) vengono aggiunti nell'ordine 3-idrossibenzaldeide (6,82 g, 55,85 mmoli), N,N'-dicicloesilcarbodiimide (11,6 g, 56,22 mmoli) e N,N-dimetilammino piridina (0,306 g, 2,5 mmoli). La miscela viene tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 6 ore. Il precipitato viene filtrato e le fasi organiche vengono lavate con acqua (100 mlX2), anidificate su sodio solfato e il solvente viene evaporato a pressione ridotta. Il grezzo viene purificato per cromatografia su gel di silice eluendo con cloruro di metile-

(HF 2326/061)

ne. Si ottengono 20,99 g di 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-formilfenil estere: Resa 81%

B) Sintesi dell'acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(idrossimetil)fenil estere.

Una soluzione di acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-formilfenil estere (20 g, 4,33 mmoli) in acetato di etile (200 ml) viene idrogenata in presenza di palladio 5% su carbone (2 g) a temperatura ambiente sotto agitazione, utilizzando una pressione di idrogeno di circa 2,5 atm. Dopo 30 minuti si scarica il reattore allontanando il catalizzatore per filtrazione in atmosfera di azoto. Il solvente viene evaporato a pressione ridotta e il residuo viene purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con cloruro di metilene/ acido acetico (95:5 v/v). Si ottengono 14 g di acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(idrossimetil)fenil estere come un solido giallo. Resa 73%

C) Sintesi dell'acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(clorometil)fenil estere.

Ad una soluzione di acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(idrossimetil)fenil estere (13 g, 2,81 mmoli) in cloroformio (200 ml) e raffreddata in un bagno di ghiaccio, si aggiunge una soluzione di SOCl_2 (2,06 ml, 2,81 mmoli) in cloroformio (50 ml). La miscela viene tenuta sotto agitazione per 30 minuti in bagno di ghiaccio e per 20 ore a temperatura ambiente. La soluzione si lava prima con una solu-

zione di bicarbonato e poi con acqua. La fase organica viene anidrificata su sodio solfato e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con cloruro di metilene/esano (1:1 v/v). Si ottengono 9,86 g di acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(clorometil)fenil estere come solido giallo. P.f. 147-150 °C. Resa 73%.

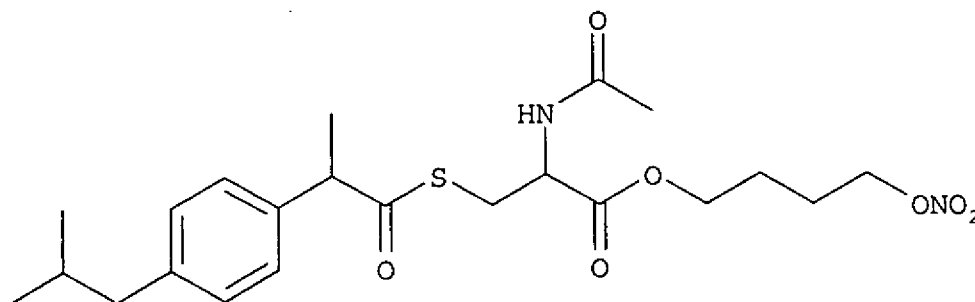
D) Sintesi dell'acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(nitrossimetil)fenil estere.

Ad una soluzione di acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(clorometil)fenil estere (9,86 g, 2,04 mmoli) in acetonitrile (100 ml) si aggiunge argento nitrate (4,87 g, 2,87 mmoli) e si scalda a 80 °C sotto agitazione per 15 ore. Si raffredda, si filtra il precipitato e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con cloruro di metilene/esano (1:1 v/v). Si ottengono 9,83 g di acido 1-(p-clorobenzoil)-5-metossi-2-metil-3-indolacetico 3'-(nitrossimetil)fenil estere. p.f. 115-119 °C. Resa 94,5%.

¹H NMR (CDCl₃): 7,70 (2H,d); 7,49 (2H,d); 7,42 (1H,t); 7,14-7,06 (4H,m); 6,90 (1H,d); 6,70 (1H,dd); 5,42 (2H,s); 3,93 (2H,s); 3,86 (3H,s); 2,48 (3H,s).

ESEMPIO 4

Sintesi di (S)-N-acetil-(α -metil[4-(2-metilpropil) benzene] acetil)cisteina 4-(nitrossi)butil estere



A) Sintesi di (S)-N-acetil-(α -metil[4-(2-metilpropil) benzene] acetil)cisteina

A una soluzione di acido α -metil[4-(2-metilpropil)benzene] acetico (10 g, 48,48 mmoli) in cloroformio (100 ml) e N,N-dimetilformamide (6 ml) si aggiunge 1,1'-carbonildiimidazolo (7,86 g, 48,48 mmoli). Dopo 1 ora la soluzione ottenuta viene trattata con (S)-N-acetilcisteina (7,91 g, 48,47 mmoli) e si lascia a temperatura ambiente per 24 ore. La miscela di reazione si lava con HCl 5%, poi con acqua ed infine con salamoia. La fase organica viene anidrificata con sodio solfato e poi evaporata a pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene purificato per cromatografia su gel di silice eluendo con acetato di etile. Si ottengono 13,3 g del prodotto atteso nella forma di un olio.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : 10,17 (1H,s) 7,13 (2H,d) 6,54 (1H,d), 4,76 (1H,m), 3,93 (1H,q), 3,42-3,30 (2H,m), 2,49 (2H,d), 1,85-1,83 (4H,m), 1,55 (3H,d), 0,93 (6H, d).

B) Sintesi di (S)-N-acetil- $\{\alpha$ -metil[4-(2-metilpropil)-benzene]acetil)cisteina 4-(bromobutil) estere

A una soluzione di (S)-N-acetil-S- $\{\alpha$ -metil[4-(2-metilpropil)benzene]acetil)cisteina (12,8 g, 36,4 mmoli) in tetraidrofurano (100 ml) si aggiungono trifenilfosfina (28,65 g, 109,23 mmoli) e tetrabromuro di carbonio (36,23 g, 109,23 mmoli). La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione per 48 ore a temperatura ambiente. Si allontana il solvente per evaporazione a pressione ridotta. Si purifica il grezzo ottenuto per cromatografia su gel di silice eluendo con cicloesano/etile acetato 1/1. Si ottengono 5,79 g dell'estere nella forma di un olio.

C) Sintesi di (S)-N-acetil- $\{\alpha$ -metil[4-(2-metilpropil) benzene]acetil)cisteina 4-(nitrossi)butil estere

A una soluzione dell'estere ottenuto alla fine del precedente passaggio (5,5 g, 11,3 mmoli) in acetonitrile (100 ml) si aggiunge argento nitrate (2,69 g, 15,8 mmoli). La miscela di reazione viene scaldata per 24 ore al riflusso al riparo dalla luce. Si allontana per filtrazione il sale formatosi e si evapora la soluzione a pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene purificato per cromatografia su gel di silice eluendo con cicloesano/etile acetato 7/3. Si ottengono 1,18 g

di (S)-N-acetil- $\{\alpha$ -metil[4-(2-metilpropil)benzene] acetil} cisteina 4-(nitrossi)butil estere nella forma di un olio.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : 7,27-7,09 (4H,m), 6,19 (1H,d), 4,75 (1H,m), 4,47 (2H,t), 4,15-4,02 (2H,m), 3,86 (1H,q), 3,31 (2H,d), 2,44 (2H,d), 1,89 (3H,d), 1,86-1,76 (5H,m), 1,51 (3H,d), 0,89 (6H,d).

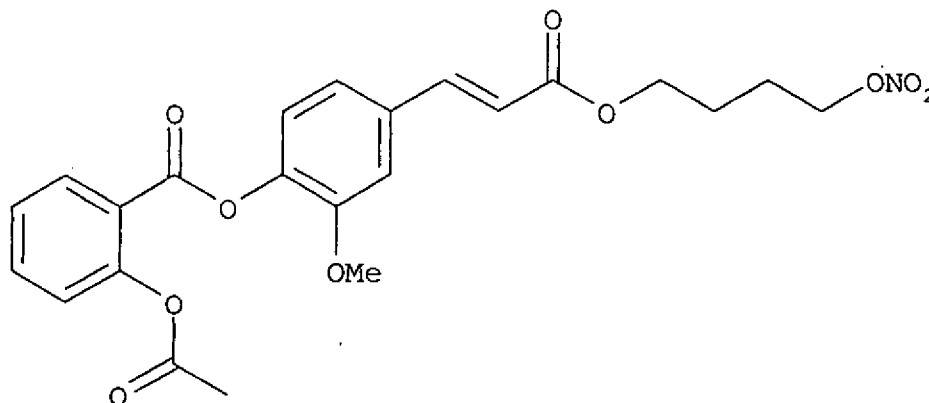
Analisi elementare:

Calcolato C: 56,39% H: 6,88% N: 6,00% S: 6,84%

Trovato C: 56,22% H: 6,79% N: 5,88% S: 6,92%

ESEMPIO 5

Sintesi dell'acido trans-3-[4-[2-(acetilossi)benzoilossi]-3-metossifenil]-2-propenoico 4-(nitrossi) butil estere



A) Sintesi dell'acido trans-3-[4-idrossi-3-metossifenil]-2-propenoico 4-bromo butil estere

Ad una soluzione di acido ferulico (10 g, 51,5 mmoli) in THF (400 ml), raffreddata in un bagno ad acqua, si aggiungono nell'ordine trifenilfosfina (27,01 g, 103 mmol) e tetrabromuro di carbonio (34,1 g, 103 mmol). La miscela viene tenuta sotto agitazione per 5 ore a temperatura ambiente. Terminata la re-

azione si filtra il trifenilfosfinossido formatosi e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con esano/acetato d'etile (7:3 v/v). Si ottengono 7,75 g di acido trans-3-[4-idrossi-3-metossifenil]-2-propenoico 4-bromobutil estere come un solido bianco. P.f. 86-89 °C. Resa 46%.

B) Sintesi dell'acido trans-3-[4-[2-(acetilossi)benzoilossi]-3-metossifenil]-2-propenoico 4-bromobutil estere

Ad una soluzione di acido trans 3-[4-idrossi-3-metossifenil]-2-propenoico 4-bromo butil estere (2 g, 6,1 mmoli) in CHCl_3 (20 ml) si aggiunge una miscela di acido acetil salicilico (1,1 g, 6,1 mmoli) in DMF (2 ml) e si raffredda a 0°C. Quindi si aggiungono DCC (1,50 g, 7,2 mmol) e DMAP (74 mg, 6×10^{-3} mmoli). Si lascia alla medesima temperatura per 30 minuti e poi si fa rinvenire a temperatura ambiente, mantenendo quest'ultima temperatura per 16 ore. Si filtra il precipitato e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene sciolto in acetato di etile (100 ml x 2 volte) e lavato con acqua e NaCl. Si anidrifica la fase organica e si evapora il solvente a pressione ridotta.

Il residuo viene purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con esano/acetato di etile (8:2 v/v), ottenendo 1' acido trans-3-[4-[2-(acetilossi)benzoilossi]-3-metossifenil]-2-propenoico 4-bromobutil estere (1,1 g, Resa 37%).

¹H NMR: 8,25 (1H,d); 7,65 (2H,m); 7,40 (1H,t); 7,20 (4H,m); 6,39 (1H,d); 4,25 (2H,t); 3,85 (3H,s); 3,47 (2H,t); 2,29 (3H,s); 2,01 (2H,m); 1,89 (2H,m):

C) Sintesi dell'acido trans-3-[4-[2-(acetilossi)benzoilossi]-3-metossifenil]-2-propenoico 4-nitrossibutil estere

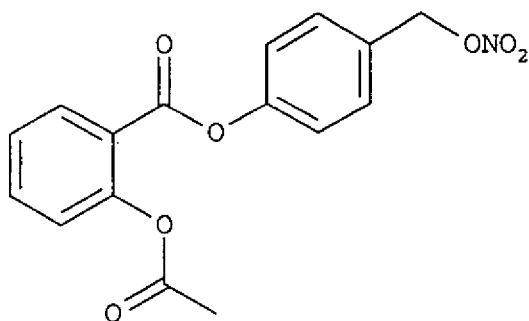
Ad una soluzione di acido 3-[4-[2-(acetilossi)benzoilossi]-3-metossifenil]-2-propenoico 4-bromobutil estere (1 g, 2,03 mmoli) in acetonitrile (10 ml) viene aggiunto argento nitrato (0,530 g, 3,11 moli), sotto agitazione, al riparo dalla luce. Si scalda a 80°C per 8 ore e al termine si raffredda a temperatura ambiente. Si filtra il precipitato e si evapora il solvente a pressione ridotta.

Il residuo viene purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con esano/acetato di etile (7:3 v/v) ottenendo l'acido 3-[4-[2-(acetilossi)benzoilossi]-3-metossifenil]-2-propenoico 4-nitrossibutil estere (506 mg) come un solido bianco. Resa 52,6 %

¹H NMR: 8,24 (1H, d); 7,65 (2H, m); 7,39 (1H, t); 7,18-7,14 (4H, m); 6,39 (1H, d); 4,51 (2H, t); 4,25 (2H, t); 3,85 (3H, s); 2,95 (3H, s); 1,89-1,82 (4H, m).

ESEMPIO 6

Sintesi dell'acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(nitrossimetil)fenil estere



A) Sintesi dell'acido 2-(acetossi)benzoico 4-(formil)fenil estere

Ad una miscela di 4-idrossibenzaldeide (20,75 g, 0,17 moli) e trietilammina (0,205 g, 2,4 mmoli) in cloruro di metilene (300 ml) tenuta sotto agitazione in atmosfera inerte di azoto, raffreddata a una temperatura compresa tra -5°C e 0°C , viene aggiunto, a piccole porzioni nel tempo di un'ora, acetilsalicililoil cloruro (41,25 g, 0,21 moli). Dopo 15 minuti dal completamento dell'aggiunta si aggiunge acqua (250 ml) e si separano le fasi. La fase acquosa viene recuperata ed estratta a parte con metilene cloruro. Si riuniscono le fasi organiche, si lavano con una soluzione di carbonato al 5% (150 ml x 2) e poi con acqua (125 ml x 2). Si anidrifica la fase organica con solfato di sodio in presenza di carbone decolorante. Si filtra sotto vuoto e si evapora il solvente a pressione ridotta con temperatura del bagno non superiore a 40°C , ottenendo 48,2 g di acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(formil)fenil estere. Il grezzo di reazione viene usato senza ulteriore purificazione.

B) Sintesi dell'acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(idrossimetil)fenil estere

Una soluzione di acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(formil)fenil (48,2 g, 0,18 moli) estere in acetato di etile (500 ml) viene idrogenata in presenza di palladio 5% su carbone (4 g) a temperatura ambiente sotto agitazione, utilizzando una pressione di idrogeno di circa 2,5 atm. Dopo 30 minuti si scarica il reattore e si allontana il catalizzatore per filtrazione in atmosfera di azoto.

La fase organica viene lavata con una soluzione di bicarbonato di sodio al 5% e con acqua. Si anidrifica con solfato di sodio e il solvente si evapora a pressione ridotta. Il residuo viene utilizzato senza ulteriore purificazione.

C) Sintesi dell'acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(clorometil)fenil estere

Ad una miscela di acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(idrossimetil)fenil (51,5 g, 0,18 moli) e SOCl_2 (153 ml) tenuta sotto agitazione, si aggiunge a temperatura ambiente, dimetilformamide (140 ml) e si lascia sotto agitazione per un'ora. Al termine si evapora il cloruro di tionile a pressione ridotta a temperatura del bagno inferiore a 40°C. Le tracce di cloruro di tionile nel composto vengono eliminate riprendendo il residuo solido con toluene (60 ml x 2). Il solvente viene allontanato per evaporazione a pressione ridotta con temperatura del bagno inferiore a 40 °C. Il grezzo viene puri-

ficato mediante cristallizzazione con etere isopropilico a dare acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(clorometil)fenil estere (32,9 g, 0,10 moli). Resa 60%.

^1H NMR: 8,25 (1H,d); 7,68 (1H,t); 7,43 (3H,m); 7,20 (3H,m); 4,60 (2H,s); 2,34 (3H,s).

D) Sintesi dell'acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(nitrossimetil)fenil estere

Ad una soluzione di acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(clorometil)fenil estere (32,9g, 0,10 moli) in acetonitrile viene aggiunto argento nitrato (22,2 g, 0,12 moli), sotto agitazione, al riparo dalla luce. Si scalda a 70 °C per 4 ore e poi si raffredda a temperatura ambiente. Si filtra il precipitato e si evapora il solvente a pressione ridotta.

Il residuo viene purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con esano/acetato di etile (7:3 v/v) a dare di acido 2-(acetilossi)benzoico 4-(nitrossimetil)fenil estere (16,6 g, 0,05 moli). P.f. 86-88 °C. Resa 50%.

^1H NMR (CDCl_3): 8,21 (1H,dd); 7,66 (1H,dt); 7,42 (3H,m); 7,20 (3H,m); 5,40 (2H, s), 2,25 (3H,s).

ESEMPI FARMACOLOGICI

ESEMPIO F1

Per valutare l'effetto potenziante dei farmaci dell'invenzione sull'attività antidiabetica dell'insulina, animali (ratti) vengono trattati con una dieta ricca di fruttosio (Am. J. Physiol. 275, R788-R792, 1998). In questo

modo si induce negli animali una resistenza insulinica. In tali condizioni l'animale non risponde più alle dosi abituali di insulina.

Il test farmacologico è un test in vitro e consiste nella determinazione dell'attività vasorilasciante indotta dai prodotti dell'invenzione, misurata su un vaso isolato (aorta) prelevato da animali trattati come sopraindicato. Il test in vitro viene effettuato sia in presenza che in assenza di LNNA (N-nitro-L-Arginina), che è un inibitore irreversibile delle sintetasi dell'ossido nitrico, per verificare se l'effetto vaso-rilasciante dipenda dalla sostanze endogene protettive (ossido nitrico).

La capacità dei composti dell'invenzione di esercitare un effetto vaso-rilasciante sia in presenza che in assenza di sostanze vasoprotettive in tali condizioni di diabete sperimentale, (animali a dieta ricca di fruttosio, e trattati con o senza LNNA) è un indice che permette di valutare l'azione antidiabetica del composto in esame.

Nell'esperimento farmacologico si utilizzano vasi isolati prelevati da ratti che hanno sviluppato, come detto, una condizione di resistenza insulinica indotta somministrando una dieta ricca di fruttosio per 4 settimane.

Preparazione dei tessuti

Ratti Sprague Dawley di sesso maschile di peso medio pari a 150 - 200 g venivano sacrificati ed esanguinati. L'aorta addominale era rimossa e preparata in modo idoneo per la

(HF 2326/061)

determinazione dell'attività miorilasciante in vitro secondo la metodica descritta in Vogel G.H. et al., Drug Discovery Evaluation-Pharmacological Assays pag. 32, 1996.

Una parte dei campioni viene trattata con LNNA.

I tessuti vengono precontratti con fenilefrina (10 μ M) ed il rilasciamento era determinato in presenza o in assenza dei composti dell'invenzione o degli standard di riferimento. I prodotti venivano sciolti in dimetilsolfossido e saggiati a dosi che non modificano significativamente il tono vascolare nell'animale non insulino resistente (sottoposto a dieta normale). I risultati sono riportati in Tabella 1 e sono espressi come percentuale rispetto all'effetto vasorilasciante misurato nei controlli.

Nella tabella 1 il composto dell' es. 3 confronto è l'estere dell'indometacina con m-nitrossimetilfenolo, Il composto dell'esempio 6 è l'estere dell'acido acetilsalicilico con p-nitrossimetilfenolo, il composto dell'esempio 2 è l'estere dell'acido acetilsalicilico con m-nitrossimetilfenolo, il composto dell'esempio 1 è l'estere dell'acido acetilsalicilico con 6-(nitroossimetil)-2-idrossimetil piridina.

I risultati del test farmacologico che sono mostrati in Tabella dimostrano che i composti dell'invenzione sono in grado di indurre un effetto vaso-rilasciante sia in presenza che in assenza di sostanze vasoprotettive (ossido nitrico) in condizioni di diabete sperimentale.

L'estere dell'indometacina (es. 3 cfr.) e il sodio nitroprussiato, entrambi composti NO-donor, non sono invece risultati attivi.

La metformina, che è un farmaco usato nella terapia del diabete, è attivo solo in assenza dell'inibitore della sintesi di NO.

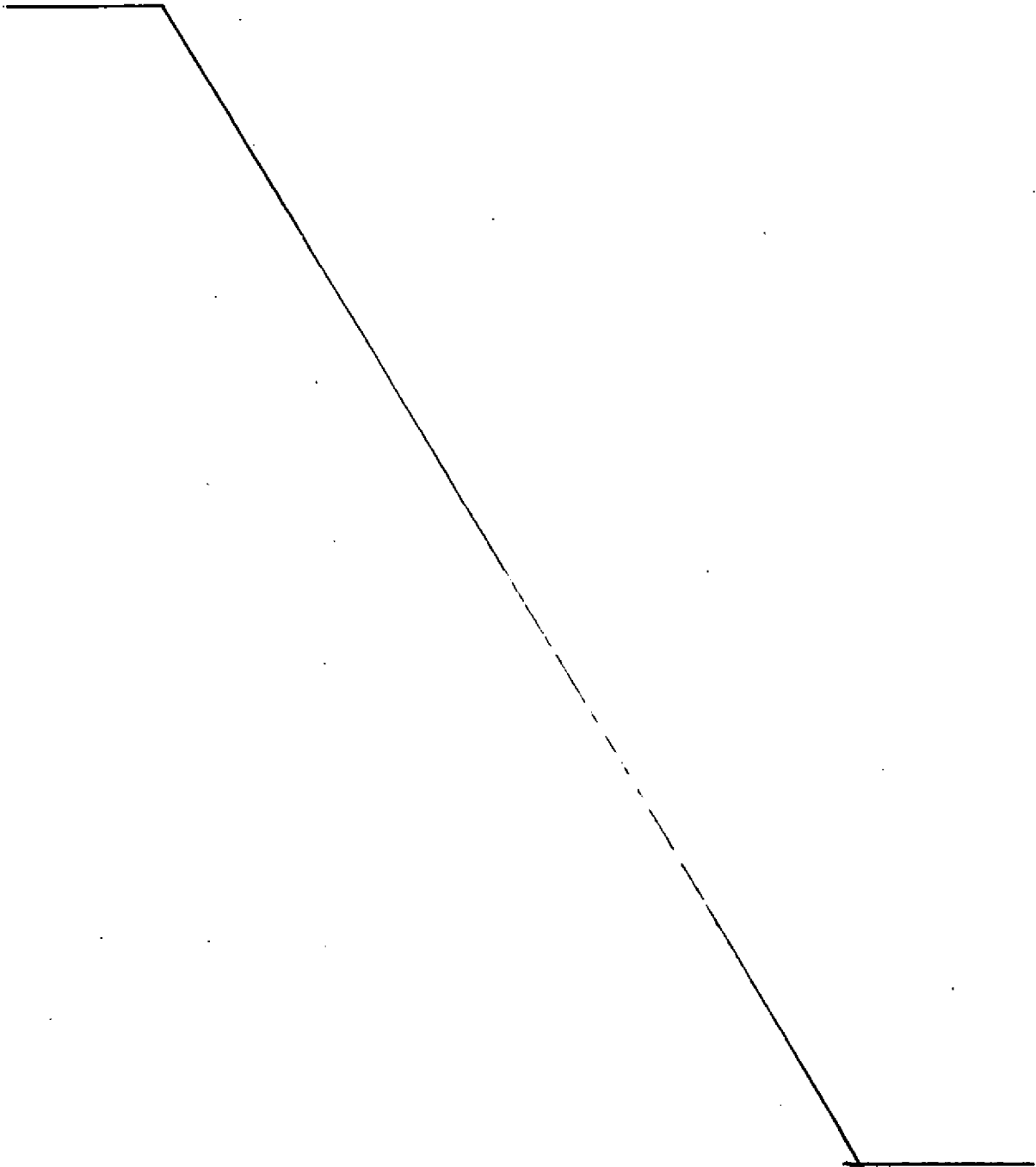
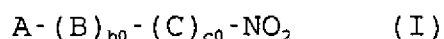


Tabella 1

Determinazione in vitro sull'aorta di ratti insulino-resistenti dell'effetto vaso rilasciante. I risultati sono espressi come percentuali rispetto ai controlli non insulino-resistenti			
		% Rilasciamento	
Trattamento	Concentrazione (M)	Aorta Senza LNNA	Aorta con LNNA
Veicolo	-	45	10
Composto Es. 3 cfr.	10^{-6}	20	20
Sodio Nitroprussiato cfr.	10^{-6}	30	30
Composto Es. 6	10^{-5}	90	65
Composto Es. 2	10^{-4}	70	70
Composto Es. 1	10^{-5}	93	70
Metformin Cfr.	10^{-4}	90	30

RIVENDICAZIONI

1. Uso per la preparazione di farmaci per il trattamento del diabete, preferibilmente di tipo 2, di composti o loro sali, aventi la seguente formula generale:



in cui:

c_0 è un intero ed è 0 oppure 1;

b_0 è un intero ed è 0 oppure 1; con la condizione che almeno uno fra c_0 e b_0 è diverso da zero;

$A = R-T_1-$, in cui

R è il radicale di un farmaco e

$T_1 = (CO)_t$ oppure $(X)_{t'}$, dove $X = O, S, NR_{1c}, R_{1c}$ è

H oppure un alchile lineare o ramificato, avente da 1 a 5 atomi di carbonio, oppure una valenza

libera, t e t' sono interi ed uguali a zero oppure

1, con la condizione che $t = 1$ quando $t' =$

0; $t = 0$ quando $t' = 1$;

$B = -T_B-X_2-T_{BI}-$ in cui

T_B e T_{BI} sono uguali o diversi;

$T_B = (CO)$ quando la funzione reattiva nel farmaco

precursore è $-OH$ oppure $-NH_2$; $T_B = X$, come sopra

definito, quando la funzione reattiva nel far-

maco precursore è $-COOH$;

$T_{BI} = (CO)_{tx}$ oppure $(X)_{txx}$, in cui tx e txx hanno

il valore di 0 oppure 1; con la condizione che

$tx = 1$ quando $txx = 0$, $tx = 0$ quando $txx = 1$; X

é come sopra definito;

X_2 é un pontante bivalente come sotto definito;

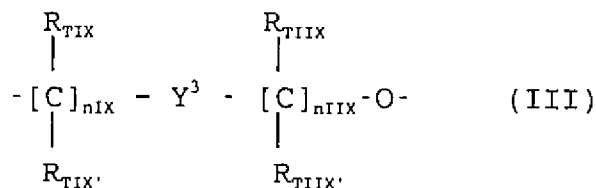
C é il radicale bivalente $-T_c-Y-$ in cui

$T_c = (CO)$ quando $tx = 0$, $T_c = X$ quando $txx = 0$,

essendo X come sopra definito;

Y é:

Y_p :



in cui:

nIX é un intero compreso tra 0 e 3, preferibilmente 1;

$nTIIX$ é un intero compreso tra 1 e 3, preferibilmente 1;

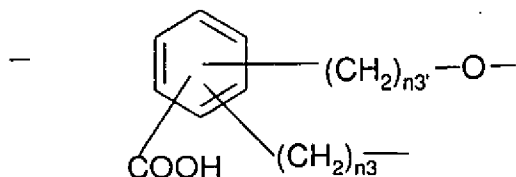
R_{TIX} , $R_{TIX'}$, R_{TIIX} , $R_{TIIX'}$, uguali o diversi tra loro sono H oppure alchile lineare o ramificato C_1-C_4 ; preferibilmente R_{TIX} , $R_{TIX'}$, R_{TIIX} , $R_{TIIX'}$ sono H.

Y^3 é un anello eterociclico contenente uno o due atomi di azoto, saturo, insaturo o aromatico, a 5 o 6 atomi,

oppure Y può essere:

Y_0 , scelto tra i seguenti:

in cui n_3 è un intero da 0 a 3 ed $n_{3'}$ è un intero da 1 a 3;



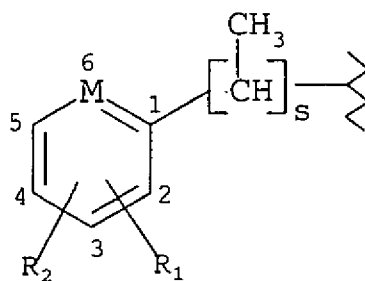
in cui n_3 ed $n_{3'}$ hanno il significato sopra indicato

- X_2 , radicale bivalente, è tale che il corrispondente precursore di B, $-T_B-X_2-T_{BI}$ in cui le valenze libere di T_B e di T_{BI} sono saturate ciascuna con OZ , con Z oppure con $-N(Z^I)(Z^{II})$, in cui $Z = H, C_1-C_{10}$, preferibilmente C_1-C_5 alchile lineare o ramificato quando possibile, Z^I, Z^{II} uguali o diversi hanno i valori di Z come sopra definito, a seconda che T_B e/o $T_{BI} = CO$ oppure X , in funzione dei valori di t, t', tx e txx ;

quando nella formula (I) $b_0 = 1$

- se il precursore di B come sopra definito soddisfa il test 4a e non soddisfa il test 5 come sotto descritti, allora $c_0 = 0$;
- se il precursore di B soddisfa entrambi i test 4a e 5, ma non soddisfa il test 4 come sotto descritto, allora $c_0 = 0$ oppure 1, e Y preferibilmente è Y_0
- se il precursore di B soddisfa il test 4, allora $c_0 = 1$ e Y è preferibilmente Y_0 ;

quando nella formula (I) $b_0 = 0$, $c_0 = 1$ e $Y = Y_p$ o Y_{Ar} ; R è il radicale di un farmaco precursore avente attività antiinfiammatoria e/o analgesica ed ha le seguenti formule:



(AII)

in cui:

s è un intero ed è zero oppure 1;

R_1 è H, $COOR_3$, $OCOR_3$ essendo R_3 metile, etile o alchile C_3-C_5 lineare o ramificato; un anello aromatico a 5 o 6 atomi di carbonio, preferibilmente a 6 atomi, che può essere sostituito in posizione orto, meta o para con uno o più gruppi R_2 , preferibilmente con gruppi ossidrilici o acetilossici in posizione 2 ed acetilammino in posizione 4; $CONHCOR_3$; o il residuo di un eterociclo ad un solo anello avente 5 o 6 atomi che può essere aromatico, parzialmente o totalmente idrogenato, contenente uno o più eteroatomi scelti indipendentemente fra O, N e S;

$R_2 = H$, OH, alogeno preferibilmente bromo, alchile da 1 a 4 atomi di carbonio R_4 , lineare o ramificato quando possibile, $-OR_4$; $-COR_4$; un perfluoroalchile da

1 a 4 atomi di carbonio, lineare o ramificato quando possibile, ad esempio trifluorometile; nitro, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}_4$, $-\text{N}(\text{R}_4)_2$, in cui R_4 è come sopra definito, $-\text{OSO}_3\text{H}$, acetilammino; $-\text{CONH}_2$;

con la condizione che R_1 e R_2 non possono essere contemporaneamente idrogeno;

M è un atomo di carbonio oppure di azoto;

- in cui il test 4A che deve essere soddisfatto dal composto precursore di B, è un test in vitro in cui eritrociti isolati con tecniche standard da ratti maschi Wister, sono sospesi a 4°C per 4 giorni in una soluzione fisiologica tamponata a pH 7,4 con tampone fosfato; al termine, dopo aver centrifugato a 1000 giri al minuto per 5 minuti un'aliquota di sospensione, si diluiscono 0,1 ml degli eritrociti centrifugati a 50 ml con tampone sodio fosfato pH 7,4, da cui vengono prelevate aliquote (n. 5 campioni) di 3,5 ml che sono incubate a 37°C in presenza di cumene idroperossido ($270 \mu\text{M}$ in etanolo), che lisando le cellule provoca nella sospensione un aumento della torbidità, che viene determinata a 710 nm a intervalli di 30 minuti per stabilire il tempo (T_{max}) a cui si ha il massimo di emolisi o massima torbidità (100% di emolisi); soluzioni etanoliche 2mM dei precursori di B vengono preincubate per 30 minuti con aliquote da 3,5 ml della sospensione diluita di eritrociti preparata dopo centrifugazione (prove eseguita su 5 campioni per ogni precursore

di B), aggiungendo poi cumene idroperossido, e al tempo T_{max} misurando la percentuale di emolisi nel campione, espressa come rapporto tra l'assorbanza della sospensione del campione e quella della sospensione contenente solo cumene idroperossido; i precursori di B superano il test 4A se inibiscono l'emolisi indotta da cumene idroperossido in percentuale $>15\%$;

- in cui il test 5 é il seguente: é una determinazione analitica eseguita aggiungendo aliquote di soluzioni metanoliche di concentrazione 10^{-4} M del precursore di B a una soluzione contenente aliquote di 2 mM deossiribosio in acqua, 100 mM di tampone fosfato e 1 mM del sale misto $Fe^{II}(NH_4)_2(SO_4)_2$; dopo aver condizionato la soluzione a $37^\circ C$ per un'ora si aggiungono, nell'ordine, aliquote di acido tricloroacetico 2,8% e di acido tiobarbiturico 0,5 M, si scalda a $100^\circ C$ per 15 minuti e si legge l'assorbanza della soluzione in esame a 532 nm; poi si determina la percentuale di inibizione del precursore di B verso la produzione di radicali attraverso la formula:

$$(1 - A_s/A_c) \times 100$$

in cui A_s e A_c sono rispettivamente i valori di assorbanza della soluzione contenente il composto in esame e il sale di ferro e quella della soluzione contenente solo il sale di ferro, il composto soddisfa il test 5 quando la per-

centuale di inibizione come sopra definita del precursore di B é maggiore o uguale del 50%.

- in cui il test 4 é il seguente: é una determinazione analitica eseguita aggiungendo aliquote di soluzioni metanoliche di concentrazione 10^{-4} M del precursore di B a una soluzione metanolica di DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl); dopo aver conservato la soluzione a temperaturá ambiente e al riparo dalla luce per 30 minuti, si legge l'assorbanza della soluzione in esame e di una soluzione contenente solamente DPPH nella stessa quantità, alla lunghezza d'onda di 517 nm; poi si determina la percentuale di inibizione del precursore di B verso la produzione di radicali indotta da DPPH attraverso la formula:

$$(1 - A_s/A_c) \times 100$$

in cui A_s e A_c sono rispettivamente i valori di assorbanza della soluzione contenente il composto in esame e DPPH e quello della soluzione contenente solo DPPH,

il criterio di accettazione dei composti secondo questo test é il seguente: il test 4 é soddisfatto dai composti precursori di B se la percentuale di inibizione come sopra definita é maggiore o uguale del 50%.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui i composti preferiti di formula (AII) quando $s = 0$ sono i seguenti:
-

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è idrogeno, ed R_2 è un gruppo ossidrile in posizione 2 e la valenza libera è saturata con il gruppo COOH. il composto è noto come Acido salicilico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è idrogeno, R_1 è $\text{CH}_3\text{CONHCO-}$ ed è in posizione 2 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo OH, il composto è noto come Salacetamide;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è CONH_2 ed è in posizione 2 dell'anello, R_1 è H e la valenza libera è saturata con un gruppo OH, il composto è noto come Salicilamide;

quando nella formula (AII) M è azoto, R_1 è idrogeno, R_2 è metile in posizione 3 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo NH_2 , il composto è noto come 2-Ammino-picolina;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è idrogeno, R_2 è un gruppo $-\text{OSO}_3\text{H}$ in posizione 2 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo COOH, il composto è noto come acido Salicilsolforico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è idrogeno, R_1 è un gruppo $-\text{OCOR}_3$ con $R_3 =$ metile, in posizione 2 dell'anello e la valenza libera è saturata con un gruppo $-\text{COOH}$, il composto è noto come Acido acetilsalicilico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è un atomo di bromo in posizione 5, R_1 è un gruppo -OCOR₃ con $R_3 = CH_3$ in posizione 2 e la valenza libera è saturata con -COOH, il composto è noto come Acido 5-bromo salicilico acetato;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_2 è idrogeno, R_1 è in posizione 2 ed è un gruppo -OCOR₃ con R_3 uguale a 2-(acetilossi)fenile e la valenza libera del radicale fenile della formula (AII) è saturata con un gruppo COOH il composto è noto come Acido acetilsalicil-salicilico;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è in posizione 2 ed è il residuo -OCOR₃ dove R_3 è 2-(idrossi)fenile, R_2 è idrogeno e la valenza libera è saturata con un gruppo COOH, il composto è noto come Salsalato;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è in posizione 2 ed è il residuo -COOR₃ essendo R_3 fenile, R_2 è idrogeno e la valenza libera è saturata con un gruppo OH, il composto è noto come Fenilsalicilato;

quando nella formula (AII) M è un atomo di carbonio, R_1 è in posizione 2 ed è il residuo -COOR₃ essendo R_3 il gruppo 4-(acetilammino)fenile, R_2 è idrogeno e la valenza libera è saturata con il gruppo OH, il composto è noto come Acetaminosalol.

Quando nella formula (AII) $s = 1$, $R_1 = H$, $R_2 = -CH_2CH(CH_3)_2$ in posizione 4 dell'anello, M è atomo di carbonio e la valenza libera è saturata con COOH il composto è noto come Ibuprofen.

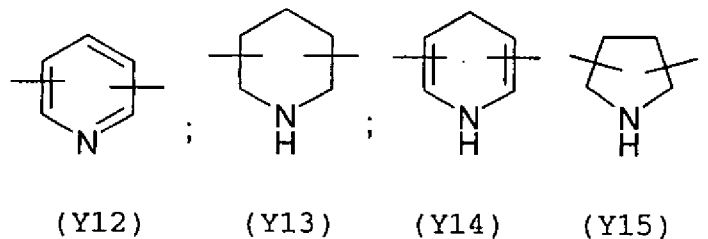
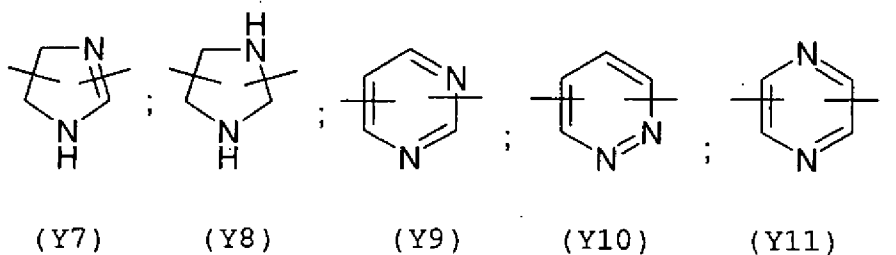
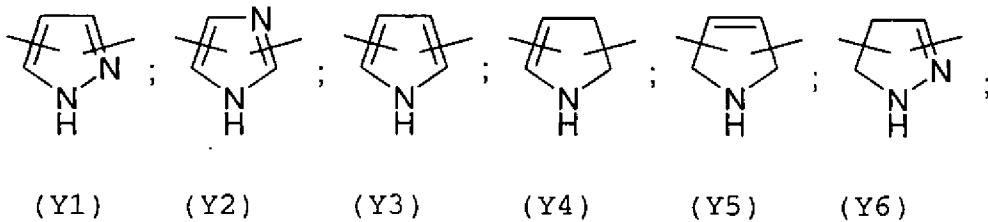
3. Uso secondo le rivendicazioni 1-2 in cui il composto precursore di B (precursore del radicale X_2 nella formula (I)) che soddisfa il test 4 è scelto nelle seguenti classi di composti:

- amminoacidi, scelti tra i seguenti: L-carnosina, anserina, selenocisteina, selenometionina, penicilamina, N-acetilpenicilamina, cisteina, N-acetilcistena, glutatione o suoi esteri, preferibilmente estere etilico o isopropilico;
- idrossiacidi, scelti tra i seguenti: acido gallico, acido ferulico, acido gentisico, acido citrico, acido caffeico, acido p-cumarico, acido vanillico;
- mono- e polialcooli aromatici ed eterociclici, scelti tra i seguenti: acido nordiidroguaiaretico, quercetina, catechina, kaempferolo, sulfuretina, acido ascorbico, acido isoascorbico, idrochinone, gossypol, acido reductico, metossiidrochinone, idrossiidrochinone, propil gallato, saccarosio, 3,5-di-tertbutil-4-idrossibenziltio glicollato, alcool p-cumarico, 4-idrossi-feniletalcolool, alcool coniferilico;

- composti contenenti almeno una funzione acida libera, scelti tra i seguenti: acido 3,3'-tiodipropionico, acido fumarico, acido diidrossimaleico, acido tioctico, acido edetico, bilirubina.
4. Uso secondo le rivendicazioni 1-2 in cui il composto precursore di B che soddisfa il test 5 é scelto tra i seguenti:
- aminoacidi: acido aspartico, istidina, 5-idrossi triptofano, acido 4-tiazolidincarbossilico, acido 2-oxo-4-tiazolidin carbossilico; aminoacidi : acido aspartico, istidina, 5-idrossi triptofano, acido 4-tiazolidincarbossilico, acido 2-oxo-4-tiazolidin carbossilico;
 - mono e polialcooli o tioli: 2-tiouracile, 2-mercaptoetanololo, esperidina, secalciferolo, 1- α -OH vitamina D₂, flocalcitriolo, 22-oxacalcitriolo, 24,28-metilene-1 α -idrossivitaminina D₂;
 - acido succinico.
5. Uso secondo le rivendicazioni 1-2 in cui i composti precursori di B che soddisfano il test 4A e non soddisfano il test 5 sono scelti tra i seguenti: 1,4-butandiolo, acido 6-idrossiesanoico, acido 4-idrossibutirrico, N-metildieta-nolammina, dietilenglicole, tiodietilenglicole, 1,4-diossan-2,6-dimetanololo, tetraidropiran-2,6-dimetanololo 4H pirano-1,4-2,6-dimetanololo, tetraidrotiopirano-2,6-di metanololo, 1,4-ditiano-2,6-dimetanololo, cicloesene-

1,5-dime-tanolo, tiazol-2,5-dimetanolo, tiofene-2,5-dime-
tanolo, ossazol-2,5-dimetanolo, preferibilmente N-metil
dietanolamina, dietilenglicole, tiodietilenglicole.

6. Uso secondo le rivendicazioni 1-5 in cui Y^3 nella formula
(III) é scelto tra i seguenti:



7. Uso secondo la rivendicazione 6, in cui Y^3 é un anello
aromatico a 6 atomi, contenente un atomo di azoto e aven-
te le due valenze libere rispettivamente in posizione 2 e
6, o 2 e 3, oppure 2 e 5 rispetto all'eteroatomo.
8. Uso secondo la rivendicazione 7 in cui Y^3 é Y12 (piridile)
sostituito in posizione 2 e 6, avente i legami anche in
posizione non simmetrica.
9. Uso secondo le rivendicazioni 1-8 in cui:

- se nella formula (I) $c_0 = 0$ e $b_0 = 1$ e nel radicale R di formula (AII) $s = 0$, $R_1 = H$, R_2 è in posizione 2 dell'anello aromatico ed è OH o acetilossi, B è un residuo di un polialcool aromatico, preferibilmente di un idrossimetilfenolo;
- se nella formula (I) $c_0 = 1$ e $b_0 = 0$ e nel radicale R di formula (AII) $s = 0$, $R_1 = H$, R_2 è in posizione 2 dell'anello aromatico ed è OH o acetilossi, C è Y_p in cui Y_p è preferibilmente il residuo di bis (idrossimetil)piridina;
- se nella formula (I) $c_0 = 1$ e $b_0 = 1$ e nel radicale R di formula (AII):
 - $s = 0$, $R_1 = H$, R_2 è in posizione 2 dell'anello aromatico ed è OH o acetilossi, B è il residuo dell'acido ferulico e Y è Y_0 , preferibilmente un alchilene C_4 .,
 - $s = 1$, $R_1 = H$, R_2 è in posizione 4 dell'anello aromatico ed è $CH_2CH(CH_3)_2$, B è il residuo di N-acetilcisteina e Y è Y_0 , preferibilmente un alchilene C_4 .

10. Uso secondo la rivendicazione 9 in cui i composti sono scelti tra i seguenti: acido 2-acetilossibenzoico 6-(nitrossimetil)-2-metilpiridinil estere cloridrato o nitrato, acido 2-acetilossibenzoico 3-nitrossi metilfenil estere, acido 2-acetilossibenzoico 4-(nitrossimetil) fe-

nil estere, acido 2-acetilossibenzoico 5-(nitrossimetil)-2-metilpiridinil estere cloridrato o nitrato, acido 2-(acetilossi) benzoico 3-(nitrossimetil)-2-metil piridinil estere cloridrato o nitrato.

11. Uso secondo le rivendicazioni 1-9 in cui i composti di formula (I) sono trasformati nei corrispondenti sali.
12. Uso secondo le rivendicazioni 1-10 in cui i composti o loro sali vengono impiegati nelle corrispondenti formulazioni farmaceutiche per uso parenterale, orale e topico.
13. Uso secondo le rivendicazioni 1-12 in cui i composti delle riv. 1-12 vengono somministrati a pazienti già in trattamento con farmaci ipoglicemizzanti, preferibilmente insulina.
14. Composti secondo la rivendicazione 10.

Milano, 12 OTT. 2000

p. NICOX S.A.

SAMA PATENTS

Daniele Sama

