



Brevetto europeo No. 2552906

Domanda di brevetto europeo No. 11710087.5

Data di deposito: 11 marzo 2011

Classificazione Internazionale: C07D401/14, A61K31/496, A61P29/00

5 Priorità: Statunitense No. 20100319015P del 30 marzo 2010

Titolo: ANTAGONISTA DEL RECETTORE PER CGRP

Richiedente: Bristol-Myers Squibb Company  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543

10 U.S.A.

Inventori: CHATURVEDULA, Prasad V.  
DUBOWCHIK, Gene M.  
MACOR, John E.

\*\*\*\*\*

15 Descrizione

SFONDO DELL'INVENZIONE

RIFERIMENTO INCROCIATO A DOMANDE CORRELATE

Questa domanda rivendica la priorità della Domanda U.S. Provvisoria No. 61/319,015 depositata il 30 aprile, 2010.

20 La descrizione concerne, in generale, il composto (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-ossopropan-2-il)-4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-carbossammide (Composto I o il composto di Formula I) compresi suoi sali farmaceuticamente accettabili, che è un antagonista del recettore per CGRP. La descrizione concerne anche composizioni farmaceutiche e metodi per usare il composto nel trattamento di malattie correlate con CGRP, compresi mal di testa da emicrania, vasodilatazione neurogenica, infiammazione neurogenica,



lesione termica, shock circolatorio, vampate associate con la menopausa, malattie infiammatorie delle vie aeree, come asma, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD) e cancro.

Il peptide correlato con il gene della calcitonina (CGRP, *Calcitonin Gene-Related Peptide*) è un peptide da 37 amminoacidi naturalmente presente identificato innanzitutto in 1982 (Amara, S. G. et al, Science 1982, 298, 240-244).

5 Sono espresse due forme del peptide ( $\alpha$ CGRP e  $\beta$ CGRP) che differiscono per uno e tre amminoacidi in ratti e in umani, rispettivamente. Il peptide è ampiamente distribuito sia nel sistema nervoso periferico (PNS) che centrale (CNS), è localizzato principalmente in neuroni sensoriali afferenti e centrali e mostra una serie di effetti biologici, compresa la vasodilatazione.

Quando rilasciato dalla cellula, CGRP si lega a specifici recettori di superficie cellulare accoppiati a proteine G ed esercita la sua azione biologica principalmente mediante l'attivazione dell'adenilato ciclastasi intracellulare (Poyner, D. R. et al, Br J Pharmacol 1992, 105, 441-7; Van Valen, F. et al, Neurosci Lett 1990, 119, 195-8.). Sono state proposte due classi di recettori per CGRP, CGRP1 e CGRP2, sulla base delle proprietà antagonistiche del frammento peptidico di CGRP(8-37) e dalla capacità di analoghi lineari di CGRP di attivare i recettori CGRP2 (Juaneda, C. et al. TiPS 2000, 21, 432-438). Tuttavia, vi è una mancanza di prove molecolari per il recettore CGRP2 (Brain, S. D. et al, TiPS 2002, 15 23, 51-53). Il recettore CGRP1 ha tre componenti: (i) un recettore simile al recettore per calcitonina a 7 domini transmembrana(CRLR); (ii) l'attività recettoriale a singolo dominio transmembrana che modifica le proteine di tipo 1 (RAMP1); e (iii) la proteina componente dei recettori intracellulari (RCP) (Evans B. N. et al., J Biol Chem. 2000, 275, 31438-43). RAMP1 è necessario per il trasporto di CRLR alla membrana plasmatica e per il legame del ligando al recettore per CGRP (McLatchie, L. M. et al, Nature 1998, 393, 333-339). RCP è necessaria per la trasduzione del 20 segnale (Evans B. N. et al., J Biol Chem. 2000, 275, 31438-43). Vi sono differenze note specie-specifiche nel legame di antagonisti piccole molecole al recettore per CGRP con affinità tipicamente maggiore osservata per l'antagonismo al recettore umano piuttosto che per altre specie (Brain, S. D. et al, TiPS 2002, 23, 51-53). La sequenza amminoacidica di RAMP 1 determina la selettività per le specie, in particolare, il residuo amminoacidico Trp74 è responsabile per il fenotipo del recettore umano (Mallee et al. J Biol Chem 2002, 277, 14294-8).

E' suggerito che inibitori di CGRP a livello recettoriale siano utili in condizioni patofisiologiche, in cui è avvenuta eccessiva attivazione del recettore per CGRP. Alcuni di questi includono vasodilatazione neurogenica, infiammazione neurogenica, emicrania, cefalea a grappolo ed altre cefalee, lesione terminale, shock termico, vampate da menopausa e asma. L'attivazione del recettore per CGRP è stata implicata nella patogenesi della cefalea da emicrania (Edvinsson L. *CNS Drugs* 2001;15(10):745-53; Williamson, D. J. *Microsc. Res. Tech.* 2001, 53, 167-178.; Grant, A. D. *Brit. J. Pharmacol.* 2002, 135, 356-362.). I livelli serici di CGRP sono elevati durante l'emicrania (Goadsby PJ, et al. *Ann Neurol* 1990;28:183-7) ed il trattamento con farmaci antiemicrania riporta i livelli di CGRP a livelli normali, che coincidono con l'alleviamento della cefalea (Gallai V. et al. *Cephalalgia* 1995; 15: 384-90). I pazienti che soffrono di emicrania mostrano elevati livelli basali di CGRP a confronto con i controlli (Ashina M, et al., *Pain* 2000, 86(1-2):133-8.2000). L'infusione endovenosa di CGRP produce cefalea durevole in pazienti con emicrania (Lassen LH, et al. *Cephalalgia* 2002 Feb;22(1):54-61). Studi preclinici in cani e ratti riportano che il blocco sistemico di CGRP con l'antagonista peptidico di CGRP(8-37) non altera l'emodinamica sistemica a riposo né il flusso sanguigno regionale (Shen, Y-T. et al, *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 298, 551-8). Pertanto, gli antagonisti del recettore per CGRP possono rappresentare un nuovo trattamento per l'emicrania che eviti labilità cardiovascolari di vasocostrizione attiva associata con agonisti non selettivi di 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 'triptani' (per esempio, sumatriptan).

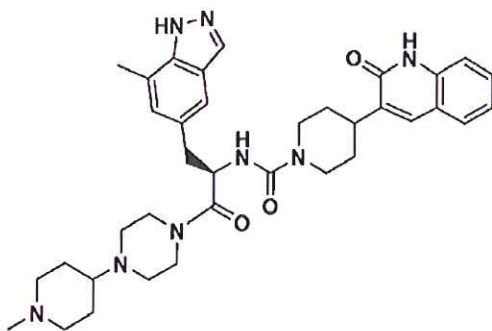
Gli antagonisti di CGRP hanno mostrato efficacia in test clinici umani. Vedi, Davis CD, Xu C. *Curr Top Med Chem.* 2008 8(16):1468-79; Benemei S, Nicoletti P, Capone JG, Geppetti P. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 9(1):9-14. Epub 2009 Jan 20; Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, Leibensperger H, Froman S, Assaid C, Lines C, Koppen H, Winner PK. *Lancet.* 2008 372:2115. Epub 2008 Nov 25; Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, Jones CJ, Lines CR, Rapoport AM; *Neurology* 2008 70:1304. Epub 2007 Ott 3.

L'invenzione fornisce vantaggi tecnici, ad esempio, il composto è nuovo e inibisce CGRP. In aggiunta, il composto fornisce vantaggi per usi farmaceutici, ad esempio, con riferimento ad uno o più dei loro meccanismi d'azione, legame, efficacia di inibizione, selettività del bersaglio, solubilità, profili di sicurezza o biodisponibilità.

Gli antagonisti di recettori per CGRP sono stati descritti nelle Pubblicazioni PCT, comprese WO2003/104236 e WO 2005/065779.

#### DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

L'invenzione comprende (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-ossopropan-2-il)-4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-carbossammide (Composto I o il Composto di Formula I) e composizioni farmaceutiche che sono utili in metodi per modulare CGRP e per trattare pazienti con condizioni mediche associate con livelli aberranti di CGRP o di segnalazione dei recettori per CGRP.



I

L'invenzione include tutte le forme di sali farmaceuticamente accettabili dei composti. I sali farmaceuticamente accettabili sono quelli in cui i controioni non contribuiscono in modo significativo all'attività fisiologica o alla tossicità dei composti e come tali agiscono come equivalenti farmacologici. Questi sali sono preparati in accordo con comuni tecniche organiche, impiegando reagenti disponibili in commercio. Alcune forme di sali anionici includono acetato, acistrato, besilato, bromuro, cloruro, citrato, fumarato, glucouronato, bromidrato, cloridrato, iodidrato, ioduro, lattato, maleato, mesilato, nitrato, pamoato, fosfato, succinato, solfato, tartrato, tosilato e xinofoato. Alcune forme di sali cationici includono ammonio, alluminio, benzatina, bismuto, calcio, colina, dietilammina, dietanolammina, litio, magnesio, meglumina, 4-fenilcicloesilammina, piperazina, potassio, sodio tromeatmmina e zinco.

L'invenzione intende includere tutti gli isotopi degli atomi che si trovano nei presenti composti. Gli isotopi includono quegli atomi aventi lo stesso numero atomico, ma differenti numeri di massa. A titolo di esempio generale e senza limitazione, gli isotopi dell'idrogeno includono deuterio e trizio. Gli isotopi del carbonio includono  $^{13}\text{C}$  e  $^{14}\text{C}$ . I

composti dell'invenzione marcati con isotopi possono essere preparati, in generale, con tecniche convenzionali note a coloro aventi esperienza nell'arte o con processi analoghi a quelli descritti qui, usando un appropriato reagente marcato con isotopi al posto del reagente non marcato altrimenti impiegato. Tali composti possono avere una varietà di usi potenziali, ad esempio come standard e reagenti per determinare l'attività biologica. Nel caso di isotopi stabili, tali composti possono avere il potenziale di modificare vantaggiosamente proprietà biologiche, farmacologiche o farmacocinetiche.

#### Metodi di Sintesi

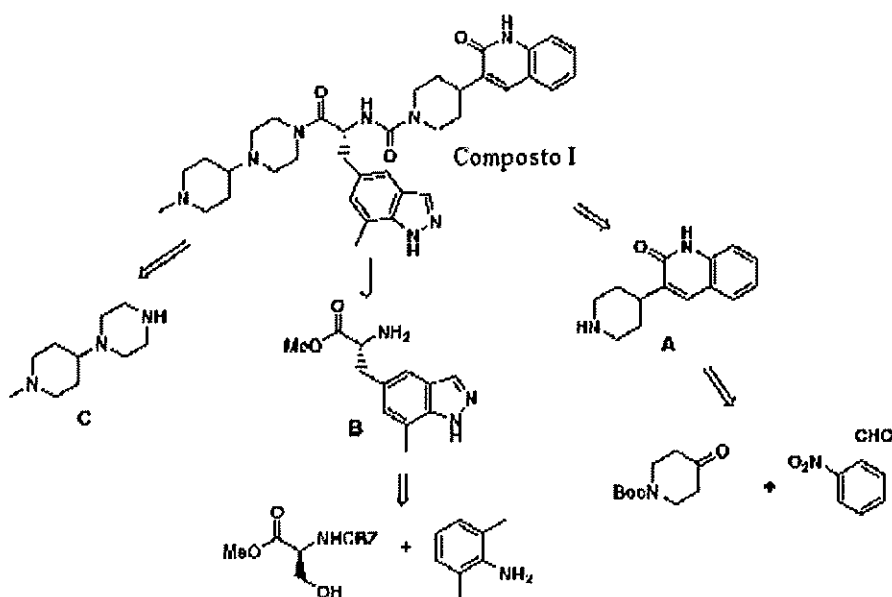
Le abbreviazioni seguono generalmente le convenzioni usate nell'arte. Le abbreviazioni chimiche usate nella descrizione e negli esempi sono definite come segue: "NaHMDS" per sodio bis(trimetilsilil)ammide; "DMF" per N,N-dimetilformammide; "MeOH" per metanolo; "NBS" per N-bromosuccinimide; "Ar" per arile; "TFA" per acido trifluoroacetico; "LAH" per idruro di litio alluminio; "BOC", "DMSO" per dimetilsolfossido; "h" ore; "rt" per temperatura ambiente o per tempo di ritenzione (a seconda del contesto); "min" per minuti; "EtOAc" per etil acetato; "THF" per tetraidrofurano; "EDTA" per acido etilendiammintetracetico; "Et<sub>2</sub>O" per dietil etere; "DMAP" per 4-dimetilamminopiridina; "DCE" per 1,2-dicloroetano; "ACN" per acetonitrile; "DME" per 1,2-dimetossietano; "HOBt" per 1-idrossibenzotriazolo idrato; "DIEA" per diisopropiletilammina, "Nf" per CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-; e "TMOF" per trimetilortoformiato.

Le abbreviazioni come usate qui, sono definite come segue: "1 x" per una volta, "2 x" per due volte, "3 x" per tre volte, "°C" per gradi Celsius, "eq" per equivalente o equivalenti, "g" per grammo o grammi, "mg" per milligrammo o milligrammi, "L" per litro o litri, "mL" o "ml" per millilitro o millilitri, "μL" per microlitro o microlitri, "N" per normale, "M" per molare, "mmol" per millimole o millimoli, "min" per minuto o minuti, "h" per ora o ore, "rt" per temperatura ambiente, "RT" per tempo di ritenzione, "atm" per atmosfera, "psi" per libbre per pollice quadrato, "conc." per concentrato, "sat" o "sat'd" per saturo, "MW" per peso molecolare, "mp" per punto di fusione, "ee" per eccesso enantiomerico, "MS" o "Mass Spec" per spettrometria di massa, "ESI" per spettrometria di massa con ionizzazione mediante elettrospray, "HR" per elevata risoluzione, "HRMS" per spettrometria di massa ad elevata risoluzione, "LCMS" per spettrometria di massa con cromatografia liquida, "HPLC" per cromatografia liquida ad elevate pressioni,

"RP HPLC" per HPLC in fase inversa, "TLC" o "tlc" per cromatografia su strato sottile, "NMR" per spettroscopia con risonanza magnetica nucleare, "<sup>1</sup>H" per protone, "δ" per delta, "s" per singoletto, "d" per doppietto, "t" per tripletto, "q" per quartetto, "m" per multipletto, "br" per ampio, "Hz" per Hertz e "α", "β", "R", "S", "E" e "Z" sono designazioni stereochimiche familiari ad un esperto nell'arte.

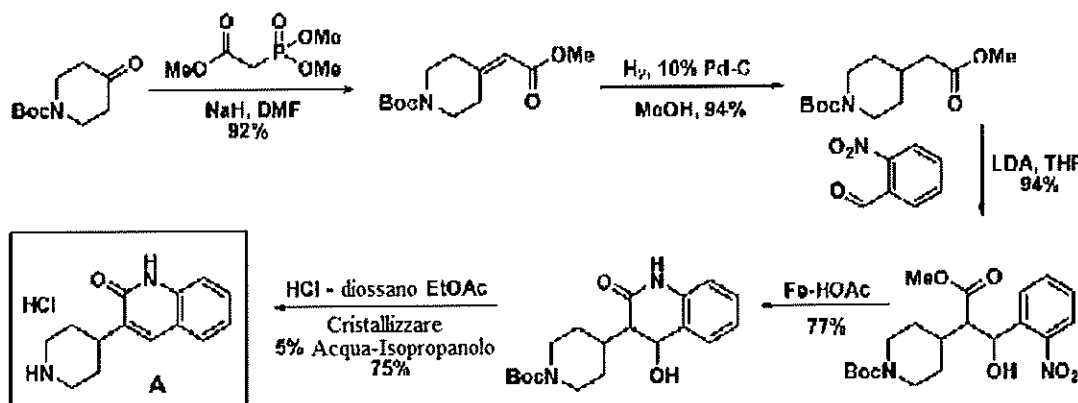
5 Il Composto I può essere preparato in accordo con lo Schema 1. Questa sintesi è di 14 fasi chimiche ed è altamente convergente, accoppiando i tre frammenti principali nelle ultime tre fasi. Come tale, la sintesi inizia con la preparazione dei frammenti principali A (Schema 2) e B (Schema 3).

Schema 1



La sintesi del frammento A ha inizio con la reazione di Horner-Emmons di *N*-Boc-4-piperidone con la ilide generata da trimetilfosfonoacetato per ottenere *tert*-butil 4-(2-metossi-2-ossoetiliden)piperidin-1-carbossilato in resa eccellente (Schema 2). L'idrogenazione catalitica mediata da palladio su carbonio riduce il doppio legame insaturo. Il trattamento di *tert*-butil 4-(2-metossi-2-ossoetil)piperidin-1-carbossilato con LDA genera l'enolato che, dopo intrappolamento con 2-nitrobenzaldehyde, fornisce il nitroalcol. La riduzione del gruppo nitro con ferro in acido acetico, seguito da trattamento con cloruro di idrogeno in diossano completa la sintesi del frammento A.

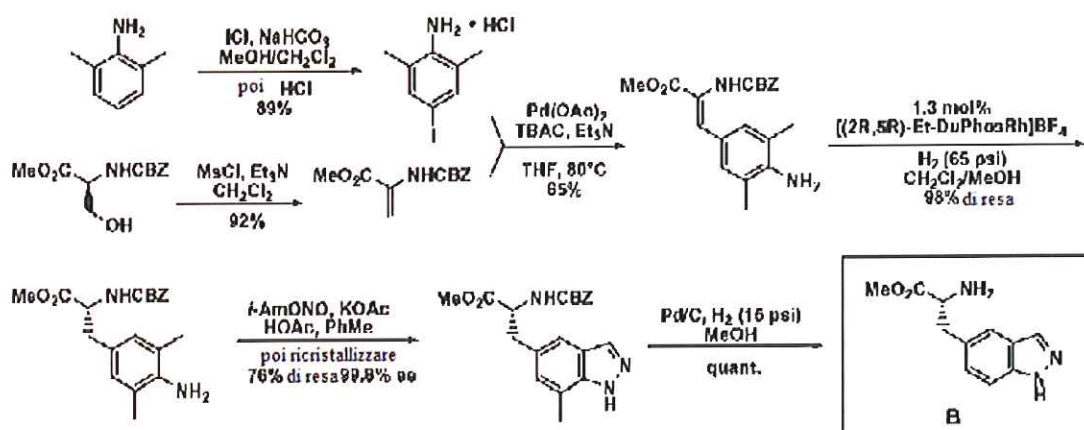
Schema 2



La sintesi dell'amminoacido indazolo B ha inizio con la iodazione di 2,6-dimetilalanina mediante l'azione di monoclورو di iodio (Schema 3). Questo intermedio è stato temporaneamente messo da parte. Il metil estere di *N*-CBZ-L-serina è stato sottoposto ad una reazione di metansolfonilazione/eliminazione in un recipiente per ottenere il metil estere di *N*-CBZ-deidroalanina. Con lo iodio e la deidroalanina alla mano, essi sono accoppiati in modo efficiente usando acetato di palladio (II) in un accoppiamento di Heck per ottenere il prodotto in una resa del 65%. A questo punto, il centro chirale è installato usando un'idrogenazione asimmetrica catalitica usando (-)-1,2-bis((2*R*,5*R*)-2,5-dietilfosfolano)benzen(cicloottadiene)rodio(I) tetrafluoroborato e idrogeno (60 psi) a dare l'amminoacido chirale in

~96% ee. L'anello indazolico è poi formato mediante l'azione di iso-amil nitruro. L'indazolo risultante è altamente cristallino. Una cristallizzazione da acetone/esani permette di ottenere l'amminoacido indazolo in purezza eccellente e con un 99,8% ee migliorato. La rimozione del gruppo protettivo CBZ in condizioni di idrogenazione completa la preparazione del frammento B. L'amminoacido indazolo B può anche essere preparato usando la risoluzione enzimatica dell'amminoacido o del chetoacido racemici (Hanson, Ronald L.; Davis, Brian L.; Goldberg, Steven L.; Johnston, Robert M.; Parker, William L.; Tully, Thomas P.; Montana, Michael A.; Patel, Ramesh N. Process Research and Development, Bristol-Myers Squibb, New Brunswick, NJ, USA. Organic Process Research & Development (2008), 12(6), 1119-1129.).

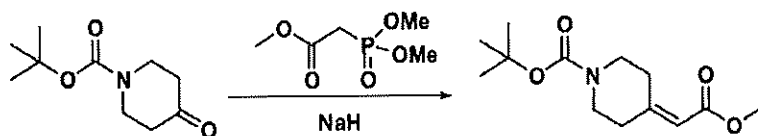
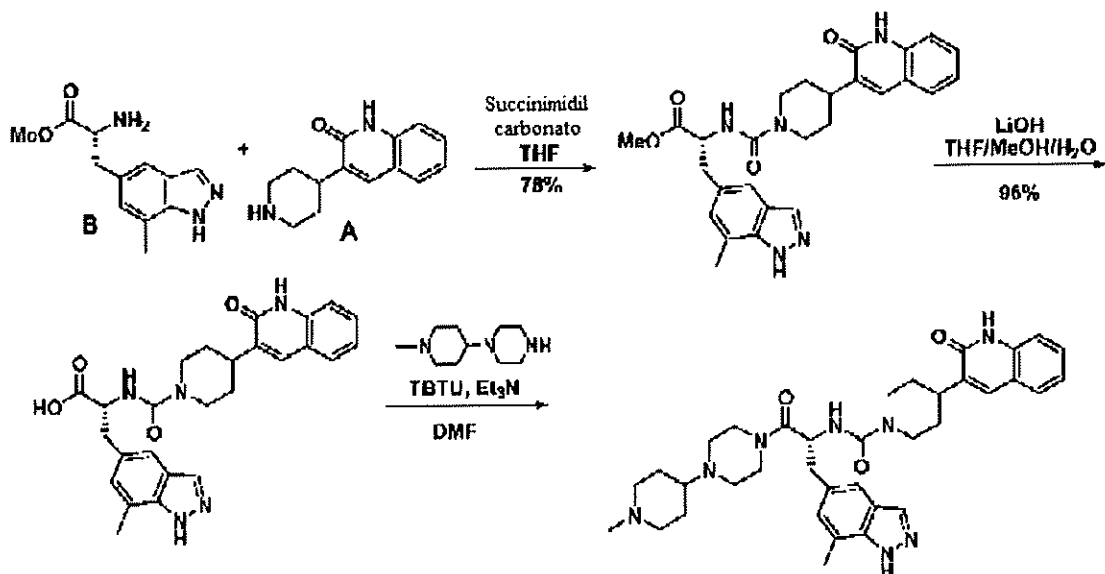
Schema 3



10 I frammenti A e B sono accoppiati in modo efficiente usando *N,N*-disuccinimidil carbonato per installare la porzione di urea in una resa del 78% (Schema 4). La saponificazione del metil estere con idrossido di litio da una resa quasi quantitativa dell'acido carbossilico. L'accoppiamento mediato da TBTU<sup>®</sup> dell'acido con 1-(1-metilpiperidin-4-

il)piperazina completa la sintesi del Composto I. La cromatografia flash permette di ottenere il prodotto come polvere amorfa che può essere cristallizzata da acetone per ottenere il Composto I come polvere cristallina bianca fine.

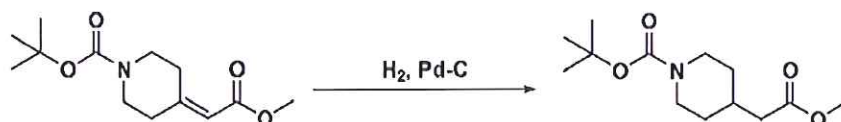
Schema 4



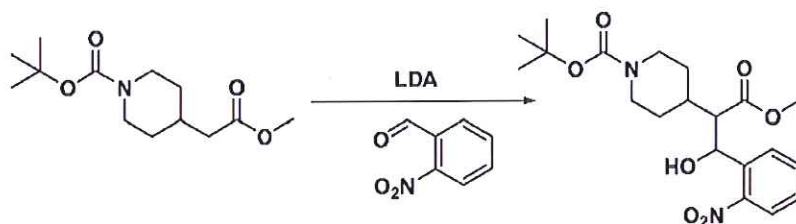
5

*tert*-butil 4-(2-metossi-2-ossoetiliden)piperidin-1-carbossilato. Idruro di sodio in olio minerale (60%, 7,92 g, 198,02 mmoli) è stato lavato con esani, poi sospeso in dimetilformammide (220 mL). La miscela è stata raffreddata a 0°C. Trimetil fosfonoacetato (29,0 mL, 189,82 mmoli) è stato aggiunto in gocce alla miscela di reazione agitata. Dopo

20 min a 0°C, una soluzione di *N-tert*-butossicarbonil-4-piperidone (30,41 g, 152,62 mmoli) in dimetilformammide (80 mL) è stata aggiunta alla miscela in gocce. La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore e poi diluita con dietil etere (650 mL). La miscela è stata lavata una volta con acqua e lo strato acquoso è stato estratto una volta con dietil etere. Gli strati organici combinati sono stati lavati 4 volte con acqua e la fase acquosa è stata scartata. La fase organica è stata lavata con salamoia ed essiccata su solfato di magnesio, filtrata e concentrata fino all'essiccamento. Il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco in una resa del 92%. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5,68 (s, 1 H), 3,66 (s, 3 H), 3,40-3,51 (m, 4 H), 2,90 (t, *J* = 5,49, 2 H), 2,25 (t, *J* = 5,49, 2 H), 1,44 (s, 9 H).

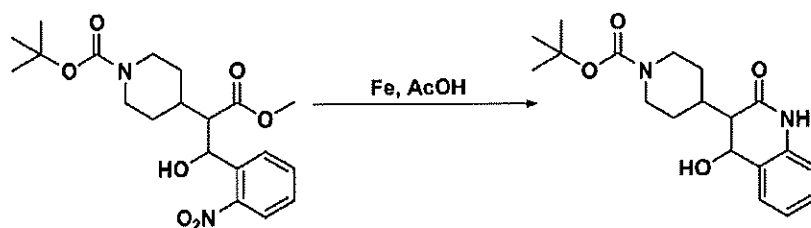


*tert*-butil 4-(2-metossi-2-ossoetil)piperidin-1-carbossilato. Una soluzione di *tert*-butil 4-(2-metossi-2-ossoetiliden)piperidin-1-carbossilato (35,71 g, 140 mmoli) in una miscela di 1:1 etil acetato/metanolo (220 mL) è stata trattata accuratamente con 50% di palladio al 10% umido su carbonio (3,3 g). Il recipiente di reazione è stato caricato con 55 psi di gas idrogeno e la miscela è stata agitata in un dispositivo Parr a temperatura ambiente per 16 ore. La miscela di reazione è stata poi filtrata per rimuovere il catalizzatore e il filtrato è stato concentrato *in vacuo*. Il composto del titolo è stato ottenuto come olio chiaro trasparente incolore in una resa del 97%. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4,04 (d, *J* = 10,25, 2 H), 3,64 (s, 3 H), 2,68 (t, *J* = 12,44, 2 H), 2,21 (d, *J* = 6,95, 2 H), 1,98-1,77 (m, 1 H), 1,64 (d, *J* = 13,54, 2 H), 1,41 (s, 9 H), 1,25-0,99 (m, 2 H).



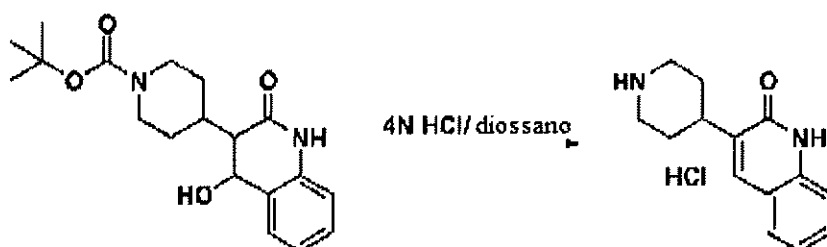
*Tert* butil estere dell'acido 4-[2-(1-drossi-1-metossicarbonil-2-(2-nitro-fenil)-etil]-piperidin-1-carbossilico. *N,N*-diisopropilammina (4,40 mL, 31,3 mmoli) è stata disciolta in tetraidrofurano (50 mL). La miscela è stata raffreddata a -

78°C. E' stato aggiunto butillitio (2,5 M in esani, 12,4 mL, 31 mmoli) in gocce alla soluzione agitata. Dopo agitazione a -78°C per 30 min, una soluzione di *tert*-butil 4-(2-metossi-2-ossoetil)piperidin-1-carbossilato (6,65 g, 25,8 mmoli) in tetraidrofurano (15 mL) è stata aggiunta in gocce alla miscela. L'agitazione è proseguita a -78°C per 1 ora. Una soluzione di 2-nitrobenzaldeide (3,90 g, 25,8 mmoli) in tetraidrofurano (20 mL) è stata aggiunta alla miscela in gocce e poi l'agitazione è proseguita a -78°C per altre 2,5 ore. La reazione è stata temprata con cloruro di ammonio acquoso freddo e poi diluito con acqua. La miscela è stata estratta due volte con etil acetato e la fase acquosa è stata scartata. Il materiale è stato essiccato (solfato di magnesio), filtrato e concentrato fino all'essiccamento. La cromatografia in gel di silice ha permesso di ottenere il prodotto desiderato in una resa del 94% come schiuma gialla brillante. MS m/e (M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>+H)<sup>+</sup> = 353,1.

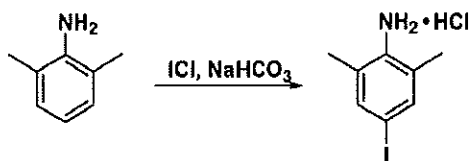


*Tert butil estere dell'acido 4-(4-idrossi-2-osso-1,2,3,4-tetraidro-chinolin-3-il)-piperidin-1-carbossilico.* In una beuta a 3 colli con un ingresso per l'azoto, un termometro e un agitatore meccanico, *tert* butil estere dell'acido 4-[2-idrossi-1-metossicarbonil-2-(2-nitro-fenil)-etil]-piperidin-1-carbossilico (9,93 g, 24,3 mmoli) è stato disciolto in acido acetico (1,75 moli, 100 mL). Polvere di ferro (8,90 g, 159 mmoli) è stata aggiunta al recipiente con agitazione. La miscela agitata è stata lentamente riscaldata a 80°C per 30 min e poi raffreddata a temperatura ambiente. Questa è stata diluita con etil acetato e filtrata attraverso un cuscinetto di Celite. I solidi sono stati lavati con metanolo al 20%/etil acetato e poi con metanolo. Il filtrato è stato concentrato e il residuo ripartito tra etil acetato e bicarbonato di sodio acquoso. Gli strati sono stati separati. La fase acquosa risultante è stata estratta due volte con etil acetato. Gli strati organici sono stati combinati. La miscela è stata lavata due volte con acqua e la fase acquosa è stata scartata. Il materiale è stato essiccato (solfato di magnesio), filtrato e concentrato fino all'essiccamento. La cromatografia su gel di

silice ha permesso di ottenere il composto del titolo come schiuma gialla brillante in una resa del 77%. MS m/e (M-H)<sup>-</sup> = 345,1.

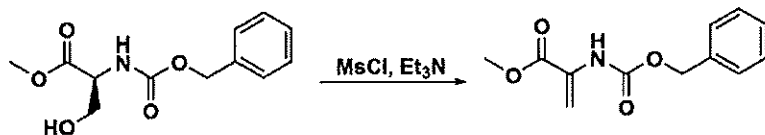


5 *3-(Piperidin-4-il)chinolin-2(1H) cloridrato*. Una soluzione agitata di tert-butil estere dell'acido 4-(4-idrossi-2-  
 osso-1,2,3,4-tetraidro-chinolin-3-il)-piperidin-1-carbossilico (5,60 g, 16,2 mmoli) in etil acetato (70 mL) è stata trattata  
 con HCl in dioxano (4N, 40 mmoli, 10 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 45 min. Più HCl in  
 dioxano (4N, 120 mmoli, 30 mL) è stato aggiunto e l'agitazione è continuata a temperatura ambiente per 16 ore. Il  
 solido risultante è stato raccolto mediante filtrazione e lavato con etil acetato. Esso è stato poi sospeso in acqua-  
 isopropanolo al 5% (100 mL) e la miscela è stata riscaldata a riflusso e agitata per 20 min. La miscela è stata raffreddata  
 10 a temperatura ambiente e agitata a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido è stato raccolto mediante filtrazione,  
 lavato con isopropanolo ed essiccato sotto elevato vuoto. Il composto del titolo è stato ottenuto come solido bianco in  
 una resa del 75%. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,85 (s, 1 H), 9,02 (bs, 1 H), 8,88 (bs, 1 H), 7,70 (t, J = 3,81 Hz, 2 H), 7,53 -  
 7,30 (d, J = 8,24 Hz, 1 H), 7,17 (t, J = 7,48 Hz, 2 H), 3,36 (d, J = 12,51 Hz, 2 H), 3,10 - 2,94 (m, 3 H), 2,01 (d, J =  
 13,43 Hz, 2 H), 1,87 - 1,73 (m, 2 H); MS m/e (M+H)<sup>+</sup> = 229,0.



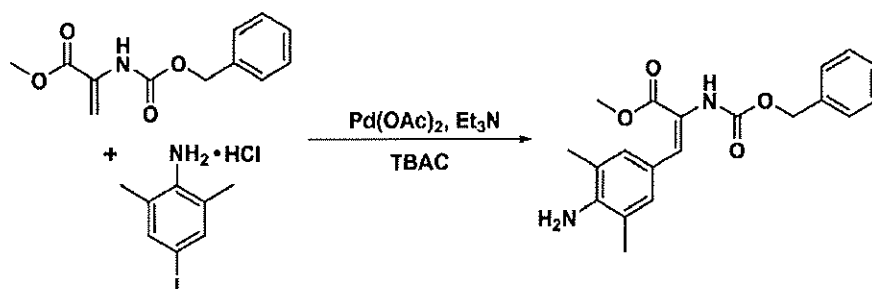
15

4-Iodo-2,6-dimetilbenzenammina cloridrato. Ad una sospensione di bicarbonato di sodio (126 g, 1,5 moli) e 2,6-dimetilalanina (61,5 mL, 500 mmoli) in metanolo (700 mL) è stato aggiunto monoclورو di iodio (1,0 M in diclorometano, 550 mL, 550 mmoli) a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo il completamento dell'aggiunta, l'agitazione è continuata per 3 ore. La reazione è stata filtrata per rimuovere il bicarbonato di sodio in eccesso e il solvente è stato rimosso *in vacuo*. Il residuo è stato ridisciolto in dietil etere (1,5 L) e trattato con acido cloridrico (2M in etere, 375 mL, 750 mmoli). La sospensione risultante è stata conservata nel freezer (-15°C) per tutta la notte. Il solido è stato filtrato e lavato con dietil etere fino a che non è diventato incolore a dare 126,5 g (89%) come polvere grigio-verde. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2,33 (s, 6 H), 7,48 (s, 2 H), 9,05 (bs, 3 H); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 17,4, 91,5, 133,1, 131,2, 136,9.

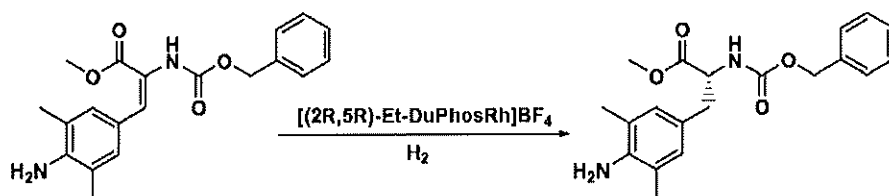


15 Metil 2-(benzilossicarbonil)acrilato. Ad una beuta a fondo tondo a tre colli essiccata con fiamma, dotata di un agitatore meccanico, sono stati aggiunti (S)-metil 2-(benzilossicarbonil)-3-idrossipropanoato (129 g, 509 mmoli), diclorometano anidro (2 L) e metansolfonil cloruro (49,3 mL, 636 mmoli). La miscela è stata raffreddata a -15°C e trattata con trietilammina (213 mL, 1527 mmoli), in gocce per garantire che la temperatura della miscela di reazione non superasse 0°C. L'aggiunta del primo equivalente di trietilammina è stata esotermica. Dopo l'aggiunta di trietilammina, la miscela è stata agitata a 0°C per 30 min. Il bagno di raffreddamento è stato rimosso e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 1,5 h. La reazione è stata interrotta aggiungendo metanolo (21 mL). La miscela è stata lavata con potassio bisolfato acquoso al 0.5% fino a che i lavaggi erano a pH 5, poi sono stati aggiunti bicarbonato di sodio saturo e salamoia, è stata essiccata su solfato di sodio e concentrata. La cromatografia flash (gel di silice, 1:9 etil acetato/esani) ha dato 111 g (92%) come olio incolore viscoso, che è cristallizzato a riposo. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3,71 (s, 3 H), 5,10 (s, 2 H), 5,60 (s, 1 H), 5,76 (s, 1 H), 7,39-7,35 (m, 5 H), 8,96 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 52,3, 65,9, 127,8, 128,1, 128,3, 128,8, 133,3, 136,3, 153,5, 163,7.

20

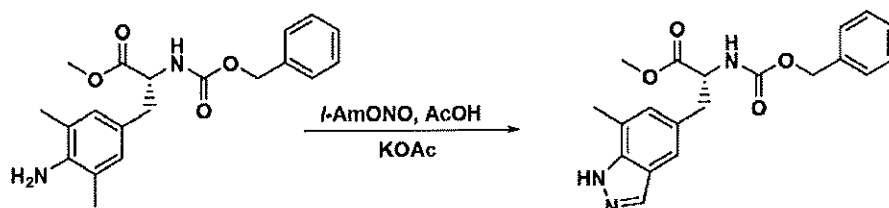


(Z)-Metil 3-(4-ammino-3,5-dimetilfenil)-2-(benzilossicarbonil)acrilato. Una beuta a fondo tondo da 2L è stata caricata con sale cloridrato di 4-iodo-2,6-dimetilbenzenammina (55 g, 194 mmol), metil 2-(benzilossicarbonil)acrilato (59,2 g, 252 mmoli), tetrabutilammonio cloruro (59,2 g, 213 mmoli), acetato di palladio (II) (4,34 g, 19,4 mmoli) e tetraidrofurano (1,2 L, degassato da un flusso di azoto per 30 min). La miscela è stata agitata di modo che si formasse una sospensione e poi degassata da un flusso di azoto per 30 min. E' stata aggiunta trietilammina (110 mL, 789 mmoli) e la miscela risultante è stata riscaldata a riflusso per 3 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata filtrata attraverso un cuscinetto di Celite, lavata con tetraidrofurano (2 × 100 mL) e concentrato. Il residuo è stato disciolto in diclorometano, lavato con acqua (3X) e salamoia (2X), essiccato su solfato di sodio e concentrato. La cromatografia flash (gel di silice usando etil acetato / dicloro metano a 1:9) ha dato un solido bruno. Il solido è stato ricristallizzato da metanolo caldo (210 mL) e acqua (100 mL). La miscela è stata mantenuta a temperatura ambiente per tutta la notte, poi a 0°C per 2 ore e infine a -15°C per 2 ore. Il solido risultante è stato filtrato, lavato con metanolo/acqua a 1:1 ghiacciato ed essiccato sotto elevato vuoto a dare 44,7 g (65%) come solido lievemente brunito, che era una miscela di isomeri Z/E (73:27). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ, 2,05 (s, 6 H), 3,61 (s, 0,8 H), 3,68 (s, 2,2 H), 5,00 (s, 0,54 H), 5,13 (s, 1,46 H), 5,24 (s, 2 H), 7,40-7,21 (m, 8 H), 8,51 (s, 0,27 H), 8,79 (s, 0,73 H); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 17,8, 51,7, 65,3, 119,4, 120,0, 120,3, 127,3, 127,7, 128,3, 130,9, 135,8, 137,2, 146,9, 154,7, 166,0.



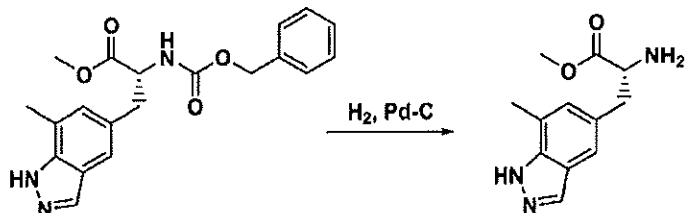
5 *(R)*-Metil 3-(4-ammino-3,5-dimetilfenil)-2-(benzilossicarbonil)propanoato. Una bottiglia per idrogenazione di Parr da 2L essiccata con fiamma è stata caricata con (Z)-metil 3-(4-ammino-3,5-dimetilfenil)-2-(benzilossicarbonil)acrilato (84,5 g, 239 mmoli), diclorometano (300 mL) e metanolo (300 mL). La bottiglia è stata fatta vorticare, di modo che si formasse una sospensione marrone chiara. La miscela è stata degassata usando un flusso di azoto per 30 min. A questa, è stato aggiunto rapidamente (-)-1,2-bis((2*R*,5*R*)-2,5-dietilfosfolano)-benzene(ciclottadiene) rodio (I) tetrafluoroborato ([*(2R,5R)*-Et-DuPhosRh]BF<sub>4</sub>) (2,11 g, 3,20 mmoli). La bottiglia è stata attaccata ad un idrogenatore di Parr. Dopo 5 cicli di idrogeno (60 psi) e vuoto, la bottiglia è stata pressurizzata a 65 psi e la sospensione è stata agitata a temperatura ambiente per 16 ore. La reazione è diventata omogenea. La miscela di

10 reazione è stata concentrata e il residuo risultante è stato purificato mediante cromatografia flash (gel di silice, etil acetato / diclorometano a 1:9) a dare 82,9 g (98%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2,04 (s, 6 H), 2,65 (dd, *J*= 13,4, 9,8 Hz, 1H), 2,82 (dd, *J*= 13,7, 5,2 Hz, 1 H), 3,62 (s, 3 H), 4,15-4,10 (m, 1H), 4,41 (s, 2 H), 5,00 (s, 2 H), 6,68 (s, 2 H), 7,37-7,28 (m, 5 H), 7,70 (d, *J*= 7,9 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 17,7, 35,9, 51,7, 56,1, 65,3, 120,4, 124,0, 127,5, 127,7, 128,2, 128,3, 136,9, 142,6, 155,9, 172,5.



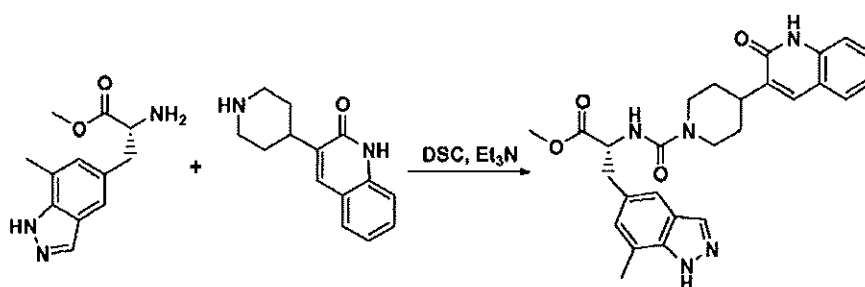
15 *(R)*-Metil 2-(benzilossicarbonil)-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)propanoato. *(R)*-Metil 3-(4-ammino-3,5-dimetilfenil)-2-(benzilossicarbonil)propanoato (50,0 g, 140 mmoli) è stata pesata in una beuta a fondo tondo a tre colli

da 5 L essiccata con fiamma seguito dall'aggiunta di toluene (2,4 L) e di acido acetico glaciale (120 mL, 2,1 moli). La miscela è stata agitata meccanicamente per formare una soluzione chiara e poi è stato aggiunto acetato di potassio (103 g, 1,05 moli). Alla sospensione bianca risultante, è stato aggiunto *iso*-amil nitrato (20,7 mL, 154 mmoli) in gocce a temperatura ambiente e la miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 16 ore. E' stato aggiunto bicarbonato saturo (1 L), seguito dall'aggiunta accurata di bicarbonato di sodio solido per neutralizzare l'acido acetico. La miscela è stata estratta con una miscela di diclorometano (2 L) e salamoia (1,5 L). Dopo la separazione, lo strato acquoso è stato estratto con diclorometano (500 mL). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e filtrati. I solventi sono stati rimossi per ottenere un solido brunito, che è stato lavato con esani (2 L) e toluene (150 mL). Il solido è stato ricristallizzato da acetone caldo (260 mL) ed esani (700 mL). La miscela lievemente torbida è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente lentamente, poi a 0°C per 1,5 ore e infine a -15°C per 1,5 ore. Il solido risultante è stato filtrato e lavato con acetone / esani ghiacciati (1:1, 200 mL) per ottenere 39,1 g (76% di resa). La HPLC analitica ha mostrato una purezza agli UV di > 98%. L'eccesso enantiomerico (ee) è stato determinato a 99,8% (condizioni: colonna Chiralpak AD, 4,6 × 250 mm, 10 µm; A = etanolo, B = 0,05% di dietilammina / eptano; 85%B @1,0 mL/min. per 55 min. I tempi di ritenzione per R erano 44,6 min e per S erano 28,8 min). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2,48 (s, 3 H), 2,93 (dd, *J*= 13,4, 10,7 Hz, 1H), 3,10 (dd, *J*= 13,7, 4,9 Hz, 1H), 3,63 (s, 3H), 4,32-4,27 (m, 1 H), 4,97 (s, 2 H), 7,03 (s, 1 H), 7,24-7,22 (m, 2 H), 7,29 -7,27 (m, 3 H), 7,41 (s, 1 H), 7,83 (d, *J*= 8,2 Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 13,1 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 16,7, 36,5, 51,8, 56,0, 65,3, 117,6, 119,6, 122,7, 127,2, 127,4, 127,6, 128,2, 129,3, 133,4, 136,8, 139,2, 155,9, 172,4. Spett. Massa: 368,16 (MH)<sup>+</sup>.



20 (R)-Metil 2-ammino-3-(7-metil -1H-indazol-5-il)propanoato. Una bottiglia di idrogenazione di Parr è stata caricata con (R)-metil 2-(benzilossicarbonil)-3-(7-metil -1H-indazol-5-il)propanoato (11,0 g, 29,9 mmoli) e metanolo

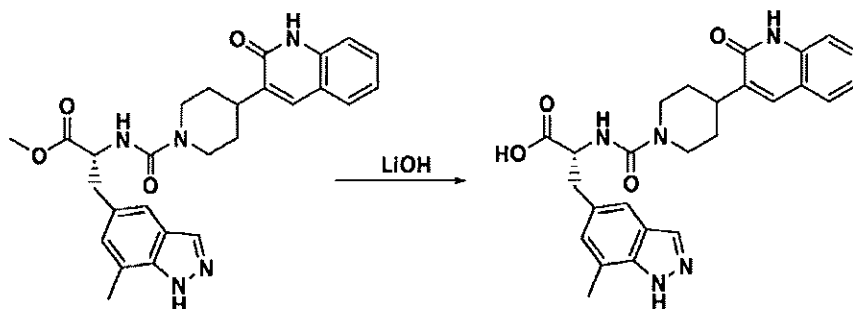
(75 mL). La sospensione è stata purgata con azoto e trattata con palladio (10% su carbone, 700 mg). La bottiglia è stata agitata sotto idrogeno (15 psi) per tutta la notte. La miscela è stata filtrata attraverso un cuscinetto di Celite per rimuovere il catalizzatore. La concentrazione dell'eluente ha dato 7,7 g (quant.) come olio che è stato usato senza ulteriore purificazione. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 2,54 (s, 3 H), 2,98 (dd, *J* = 13,5, 7,0 Hz, 1 H), 3,09 (dd, *J* = 13,5, 5,9 Hz, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,75 (dd, *J* = 7,0, 6,2 Hz, 1 H), 7,01 (s, 1 H), 7,39 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H). Spett. Massa: 232,34 (M-H)<sup>+</sup>.



(R)-Metil

3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-

carbossammido)propanoato. Ad una soluzione di (R)-metil 2-ammino-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)propan cloridrato (7,26 g, 27,0 mmoli) in dimetilformammide (50 mL) a temperatura ambiente è stato aggiunto N,N'-disuccinimidil carbonato (7,60 g, 29,7 mmoli) seguito da trietilammia (11,29 mL, 81 mmoli). La miscela risultante è stata agitata per 30 min e trattata con 3-(piperidin-4-il)chinolin-2(1H)-one (6,77 g, 29,9 mmoli) in porzioni. La reazione è stata lasciata agitare per 24 ore. La miscela è stata concentrata, disciolta in etil acetato e lavata in sequenza con acqua, salamoia e HCl 0,5 N (2X). La fase organica è stata essiccata su solfato di magnesio, filtrata e concentrata. La miscela risultante è stata purificata mediante cromatografia flash (gel di silice, etil acetato/metanolo 20:1) a dare 11,9 g (78%). <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 13,0 (s, 1 H), 11,8 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H), 7,63 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 7,45 - 7,41 (m, 2 H), 7,27 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,16 (t, *J* = 7,9 Hz, 1 H), 7,03 (s, 1 H), 6,85 (d, *J* = 7,9 Hz, 1 H), 4,31 - 4,26 (m, 1 H), 4,10 - 4,08 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,07 - 3,01 (m, 2 H), 2,93 - 2,88 (m, 1 H), 2,77 - 2,67 (m, 2 H), 2,48 (s, 3 H), 1,78 - 1,72 (m, 2 H), 1,34 - 1,26 (m, 2 H). Spett. Massa: 488,52 (MH)<sup>+</sup>.



Acido

(R)-3-(7-Metil-1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-

carbrossammido)propanoico. Una soluzione di (R)-metil 3-(7-metil -1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-

il)piperidin-1-carbrossammido)propanoato (5,50 g, 11,3 mmoli) in tetraidrofurano (50 mL) e metanolo (10 mL) è stata

5 raffreddata a 0°C. A questa è stata aggiunta una soluzione fredda (0°C) di idrossido di litio monoidrato (0,95 g, 22,6

mmoli) in acqua (20 mL), in gocce per 15 min. La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per ulteriori 3 ore. La

miscela è stata concentrata per rimuovere i solventi organici. Il residuo risultante è stato disciolto in una quantità

minima di acqua, raffreddato a 0°C e trattato con HCl 1N (0°C) fino a raggiungere un pH 2. Il solido risultante è stato

raccolto mediante filtrazione, lavato con acqua fredda ed etere e poi essiccato per tutta la notte sotto vuoto a dare 5,0 g

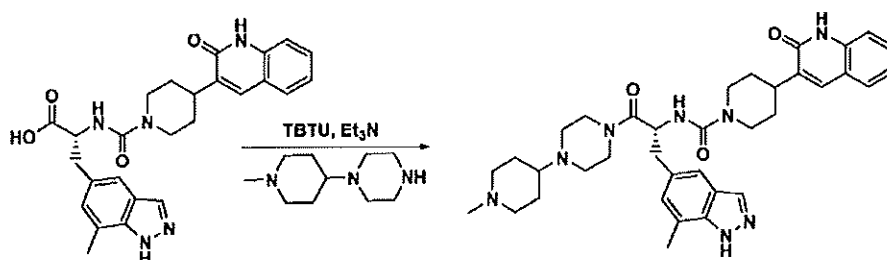
10 (94%) come solido bianco. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,05 (bs, 1 H), 11,77 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H), 7,62 (d, J= 8,0 Hz, 1

H), 7,55 (s, 1 H), 7,44 (d, J= 8,2Hz, 1 H), 7,42 (s, 1 H), 7,27 (d, J= 8,2 Hz, 1 H), 7,16 (t, J= 7,6 Hz, 1 H), 7,05 (s, 1 H),

6,65 (d, J= 7,9 Hz, 1 H), 4,27 - 4,22 (m, 1 H), 4,10 - 4,07 (m, 2 H), 3,12 - 3,07 (m, 1 H), 3,03 - 2,99 (m, 1 H), 2,93 -

2,88 (m, 1 H), 2,77 - 2,66 (m, 2 H), 2,47 (s, 3 H), 1,77 - 1,74 (m, 2 H), 1,34 - 1,27 (m, 2 H). Spett. Massa: 474,30

(MH)<sup>+</sup>.

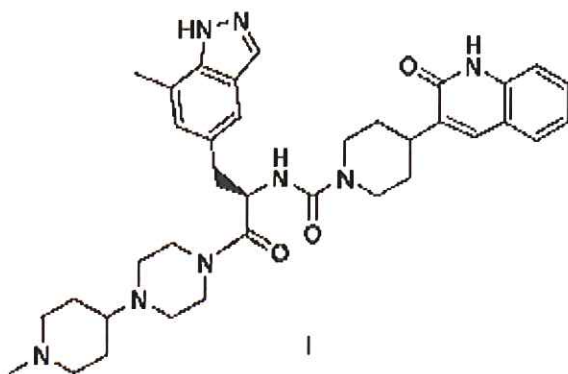


(R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-ossopropan-2-il)-4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-carbossammide (I). Una beuta è stata caricata con acido (R)-3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-2-(4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-carbossammide)propanoico (2,9 g, 6,11 mmoli), trietilammina (3,00 mL, 21,5 mmoli), 1-(1-metilpiperidin-4-il)piperazina (1,23 g, 6,72 mmoli) e dimetilformammide (10 mL). La soluzione risultante è stata trattata con 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (2,26 g, 7,03 mmoli) in porzioni. La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela è stata concentrata sotto vuoto per rimuovere dimetilformammide. Il prodotto grezzo è stato disciolto in metanolo al 7% in diclorometano e purificato mediante cromatografia flash usando metanolo al 7% in diclorometano contenente il 2% di idrossido di ammonio acquoso come eluente. Le frazioni pure sono state raccolte e il solvente è stato rimosso sotto vuoto. Il prodotto desiderato è stato cristallizzato da acetone caldo a dare il Composto I con una resa del 77%. La HPLC analitica ha mostrato una purezza agli UV del 99,0 % a 230 nm. L'eccesso enantiomerico (ee) è stato determinato a >99,9% (condizioni: colonna Chiralpak AD, 4,6 × 250 mm, 10 µm; eluente: 70% (0,05% di dietilammina)/eptano /30% di etanolo; @1,0 mL/min. per 45 min. I tempi di ritenzione erano 18,7 min per R per 28,1 min per S). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 13,01 (s, 1 H), 11,76 (s, 1 H), 7,96 (s, 1 H), 7,62 (d, J = 7,10 Hz, 1 H), 7,60 (s, 1 H), 7,42 (m, 1 H), 7,36 (s, 1 H), 7,26 (d, J = 8,25 Hz, 1 H), 7,14 (m, 1 H), 7,00 (s, 1 H), 6,69 (d, J = 8,25 Hz, 1 H), 4,78 (q, J = 7,79 Hz, 1 H), 4,14 (d, J = 12,37 Hz, 2 H), 3,54 (dd, J = 9,16, 4,58 Hz, 1 H), 3,24 (m, 1 H), 3,11 (m, 1 H), 2,97 (m, 1 H), 2,89 (m, 2 H), 2,69 (m, 4 H), 2,32 (m, 1 H), 2,21 (m, 1 H), 2,07 (m, 4 H), 1,95 (t, J = 8,25 Hz, 1 H), 1,87 (m, J = 11,28, 11,28, 3,55, 3,44 Hz, 1 H), 1,76 (t, J = 12,03 Hz, 2 H), 1,68 (t, J = 11,11 Hz, 2 H), 1,53 (t, J = 8,25 Hz, 1 H), 1,32 (m, 4 H), 1,16 (m, 2 H); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 16,80, 27,30, 30,51, 30,51, 30,67, 35,50, 38,04, 41,74, 44,00, 44,16, 45,35,

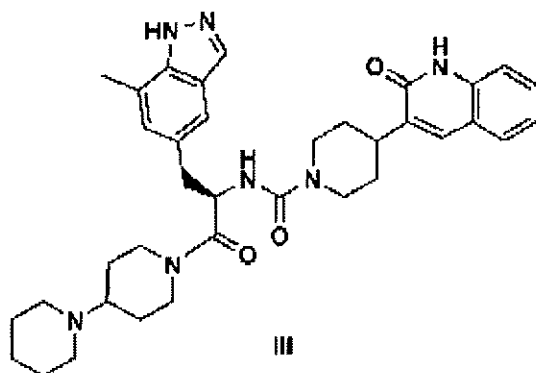
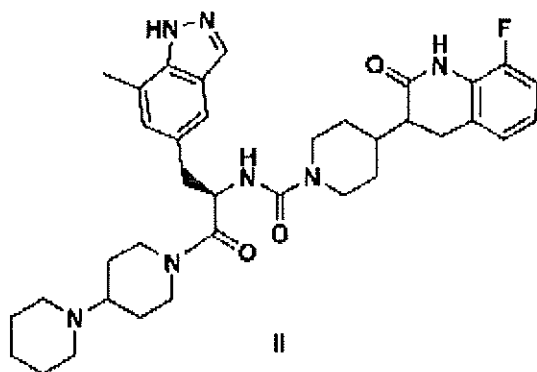
45,78, 48,14, 48,39, 51,45, 54,76, 54,76, 60,61, 114,53, 117,79, 119,29, 119,34, 121,57, 122,78, 127,46, 127,79, 129,29, 129,79, 133,31, 133,72, 136,98, 137,41, 139,12, 156,50, 161,50, 170,42. Analisi accurata della massa:  $m/z$  639,3770,  $[MH]^+$ ,  $\Delta = -0,2$  ppm. Rotazione ottica:  $-27,36^\circ @ 589$  nm, concentrazione= 4,71 mg/mL in metanolo.

Metodi biologici e altre proprietà

Schema 5. Composto I e Composti Comparativi II e III



5



5 *Solubilità acquosa.* La base priva di solidi è stata miscelata con carbonato e tamponi di etanolamina. Il pH di un terzo campione è stato regolato con HCl. I solidi sono stati miscelati con veicoli usando un miscelatore che è stato incluso in un incubatore impostato a 25°C. Dopo l'equilibratura, sono stati prelevati campioni di surnatante, diluiti come appropriato e analizzati mediante HPLC.

*Solubilità in mezzi acquosi, dipendenza da pH.* Il Composto I cristallino è stato convertito in una fase gelatinosa durante la misurazione del profilo di solubilità legato al pH. L'assenza di una fase cristallina in equilibrio con

acqua previene una valutazione confidente dell'intervallo di pH in cui il Composto I può essere formulato come soluzione termodinamicamente stabile. Sono in corso tentativi per generare una forma cristallina della base libera del Composto I che possa essere equilibrata in acqua. I dati raccolti dalla fase gelatinosa sono elencati in Tabella 1.

*Tabella 1: Solubilità del Composto I in mezzo acquoso a 25C*

<i>Veicolo</i>	<i>Solubilità (mg/mL)</i>
Tampone di carbonato, pH= 10,4	0,2
Tampone di etanolamina, pH= 9,4	,5
Titolazione parziale del Composto I con HCl, pH=8,5	105
pH < 8,5	> 300

5 *Stabilità di stato della soluzione.* La stabilità di stato della soluzione del Composto I è stata valutata come funzione della temperatura, del pH, della luce ad alta intensità, della concentrazione del tampone e della concentrazione del farmaco. La matrice sperimentale usata è mostrata in Tabella 2.

*Tabella 2: Matrice della Stabilità di stato della soluzione*

<i>Campione</i>	<i>pH</i>	<i>Temp (C)</i>	<i>Conc Farmaco (mg/ml)</i>	<i>Conc. Tampone (M)</i>
A	4	40	0,1	0,05
B	5	25	0,1	0,05
C	5	25/luce	0,1	0,05
D	5	60	0,1	0,05
E	5	40	0,1	0,05
F	6	40	0,1	0,05
G	4	40	40	0,05
H	5	40	40	0,05
I	6	40	40	0,05
J	5	40	0,1	0,01

Il tampone succinato è stato usato per tutte le soluzioni. Per campioni esposti alla luce, è stata usata una camera di fotostabilità in accordo con le linee guida ICH (esposizione di 1,2 milioni di lux ore a luce visibile e 200 watt ore/m<sup>2</sup> a UV). Le analisi sono state eseguite a 4, 8 e 12 settimane.

5 Sono stati trovati dieci prodotti di degradazione durante lo studio di stabilità della soluzione. La percentuale di ogni prodotto di degradazione trovata nei campioni dopo 12 settimane di conservazione è elencata in Tabella 3. E' da notare che al momento iniziale, i prodotti di degradazione B e G erano gli unici prodotti di degradazione e le loro concentrazioni iniziali 0,17% e 0,06%, rispettivamente.

10 La valutazione mediante spettroscopia di massa è stata eseguita su quei prodotti di degradazione in quantità sufficiente a consentire la determinazione della massa. I risultati sono elencati in Tabella 4. Sotto il prodotto di degradazione B sono elencati due picchi, dato che è stato scoperto che i due prodotti di degradazione non erano stati ben separati con il metodo di HPLC attuale. I prodotti di degradazione A e C corrispondono ai prodotti di idrolisi (Figura 2).

Nella condizione più favorevole esaminata, la Condizione I in Tabella 2, il Composto I mostrava solo lo 0,3% di degradazione dopo 12 settimane a 40C. Questo suggerisce che può essere trovata una formulazione acquosa che corrisponda alle linee guida ICH per almeno un anno di stabilità chimica.

15 *Tabella 3: Area percentuale di prodotti di degradazione osservata a dodici settimane e loro tempi di ritenzione (minuti)*

	Deg	Deg	Deg	Deg	Deg	Deg	Deg	Deg	Deg	Deg
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	<i>t<sub>r</sub></i> =3,9	<i>t<sub>r</sub></i> =5,4	<i>t<sub>r</sub></i> =4,6	<i>t<sub>r</sub></i> =4,1	<i>t<sub>r</sub></i> =5,0	<i>t<sub>r</sub></i> =6,6	<i>t<sub>r</sub></i> =7,5	<i>t<sub>r</sub></i> =6,7	<i>t<sub>r</sub></i> =4,3	<i>t<sub>r</sub></i> =5,6
A	2,0	-	10,5	-	-	-	-	-	-	-
B	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
C	16,9	2,9	2,8	5,2	1,0	7,7	-	-	5,7	-
D	1,2	-	55,0	-	-	-	-	-	-	-
E	1,9	0,2	-	-	.1	-	-	-	-	-

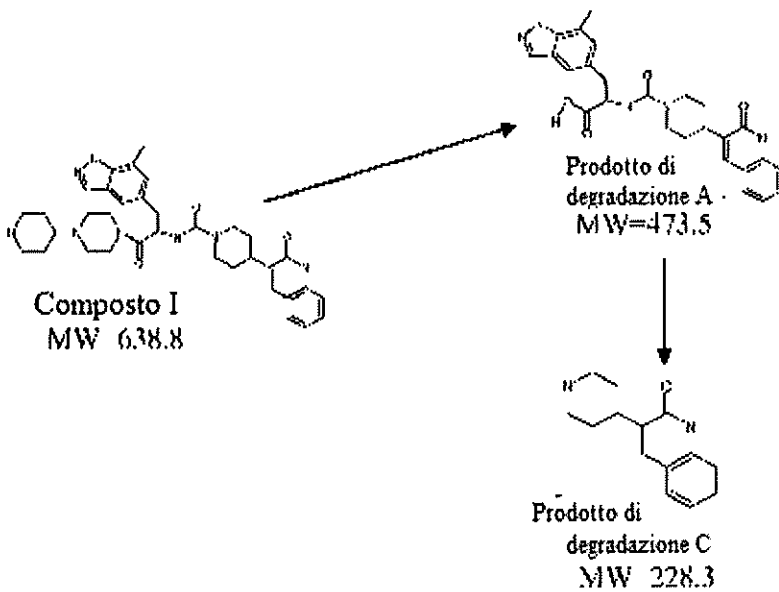


F	0,4	0,1	-	-	.1	-	-	-	-	-
G	4,9	-	-	-	3,5	-	0,1	.1	-	0,1
H	1,2	0,1	-	-	0,0	-	0,1	-	-	0,0
I	.2	0,1	0,0	-	0,0	-	0,1	-	-	0,1
J	1,1	0,1	-	-	.1	-	-	0,5	-	-

Tabella 4: Pesi molecolari del prodotto di degradazione

Marcatore del prodotto di degradazione	Peso Molecolare
A	473,5
B	541,4
	612,4
C	228,3

Schema 6



5 *Stabilità della soluzione: L'effetto della Temperatura.* L'effetto della temperatura è riassunto in Tabella 5. Il miglioramento della velocità di degradazione con la temperatura è ampiamente dovuto al miglioramento dell'idrolisi. Alla temperatura massima, la degradazione è proceduta fino in fondo al prodotto C, ma alle temperature di degradazione inferiori si è interrotto al prodotto A (Figura 2).

Tabella 5: Stabilità della soluzione e Temperatura

pH	Prodotti di degradazione totali (25C)	Prodotti di degradazione totali (40C)	Prodotti di degradazione totali (60C)
5	0,6 %	2,2 %	56,2 %

*Stabilità della soluzione: L'effetto della luce.* L'effetto della luce sulla stabilità è riassunto in Tabella 6. Sono stati notati sette prodotti di degradazione per i campioni esposti alla luce, tre dei quali non compaiono nei campioni conservati in qualsiasi altra condizione. L'idrolisi (prodotto di degradazione A) è stata migliorata dall'esposizione alla luce.

5 *Tabella 6: Stabilità della soluzione e Luce*

<i>pH</i>	<i>Temperature (C)</i>	<i>Condizione di luce</i>	<i>Prodotti di degradazione totali</i>
5	25	Buio	2,3 %
5	25	Luce	72 %

*Stabilità della soluzione: l'effetto del pH.* L'effetto del pH sulla velocità di degradazione è riassunto in Tabella 7. Il miglioramento nella velocità di degradazione è variato inversamente con il pH ed è stato dominato da un miglioramento nell'idrolisi. A pH 4, la degradazione è proceduta fino all'idrolisi del prodotto C, ma a pH 5 e 6 la degradazione si è interrotta all'idrolisi del prodotto A.

10 *Tabella 7: Stabilità della soluzione e pH*

<i>pH</i>	<i>Prodotti di degradazione totali</i>
4	12,5 %
5	2,2 %
6	0,62 %

*Stabilità della soluzione: l'effetto della concentrazione del tampone.* Concentrazioni maggiori di tamponi succinati hanno teso a produrre una velocità maggiore di idrolisi a dare il prodotto di degradazione A (Tabella 8).

*Tabella 8: Stabilità della soluzione e Concentrazione del tampone succinato*

<i>pH</i>	<i>Prodotti di degradazione totali</i>	<i>Prodotti di degradazione totali</i>
	<i>[Tampone] = 0,01M</i>	<i>[Tampone] = 0,05M</i>
5	1,8 %	2,2 %

*Stabilità della soluzione: l'effetto della concentrazione del farmaco.* Un carico elevato di farmaco ha rallentato la velocità di idrolisi ed ha limitato l'idrolisi fino alla formazione del prodotto di degradazione A (Tabella 9). Il prodotto di degradazione G, che è stato rilevato solo in campioni ad alta concentrazione, non è cresciuto notevolmente in concentrazione durante lo studio e può essere semplicemente un'impurità. Il prodotto di degradazione j può essere rilevato solo nel momento finale.

*Tabella 9: Stabilità della soluzione e Concentrazione del Composto I*

pH	Prodotti di degradazione totali	
	[Farmaco] = 0,1 mg/ml	[Farmaco] = 40 mg/ml
4	12,5 %	8,6 %
5	2,2 %	1,5 %
6	0,62 %	0,5 %

Competizione per il legame a [<sup>125</sup>I]CGRP

*Saggio di legame.* L'omogenato delle membrane di cellule SK-N-MC serve come fonte di recettori. Le cellule SK-N-MC di neuroblastoma umano *in vitro* sono usate per saggi in vitro, dato che esse esprimono in modo endogeno il recettore per CGRP con una sequenza identica al recettore umano per CGRP clonato (Aiyar et al., 2001). Le cellule sono fatte crescere a 37 °C in 5% di CO<sub>2</sub> in terreno consistente in MEM con sali di Earle e L-glutammina arricchito con siero fetale bovino al 10% fino a confluenza. Le cellule sono state raccolte risciacquando due volte con soluzione salina tamponata con fosfati e sono state incubate per 5-10 minuti a 4 °C tampone ipotonico di lisi consistente in 10 mM di Tris (pH 7,4) e 5 mM di EDTA. Le cellule sono state raccolte e trasferite in provette di polipropilene e omogeneizzate usando un polytron. Gli omogeneizzati sono stati centrifugati a 32,000 x g per 30 min. I pellet sono stati risospesi in tampone ipotonico di lisi freddo con un cocktail di inibitori di proteasi di mammifero al 0,1% e saggiati per la concentrazione di proteine. L'omogeneizzato di membrana è stato poi aliquotato e conservato a -80°C fino al giorno del saggio.

La capacità del Composto I di competere per il peptide umano alfa CGRP (hαCGRP) endogeno radiomarcato ([<sup>125</sup>I]CGRP, Amersham Biosciences) è stata misurata usando un saggio di competizione con radioligando. Il composto

I è stato innanzitutto solubilizzato in e sottoposto a diluizioni seriali usando DMSO al 100%. Il composto è ulteriormente diluito 25 volte in tampone di saggio (50 mM di Tris-Cl, pH 7,5, 5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0,005% di Triton X-100) e trasferito (50 µl) in piastre di saggio a 96 pozzetti. [<sup>125</sup>I]-CGRP è diluito a 600 pM in tampone di saggio ed è stato aggiunto un volume di 50 µl a ciascun pozzetto (Concentrazione finale di 15 pM nel saggio). I pellet di membrana di SK-N-MC sono stati scongelati, diluiti in tampone di saggio con un cocktail di inibitori di proteasi di mammifero al 0,1% fresco e omogeneizzati come descritto precedentemente. Sono stati poi aggiunti da cinque a dieci µg per pozzetto in un volume di 100 µl. Le piastre del saggio sono state poi incubate a temperatura ambiente (25°C) per due ore. I saggi sono stati interrotti aggiungendo un eccesso di tampone di lavaggio freddo (20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1% di BSA) seguito immediatamente da filtrazione su filtri in fibre di vetro pre-immesse in 0,5% di PEI. Il legame non specifico è stato definito con 1 µM di β-CGRP. La radioattività legata a proteine è stata misurata usando un contatore di scintillazione gamma. La IC<sub>50</sub> è definita come la concentrazione di composto necessaria a inibire il 50% di legame del radioligando.

*Risultati.* Il Composto I mostra l'inibizione dipendente da concentrazione del legame di [<sup>125</sup>I]CGRP al recettore per CGRP espresso in modo endogeno dalle membrane di cellule SK-N-MC. La  $K_i$  media è  $22,7 \pm 1,6$  pM.

#### Interazione con il peptide CGRP

*Metodi.* La natura dell'interazione tra il peptide CGRP endogeno e il composto I è stata studiata nel dettaglio usando esperimenti di legame per saturazione. Brevemente, il legame di [<sup>125</sup>I]CGRP alla preparazione di membrane di cellule SK-N-MC è misurato con concentrazioni crescenti di [<sup>125</sup>I]CGRP senza (condizione di controllo) o in presenza di (condizioni di test) una delle due concentrazioni (30 pM e 100 pM) di Composto I. I dati di saturazione sono stati analizzati con equazioni iperboliche usando il software Kell (Biosoft, Cambridge, UK) per stimare la costante di dissociazione ( $K_d$ ) ed il numero massimo di siti di legame ( $B_{max}$ ). L'impatto dell'aggiunta del Composto I ai parametri di legame ( $K_d$ ,  $B_{max}$ ) di [<sup>125</sup>I]CGRP è stato misurato e confrontato.

*Risultati.* La dipendenza dalla concentrazione del Composto I aumenta la costante di dissociazione  $K_d$  del legame di [<sup>125</sup>I]CGRP (ne diminuisce l'affinità), senza variare in modo significativo il numero massimo dei siti di

legame del legame di [<sup>125</sup>I]CGRP ( $B_{max}$ ). Questo indica un meccanismo competitivo di inibizione da parte del Composto I del legame di [<sup>125</sup>I]CGRP al recettore umano (Tabella 10).

*Tabella 10.  $K_d$ ,  $B_{max}$  di [<sup>125</sup>I]CGRP alla preparazione delle membrane delle cellule SK-N-MC con o senza la presenza del Composto I.*

	<i>Controllo</i>	<i>30 pM di Composto I</i>	<i>100 pM di Composto I</i>
<i>K<sub>d</sub> (pM)</i>	23,1 ± 5,0	58,0 ± 19,6	129,7 ± 31,9
<i>B<sub>max</sub> (fmol/mg di proteina)</i>	142,6 ± 10,6	112,1 ± 20,6	146,8 ± 6,4

5 Saggio cellulare funzionale - Saggio di AMP ciclico

*Metodi.* Il complesso del recettore per CGRP è accoppiato alla classe Gs delle proteine G. Il legame di CGRP a questo complesso porta alla produzione di AMP ciclico (adenosina 3'5'-ciclica monofosfato) mediante attivazione dipendente da Gs dell'adenilato ciclasi.

10 L'antagonista funzionale mediante il Composto I è determinato misurando la sua capacità di inibire la formazione stimolata da CGRP di AMP ciclico in cellule SK-N-MC intere attaccate. Le cellule SK-N-MC sono state incubate a temperatura ambiente con 0,3 nM di CGRP solo per 30 minuti o pre-incubate con varie concentrazioni di Composto I per 15 minuti prima dell'aggiunta di 0,3 nM di CGRP e poi ulteriormente incubate per 30 minuti. Il AMP ciclico (cAMP) prodotto è stato estratto usando il "Reagente di Lisi" e la sua concentrazione è stata determinata  
 15 mediante radioimmunosaggio usando il Kit per il saggio di screening diretto RPA559 cAMP SPA (Amersham Pharmacia Biotech). I valori di  $IC_{50}$  sono definiti come la concentrazione di Composto necessaria ad inibire il 50% di 0,3 nM di produzione di cAMP stimolata da CGRP.  $Y_{max}$  è definito come inibizione percentuale massima di 0,3 nM di produzione di cAMP stimolata da CGRP.

20 *Risultati.* Il Composto I mostra inibizione dipendente da concentrazione della produzione di cAMP stimolata da CGRP in cellule SK-N-MC intere attaccate, con una  $IC_{50}$  di 38,6 ± 4,2 pM ed un  $Y_{max}$  di 95,4 (± 1,3)%. L'inibizione massima (ca. 100%) osservata indica antagonismo pieno verso il recettore per CGRP.

Analisi di Schild

*Metodi.* L'analisi di Schild è stata usata per caratterizzare la natura dell'antagonismo del Composto I. La risposta alla dose della produzione di cAMP stimolata da CGRP è generata con CGRP solo o con CGRP in presenza di arie concentrazioni di Composto I. Nello specifico, la stimolazione di cAMP dipendente dalla dose da parte di CGRP è saggiata con o senza cinque differenti concentrazioni di Composto I. La concentrazione del Composto I è resa graficamente sull'asse X rispetto al rapporto delle dosi meno 1 sull'asse Y (il rapporto delle dosi è definito come  $EC_{50}$  di CGRP in presenza del Composto I diviso per la  $EC_{50}$  di CGRP solo). La regressione lineare è stata poi eseguita su entrambi gli assi X e Y trasformati in logaritmo. Una pendenza che non differisce significativamente dall'unità (1) indica antagonismo competitivo.  $K_b$  è la costante di dissociazione dell'antagonista.

*Risultati.* L'analisi di Schild per il Composto I rivela una pendenza media di  $1,02 \pm 0,04$  ed una costante media di dissociazione dell'antagonista  $K_b$  di  $21,5 \pm 9,4$  pM. Lo spostamento parallelo verso destra della risposta alla concentrazione di CGRP in presenza di una concentrazione crescente di Composto I indica antagonismo competitivo da parte del Composto I della produzione di cAMP stimolata da CGRP. La pendenza di 1,02 del diagramma di Schild supporta ulteriormente l'interazione competitiva tra il Composto I e la funzione di CGRP. La  $K_b$  di 21,5 pM è in accordo con la  $K_d$  di legame (22,7 pM).

#### Reversione della dilatazione indotta da CGRP nell'arteria intracraniale umana *ex vivo*

Per fornire una misura *ex vivo* che mimi la condizione clinica (in cui il rilascio di CGRP correlato con l'emigrania precede l'inizio della terapia), i vasi sono stati dilatati innanzitutto mediante CGRP e poi la dilatazione è stata revertita con il Composto I. In questo protocollo di reversione, l'antagonista reverte dopo il trattamento la dilatazione dell'arteria indotta da CGRP (usando una singola dose di agonista e dosi multiple di antagonista). In breve, gli anelli delle arterie montati con filo sono stati fatti contrarre con ioni potassio (per mimare il tono endogeno), dilatati interamente con CGRP e la dilatazione è stata revertita con concentrazioni crescenti del Composto I dell'antagonista di CGRP. Il Composto I è efficace dopo il trattamento nel revertire la dilatazione indotta da CGRP stabilizzata di arterie intracraniali umane *ex vivo*.

*Campioni di tessuto.* Campioni da autopsie da arterie umane sono stati da venditori che procurano tessuti. Tutti i vasi sono stati trasportati in tampone HEPES ghiacciato (composizione in mM: NaCl 130, KCl 4,  $KH_2PO_4$  1,2,  $MgSO_4$



1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,8, Glucosio 6, NaHCO<sub>3</sub> 4, HEPES 10, EDTA 0,025). Dopo ricezione, i recipienti sono stati posti in tampone di Krebs freddo (composizione in mM: NaCl 118,4, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,8, Glucosio 10,1, NaHCO<sub>3</sub> 25) saturo con carbogeno (5% di CO<sub>2</sub> e 95 % di ossigeno).

5 *Metodi.* I vasi sono stati puliti dai tessuti connettivi e tagliati in segmenti cilindrici di 4-5 mm in lunghezza. I vasi sono stati montati in bagni per tessuti tra due ganci in acciaio inossidabile; uno dei quali è fisso e l'altro è connesso ad un trasduttore di spostamento delle forze. La tensione del vaso è stata continuamente registrata usando un sistema di acquisizione di dati (Powerlab, AD Instruments, Mountain View, CA). I bagni dei tessuti contenenti il tampone di Krebs ed i vasi montati sono stati controllati per la temperatura (37 °C) e il pH (7,4) e fatti gorgogliare continuamente con carbogeno. I segmenti delle arterie sono stati lasciati equilibrare per circa 30-45 minuti fino all'ottenimento di un  
10 tono stabile di riposo (da 0,25 a 0,5 g). Prima del saggio, i vasi sono stati preparati (condizionati) con 100 mM di KCl e lavati successivamente.

Per testare l'effetto anti-dilatatorio del Composto I, i vasi si sono innanzitutto contratti con 10 mM di cloruro di potassio (KCl) per mimare il tono endogeno, poi dilatati completamente con 1 nM di huCGRP ed infine la dilatazione è stata revertita dall'aggiunta cumulativa di concentrazioni crescenti di Composto I in unità semilogaritmiche  
15 (consentendo il calcolo della EC<sub>50</sub>). A ciascuna concentrazione, gli effetti dei farmaci sono stati espressi come reversione in % della dilatazione di ciascun vaso indotta da CGRP. L'analisi dei dati è stata eseguita per ciascun vaso singolarmente, adattando i dati di concentrazione-risposta ad una funzione logica di quattro parametri mediante analisi di regressione non lineare, per stimare i valori di EC<sub>50</sub>.

20 *Risultati.* Il Composto I mostra reversione potente e completa della dilatazione indotta da CGRP di arterie intracraniali umane *ex vivo* con EC<sub>50</sub> = 880 ± 50 pM.

*Analisi di Schild:* Inibizione della curva di concentrazione di CGRP-risposta in un'arteria intracraniale umana *ex vivo*

Per valutare l'antagonismo funzionale contro un intervallo di concentrazioni di CGRP, il Composto I è stato pre-incubato con singoli anelli delle arterie nel bagno per tessuti e poi è stata generata una curva di concentrazione di  
25 CGRP-risposta per ottenere la dilatazione completa (usando dosi multiple di agonista e multiple di antagonista).

Concentrazioni maggiori di antagonista producono uno "spostamento verso destra" nella curva di concentrazione di CGRP, necessitando concentrazioni maggiori di agonista per superare la presenza di antagonista e ottenere la dilatazione completa. In breve, gli anelli delle arterie montate su filo sono stati pre-incubati con antagonista, poi contratti con KCl (per mimare il tono endogeno) e seguito dall'aggiunta di concentrazioni crescenti di CGRP per ottenere il rilassamento completo. Il pretrattamento con il Composto I è efficace nell'inibire la dilatazione indotta da CGRP di arterie intracraniali umane *ex vivo* e mostra uno spostamento parallelo verso destra della curva di concentrazione di CGRP-risposta.

*Metodi.* Ogni anello dell'arteria montato con filo è stato pre-incubato per 30 min con una singola concentrazione (0,1-30 nM) del Composto I antagonista, poi contratto con 10 mM di KCl (per mimare il tono endogeno), seguito dall'aggiunta di concentrazioni crescenti di CGRP per ottenere il rilassamento completo. La contrazione con KCl è lasciata stabilizzare, di modo che il tempo totale di pre-trattamento con l'antagonista fosse di approssimativamente 45 min prima dell'applicazione di CGRP.

*Risultati.* Il Composto I produce uno spostamento parallelo verso destra della curva di concentrazione di CGRP-risposta in arterie intracraniali umane *ex vivo*. L'analisi di Schild ha rivelato una  $K_b$  di 91 pM. Questi risultati possono essere confrontati in modo favorevole ai saggi di legame ( $K_i = 22,7$  pM) e funzionali ( $K_b = 21,5$  pM) *in vitro*.

Efficacia *in vivo* del Composto I in flusso sanguigno facciale di Uistiti

Per valutare l'efficacia *in vivo* di nuovi antagonisti del recettore per CGRP, gli uistiti hanno ricevuto una serie di quattro iniezioni endovenose di hαCGRP (ad intervalli di 45 min). La prima serve come controllo di base ed è seguita dal rilascio sottocutaneo dell'articolo da testare. Le successive tre stimolazioni con CGRP forniscono una valutazione dell'antagonismo funzionale di CGRP *in vivo*. Nel presente studio, il Composto I ha dimostrato un antagonismo di CGRP forte, duraturo.

*Metodi.* Gli uistiti sono stati anestetizzati ed il flusso di sangue facciale è stato aumentato mediante somministrazione endovenosa (IV) di hαCGRP ad intervalli di 45 min (-30, 15, 60 & 105 min). L'effetto del composto da testare, rilasciato al 0 min, sui cambiamenti indotti da hαCGRP nel flusso sanguigno facciale è misurato mediante

flussimetria laser Doppler. I composti efficaci sopprimeranno l'aumento indotto da  $h\alpha$ CGRP nel flusso sanguigno facciale osservato a 15, 60 & 105 min (come confrontato rispetto all'effetto di base di  $h\alpha$ CGRP osservato a -30 min).

*Soggetti:* Uistiti comuni (*Callithrix jacchus*) adulti maschi e femmine di peso 350-650 g servono come soggetti.

5            *Anestesia e Preparazione:* Gli animali sono stati anestetizzati mediante anestesia con isoflurano in una camera di induzione (induzione rapida al 4-5%, mantenuta con 1-2,5%; Solomon et al., 1999). L'anestesia è stata mantenuta rilasciando un'alimentazione costante di aria:ossigeno (50:50) e isoflurano mediante intubazione e ventilazione (con monitoraggio dei gas ematici). La temperatura corporea è stata mantenuta a  $38 \pm 0,5$  °C ponendo su una superficie a temperatura controllata automatizzata con sonda rettale. Una piccola area di pelo (appross. 1,5 cm quadrati) è stata  
10 rimossa da uno o entrambi i lati della faccia applicando una crema depilatoria e/o mediante rasatura. Le aree chirurgiche sono state tagliate e preparate con Betadine. Una linea IV è stata posta nella vena safena per la somministrazione dei composti da testare e l'antagonista del recettore per CGRP  $h\alpha$ CGRP. In aggiunta, questa linea IV consente il prelievo di campioni di sangue (max 2,5 ml, 10%) per il monitoraggio dei gas ematici e l'analisi dei livelli plasmatici di composto. Una soluzione di destrosio al 5% è stata somministrata per via IV per mantenere i livelli di zuccheri nel sangue. La  
15 profondità dell'anestesia è stata monitorata misurando la pressione sanguigna e la frequenza cardiaca usando un metodo con fascia da polso non invasiva ed un ossimetro da polso, rispettivamente. Guanetidina, 5-10 mg/kg IV, arricchita per IV 5 mg/kg IV come necessario, è fornita per stabilizzare il flusso di picco nel flusso sanguigno facciale, che mostrerebbe altrimenti una riduzione progressiva in seguito a stimolazione ripetuta.(Escott et al., 1995). Il flusso sanguigno microvascolare è monitorato attaccando una sonda per flusso laser-Doppler autoadesiva alla pelle facciale.  
20 La sonda registra il numero di globuli rossi che attraversa il percorso dei due fasci laser, moltiplicato per la loro velocità (riportato come variazioni di flusso).

*Rilascio del farmaco:* I composti da testare sono stati somministrati per via SC (0,1-0,6 ml/kg) nella nuca del collo. L'antagonista del recettore per CGRP,  $h\alpha$ CGRP è rilasciato per via IV (1 ml/kg) ad una dose di 10  $\mu$ g/kg.

25            *Protocollo del Test:* Per valutare l'efficacia e la durata d'azione *in vivo*, un aumento di controllo nel flusso sanguigno facciale è indotto somministrando  $h\alpha$ CGRP (10  $\mu$ g/kg IV) 30 min prima (-0,5 ore) del rilascio del farmaco. Il

Composto I è stato poi somministrato al tempo zero (0 min) e ripetizioni di hαCGRP sono state rilasciate ad intervalli di 45 min per ~2 ore (dati raccolti a 0,25, 1 e 1,75 ore post-dose). Il Composto I è stato dosato a 0,003, 0,01 e 0,03 mg/kg, SC. I composti sono stati ottenuti appena prima di ogni somministrazione di hαCGRP. In seguito al test, gli animali sono stati riportati alla gabbia di trasporto che è stata posta su una superficie a temperatura controllata che mantiene gli animali caldi fino al risveglio e ambulazione. Gli animali possono essere testati nuovamente dopo un riposo e di *wash out* di 14-21.

*Risultati.* Il Composto I (0,003-0,03 mg/kg, SC) mostra un'inibizione dose-dipendente degli aumenti di GCRP nel flusso sanguigno facciale di uistiti. Una forte inibizione (53-80%) è osservata a 0,03 mg/kg a 0,25, 1 e 1,75 ore post-dose. Un'inibizione significativa (35-40%) è stata osservata in tutti i tempi di test post-dose a 0,01 mg/kg. A 0,003 mg/kg, un'inibizione lieve (20%) ma significativa è stata osservata a 0,25 ore, senza effetto in tempi di test successivi.

Confrontando l'efficacia rispetto all'esposizione, livelli plasmatici  $\geq 8$  nM sono associati con un'efficacia significativa *in vivo* e livelli  $\geq 25$  nM con efficacia massima per il Composto I.

Studi di irritazione intranasale in ratti

*Composto I e Composto III: Studio di irritazione intranasale comparativo di una settimana in ratti.* Questo studio è stato condotto per confrontare una potenziale irritazione nasale del Composto I rispetto al Composto III quando somministrati per via intranasale a ratti maschi per 1 settimana. A ratti maschi (10/gruppo) sono state istillate per via intranasale soluzioni di Composto I o di Composto III (25, 75 o 175 mg/L in 225 mM di acido succinico, 0,02% in benzalconio cloruro, 1,25% in destrosio anidro, pH 5,8-6,2) una volta al giorno ad un volume di dose di 100  $\mu$ L/narice. Usando il paradigma di dosaggio, sono state rilasciate quotidianamente dosi fisse di 5, 15 o 35 di articolo da testare. Come conseguenza, i dosaggi normalizzati rispetto al peso corporeo sono diminuiti nel tempo al crescere dei ratti. Ad un gruppo di controllo è stato somministrato il veicolo succinato e ad un gruppo di controllo *sham* è stata somministrata soluzione salina mediante istillazione intranasale. I parametri valutati hanno incluso osservazioni cliniche, peso corporeo, consumo di cibo, tossicocinetica e valutazione istologica dei tessuti nasali.

I valori per i parametri tossicocinetici sono mostrati in Tabella 11.

*Tabella 11: Dati tossicocinetici derivati per il Composto I.*

<i>Composto I</i>						
<i>Dose, mg</i>	5		15		35	
<i>Dose, mg/cm<sup>2(3)</sup></i>	0,357		1,07		2,50	
<i>Parametro</i>	<i>Giorno 0</i>	<i>Giorno 6</i>	<i>Giorno 0</i>	<i>Giorno 6</i>	<i>Giorno 0</i>	<i>Giorno 6</i>
Dosaggio medio (mg/kg)	21	19	62	56	144	132
C <sub>max</sub> media (μM)	0,33	0,66	2,2	0,83	1,5	1,2
AUC <sub>0-24h</sub> Composita (μM•h)	1,6	2,6	4,6	5,2	7,9	5,4
T <sub>max</sub> media (h)	0,50	1,0	1,0	0,50	2,0	1,0
T <sub>1/2</sub> media (h)	7,1	5,6	5,1	6,7	ND <sup>1</sup>	6,0
C <sub>24h</sub> Media (μM)	0,022	0,015	0,017	0,059	0,12	0,036

<sup>1</sup>Non determinato a causa di esposizione prolungata.

<sup>2</sup>Biodisponibilità assoluta basata su una AUC<sub>0-24h</sub> di 7,7 μM•h in ratti in seguito a somministrazione endovenosa di 1 mg/kg.

<sup>3</sup>Area di superficie stimata della mucosa nasale in ratti=14cm<sup>2</sup>

Il dosaggio intranasale del Composto I ha fornito un'esposizione sistematica in ratti fino a 24 ore ed è stata osservata poca differenza tra i primi e gli ultimi giorni di dosaggio in questo studio da 1 settimana.

La somministrazione intranasale del Composto I è stata ben tollerata; le scoperte in vita sono state limitate ad una salivazione aumentata in tutti i gruppi di dosaggio e nei veicoli di controllo ed è stata probabilmente correlata con un volume di dosaggio eccessivamente grande usato per lo studio. Non è stata osservata salivazione in ratti trattati con soluzione salina.

L'irritazione nasale è stata osservata per entrambi i composti, ma il Composto I ha causato chiaramente meno atrofia dell'epitelio olfattivo rispetto al Composto III per l'intervallo di dosaggio (Tabella 12). Il tipo di lesione osservata era in accordo con le osservazioni precedenti effettuate per il Composto II. La gravità e l'incidenza delle scoperte nasali hanno dimostrato che il Composto I aveva un profilo di tossicità nasale superiore rispetto a quello del Composto III.

*Tabella 12: Incidenza e Gravità dell'atrofia dell'epitelio olfattivo in seguito a istillazione nasale di Composto III e di Composto I in ratti*

Dose (mg)	5		15		35	
Dose, (mg/cm <sup>2</sup> ) <sup>(1)</sup>	0,357		1,07		2,50	
Gravità	Composto III	Composto I	Composto III	Composto I	Composto III	Composto I
Nessuno	1	8	1	1	3	4
Minimo	6	1	0	6	0	3
Lieve	2	0	2	2	2	2
Moderato	0	0	6	0	3	0
Marcato	0	0	0	0	1	0

<sup>1</sup> L'area di superficie della mucosa nasale totale stimata del ratto è 14 cm<sup>2</sup>

*Composto I e Composto II: Studio esplorativo di Irritazione intranasale di una settimana in ratti.* Il Composto I e il Composto II sono stati anche confrontati direttamente per l'irritazione intranasale. A ratti maschi (6/gruppo) sono state istillate per via intranasale soluzioni di Composto I o di Composto II (75 o 175 mg/L) in 225 mM di acido succinico, 1,25% in destrosio anidro, pH 5,8-6,2) una volta al giorno ad volumi di dose di 12,5, 25 o 100 µL/narice. L'unico punto finale valutato in questo studio era la valutazione dei turbinati nasali.

L'atrofia dell'epitelio olfattivo causata dal Composto I era chiaramente meno grave rispetto a quella prodotta dal Composto II per ciascuna dose (volume × concentrazione) valutata (Tabella 13).

*Tabella 13: Tossicità sull'epitelio olfattivo, punteggi di gravità per il Composto I e il Composto II.*

Composto	volume/narice	12,5 µL		25 µL		100 µL	
	mg/ml	75	175	75	175	75	175
	mg/ratto/giorno	1,875	4,375	3,75	8,75	15	35
	mg/cm <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> )	0,134	0,313	0,268	0,625	1,071	2,500
<i>Composto I</i>	Nessuno	5	5	2	4		

	Minimo			3	1		
	Scarso					5	1
	Lieve						4
<i>Composto II</i>	Nessuno	3	3	2	1		
	Minimo		1	2	3		
	Scarso	1		1	1	4	
	Lieve	1	1			1	2
	Moderato						3
<p>La gravità delle lesioni è stata valutata in una scala da 1 a 5. I valori corrispondono al numero di animali che mostrano ogni grado di gravità. I punteggi includono l'atrofia dell'epitelio olfattivo, l'essudato e necrosi a cellule singole. Ogni tipo di ferita è stato valutato separatamente ed è mostrato qui il punteggio più grave. Non vi erano lesioni in animali a cui è stata somministrata la dose di veicolo. n=5 animali per gruppo. Non sono stati ottenuti dati di esposizione in questo studio comparativo di irritazione. <sup>1</sup> L'area di superficie della mucosa nasale totale stimata del ratto è 14 cm<sup>2</sup></p>							

La relazione dose-risposta del Composto II era in accordo con quella osservata in altri studi. Sia il volume aumentato che la concentrazione aumentata hanno contribuito ad una tossicità nasale più significativa, ma la concentrazione è probabilmente il fattore più importante.

5 Riepilogando, il Composto I ha dimostrato superiorità rispetto al Composto II con riferimento all'irritazione nasale.

10 *Potenziale per il rilascio nasale.* La via di somministrazione intranasale (IN) per gli antagonisti di CGRP è attraente, dato che consente il rilascio non invasivo con potenziale rapida insorgenza di azione. La barriera epiteliale nasale altamente permeabile, tessuto mucosale ben perfuso e capacità metabolica limitata/tempo di permanenza nei tessuti sono caratteristiche potenzialmente utili che supportano il rilascio intranasale di un composto come il Composto I che mostra assorbimento orale molto scarso.

La fattibilità del rilascio nasale è stata valutata in un modello IN di coniglio confrontando i profili di concentrazione plasmatica-tempo ed i parametri farmacocinetici (C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC e biodisponibilità) per il

Composto I rilasciato per via intranasale rispetto a quelli mediante via IV. La concentrazione della soluzione di dosaggio ed il volume di rilascio sono inclusi nelle tabelle di dati per ogni studio. Le composizioni dei veicoli sono descritte nelle note in fondo alla Tabella.

5 *Metodi.* Gruppi di tre conigli bianchi New Zealand maschi, di peso nell'intervallo tra 3-3,5 kg, che hanno ricevuto una singola dose di un farmaco in uno dei seguenti trattamenti: Iniezione di bolo IV da 0,5 mg/kg per 30 secondi o 0,3-3 mg/kg somministrati IN con un microspruzzatore con siringa. Prima del dosaggio IN i conigli sono stati lievemente sedati con l'anestetico per inalazione, Sevoflurane. I conigli hanno riacquisito coscienza in 2-5 min. Campioni seriali di sangue sono stati raccolti in vacutainer contenenti eparina prima della dose 2, 5, 10, 15, 30 min e 1, 2, 4, 6 e 24 ore post-dose. I campioni di sangue sono stati centrifugati immediatamente a 4°C ed il plasma separato è stato conservato a -80°C fino ad ulteriore analisi con il saggio LC/MS/MS.

10 *Risultati.* Il profilo farmacocinetico indica che il Composto I è rapidamente assorbito dalla cavità nasale di conigli, quando spruzzato come soluzione. Il tempo per raggiungere le concentrazioni di picco (Tmax) avviene entro 0,2-0,3 ore (15-20 min) a tutte le dosi studiate. La biodisponibilità assoluta a 0,3, 1 e 3 mg/kg variava da 13 a 30% e la Cmax variava da 0,12 a 2,0 µM (Tabella 14).

15 *Tabella 14: Parametri farmacocinetici per il Composto I nel Coniglio dopo la somministrazione IV e IN.*

<i>Parametro</i>	<i>IV (n=3, Media ± SD)</i>	<i>IN (dose bassa) (n=3, Media ± SD)</i>	<i>IN (dose media) (n=3, Media ± SD)</i>	<i>IN (dose elevata) (n=3, Media ± SD)</i>
Dose (mg/kg)	0,5	0,3	1,0	3,0
Volume del dosaggio (µl)		100 (50/narice)	100 (50/narice)	100 (50/narice)
Concentrazione di dosaggio (mg/ml)	5	10	30	100
Cmax (µM)	13,7 ± 1,8	0,12 ± 0,69	0,55 ± 0,26	2,03 ± 1,0

Tmax (h)		0,25	0,25	0,33
AUC <sub>tot</sub> (μM·h)	1,8 ± 0,58	0,14 ± 0,07	0,69 ± 0,33	3,27 ± 1,17
Cl (ml/min/kg)	7,9 ± 3,0	-	-	-
V <sub>ss</sub> (L/kg)	0,16 ± 0,01	-	-	-
T <sub>1/2</sub> (h)	1,3 ± 0,26	-	-	-
MRT (h)	0,38 ± 0,15	-	-	-
Biodisponibilità (F%)	-	12,5 ± 6,56	18,8 ± 8,96	30,2 ± 10,82
Formulazione per IV: 50 mM di tampone succinato/veicolo D5W, pH 5.				
Formulazione per IN: 50 mM di tampone succinato, pH 5-6.				

L'assorbimento per IN del Composto I nel coniglio è stata molto rapida. Livelli plasmatici >10 nM sono stati misurati entro 5 min. Il farmaco è stato rilevato nel plasma per almeno 6 ore post-dose e fino a 24 ore alla dose elevata.

5 Precedentemente, il Composto II vi era una deviazione maggiore dalla linearità con il volume per il rilascio intranasale piuttosto che quando è stata variata la concentrazione di dosaggio. Mantenendo il volume di rilascio del Composto I e variando la concentrazione della soluzione di dosaggio, la AUC e C<sub>max</sub> per IN mostravano una tendenza verso una linearità dose-dipendente (Tabella 15). Anche la variabilità di questi parametri è aumentata con la dose. Da un esame più approfondito, la biodisponibilità per IN si è dimostrata aumentare con la dose (o con la concentrazione del dosaggio) per le tre dosi testate (Tabella 15).

*Tabella 15: Linearità della Dose del Composto I per IN in conigli*

Dose (mg/kg)	C <sub>max</sub>	AUC <sub>tot</sub>
(n = 3, media ±SD)	(μM)	(μM·h)
0,3	0,12 ± 0,07	0,14 ± 0,07
1,0	0,55 ± 0,26	0,69 ± 0,33
3,0	2,03 ± 1,0	3,27 ± 1,17
Linea di tendenza R <sup>2</sup>	0,99	0,99

Le concentrazioni di dosaggio erano 10, 30 e 100 mg/ml in 50 mM di veicolo tampone succinato, pH 5.

Riepilogando, la via di somministrazione intra-nasale per il Composto I fornisce un assorbimento sistemico rapido e livelli plasmatici relativamente prolungati a confronto con la via orale. L'elevata solubilità acquosa elevata e la stabilità migliorata della soluzione supportano in modo vantaggioso la vita del prodotto spray nasale in un dispositivo spray appropriato. E' previsto che il rilascio della soluzione di farmaco ed il suo deposito nella cavità nasale in umani siano più forti e riproducibili rispetto a quanto possibile con i modelli animali IN preclinici. Le formulazioni del Composto I sono previste per essere rilasciate in dispositivi per spray nasali multidose riutilizzabili e a dosi unitarie usa e getta.

#### Composizioni Farmaceutiche e Metodi di Trattamento

Un altro aspetto dell'invenzione è una composizione farmaceutica comprendente il Composto I con un adiuvante, un trasportatore o un diluente farmaceuticamente accettabili.

Il Composto I sarà generalmente fornito come composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace del Composto I o di un suo sale farmaceuticamente accettabile ed un trasportatore farmaceuticamente accettabile e possono contenere eccipienti convenzionali. Una quantità terapeuticamente efficace è la quantità necessaria a fornire un beneficio significativo al paziente, come determinato dai praticanti nell'arte. I trasportatori farmaceuticamente accettabili sono quei trasportatori noti convenzionalmente aventi profili di sicurezza accettabili. Le composizioni comprendono tutte le forme solide e liquide, compres, capsule, compresse, losanghe e polvere, così come sospensioni liquide, sciroppi, elisir e soluzioni. Le composizioni solide possono essere formate in formulazioni temporizzate o a rilascio prolungato. Le composizioni sono preparate usando tecniche comuni di formulazione ed eccipienti convenzionali (come agenti leganti ed umettanti) e veicoli (come acqua ed alcoli).

Le composizioni solide sono formulate normalmente in unità di dosaggio fornendo da circa 1 a 1000 mg di ingrediente attivo per dose. Alcuni esempi di unità di dosaggio solido sono 0,1 mg, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 500 mg, e 1000 mg. Le composizioni liquide sono generalmente in un intervallo di dosaggi unitari di 1-100 mg/mL. Alcuni esempi di unità di dosaggio liquido sono 1 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL.

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

L'invenzione comprende tutte le modalità convenzionali di somministrazione, compresi i metodi orali, parenterali, intranasali, sublinguali e transdermici. Tipicamente, la dose giornaliera sarà di 0,01-100 mg/kg di peso corporeo al giorno. In generale, è necessario più composto per via orale, meno per via parenterale. Il regime di dosaggio specifico, tuttavia, dovrebbe essere determinato da un medico usando giudizio medico affidabile.

5 Un altro aspetto dell'invenzione è la somministrazione intranasale.

E' suggerito che inibitori di CGRP a livello recettoriale siano utili in condizioni patofisiologiche, in cui è avvenuta eccessiva attivazione del recettore per CGRP. Alcuni di questi includono vasodilatazione neurogenica, infiammazione neurogenica, emicrania, cefalea a grappolo ed altre cefalee, lesione terminale, shock termico, vampate da menopausa e asma. L'attivazione del recettore per CGRP è stata implicata nella patogenesi della cefalea da emicrania (Edvinsson L. CNS Drugs 2001;15(10):745-53; Williamson, D. J. Microsc. Res. Tech. 2001, 53, 167-178.; Grant, A. D. Brit. J. Pharmacol. 2002, 135, 356-362.). I livelli sierici di CGRP sono elevati durante l'emicrania (Goadsby P.J. et al. Ann. Neurol. 1990;28:183-7) ed il trattamento con farmaci antiemicrania riporta i livelli di CGRP a livelli normali, che coincidono con l'alleviamento della cefalea (Gallai V. et al. Cephalalgia 1995, 15, 384-90). I pazienti che soffrono di emicrania mostrano elevati livelli basali di CGRP a confronto con i controlli (Ashina M, et al., Pain 2000, 86(1-2):133-8). L'infusione endovenosa di CGRP produce cefalea durevole in pazienti con emicrania (Lassen L.H. et al. Cephalalgia. 2002, 22(1), 54-61). Studi preclinici in cani e ratti riportano che il blocco sistemico di CGRP con l'antagonista peptidico di CGRP(8-37) non altera l'emodinamica sistemica a riposo né il flusso sanguigno regionale (Shen, Y-T. et al. J. Pharmacol. J. Exp. Ther. 2001, 298, 551-8). Pertanto, gli antagonisti del recettore per CGRP possono rappresentare un nuovo trattamento per l'emicrania che eviti labilità cardiovascolari di vasocostrizione attiva associata con agonisti non selettivi di 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 'triptani' (per esempio, sumatriptan).

20 Il Composto di Formula I o un suo sale farmaceuticamente accettabile sono anche utili in un metodo per inibire il recettore per CGRP comprendente mettere a contatto il recettore per CGRP con un composto di Formula I o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Il Composto di Formula I è anche utile in un metodo per trattare condizioni associate con livelli aberranti di CGRP o con la segnalazione del recettore per CGRP comprendente la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di un composto di Formula I ad un paziente.

5 Un altro aspetto dell'invenzione prevede l'uso di un composto di Formula I nella preparazione di un medicamento per il trattamento di condizioni correlate con livelli aberranti di CGRP o di segnalazione del recettore per CGRP.

Un altro aspetto dell'invenzione prevede il composto di Formula I per l'uso in un metodo per trattare l'emicrania.

Un altro aspetto prevede il composto di Formula I per l'uso in un metodo per trattare il dolore neuropatico.

10 Un altro aspetto dell'invenzione concerne il composto di Formula I per l'uso in un metodo per trattare infiammazione (in particolare, l'infiammazione neurogenica), dolore, lesione termica, shock circolatorio, diabete, sindrome di Reynaud, insufficienza arteriosa periferica, emorragia subaracnoidea/craniale, crescita tumorale, vampate associate con menopausa. Il trattamento può essere effettuato mediante l'antagonismo del recettore per CGRP somministrando le composizioni farmaceutiche comprendenti un composto di Formula I, come definito qui.

15 Il composto di Formula I è anche utile in metodi selezionati dal gruppo consistente in (a) regolazione immunitaria nella mucosa intestinale, (b) effetto protettivo contro la lesione cardiaca anafilattica, (c) la stimolazione o la prevenzione della stimolazione di interleuchina-1b(IL-1b) del riassorbimento osseo, (d) la modulazione dell'espressione di recettori NK1 in neuroni spinali e (e) malattie infiammatorie delle vie aeree e la malattia polmonare ostruttiva cronica, comprendente asma. Vedi (a) Calcitonin Receptor-Like Receptor Is Expressed on Gastrointestinal Immune  
20 Cells. Hagner, Stefanie; Knauer, Jens; Haberberger, Rainer; Goeke, Burkhard; Voigt, Karlheinz; McGregor, Gerard Patrick. Institute of Physiology, Philipps University, Marburg, Germany. Digestion (2002), 66(4), 197-203; (b) Protective effects of calcitonin gene-related peptide-mediated evodiamine on guinea-pig cardiac anaphylaxis. Rang, Wei-Qing; Du, Yan-Hua; Hu, Chang-Ping; Ye, Feng; Tan, Gui-Shan; Deng, Han-Wu; Li, Yuan-Jian. School of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacology, Central South University, Xiang-Ya Road 88, Changsha,  
25 Hunan, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2003), 367(3), 306-311; (c) The experimental study on the

effect calcitonin gene-related peptide on bone resorption mediated by interleukin-1. Lian, Kai; Du, Jingyuan; Rao, Zhenyu; Luo, Huaican. Department of Orthopedics, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Peop. Rep. China. *Journal of Tongji Medical University* (2001), 21(4), 304-307, (d) Calcitonin gene-related Peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons. Seybold VS, 5 McCarson KE, Mermelstein PG, Groth RD, Abrahams LG. *J. Neurosci.* 2003 23 (5): 1816-1824. Department of Neuroscience, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455, e Department of Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas 66160 (e) Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. Aoki-Nagase, Tomoko; Nagase, Takahide; Oh-Hashi, Yoshio; Shindo, Takayuki; Kurihara, Yukiko; Yamaguchi, Yasuhiro; Yamamoto, Hiroshi; Tomita, Tetsuji; Ohga, Eijiro; Nagai, 10 Ryozo; Kurihara, Hiroki; Ouchi, Yasuyoshi. Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan. *American Journal of Physiology* (2002), 283(5,Pt. 1), L963-L970; (f) Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. Springer, Jochen; Geppetti, Pierangelo; Fischer, Axel; Groneberg, David A. Charite Campus-Virchow, Department of Pediatric Pneumology and Immunology, Division of Allergy Research, Humboldt-University Berlin, Berlin, Germany. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (2003), 16(3), 121- 15 130; e (g) Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. Helyes, Zsuzsanna; Pinter, Erika; Nemeth, Jozsef; Szolcsanyi, Janos. Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Pecs, Pecs, Hung. *Current Medicinal Chemistry: Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* (2003), 2(2), 191-218.

Un altro aspetto di questa invenzione concerne il composto di Formula I per l'uso in un metodo per il 20 trattamento di cancro mammario o glioma o di malattie proliferative. E' stato anche proposto che gli antagonisti di CGRP mostrino utilità nel trattamento di malattie maligne, in particolare contro gliomi e cancro mammario che metastatizzano al cervello. Gli antagonisti di CGRP possono essere particolarmente utili contro tumori ipossici e nella prevenzione dell'impianto metastatico. Vedi, la pubblicazione della Domanda PCT WO2010006168.

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

Questo composto di Formula I è anche utile in un metodo di trattamento usando combinazioni di composti di Formula I con uno o più agenti selezionati dal gruppo consistente in inibitori di COX-2, FANS, aspirina, acetamminofene, triptani, ergotamina e caffeina per il trattamento di emicrania.

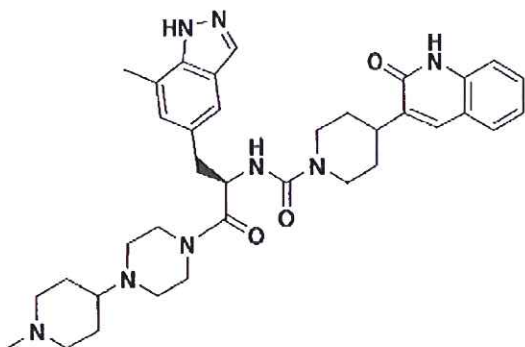
5 "Emicrania", "cefalea" e termini correlati sono come intesi dai medici praticanti. L'emicrania comprende tutte le classi di emicrania, comprese quelle classica, a grappolo, folgorante, emiplegica, oftalmoplegica e oftalmica.

"Terapeuticamente efficace" significa che vi è un beneficio significativo per il paziente, come inteso da medici praticanti.

"Paziente" indica una persona che può trarre beneficio dal trattamento, come determinato dai medici praticanti.

RIVENDICAZIONI

1. Composto (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-ossopropan-2-il)-4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-carbossammide o suo sale farmaceuticamente accettabile.



5

2. Composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace di (R)-N-(3-(7-metil-1H-indazol-5-il)-1-(4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazin-1-il)-1-ossopropan-2-il)-4-(2-osso-1,2-diidrochinolin-3-il)piperidin-1-carbossammide in associazione con un adiuvante, un trasportatore o un diluente farmaceuticamente accettabili.

10 3. Composto secondo la rivendicazione 1 o suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso in un metodo per trattare infiammazione, dolore, lesione termica, shock circolatorio, diabete, sindrome di Reynaud, insufficienza arteriosa periferica, emorragia subaracnoidea/craniale, crescita tumorale, vampate associate con menopausa.

4. Composto secondo la rivendicazione 1 o suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso in un metodo per trattare emicrania.

15 5. Composto secondo la rivendicazione 1 o suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso in un metodo per trattare dolore neuropatico.

6. Composto secondo la rivendicazione 1 o suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso in un metodo per trattare una malattia proliferativa.

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

7. Composto o suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 6, in cui la malattia proliferativa è cancro mammario o glioma.

5

Il sottoscritto dichiara che la presente  
traduzione è conforme al testo originale.

10

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

15