



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

DOMANDA NUMERO	102006901439607
Data Deposito	07/08/2006
Data Pubblicazione	07/02/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

IBRIDI FARMACODINAMICI CON ATTIVITA' IPOGLICEMIZZANTE E NO-DONOR OTTENUTI DALLA CONIUGAZIONE DI DERIVATI IDROSSILATI DELLA GLIBENCLAMIDE CON ACIDI CARBOSSILICI NITROOSI-SOSTITUITI.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo
"IBRIDI FARMACODINAMICI CON ATTIVITÀ IPOGLICEMIZZANTE E
NO-DONOR OTTENUTI DALLA CONIUGAZIONE DI DERIVATI
IDROSSILATI DELLA GLIBENCLAMIDE CON ACIDI CARBOSSILICI
5 NITROOSSI-SOSTITUITI" a nome UNIVERSITÀ DI PISA.

Inventori: BALSAMO Aldo, RAPPOSELLI Simona,
CALDERONE Vincenzo, MARCHETTI Piero, TORRI Scilla.

===()===()

DESCRIZIONE

10 Ambito dell'invenzione

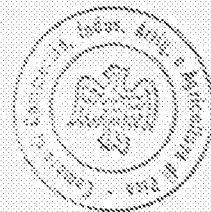
La presente invenzione riguarda una nuova classe di
composti in grado di esercitare un'azione
ipoglicemizzante e contemporaneamente assicurare un
rilascio in vivo di ossido di azoto (NO).

15 Inoltre, l'invenzione si riferisce ad una
composizione farmaceutica da impiegare nel trattamento
di soggetti affetti da deficit di NO endogeno come
conseguenza del diabete mellito di tipo 2.

Descrizione della tecnica nota

20 Come noto, il diabete mellito di tipo 2 è una
patologia caratterizzata dall'incapacità del corpo di
rispondere in modo adeguato all'azione dell'insulina
prodotta dal pancreas.

Esistono in particolare due fattori che possono
25 determinare l'insorgere di tale patologia. Da una parte
l'insulino-resistenza, dall'altra il deficit di
secrezione di insulina.

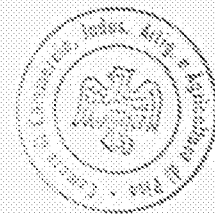


Lo stato iperglicemico associato alla patologia diabetica costituisce il fattore causale alla base di alterazioni a carico del sistema circolatorio. Tra i vari meccanismi responsabili della correlazione tra iperglicemia e disturbi cardiovascolari, un ruolo sicuramente ben definito spetta allo squilibrio dei sistemi ossidativi, al coinvolgimento di processi infiammatori vascolari, all'attivazione di segnali intracellulari.

Tutti questi processi, comunque, concorrono a determinare un quadro di disfunzione endoteliale che, attraverso una ridotta biosintesi di ossido di azoto (NO) da parte dell'endotelio, rappresenta la principale causa delle svariate manifestazioni patologiche cardiovascolari legate al diabete mellito.

Inoltre, spesso il trattamento del diabete mellito di tipo 2 in regime di monoterapia, ossia di somministrazione di un unico farmaco, non risulta soddisfacente e necessita del ricorso a somministrazioni di più farmaci, "cocktail" farmacologico, dotati di differenti meccanismi d'azione.

Tuttavia, il trattamento con il cocktail farmacologico può comportare degli svantaggi, quali una imprevedibile interazione farmacodinamica e/o farmacocinetica tra i diversi farmaci, una più difficile gestione della posologia da parte del paziente, costretto ad assumere più preparati farmaceutici e



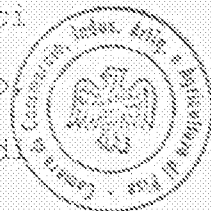
talvolta in tempi differenziati e, generalmente, una scarsa "compliance" da parte del paziente stesso.

Negli ultimi anni, lo studio di nuovi farmaci "ibridi", dotati di un duplice profilo farmacodinamico (una sola molecola dotata di due o più meccanismi di azione), è emerso come promettente campo di ricerca. Tale approccio è stato finalizzato al conferimento di migliori proprietà farmacoterapeutiche e/o alla limitazione di effetti avversi.

Tra le strategie utilizzate nello sviluppo di tali farmaci ibridi, un particolare successo ha riscosso la coniugazione di farmaci "nativi" noti con ulteriori porzioni molecolari capaci di rilasciare ossido d'azoto (NO). I molteplici effetti benefici dell'NO, tra cui, ad esempio, le azioni vasorilasciante, antiaggregante piastrinica e cardioprotettiva, possono infatti rappresentare effetti addizionali e comportare un interessante complemento ad una già esistente azione farmacologica tipica del farmaco nativo.

In letteratura sono descritti numerosi esempi di "ibridi farmacodinamici" in cui un farmaco "nativo" è stato dotato anche di un'azione NO-donor (M.C. Breschi et al, *J Med Chem*, 49, 2006, 2628-2639; P. Del Soldato, WO0230867, 2002).

Su questa strategia, l'impiego di ibridi farmacodinamici in grado di esercitare un'azione congiunta NO-donor/ipoglicemizzante può essere utile nel



trattamento del diabete mellito di tipo 2 e dei disturbi cardiovascolari a questo associati.

Sintesi dell'invenzione

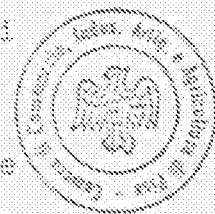
5 È quindi scopo della presente invenzione fornire un composto in grado di associare ad un'attività ipoglicemizzante un rilascio graduale e modulato di ossido di azoto (NO).

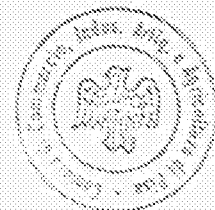
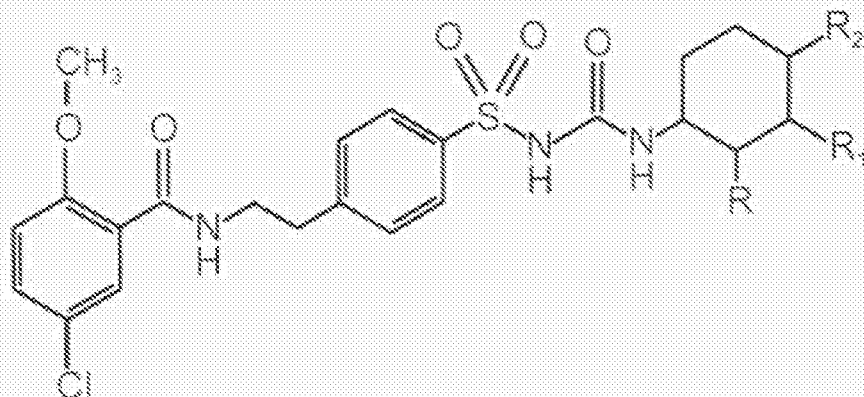
È un altro scopo della presente invenzione fornire
10 una composizione farmaceutica di tipo duale in grado di contrastare l'aspetto patologico prettamente endocrino/metabolico del diabete mellito di tipo 2.

È anche scopo della presente invenzione fornire una
15 composizione farmaceutica in grado di assicurare il corretto svolgimento delle funzioni cardiovascolari compromesse a causa di deficit di NO endogeno, imputabile alla disfunzione endoteliale di origine diabetica.

È anche scopo della presente invenzione fornire un
20 composto che non presenti gli effetti collaterali tipici dei farmaci di tecnica nota.

Questi ed altri scopi sono raggiunti dal composto, secondo l'invenzione, la cui caratteristica principale è di avere un'azione ipoglicemizzante e di rilasciare nel
25 contempo ossido di azoto (NO) detto composto avendo la seguente formula generale (I):



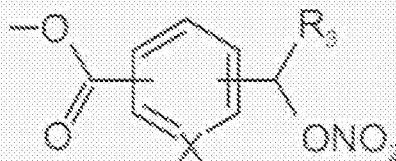


dove almeno uno tra R , R_1 , ed R_2 è un sostituito
comprendente un gruppo nitrossiestereo legato ad un
raggruppamento acilico alifatico, aromatico o alifatico-
aromatico.

5 In particolare, il raggruppamento acilico alifatico
può essere lineare, o in alternativa ramificato (C2-
C12).

Il raggruppamento acilico aromatico può essere il
sostituito rappresentato dalla formula (II):

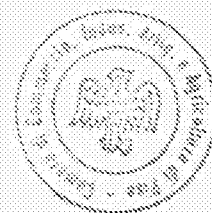
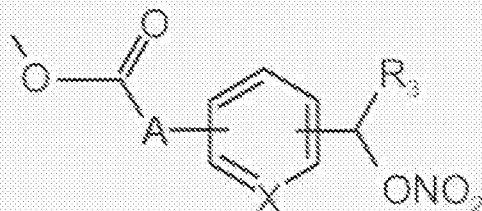
10



in cui:

- 15 — X è scelto tra: un atomo di azoto, un CH ,
- R_3 è scelto tra: un atomo di idrogeno, un gruppo
alchilico quale un gruppo metilico, un gruppo
etilico, un gruppo iso-propilico, un gruppo
propilico, un gruppo butilico, un gruppo iso-
20 butilico.

Il raggruppamento acilico alifatico-aromatico può essere un gruppo sostituyente rappresentato dalla formula (III):



in cui:

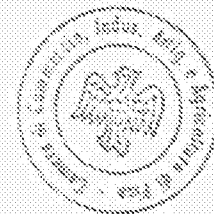
- 5 — A è scelto tra: un metilene, un gruppo alchilico lineare (C2-C4), un gruppo ramificato, ad esempio -CH(CH₃), -CH(CH₂-CH₂), -CH(iso-propile).
- X è scelto tra: un atomo di azoto, un CH,
- R₂ è scelto tra: un atomo di idrogeno, un gruppo alchilico quale un gruppo metilico, un gruppo etilico, un gruppo iso-propilico, un gruppo propilico, un gruppo butilico, un gruppo iso-butilico.

In particolare, i radicali tra R, R₁, ed R₂ che non siano uno dei sostituenti sopra descritti, sono atomi di idrogeno.

Vantaggiosamente, il gruppo sostituyente può avere configurazione cis-, o in alternativa configurazione trans-, rispetto al legame CH-NHCO-.

Ad esempio, il composto rappresentato dalla formula generale (I) è il 5-cloro-N-[2-[4-[(4'-trans-[(nitrossi)metil]benzoilossi)cicloesilcarbamoilsulfamoil]fenil]etil]-2-metossi-benzamide, di seguito indicato

Ing. Marco Celestino
 ABM Agenzia Brevetti & Marchi
 Iscritto all'albo N. 344



come DK315.

Secondo un altro aspetto dell'invenzione un procedimento di sintesi di un composto di formula generale (I) prevede una reazione di condensazione tra un derivato idrossilato di una sulfonilurea ed un acido carbossilico.

Ad esempio, la sintesi del suddetto derivato idrossi-sulfonilureico può essere condotta secondo procedimenti noti, riportati in letteratura, si veda ad esempio R.A. Hill et al *Bicorg Med Chem*, 11, 2003, 2098-2113.

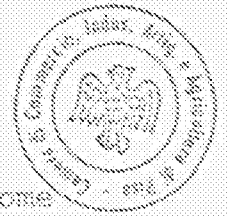
Vantaggiosamente, la reazione di condensazione tra il derivato idrossilato della sulfonilurea e l'acido carbossilico viene condotta in presenza di dicitcloesilurea (DCC) e di quantità catalitiche di 4-dimetilamminopiridina (DMAP).

Nell'esempio riportato, il derivato idrossilato è un composto idrossilato sull'anello cicloesilico della glibenclamide.

Preferibilmente, il derivato idrossilato della glibenclamide è un metabolita attivo di questa, ad esempio:

- 4-trans-idrossiglibenclamide (M-1),
- 3-cis-idrossiglibenclamide (M-2).

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione una composizione farmaceutica per il trattamento del diabete mellito di tipo 2 comprende una determinata quantità di



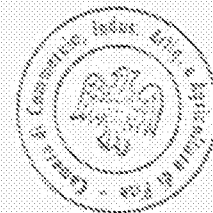
- 9 -

almeno un composto avente formula generale (I) come sopra illustrata e descritta.

In particolare, i gruppi funzionali presenti sul farmaco "nativo" sono in grado di assicurare la
5 coniugazione con opportuni linker provvisti di gruppi NO-donor attraverso la formazione di legami facilmente idrolizzabili in vivo, quale il legame estereo. Di conseguenza, la composizione farmaceutica che si ottiene è in grado di contrastare l'aspetto patologico
10 prettamente endocrino/metabolico del diabete mellito di tipo 2, grazie al profilo farmacodinamico del farmaco "nativo", secretagogo dell'insulina, e allo stesso tempo rappresenta una fonte esogena di NO, in grado di assicurare il corretto svolgimento di quelle funzioni
15 cardiovascolari notoriamente compromesse a causa del deficit di NO endogeno, imputabile alla disfunzione endoteliale di origine diabetica.

In particolare, oltre ad almeno uno dei composti sopra descritti, la composizione farmaceutica può
20 comprendere anche eccipienti farmacologicamente accettabili.

Si riporta di seguito a titolo di esempio un possibile procedimento di sintesi di un composto, secondo la presente invenzione, in particolare il DK315.



5 ESEMPIO 1

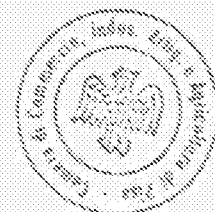
Sintesi di 5-cloro-N-[2-[4-((4'-trans-
[(nitrossi)metil]benzoilossi)cicloesilcarbamoilsulfamoil
]fenil]etil]-2-metossi-benzamide (DK315).

Ad una soluzione di 5-cloro-N-[2-[4-((4'-trans-
10 idrossi) cicloesilcarbamoilsulfamoil)fenil]etil]-2-
metossi-benzamide (250 mg, 0.49 mmol) e acido 4-
[(nitrossi)metil]benzoico (97 mg, 0.49 mmol) in CH_2Cl_2 è
stata addizionata dicicloesilurea (DCC) (122 mg; 0.59
mmol) e 4-dimetilamminopiridina (DMAP) in quantità
15 catalitica. La sospensione è stata agitata vigorosamente
a temperatura ambiente per circa 3h. Trascorso tale
periodo, il precipitato formatosi durante la reazione
viene filtrato ed il filtrato concentrato a pressione
ridotta. Il prodotto grezzo ottenuto viene quindi
20 purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando
come eluente una miscela di $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9.5:0.5) per dare
il composto desiderato come solido bianco.

Resa: 32% (110mg, 0.16 mmol)

Punto di fusione: 85-87°C

25 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.09-2.04 (m, 8H); 3.02 (t, 2H, $J =$
6.7Hz); 3.66-3.76 (m, 3H); 3.81 (s, 3H); 4.88-4.96 (m,
1H); 5.46 (s, 2H); 6.44 (d, 1H, $J = 6.7$ Hz); 6.88 (d, 1H,

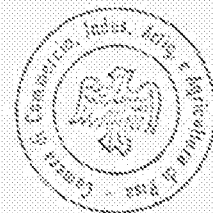


$J = 8.9 \text{ Hz}$); 7.35-7.46 (m, 5H); 7.85-7.89 (m, 3H); 8.03 (d, 2H, $J=8.2 \text{ Hz}$); 8.13 (d, 1H, $J = 2.7 \text{ Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 29.83, 30.32, 34.00, 35.75, 40.81, 48.26, 49.52, 56.47, 72.59, 73.82, 113.10, 122.73, 126.88, 127.52, 128.52, 129.69, 130.14, 131.53, 131.87, 132.60, 137.32, 145.49, 156.05, 164.30, 165.34, 168.25, 169.18.

Analisi Elementare:

$\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{SCl}$	C	H	N
Calcò	54.83	4.83	6.13
Trovò	54.27	5.02	7.92

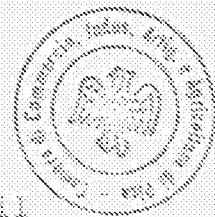


Si riportano di seguito i risultati sperimentali di alcuni test condotti sul composto DK315 finalizzati ad indagare gli effetti secretagoghi dell'insulina e il rilascio di ossido di azoto (NO), potenzialmente utile per il trattamento delle diverse conseguenze del diabete mellito di tipo 2.

Risultati sperimentali

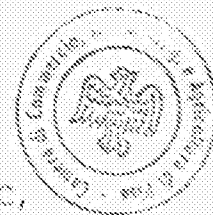
È stato condotto uno studio funzionale sull'effetto di M-1 e DK315 in isole pancreatiche umane isolate mediante digestione della ghiandola con collagenasi e successiva purificazione su gradiente di densità.

Per la digestione il pancreas viene preparato eliminando i tessuti in eccesso (tessuto adiposo, tessuto vascolare ecc.) e utilizzando una parte appropriata della ghiandola (generalmente corpo e coda). Per la digestione è stato impiegato l'enzima collagenasi (Roche, collagenase P). Il dotto pancreatico viene incannulato e la soluzione per la digestione (collagenasi, 1,5 mg/ml) solubilizzata in 200 ml di Hanks' Balanced Salts (HBSS) con il 2% di albumina umana (Human-Albumin® Biagini 20%) è lentamente iniettata per distendere il tessuto. Dopo distensione, la ghiandola è introdotta in un beker di vetro e posta all'interno di un bagnetto ad acqua termostata alla temperatura di 36,5°C. L'azione della collagenasi viene controllata una prima volta dopo 8 minuti e successivamente ogni 3 minuti osservando un'aliquota del preparato al



microscopio a luce invertita. Dopo circa 15 minuti il beker viene rimosso dal bagnetto e il pancreas viene continuamente agitato con l'ausilio di pinze chirurgiche sterili fino a quando la digestione non raggiunge un
5 livello valutato idoneo; a questo punto il tessuto viene filtrato su setacci di acciaio posti in sequenza, le cui maglie misurano rispettivamente 400 e 90 μ m. La soluzione passa attraverso i filtri ed i frammenti maggiori rimasti intrappolati sul filtro da 400 μ m
10 vengono recuperati all'interno del beker per continuare la digestione. Il tessuto trattenuto sul filtro da 90 μ m viene recuperato con HBSS al 2% di albumina umana in un beker. La stessa procedura di filtrazione, lavaggio e raccolta in soluzione di HBSS, viene ripetuta ogni 5
15 minuti per circa 45 minuti o comunque fino a completa digestione dell'organo.

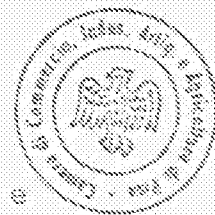
La procedura di purificazione condotta successivamente ha come scopo principale quello di separare il tessuto esocrino da quello endocrino. Il
20 volume di HBSS raccolto è aliquotato in provette di polipropilene coniche da 50 ml e centrifugato a 250 g per 2 minuti a 4 °C. Il surnatante viene scartato ed il pellet (approssimativamente di 1-2 ml) risospeso con 15 ml di una soluzione costituita dall'80% di Lymphoprep
25 (Nycomed) e dal 20% di HBSS. Sulla superficie della soluzione sono quindi stratificati 10 ml di Hanks's per creare un opportuno gradiente di densità. Dopo



centrifugazione per 5 minuti a 909 giri al minuto a 4°C, le isole si concentrano all'interfaccia tra lo strato di Lymphoprep e quello di HBSS dove vengono recuperate e nuovamente centrifugate per 2 minuti a 909 giri al minuto a 4°C. Al termine della procedura, aliquote contenenti circa 2500 isole sono sospese in 40 ml di mezzo di coltura (M199 addizionato con 10% di siero bovino ed antibiotici), caricate in fiasche di plastica per colture cellulari in sospensione (75 cm³, Iwaki) e messe in coltura a 27°C in un incubatore a CO₂ (5% CO₂). Il mezzo di coltura viene cambiato una prima volta la mattina successiva all'isolamento al fine di rallentare, per diluizione, l'azione della collagenasi, poi settimanalmente per rinnovare i componenti essenziali di coltura (Bugliani M, et al., *Transplant Proc.* 2004, 36(3):605-6).

Studio funzionale

Per la determinazione in vitro della funzionalità β -cellulare, le isole isolate sono state sottoposte ad incubazione statica in soluzioni di Krebs-Ringer-bicarbonato-Hepes (KRBBH), addizionate con albumine 0.5% e glucosio alle concentrazioni di 3.3 mM e 16.7 mM a pH 7.4. Gruppi di isole di dimensioni simili sono state trasferite in provette di polipropilene da 5 ml (ogni punto sperimentale è stato eseguito in triplicata) e preincubate per 45 minuti con soluzione di KRBBH contenente glucosio 3.3 mM. Dopo un veloce lavaggio le



isole sono incubate per 45 minuti ancora con KRBB e glucosio 3.3 mM. Da ogni provetta è stata raccolta un'aliquota di surnatante per la determinazione della quantità di insulina rilasciata in condizioni basali.

5 Successivamente le stesse isole sono incubate per 45 minuti con glucosio 16.7 mM oppure glibenclamide (Gb) 10 µM, Gb 100 µM, metabolita 4-trans-idrossi-glibenclamide (M-1) 10 µM, M-1 100 µM, DK315 10 µM, DK315 100 µM. Da ogni provetta si raccoglie un'aliquota di surnatante per

10 la determinazione della quantità di insulina rilasciata in seguito a stimolo. Come descritto di seguito, la determinazione dell'insulinemia viene eseguita con metodica IRMA (Lupi B et al, Diabetes, 2002, 51(5),1437-42; Marchetti P. et al., Diabetes, 2002, 51(5),1419-24).

15

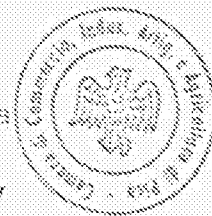
Dosaggio dell'insulina con metodo IRMA (immuno radiometric assay)

Come noto, il metodo IRMA è un dosaggio

20 immunoradiometrico basato sull'utilizzo di anticorpi, marcati radiattivamente, contro l'antigene che deve essere determinato. Il saggio prevede l'impiego di provette in polipropilene con il fondo rivestito di anticorpi monoclonali anti-insulina. Dopo l'aggiunta del

25 campione da misurare, il sistema viene completato con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale tracciante marcato con I125. Dopo lavaggio, la rimanente

radioattività legata alla provetta riflette la concentrazione dell'antigene (Lupi R et al, Diabetes, 2002, 51(5),1437-42).



Metodica

5 La procedura richiede 2 giorni e le seguenti operazioni vengono eseguite in sequenza:

1° Giorno

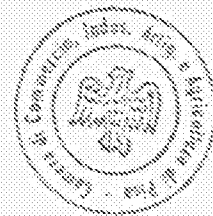
I campioni vengono messi a 4°C il giorno prima dell'esperimento.

10 2° Giorno

Gli standard forniti dal kit vengono ricostituiti con l'aggiunta degli opportuni volumi di acqua milliQ e passati al vortex. Nelle provette, precedentemente numerate, vengono dispensati 50 µl di standard o di 15 campione in doppio. Successivamente a ciascuna provetta vengono aggiunti 50 µl di anticorpo tracciante (radioattivo) e dopo agitazione i campioni vengono posti ad incubare per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine del periodo d'incubazione si aggiunge 1 ml di tampone di 20 lavaggio ricostituito con acqua milliQ. Il liquido viene aspirato con una pompa a vuoto e l'operazione di lavaggio viene ripetuta per altre due volte con 2 ml del tampone di lavaggio.

I campioni e gli standards vengono posti in sequenza 25 numerica crescente in raccoglitori del contatore gamma e ciascuno analizzato per 60 secondi.

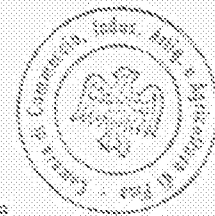
Studio funzionale sull'effetto di M-1 e DK315 in un

modello di muscolatura liscia vascolare

Al fine di evidenziare una attività vasorilasciante legata al rilascio di NO, i composti sono stati testati su anelli di aorta, prelevata da ratti albini maschi del ceppo Wistar (250-350 g), nel rispetto della normativa europea sulla sperimentazione animale (European Community Council Directive 86-609).

Gli animali sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale, sotto leggera anestesia con etere etilico. Il tratto toracico dell'aorta è stato asportato e accuratamente ripulito del tessuto connettivo ed adiposo e l'endotelio è stato rimosso meccanicamente, mediante strofinamento del lume dell'arteria con un ago da siringa. Anelli di aorta di 5 mm sono stati alloggiati, con un precarico di 2 g, in bagni per organi isolate da 20 ml e immersi in soluzione di Tyrode (composizione mM: NaCl 136.8; KCl 2.95; CaCl₂ 1.80; MgSO₄ 7H₂O 1.05; NaH₂PO₄ 0.41; NaHCO₃ 11.9; Glucosio 5.5), termostata a 37°C e continuamente gorgogliata con una miscela gassosa di O₂ (95%) e CO₂ (5%).

La tensione sviluppata dalla muscolatura liscia vascolare è stata registrata attraverso un trasduttore isometrico (Grass FT03), connesso ad un sistema computerizzato per la rilevazione e l'analisi dei dati (Bio-pac). Dopo un periodo di equilibrio di 60 min, l'avvenuta rimozione dell'endotelio è stata verificata



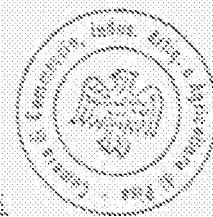
tramite la somministrazione di acetilcolina 10 microM a preparati precontratti con KCl 30 mM. Un effetto vasorilasciante dell'acetilcolina inferiore al 10% rispetto alla contrazione indotta dal KCl è stato considerato indice di un'accettabile rimozione dell'endotelio. Gli organi in cui è stata osservata un'azione vasorilasciante superiore a questo limite sono stati scartati.

A) Curve concentrazione-risposta vasorilasciante
40 min dopo il controllo della rimozione endoteliale, i preparati sono stati contratti con KCl (30mM) e, al plateau, sono state somministrate concentrazioni cumulative crescenti di M-1 o di DK315 (1nM-100µM). Esperimenti preliminari hanno consentito di valutare sia l'inefficacia del veicolo (dimetilsolfossido, DMSO) sia che la contrazione indotta da KCl (30 mM) è stabile per almeno 60 min.

Lo stesso protocollo sperimentale è stato seguito con preparati in cui, subito dopo il controllo della rimozione dell'endotelio, è stato incubato ODQ 1 microM (inibitore dell'enzima guanilato ciclasii).

B) Valutazione "time-course" della risposta vasorilasciante

40 min dopo il controllo della rimozione endoteliale, i preparati sono stati contratti con KCl (30mM) e, al plateau, è stata somministrata una singola concentrazione (1 microM) di M-1, di DK315 o del farmaco



di riferimento sodio nitroprussiato (noto donatore di NO). L'effetto vasorilasciante è stato osservato per 50 min.

Analisi dei dati

5 Il profilo dell'azione vasorilasciante è stato espresso in termini di efficacia (Emax) e di potenza (pIC50).

Il valore di Emax rappresenta la massima risposta vasorilasciante registrata nelle curve concentrazione-
10 risposta, espresso come % rispetto al tono contrattile indotto dal KCl (30 mM). Il parametro di pIC50 rappresenta il cologaritmo della concentrazione molare del composto in esame in grado di indurre una risposta
15 vasorilasciante pari al 50% del tono contrattile causato dal KCl (30 mM) ed è stato ricavato dalle curve concentrazione-risposta, mediante procedura di calcolo computerizzato (software: GraphPad Prism 3.0). I
parametri di efficacia e potenza sono espressi come
20 media \pm errore standard, ricavati da 6 diversi esperimenti.

Effetto secretagogico dell'insulina

Sono stati preliminarmente condotti esperimenti con
isole pancreatiche di cinque donatori, le cui
25 caratteristiche sono riportate nella tabella 1.

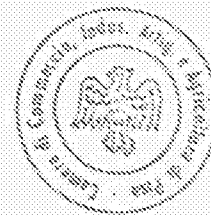


Tabella 1

	Media \pm DS
Età (anni)	63,2 \pm 10,9
Genere (M/F)	3/2
Indice di Massa Corporea (IMC) (Kg/m ²)	27,5 \pm 4,2
Causa della morte (vascolare/traumatico)	3/2

Nelle figure 1 e 3 riportate nelle tavole allegat
 5 sono illustrati i risultati ottenuti per tre diverse
 prove. I risultati di secrezione sono espressi come
 indice di stimolazione (IS). Questo è dato dal rapporto
 tra la quantità di insulina rilasciata in seguito a
 stimolo e la quantità di insulina rilasciata in
 10 condizioni basali.

Sono stati, quindi, calcolati i valori medi per le
 tre diverse prove. Questi sono riportati nelle tabelle 2
 e 3 e sono graficamente illustrati nelle figure 2 e 4.

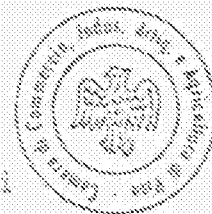
Tabella 2

	IS G	IS Glib 10 μ M	M-1 10 μ M	IS Glib 100 μ M	M-1 100 μ M
Media \pm DS	4,2 \pm 0,4	2,5 \pm 0,9	3,2 \pm 0,6	3,9 \pm 1,8	3,3 \pm 0,5

15

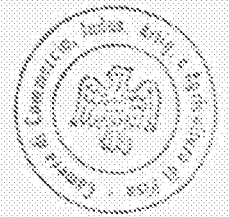
Tabella 3

	IS G	IS Glib 10 μ M	IS DK 315 10 μ M	IS Glib 100 μ M	IS DK 315 100 μ M
Media \pm DS	5,0 \pm 2,1	6,0 \pm 2,4	2,3 \pm 0,5	3,5 \pm 0,4	9,8 \pm 2,6



Con riferimento alla figura 1, il primo gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione del glucosio (IS G); il secondo gruppo gli indici di stimolazione in risposta alla glibenclamide a basse concentrazioni (IS Glib 10 μ M); il terzo gruppo indica gli indici di stimolazione in risposta al metabolita M-1 a basse concentrazioni (IS M-1 10 μ M); il quarto gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione in risposta alla glibenclamide ad alte concentrazioni (IS Glib 100 μ M) ed infine il quinto gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione in risposta al metabolita M-1 ad alte concentrazioni (IS M-1 100 μ M). Nella figura 2 sono riportate le medie di tali esperimenti.

Con riferimento alla figura 3, il primo gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione del glucosio (IS G); il secondo gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione in risposta alla glibenclamide a basse concentrazioni (IS Glib 10 μ M); il terzo gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione in risposta all'ibrido DK315 a basse concentrazioni (IS DK315 10 μ M); il quarto gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione in risposta alla glibenclamide ad alte concentrazioni (IS Glib 100 μ M). Il quinto gruppo di istogrammi indica gli indici di stimolazione in risposta all'ibrido DK315 ad alte concentrazioni (IS DK315 100 μ M). Nella figura 4 sono



riportate le medie di tali esperimenti.

I dati di questo studio indicano che, analogamente alla glibenclamide, il suo metabolita 4-trans-idrossi-glibenclamide (M-1) e l'ibrido DK315 hanno simile
5 effetto secretagogo dell'insulina. In particolare, l'ibrido DK315 induce il rilascio di insulina con un'efficacia che appare particolarmente evidente alle
concentrazione più alta [100 μ M].

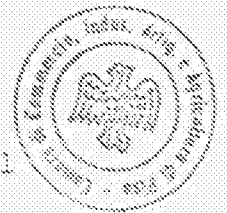
Indagine dell'effetto vasorilasciante NO-mediato

10 In figura 5 sono riportate le curve concentrazione-risposta vasorilasciante per DK315, in assenza (controllo, quadrati neri) o in presenza di ODQ 1 μ M (+ODQ, quadrati bianchi), un inibitore selettivo della
guanilato ciclasi solubile (sGC).

15 In ascissa, le concentrazioni molari della composizione farmaceutica sono riportate come logaritmi in base 10. In ordinata, l'effetto vasorilasciante è espresso come % rispetto alla pre-contrazione indotta da KCl 30 mM.

20 In particolare, il composto DK315 induce una risposta vasorilasciante dose-dipendente mostrando una efficacia totale ($E_{max} = 100$ in tutti gli esperimenti svolti) e una potenza sub-micromolare ($pIC_{50} = 7.24 \pm 0.012$).

25 La presenza (1 μ M) di ODQ ha pressoché totalmente abolito la risposta vasorilasciante di DK315. Poiché l'azione vasorilasciante di NO è legata alla sua



capacità di attivare l'enzima guanilato ciclasi, il fatto che ODQ abbia abolito l'effetto vasorilasciante di DK315 indica che tale composto induce l'effetto vasodilatatore attraverso la liberazione di NO.

8 DK315 è pertanto una molecola dotata di proprietà farmacodinamiche di NO-donor. Alle concentrazioni saggiate, il composto M-1 non ha mostrato significativi effetti vasodilatatori.

10 Valutazione "time-course" della risposta vasorilasciante

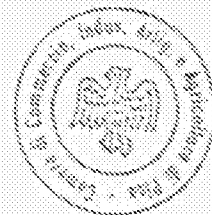
In figura 6 è riportato l'andamento della risposta vasorilasciante in funzione del tempo per DK315 (quadrati) e per un farmaco di riferimento, il sodio nitroprussiato (SNP), (triangoli). In ascissa, sono indicati i minuti di osservazione. In ordinata, l'effetto vasorilasciante è espresso come % rispetto alla pre-contrazione indotta da KCl 30 mM. Entrambi i farmaci sono stati somministrati alla concentrazione 15 μM , al tempo 0.

Alla concentrazione di 1 μM , il composto DK315 ha provocato una risposta vasorilasciante pressoché completa che raggiunge il livello massimo in circa 30 min. La risposta massima indotta da tale concentrazione è risultata analoga a quella prodotta dal 25 farmaco di riferimento sodio nitroprussiato (SNP), tuttavia il confronto tra il profilo dell'andamento



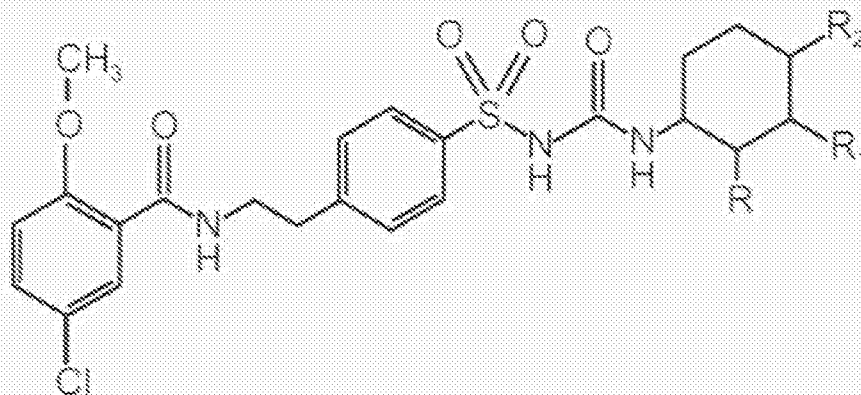
dell'effetto in funzione del tempo mostrato da DK315 e quello mostrato dal SNP consente di rilevare che la vasodilatazione indotta da DK315 può essere correlata ad un rilascio relativamente lento di NO. DK315 può essere considerato dunque un "NO-donor lento".

Alla concentrazione 1 μ M, il composto M-1 non ha indotto un effetto vasorilasciante significativo.



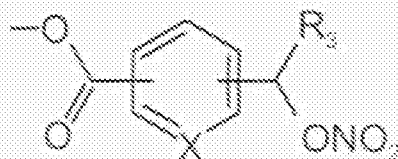
RIVENDICAZIONI

1. Composto caratterizzato dal fatto di avere un'azione ipoglicemizzante e di rilasciare nel contempo ossido di azoto (NO), detto composto avendo la seguente formula generale (I):



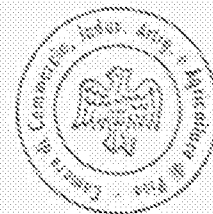
dove almeno uno tra R, R₁, ed R₂ è un sostituente comprendente un gruppo nitrossiestere legato ad un raggruppamento acilico alifatico, aromatico o alifatico-aromatico.

2. Composto, secondo la rivendicazione 1, in cui detto sostituente è rappresentato dalla formula (II):



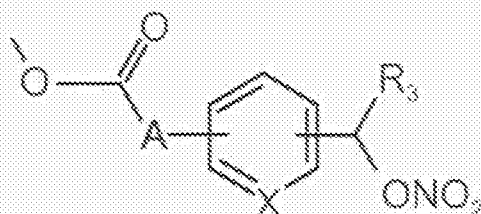
in cui:

- X è scelto tra: un atomo di azoto, un CH,
- R₃ è scelto tra: un atomo di idrogeno, un gruppo alchilico quale un gruppo metilico, un gruppo etilico, un gruppo iso-propilico, un gruppo



propilico, un gruppo butilico, un gruppo iso-butilico.

3. Composto, secondo la rivendicazione 1, in cui detto sostituente è rappresentato dalla formula (III):



in cui:

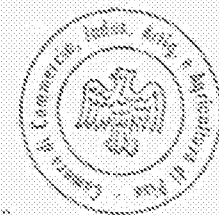
- A è scelto tra: un metilene, un gruppo alchilico lineare (C2-C4), un gruppo ramificato, ad esempio -CH(CH₃), -CH(CH₂-CH₃), -CH(iso-propile).

- X è scelto tra: un atomo di azoto, un CH,

- R₃ è scelto tra: un atomo di idrogeno, un gruppo alchilico quale un gruppo metilico, un gruppo etilico, un gruppo iso-propilico, un gruppo propilico, un gruppo butilico, un gruppo iso-butilico.

4. Composto, secondo la rivendicazione 1, 2 o 3, in cui detto gruppo sostituente di natura alifatica o di formula (II) o (III) presenta configurazione cis- rispetto al legame CH-NHCO-.

5. Composto, secondo la rivendicazione 1, 2 o 3, in cui detto gruppo sostituente di natura alifatica o di formula (II) o (III) presenta configurazione trans- rispetto al legame CH-NHCO-.



6. Procedimento di sintesi di un composto come da rivendicazione 1 **caratterizzato dal fatto** di prevedere una reazione di condensazione tra un derivato idrossilato di una sulfonilurea ed un acido carbossilico.

7. Procedimento, secondo la rivendicazione 6, in cui detta reazione di condensazione tra detto derivato idrossilato della sulfonilurea e detto acido carbossilico viene condotta in presenza di dicitcloesilurea (DCC) e di quantità catalitiche di 4-dimetilamminopiridina (DMAP).

8. Procedimento, secondo la rivendicazione 6, in cui detto derivato idrossilato della sulfonilurea è un composto idrossilato sull'anello cicloesilico della glibenclamide.

9. Procedimento, secondo la rivendicazione 8, in cui detto composto idrossilato sull'anello cicloesilico della glibenclamide è un metabolita attivo di questa scelto tra:

- 4-trans-idrossiglibenclamide (M-1),
- 3-cis-idrossiglibenclamide (M-2).

10. Composizione farmaceutica per il trattamento del diabete mellito di tipo 2 **caratterizzato dal fatto** di comprendere una determinata quantità di almeno un composto avente formula generale (I) secondo la rivendicazione 1.

p.p. Università degli studi di PISA.

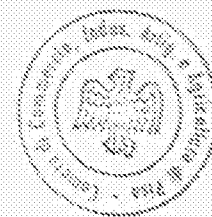


Fig. 1

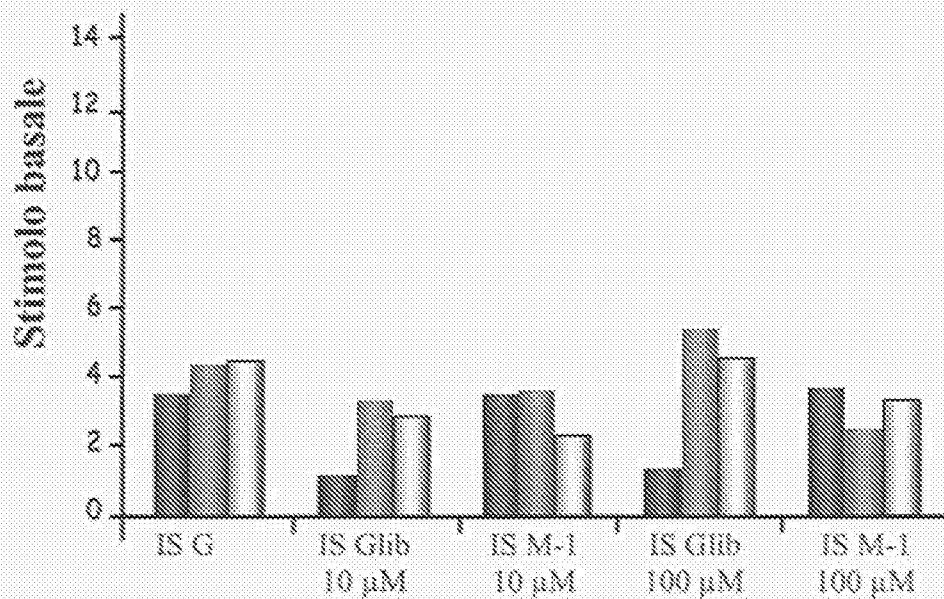
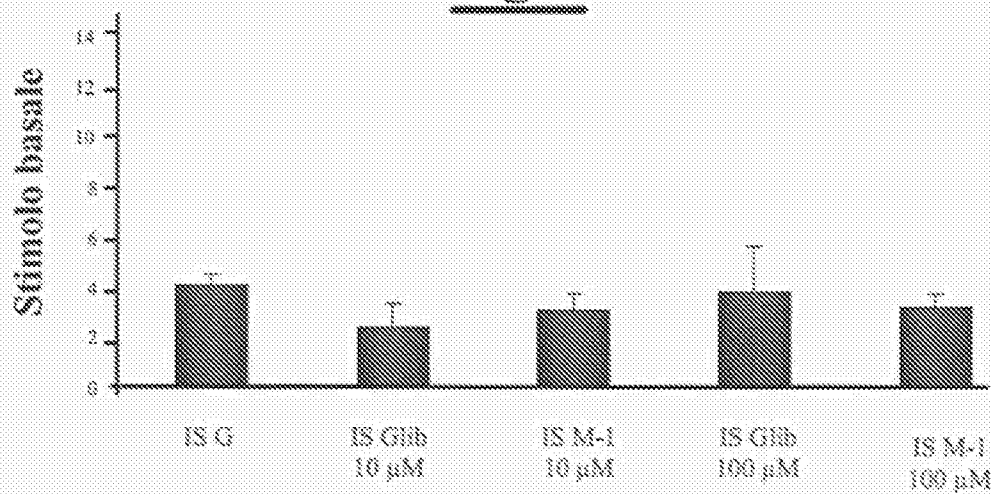


Fig. 2



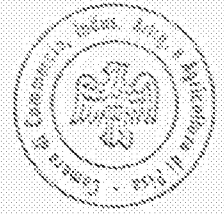


Fig. 3

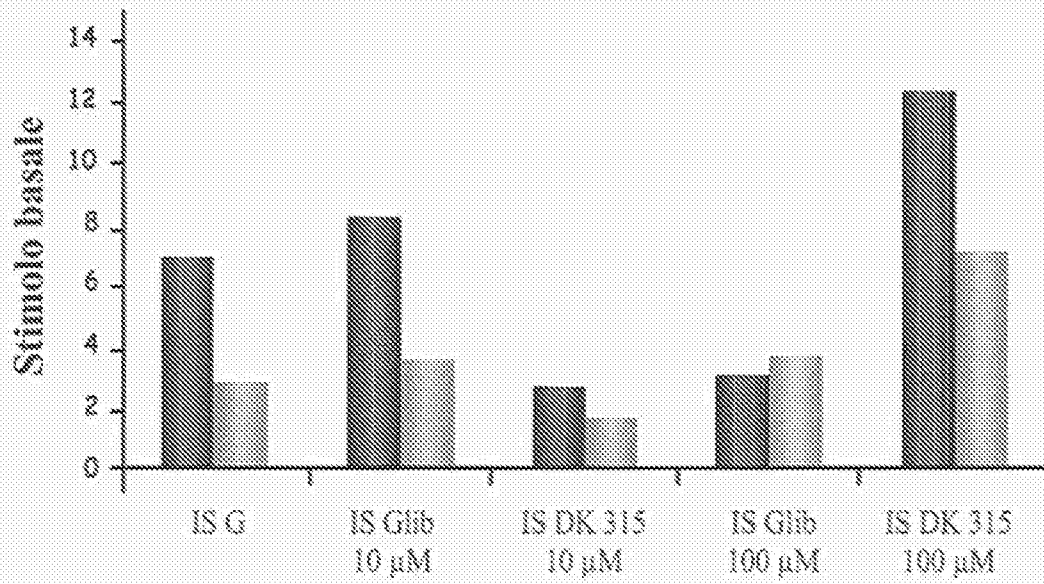
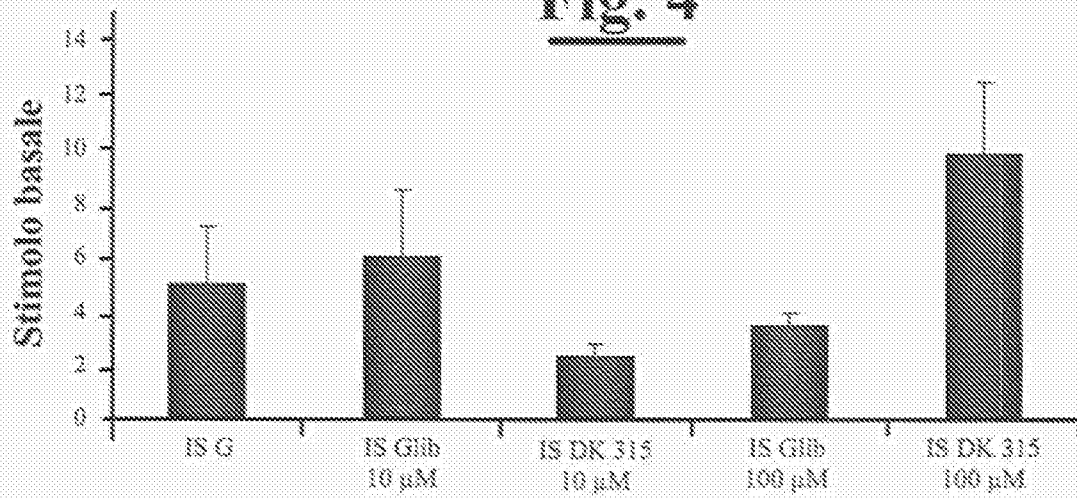


Fig. 4



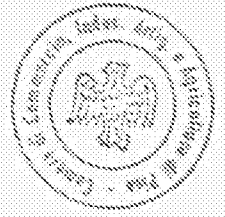


Fig. 5

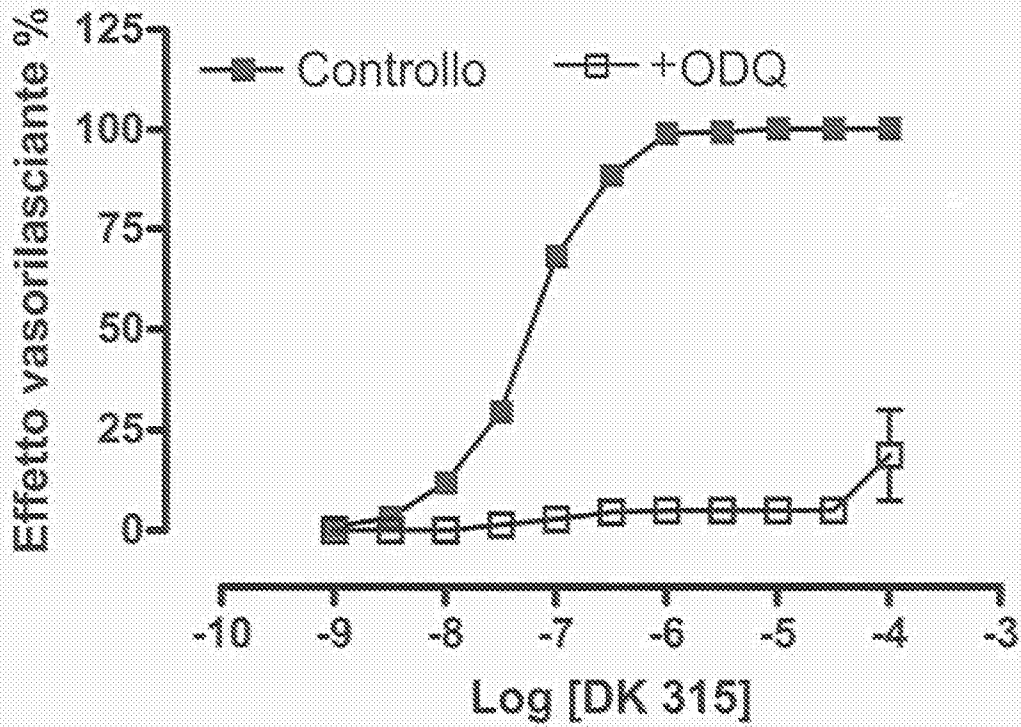


Fig. 6

