



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 688771 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07D101/04 A C07D417/04 B
C07D421/04 B A61K031/445 B
A61K031/425 B A61K031/40 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1995.06.14

(30) *Prioridade:* 1994.06.24 DE 4422237

(43) *Data de publicação do pedido:*
1995.12.27

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.07.11

(73) *Titular(es):*

GRÜNENTHAL GMBH
ZIEGLERSTRASSE 6 D-52078 AACHEN

DE

(72) *Inventor(es):*

JOHANNES SCHNEIDER
HORST BOHLKE
OSWALD ZIMMER, DR.
KAI ZWINGENBERGER
STEPHAN WENNDT, DR.

DE
DE
DE
DE

(74) *Mandatário(s):*

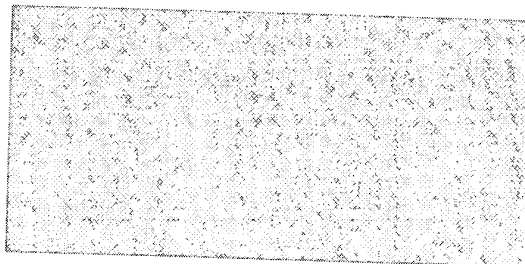
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA

PT

(54) *Epígrafe:* UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE LACTAMA COMO SUBSTÂNCIAS ACTIVAS FARMACÊUTICAS

(57) *Resumo:*

UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE LACTAMA COMO SUBSTÂNCIAS ACTIVAS
FARMACÊUTICAS



DESCRIÇÃO

“Utilização de compostos de lactama como substâncias activas farmacêuticas”

O presente invento refere-se à utilização de compostos de lactama como substâncias activas farmacêuticas, a novos compostos de lactama, assim como a processos para a sua fabricação.

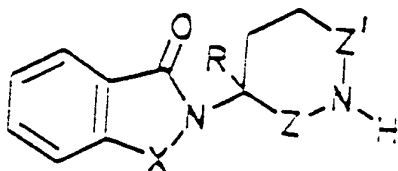
A formação excessiva de citóquinas como por exemplo, o factor de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e interferão- γ (IFN- γ) desempenha um papel central na patogénese do síndrome enxerto-*versus*-hospedeiro, da rejeição de transplantes, e de doenças provocadas pelo sistema imunitário, por exemplo *Morbus Behcet*, estomatite aftosa, *Erythema nodosum leprosum*, *Morbus Boeck*, *Lupus erythematoses* cutâneo e artrite reumatóide. Estas situações patológicas podem ser tratadas através de modulação da libertação de citóquinas, por exemplo com ciclosporina A ou glucocorticóides. No entanto, um problema na terapia com substâncias imunossupressoras consiste no facto do bloqueio do sistema imunitário dar frequentemente origem à ocorrência de infecções oportunistas, por exemplo micoses, pneumonias e doenças causadas por vírus. Por isso, as substâncias activas atenuadoras de uma resposta imunitária celular específica, sem a suprimirem completamente, representam um progresso para a terapia. No entanto, o tratamento com os compostos disponíveis nem sempre é coroado de êxito, existindo por isso uma necessidade de haver mais substâncias de eficácia imunológica.

Da descrição de patente WO-A-9420085, sujeita ao artigo 54(3) do Acordo Europeu sobre Patentes, conhece-se a utilização de talidomida e de vários compostos afins como, por exemplo, precursores, análogos, metabolitos e produtos de hidrólise de talidomida, para a redução de angiogénese não desejada e para a imunossupressão. Em WO-A-9214455 é descrita a utilização de talidomida e derivados de talidomida para a redução de concentrações elevadas de TNF- α . A substância activa talidomida é utilizada com êxito desde finais dos anos 60, no tratamento do *Erythema nodosum leprosum* e é, além disso, eficaz numa série de outras doenças, por exemplo *Morbus Behcet*, *Lupus erythematoses*, estomatite aftosa, e no síndrome enxerto-*versus*-hospedeiro (*The Lancet* 1988, 117; *N. Engl. J. Med.* 326, 1055 (1992); *Eur. J. Dermatol.* 4, 9 (1994)). Ao contrário de outras substâncias imunossupressoras não se dá, no tratamento com talidomida, uma restrição geral da imunocompetência, não se verificando deste modo infecções com agentes patogénicos oportunistas em consequência da terapia. Este diagnóstico está em correlação com a observação de que a talidomida, ao contrário de substâncias imunossupressoras típicas, reduz a distribuição sistémica das citóquinas TNF- α , IL-2 e IFN- γ não apenas *in vivo* como

também *in vitro*, mas sem o cortar completamente, nem mesmo numa concentração local elevada. Ao contrário de substâncias imunossupressoras típicas, por exemplo ciclosporina A e dexametasona, a talidomida também não corta a proliferação de células imunocompetentes.

Verificou-se agora que determinados compostos de lactama possuem um efeito igual ou melhor que a talidomida em modelos farmacológicos, sem serem no entanto teratogénicos nestes modelos, ao contrário da talidomida.

O objecto do invento é, por isso, um composto de lactama da fórmula I,



em que X significa S ou Se, e R um grupo alquilo C_{1-6} ou o grupo benzilo, Z e Z' são diferentes e significam CH_2 ou CO, ou então Z e Z' são iguais significando CO, sob forma racémica ou opticamente activa, para utilização como substância activa farmacêutica.

Os compostos de lactama da fórmula I e especialmente compostos de lactama da fórmula I em que R significa um grupo alquilo C_{1-3} , isto é um grupo metilo, etilo, propilo ou isopropilo, possuem um vasto espectro de actividade imunomoduladora, particularmente imunossupressora, sendo desta maneira os compostos de lactama da fórmula I apropriados preferencialmente para serem utilizados como imunomoduladores e/ou substâncias imunossupressoras.

Além disso, os compostos de lactama da fórmula I são também apropriados, especialmente, para reduzirem a neoangiogénese. A neoangiogénese, isto é, a formação patológica de novos vasos, é uma consequência não desejada de doenças provocadas imunologicamente como, por exemplo, *Morbus Crohn*, e de infecções com o *Mycobacterium leprae* (*Int. J. Leprosy* 9, 193 (1941)), mas também de doenças granulomatosas.

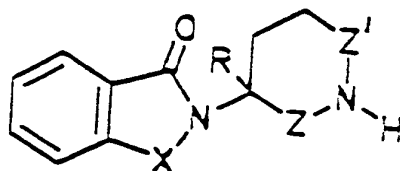
Para o tratamento de doenças do sistema imunitário, por exemplo da doença enxerto-versus-hospedeiro, da rejeição de transplantes, da doença de Behcet, de *Lupus erythematoses*, de doenças auto-imunitárias como consequência tardia de infecções, de *Morbus Crohn* ou da doença de *Kawasaki*, os compostos de lactama da fórmula I podem ser

aplicados de forma oral, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular e intranasal, assim como local, por exemplo em infecções na pele, nas mucosas e nos olhos. A quantidade de substância activa a administrar ao paciente varia em função do peso do paciente, da forma de aplicação, da indicação e da gravidade da doença. Usualmente, são aplicados 1 a 10 mg/kg de um composto de lactama da fórmula I.

Para a aplicação oral são apropriadas preparações sob a forma de comprimidos, drageias, cápsulas, granulados, gotas, sumos e xaropes, para a aplicação parentérica, tópica e inalativa, soluções, suspensões, preparações secas facilmente reconstituíveis, assim como pulverizações. Compostos de lactama da fórmula I, dissolvidos num recipiente, ou num emplastro, eventualmente com a adição de agentes fomentadores da penetração na pele, são formas de preparação percutâneas apropriadas. As formas de preparação de aplicação oral ou percutânea podem libertar de forma retardada o composto de lactama da fórmula I.

Todas as formas de preparação farmacêuticas supramencionadas são em princípio usuais e, dado que os compostos a utilizar de acordo com o invento são quimicamente estáveis, a sua integração nestas formas de preparação não constitui nenhum problema para o perito na arte. Na preparação dos medicamentos deve proceder-se com o cuidado usual na selecção dos aditivos auxiliares, por exemplo dos materiais de suporte, substâncias de enchimento, solventes, diluentes, corantes, aromatizantes correctivos, aglutinantes e agentes desagregadores do comprimido e, particularmente na fabricação de formas de preparação de aplicação parentérica, deve dar-se atenção à estabilidade e, se estiverem presentes sob a forma líquida, à isotonia.

Um outro objecto do invento são os compostos de lactama até agora desconhecidos da fórmula I,

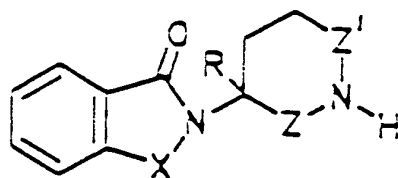


em que X significa S ou Se, e R um grupo alquilo C_{1-6} ou o grupo benzilo, Z e Z' são diferentes e significam CH_2 ou CO, ou então Z e Z' são iguais significando CO, com a

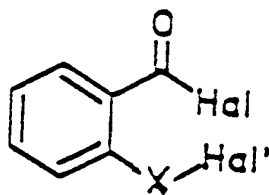
condição de X não significar S no caso de Z ser CO e Z' ser CH₂, sob forma racémica ou opticamente activa.

Os compostos da fórmula I de acordo com o invento, dos quais se preferem aqueles compostos que possuam como radical R um grupo metilo, etilo, propilo ou isopropilo, têm uma configuração estável.

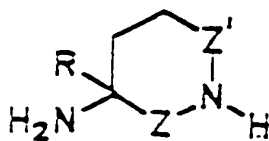
Um objecto do invento é, além disso, um processo para a fabricação de um composto da fórmula I



em que X significa S ou Se, e R um grupo alquilo C₁₋₆ ou o grupo benzilo, Z e Z' são diferentes e significam CH₂ ou CO, ou então Z e Z' são iguais significando CO, com a condição de X não significar S no caso de Z ser CO e Z' ser CH₂, sendo esse processo caracterizado por se transformar um composto da fórmula IV



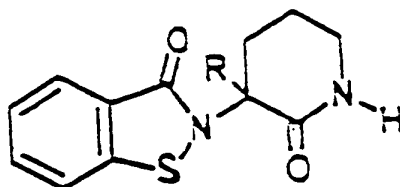
em que Hal e Hal' são iguais ou diferentes e significam cloro ou bromo, com um composto da fórmula V



na presença de uma base, a temperaturas entre os -20°C e os $+50^{\circ}\text{C}$.

De preferência transforma-se um composto da fórmula IV em que Hal e Hal' significam cloro, na presença de um solvente, por exemplo dimetilformamida, e de uma base, por exemplo trietilamina, piridina e/ou di-isopropiletilamina. Podem ser fabricados compostos da fórmula IV de acordo com os processos descritos em EP 54672 e EP 354412.

Compostos da fórmula VI



são acessíveis através do processo descrito em EP 54672.

Exemplos

As proporções indicadas para as misturas de solventes referem-se a volume.

Exemplo 1

2-(3-metil-2-oxo-piperidin-3-il)-benzo[d]iso-selenazol-3-ona

A uma solução de 0,47 g de 3-amino-3-metil-piperidin-2-ona em 10 ml de dimetilformamida foram adicionados seguidamente, gota a gota, a -20°C e sob agitação, uma solução de 0,93 g de cloreto de ácido o-cloro-selenobenzóico em 5 ml de dimetilformamida, e 1 ml de trietilamina. A mistura foi agitada durante 22 horas a esta temperatura e, a seguir, adicionaram-se gota a gota 5 ml de água. Os cristais precipitados foram isolados através de sucção e recristalizados a partir de 20 ml de etanol/acetato de etilo (3/5). Nesta operação obtiveram-se 0,49 g (43,4%) de 2-(3-metil-2-oxo-piperidin-3-il)-benzo[d]iso-selenazol-3-ona, sob a forma de cristais brancos que se fundiam a uma temperatura entre os 263°C e os 270°C .

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6): 1,72 (s, 3H, CH_3); 1,70-1,90 (m, 3H, CH_2 , CH); 2,44-2,55 (m, 1H, CH); 3,17-3,34 (m, 1H, CH_2); 7,38-8,04 (m, 5H, CH_{ar} , NH) ppm.

Exemplo 2

2-(3-metil-2-oxo-piperidin-3-il)-benzo[d]isotiazol-3-ona

O composto de lactama foi produzido através de transformação de 3-amino-3-metil-piperidín-2-ona com cloreto de ácido o-cloro-mercaptopbenzóico, sob as condições indicadas no exemplo 10 de EP 54672.

Testes farmacológicos

Eficácia de compostos de acordo com o invento num modelo animal

Para a caracterização *in vivo* dos efeitos imunofarmacológicos dos compostos de lactama da fórmula I, foi escolhido um modelo animal em que são estimulados linfócitos T. A relevância do modelo de teste imunofarmacológico cuja célula-alvo é, entre outras, a célula T, resulta da importância central que a célula T tem em várias doenças imunológicas. Destas fazem parte: a doença enxerto-*versus*-hospedeiro (GvHD), a rejeição de transplantes (hospedeiro-*versus*-enxerto), doenças auto-imunitárias como consequência tardia de infecções (por exemplo febre reumática, artrite reumatóide), a doença de Behcet (ulcerações mucocutâneas) e a doença de Kawasaki (vasculites multisistémicas).

A estimulação de células T foi obtida através de aplicação i.v. de Enterotoxina B de estafilococos (SEB; 200 µg) em ratinhos Balb/c previamente tratados com galactosamina. A SEB faz parte do grupo dos superantigénios que, em combinação com o complexo MHC-II (*Major Histocompatibility Complex*, classe II) de uma célula apresentadora de antígeno, provocam uma activação do receptor de células T (TZR). Como parâmetro para a activação de células T, foram determinadas as concentrações no soro da citóquina IL-2. A IL-2 é formada por células T_{H1}. A IL-2 foi determinada no soro através de um teste ELISA comercial que detecta especificamente IL-2 murina. A injeção de SEB provocou uma subida, em função do tempo, dos níveis de IL-2 no soro, com um nítido máximo 2 horas após a aplicação da SEB. O facto da IL-2 medida no soro ser proveniente de células T, conseguiu ser verificado através do facto de que, ao contrário dos ratinhos Balb/c, ratinhos SCID com deficiência de células T não formaram nenhum IL-2 após injeção da mesma quantidade de SEB.

Os compostos a utilizar de acordo com o invento foram dissolvidos numa solução aquosa 1% de carboximetilcelulose (CMC 1%) e aplicados de forma intraperitoneal (i.p.) em dosagens de 10 mg/kg e num volume de 1 ml/kg, 30 minutos antes da injeção de SEB. Os animais do grupo de controlo receberam na mesma altura 1 ml/kg de solução de veículo

(CMC 1%), por aplicação i.p. As concentrações de IL-2 no soro foram determinadas 2 horas após a aplicação da SEB (ou seja, 2,5 horas após a aplicação da substância). Na Tabela 1 estão indicados os efeitos máximos de inibição em % dos níveis de IL-2 no soro nos grupos tratados com um composto de lactama, em comparação ao grupo de controlo. As percentagens são médias com desvio padrão, das respectivas médias de $n = 6-8$ ensaios individuais. Através de uma recta de regressão foram calculadas as dosagens que conduziam a uma redução de 40% das concentrações de IL-2 no soro (valores ED40).

Tabela 1
Efeito de compostos de lactama da fórmula I na libertação de IL-2 *in vivo*

Composto de lactama produzido segundo o Exemplo	Inibição máxima da subida de IL-2 no soro, em % (dosagem entre parênteses)	ED40 [mg/kg i. p.]
1	43 ± 5 (10 mg/kg)	aprox. 20
2	52 ± 3 (10 mg/kg)	<10
Talidomida (comparação)	56 ± 10 (400 mg/kg)	171

Testes comparativos mostraram que, ao contrário dos glucocorticóides, os compostos de lactama a utilizar de acordo com o invento inibiram a actividade das células T mesmo no caso de serem administrados 30 minutos antes da estimulação das células T através de SEB. Para que houvesse um efeito inibidor dos glucocorticóides, foi necessário, pelo contrário, que estas substâncias fossem aplicadas 18 horas antes da estimulação das células T.

Eficácia de compostos de acordo em células humanas *in vitro*

A libertação de citóquinas pode ser estudada *in vitro* em células mononucleares humanas do sangue periférico, portanto células T, células B e monócitos após estimulação com lipopolissacárido (LPS) ou a toxina-1 do síndrome de choque tóxico (TSST-1). O LPS é um componente da parede celular bacteriana e estimula monócitos e macrófagos. No TSST-1 trata-se de um superantígeno bacteriano que activa não apenas células T como também monócitos/macrófagos. Os superantígenos ligam-se à cadeia V β do receptor de célula T e ao MHC classe II, simulando assim o reconhecimento por um receptor de célula T específico, de um antígeno apresentado pelo MHC classe II. A activação das células através de LPS ou TSST-1 provoca a libertação de TNF- α , IFN- γ e de outras citóquinas.

Do sangue heparinizado de, pelo menos, três dadores voluntários foram obtidos células mononucleares. Para este efeito dividiram-se, em cada caso, 20 ml de sangue

segundo métodos usuais, através de um gradiente Ficoll-Paque, as células foram colhidas e três vezes lavadas com um meio de cultura celular. Este meio de cultura celular consistia em RPMI 1640 Medium, com suplemento de glutamina 2mM (Life Technologies, Eggenstein, Alemanha), 10% de soro fetal de vitela (Life Technologies), 50 µg/ml de estreptomicina (Sigma, Deisenhofen, Alemanha), 50 IU/ml de penicilina (Sigma) e 100 µM de b-mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). As células mononucleares foram colocadas em 15 ml de meio de cultura celular e divididas em preparações de 1 ml, em placas de incubação estéreis de 24 poços (Sigma). Às preparações de 1 ml foi adicionado, em cada caso, 1 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) ou 1 µl de uma solução de DMSO contendo 5% em peso de um composto a utilizar de acordo com o invento. Após uma incubação de uma hora em estufa de CO₂ (5% de CO₂, humidade atmosférica de 90%), foram adicionados às preparações contendo um composto a utilizar de acordo com o invento, em cada caso, 2,5 µg de LPS (de *E. coli* 0127: B8, Sigma) ou 0,1 µg de TSST-1 (Sigma). A incubação das culturas foi continuada durante 20 horas. A concentração de TNF-α e IFN-γ nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada com testes ELISA comerciais (Boehringer-Mannheim, Alemanha; Endogen, Boston, Estados Unidos).

Na Tabela 2 é apresentada a influência de compostos de lactama a utilizar de acordo com o invento, assim como de talidomida, na libertação de TNF-α induzida por LPS. Os compostos de lactama de acordo com o invento inibiram a libertação de TNF-α mais fortemente do que a talidomida.

Tabela 2

Inibição da libertação de TNF-α por compostos de lactama da fórmula I

Composto de lactama produzido segundo o exemplo	Inibição da libertação de TNF-α em %, a uma concentração de 50 µg/ml
1	93 ± 1
2	93 ± 9
Talidomida (comparação)	54 ± 7

Os resultados dos ensaios *in vivo* e *in vitro* mostram que os compostos a utilizar de acordo com o invento são capazes de inibir a activação de células imunocompetentes. Como medida para a activação das células serviu a libertação das citóquinas IL-2, TNF-α e IFN-γ. O efeito atenuador dos compostos a utilizar de acordo com o invento, na distribuição destas citóquinas específicas da activação, é um indício de que estes compostos são apropriados para a terapia de doenças implicadas com uma actividade excessiva de células

86 315
EP 0 688 771 / PT

9

imunocompetentes. Os compostos podem ser utilizados, nestes casos, não apenas profilacticamente como também para a cura.

Lisboa, 16. AGO. 2001

Por GRÜNENTHAL GmbH

- O AGENTE OFICIAL -

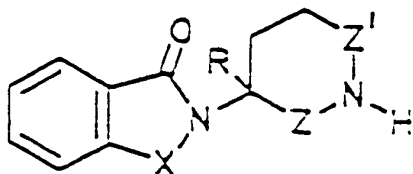
O ADJUNTO



Eng.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA Ag. Of. Pr. Ind. Rua das Flores, 74-4.º 1200-195 LISBOA
--

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de lactama da fórmula I,



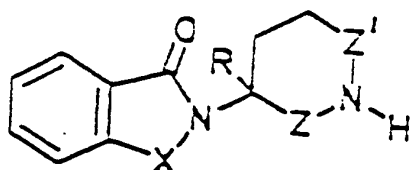
em que X significa S ou Se, e R um grupo alquilo C_{1-6} ou o grupo benzilo, Z e Z' são diferentes e significam CH_2 ou CO, ou então Z e Z' são iguais significando CO, sob forma racémica ou opticamente activa, para utilização como substância activa farmacêutica.

2. Composto de lactama de acordo com a reivindicação 1, em que R significa um grupo alquilo C_{1-3} , para utilização de acordo com a reivindicação 1.

3. Composto de lactama de acordo com a reivindicação 1 e/ou a reivindicação 2, para utilização como imunomodulador e/ou substância imunossupressora.

4. Composto de lactama de acordo com a reivindicação 1 e/ou a reivindicação 2, para a redução de neoangiogénese não desejada.

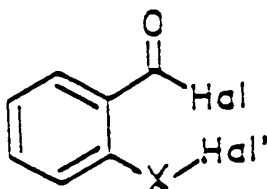
5. Compostos de lactama da fórmula I,



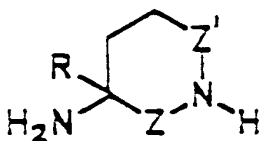
em que X significa S ou Se, e R um grupo alquilo C_{1-6} ou o grupo benzilo, Z e Z' são diferentes e significam CH_2 ou CO, ou então Z e Z' são iguais significando CO, com a condição de X não significar S no caso de Z ser CO e Z' ser CH_2 , sob forma racémica ou opticamente activa.

6. Compostos de lactama de acordo com a reivindicação 5, caracterizados por R ser um grupo alquilo C₁₋₃.

7. Processo para a fabricação de um composto de lactama da fórmula I de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por se transformar um composto da fórmula IV



em que Hal e Hal' são iguais ou diferentes e significam cloro ou bromo, com um composto da fórmula V



na presença de uma base, a temperaturas entre os -20°C e os +50°C.

Lisboa, 12. AGO. 2001

Por GRÜNENTHAL GmbH

- O AGENTE OFICIAL -

⊗ ADJUNTO

Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200-195 LISBOA