Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

M008.D1.SM.50E

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO No. 3 013 799

"N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-fenil-benzensolfonammidi e N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(2-piridil)benzensolfonammidi e loro uso terapeutico".

Pimco 2664 Limited,

con sede a Londra (Regno Unito)

* * * * * * * * * * *

D E S C R I Z I O N E

* * * * * * * * * * *

CAMPO DELLA TECNICA

La presente invenzione riguarda in generale il campo dei composti terapeutici. Più specificatamente la presente invenzione riguarda certi composti N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-fenil-benzensolfonammide e N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(2-piridil)-benzensolfonammide sostituiti (collettivamente riferiti qui come composti HMC) che sono utili, per esempio, nel trattamento di disturbi (per esempio, malattie) includenti infiammazione e/o distruzione delle articolazioni e/o perdita ossea; disturbi mediati da attivazione eccessiva e/o inappropriata e/o prolungata del sistema immunitario; disturbi infiammatori e autoimmuni, per esempio, artrite reumatoide; psoriasi, artrite psoriatica; malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD); asma; aterosclerosi; malattia dell'intestino infiammato; spondilite anchilosante; sclerosi multipla; lupus sistemico eritematoso; sindrome di Sjögren; un disturbo associato con la perdita ossea, come perdita ossea associata

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

con eccessiva attività degli osteoclasti nell'artrite reumatoide, osteoporosi, malattia ossea associata a cancro, o morbo di Paget; cancro, come malignità ematologiche, come mieloma multiplo, leucemia, o linfoma, o un cancro tumorale solido, come cancro della vescica, cancro del seno (femminile e/o maschile), cancro del colon, carcinoma delle cellule renali, cancro del rene, cancro del polmone, cancro del pancreas, cancro gastrico, cancro della prostata, cancro del cervello, cancro della pelle, cancro della tiroide, ameloblastoma delle cellule basali, o melanoma; un disturbo associato con fibrosi, come sclerosi sistemica o scleroderma, o una vascolitide rara, come il morbo di Behçet. La presente invenzione riguarda anche composizioni farmaceutiche contenenti tali composti, e l'uso di tali composti e composizioni, per esempio, in terapia.

SFONDO

Numerose pubblicazioni sono qui citate allo scopo di descrivere e divulgare più completamente l'invenzione e lo stato dell'arte alla quale l'invenzione appartiene. Ciascuna di queste pubblicazioni è incorporata qui come riferimento interamente nella presente divulgazione, nella stessa misura come se ciascuna singola pubblicazione fosse specificatamente e individualmente indicata essere incorporata come riferimento.

In questa descrizione, includendo le rivendicazioni che seguono, a meno che il contesto richieda diversamente, la parola "comprendere", e variazioni come "comprende" e "comprendente", saranno comprese implicare l'inclusione di un numero intero o

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

passaggio o gruppo di numeri interi o di passaggi indicati, ma non l'esclusione di qualunque altro numero intero o passaggio o gruppo di numeri interi o di passaggi.

Dovrebbe essere notato che, come utilizzato nella descrizione e nelle rivendicazioni accluse, le forme singolari "un", "uno" e "il" comprendono i riferimenti plurali a meno che il contesto chiaramente dica diversamente. Così, per esempio, riferimento a "un veicolante farmaceutico" comprende miscele di due o più tali veicolanti, e simili.

Gli intervalli sono spesso espressi qui come da "circa" un particolare valore, e/o a "circa" un altro particolare valore. Quando tale intervallo è espresso, un'altra forma di realizzazione comprende da un particolare valore e/o all'altro particolare valore. Similmente, quando i valori sono espressi come approssimazioni, con l'uso del prefisso "circa", sarà compreso che il particolare valore forma un'altra forma di realizzazione.

Questa divulgazione comprende informazione che può essere utile nel comprendere la presente invenzione. Non è una ammissione che qualunque dell'informazione fornita qui sia tecnica anteriore o rivelante alla presente invenzione rivendicata, o che qualunque pubblicazione a cui si fa specificatamente o implicitamente riferimento sia tecnica antecedente.

Malattia infiammatoria cronica

L'infiammazione è una risposta immunitaria dei tessuti a seguito di danno corporeo. L'infiammazione acuta è una risposta normale,

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

protettiva che protegge e guarisce il corpo dopo un danno fisico o infezione, caratterizzata da calore, gonfiore e arrossamento nel sito del danno. Comunque, se l'infiammazione persiste per un periodo prolungato, diventa cronica. L'infiammazione cronica è un segnale di, e un fattore contribuente a, una varietà di condizioni di malattia includenti artrite reumatoide, malattia dell'intestino infiammato, lupus sistemico eritematoso, sclerosi multipla e psoriasi.

Il processo infiammatorio è complesso e implica una cascata biologica di segnali molecolari e cellulari che modificano le risposte fisiologiche. Nel sito del danno, le cellule rilasciano segnali molecolari come citochine e interleuchine che provocano numerosi cambiamenti nell'area affetta includenti dilatazione dei vasi sanguigni, aumentato flusso sanguigno, aumentata permeabilità vascolare, invasione di leucociti (globuli bianchi), e essudazione di fluidi contenenti proteine come immunoglobuline (anticorpi). Parecchi differenti tipi di leucociti, includendo i granulociti, monociti e linfociti, sono implicati nella cascata infiammatoria. Comunque, l'infiammazione cronica è soprattutto mediata da monociti e macrofagi di lunga vita; i monociti maturano nei macrofagi una volta che essi lasciano il flusso sanguigno ed entrano nei tessuti. I macrofagi ingolfano e digeriscono microorganismi, corpi estranei e cellule di senescenza, e i macrofagi rilasciano parecchi differenti mediatori chimici, includenti il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNFα), interleuchine (per esempio, IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23) e prostaglandine che perpetuano la risposta infiammatoria. Negli stadi

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

successivi, altre cellule, includendo i linfociti, invadono i tessuti affetti.

C'è così una patologia comune che sottintende un'ampia varietà di condizioni infiammatorie croniche. In aggiunta, le caratteristiche dell'infiammazione cronica sono anche osservate in altre malattie includenti cancro e malattie metaboliche come obesità e diabete.

Una delle più comuni condizioni infiammatorie croniche è l'artrite reumatoide (RA), una condizione che colpisce fino al 2% della popolazione mondiale. Anche se è una malattia complessa, ci sono numerosi fattori fisiologici, cellulari e biochimici associati con la progressione di RA che sono comuni a una gamma di altre malattie, includendo quelle con una componente di autoimmunità (per esempio, sclerosi multipla), infiammazione (per esempio, atero-sclerosi e cancro), perdita ossea (per esempio, osteoporosi) e proliferazione (per esempio, malignità ematologiche). Ciò rende la comprensione della RA importante non solo per lo studio di una gamma molto più ampia di malattie, ma anche suggerisce che agenti farmaceutici che lavorano modificando questi processi comuni possono avere utilità oltre la RA. Ciò è confermato da pratica clinica dove farmaci per la RA sono stati mostrati avere un'ampia utilità attraverso una varietà di altre condizioni.

Artrite reumatoide e malattie autoimmuni/infiammatorie correlate

L'artrite reumatoide (RA) è un disturbo autoimmune caratterizzato da infiammazione cronica della membrana sinoviale di articolazioni multiple accoppiata a una progressiva degradazione

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

dell'articolazione. La RA comunemente colpisce le articolazioni del polso e della mano e può anche colpire gomiti, spalle, anche, collo e ginocchi portando a forte dolore e disabilità grave (vedi, per esempio, Scott et al., 2010). L'Organizzazione mondiale della sanità predice che 23,7 milioni di persone soffrono di RA, con un'incidenza che cresce a causa dell'associazione tra la condizione e l'aumento di età.

La causa esatta di RA, come per tutti i disturbi autoimmuni, rimane non chiarita, anche se possibili promotori comprendono una autotolleranza ridotta, una risposta anormale a fattori ambientali, agenti infettivi, e stimoli ormonali (vedi, per esempio, Klareskog et al., 2006; Firestein et al., 2005).

A livello cellulare, lo sviluppo di RA usualmente inizia con le cellule T infiltranti nella membrana sinoviale che ricopre l'articolazione colpita; ciò dopo porta all'attivazione di monociti, macrofagi e fibroblasti sinoviali per mezzo del contatto cellula-cellula e il successivo rilascio di varie citochine, includendo il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNFα), e interleuchine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 (vedi, per esempio, Astry et al., 2011). Queste citochine pro-infiammatorie sono quindi strumentali nell'orchestrare parecchie cascate complesse di trasduzione del segnale, includendo NFκB, il fattore regolatorio di interferone (IRF), il recettore tipo Toll (TLR), e i percorsi Jak/STAT (vedi, per esempio, Malemud et al., 2010) che portano all'induzione di geni codificanti i vari prodotti che propagano la

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

risposta infiammatoria e anche promuovono la distruzione dei tessuti. Questi prodotti comprendono enzimi degradanti tessuti come collagenasi, metalloproteinasi della matrice (MMP), catepsine, e altri fattori pro-infiammatori come selectine, integrine, leucotrieni, prostaglandine, chemochine, ed altre citochine (vedi, per esempio, McInnes et al., 2007); Smolen et al., 2003). In aggiunta, queste cellule aumentano anche la produzione di MMP, portando alla degradazione della matrice extracellulare e perdita di cartilagine all'interno dell'articolazione (vedi, per esempio, Sun, 2010), un processo che implica anche una classe specializzata di cellule note come osteoclasti e un fattore noto come attivatore recettoriale del ligando del fattore nucleare Kappa-B (RANKL) (vedi, per esempio, Takayanagi, 2009).

RANKL è un fattore essenziale per la generazione di osteoclasti, e la produzione di RNAKL sovraregolata porta a aumentata differenziazione degli osteoclasti e alla fine alla distruzione dell'osso (vedi, per esempio, Long et al., 2012). La risposta infiammatoria nella RA porta all'accumulo di linfociti, cellule dendritiche e macrofagi, tutti operanti localmente per produrre citochine e altri mediatori pro-infiammatori come TNFα e IL-6 che ulteriormente potenziano gli effetti di RANKL sulla distruzione dell'osso. In aggiunta, la cascata infiammatoria porta alla iperplasia dei sinoviociti (vedi, per esempio, Takayanagi, 2009), che a sua volta porta all'ispessimento e vascolarizzazione della sinovia in un tessuto distruttivo e aggressivo noto come panno. Il panno

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

contiene sia gli osteoblasti, che distruggono l'osso, che le metallo-proteinasi, che sono implicate nella distruzione della cartilagine. Come tale, l'asse RANKL è critico per la progressione e la patologia di RA così come per il sistema osteoimmune (il collegamento tra sistemi immunitario e osseo) che è centrale per la patologia di numerose differenti condizioni di malattia, descritte di seguito.

Il ruolo di TNFα in RA

La superfamiglia di recettori e di ligandi TNF esplica un ruolo primario nel causare infiammazione e perdita di osso locale e sistemica associata. TNFα è un potente agente pro-infiammatorio che regola molti aspetti della funzione dei macrofagi. E' rapidamente rilasciato dopo un trauma, infezione o esposizione a LPS derivata da batteri ed è stato mostrato essere uno dei più abbondanti mediatori precoci nel tessuto infiammato. Tra le sue varie funzioni c'è il suo ruolo centrale nell'orchestrare la posizione di una cascata di citochine pro-infiammatorie. In aggiunta alle citochine pro-infiammatorie, TNFα aumenta anche i mediatori della trasduzione del segnale dei lipidi come prostaglandine. Sulla base di questi ruoli, il TNFα è stato proposto come un attore centrale nell'attivazione e nel reclutamento delle cellule infiammatorie ed è suggerito che abbia un ruolo critico nello sviluppo di molte malattie infiammatorie croniche includenti l'artrite reumatoide (vedi, per esempio, Liu, 2005; Feldmann et al., 2001; Brennan et al., 1996; Brennan et al., 1992). L'importanza di TNFα in RA è sottolineata dal trovato che anticorpi bloccanti TNFα possono prevenire l'infiammazione in modelli

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

animali di RA, e che la terapia anti-TNFα è correntemente il trattamento più efficace per RA (vedi, per esempio, Pisetsky, 2012, e ulteriori dettagli forniti in seguito).

TNFα stesso istiga una cascata di segnalazione che porta all'attivazione dei fattori di trascrizione NFκB e AP-1 (vedi, per esempio, Parameswaran et al., 2010). Il legame di TNFα e di IL-1 ai loro rispettivi recettori porta al reclutamento di trasduttori di segnale a valle chiamati TRAF. Ulteriori chinasi sono reclutate dai TRAF, e il complesso chinasico risultante attiva il percorso della chinasi MAP, portando alla fine all'attivazione di AP-1, e alla fosforilazione della chinasi IκB. IκB è l'inibitore di NFκB, che agisce prevenendo la traslocazione di NFκB nel nucleo. La fosforilazione di IκB da parte della chinasi IκB porta alla degradazione di IκB. Una volta che IκB è stata degradata, NFκB migra sul nucleo, dove promuove la trascrizione di geni anti-apoptotici, che promuovono la sopravvivenza delle cellule T e delle cellule B, prolungando pertanto la risposta immunitaria. Questo prolungamento della risposta infiammatoria è centrale alla natura cronica di RA. L'importanza dell'attivazione di NFκB è dimostrata dal fatto che inibizione dell'attività di NFκB da parte di peptidi inibitori può prevenire l'artrite in modelli animali di RA (vedi, per esempio, Jimi et al., 2004).

Altri fattori chiave nell'artrite reumatoide

Come descritto precedentemente, numerosi fattori in aggiunta a TNFα e NFκB agiscono per promuovere l'infiammazione in RA e altre

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

malattie infiammatorie croniche. Tra questi vi sono IL-6 e i fattori regolatori dell'interferone (IRF).

L'interleuchina-6 (IL-6) è una citochina pro-infiammatoria i cui livelli sono aumentati dopo attivazione di varie cellule del sistema immunitario durante l'infiammazione in RA, predominantemente macrofagi e cellule T. Ha effetti pleiotropici nella malattia tramite il suo ruolo chiave nella risposta della fase acuta ed è pesantemente implicata nel governare la transizione da infiammazione acuta a infiammazione cronica. Fa ciò modificando la composizione dell'infiltrato dei globuli bianchi nello spazio infiammatorio, passandolo da neutrofili a monociti/macrofagi (vedi, per esempio, Gabay, 2006). In aggiunta, IL-6 esercita effetti stimolatori sulle cellule T e cellule B, favorendo così le risposte infiammatorie croniche, così come sugli osteoclasti, promuovendo così il ricambio dell'osso. Questi effetti sono implicati nella patologia di un'ampia gamma di malattie autoimmuni/infiammatorie oltre RA, includendo lupus sistemico eritematoso, aterosclerosi, psoriasi, artrite psoriatica, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), sindrome di Sjögren, aterosclerosi, e malattia infiammatoria dell'intestino, così come i cancri come mieloma multiplo e cancro della prostata.

In aggiunta, IL-6 è stata implicata in malattie implicanti perdita dell'osso (per esempio, osteoporosi, malattie mediate da fibrosi (per esempio, sclerosi sistemica), diabete, rigetto di trapianto, vari cancri (includendo, per esempio, mieloma multiplo, linfoma, cancro della prostata), malattie neurodegenerative (per

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

esempio, Alzheimer), disturbi psichiatrici (per esempio, depressione), e certe rare vascolitidi (per esempio, morbo di Behçet). Per una rassegna completa, vedere, per esempio, Rincon, 2012.

I fattori regolatori dell'interferone (IRF) consistono in una famiglia di fattori di trascrizione con diverse funzioni nella regolazione trascrizionale delle risposte cellulari in salute e nelle malattie. Gli IRF comunemente contengono un dominio legante DNA nel terminale N, con la maggior parte dei componenti contenenti anche un dominio associato al terminale C di IRF che media le interazioni proteina-proteina. Dieci IRF e parecchi omologhi di IRF codificati da virus sono stati identificati nei mammiferi. Gli IRF sono attivati in risposta a stimoli endogeni e microbici durante una risposta immunitaria, e selettivamente e cooperativamente modulano l'espressione di una citochina chiave e di fattori di trascrizione implicati in una varietà di processi infiammatori. Per esempio, la stimolazione del recettore per il lipopolisaccaride batterico, TLR-4, attiva una cascata di segnalazione che attiva sia NFκB che IRF-5, mentre IRF-7 è attivato da un processo implicante la famiglia STAT di fattori di trascrizione, che sono anche, ma indipendentemente, attivati da IL-6.

L'attivazione di IRF porta a numerosi effetti a valle includenti la specificazione del destino dei macrofagi (vedi, per esempio, Krausgruber et al., 2011), differenziazione delle cellule T helper (vedi, per esempio, Zhang et al., 2012) e proliferazione delle

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

cellule B (vedi, per esempio, Minamino et al., 2012). Questi diversi ruoli nella malattia sono sottolineati da dati da modelli animali knockout che mostrano, per esempio, livelli ridotti di IL-6 e TNFα in risposta a stimoli infiammatori (vedi, per esempio, Takaoka et al. 2005).

In aggiunta ai ruoli biologici degli IRF descritti precedentemente, parecchi componenti della famiglia IRF sono stati geneticamente associati con una predisposizione a condizioni infiammatorie. Per esempio, polimorfismi in IRF-3 e IRF-7 sono associati con la suscettibilità a lupus sistemico eritematoso (vedi, per esempio, Akahoshi et al., 2008; Fu et al., 2011). In aggiunta, IRF-5, che controlla il destino dei macrofagi, è associato con suscettibilità per RA, lupus sistemico eritematoso, granulomatosi di Wegener, sindrome di Sjögren, e sclerosi multipla (vedi, per esempio, Sharif et al., 2012; Hu et al., 2011).

Trattamento dell'artrite reumatoide

Precedenti terapie per la RA si focalizzavano sul controllo dei sintomi della malattia, soprattutto riducendo l'infiammazione, invece che ritardando la progressione della malattia. Questi farmaci includevano FANS come aspirina, diclofenac, e naproxene. L'infiammazione era ulteriormente controllata dai glicocorticoidi, e la loro combinazione con i FANS forniva un controllo a breve termine ragionevolmente efficace dell'infiammazione. Più recentemente, un approccio più aggressivo per trattare la RA è stato introdotto partendo dalla comparsa della malattia, utilizzando i cosiddetti

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARD), che agiscono rallentando o persino prevenendo la progressione della malattia. Questi includono numerosi vecchi farmaci, includendo sali d'oro; solfasalazina; antimalarici come idrossiclorochina; D-penicillamina; immunosoppressori come acido micofenolico, aza-tioprina, ciclosporina A, tacrolimus e sirolimus; minociclina; leflunomide; e più importante, metotrexato (vedi, per esempio, Smolen et al., 2003).

Il metotrexato è ora la terapia d'elezione di riferimento per i confronti in studi clinici, ed è generalmente utilizzato in associazione con le terapie più nuove. E' efficace nella maggior parte dei pazienti ma, in comune con tutti gli agenti di cui sopra, ha degli effetti collaterali gastrointestinali significativi, che costringono circa il 50% dei pazienti alla fine a cessare il trattamento (vedi, per esempio, Mount et al., 2005). Un ulteriore difetto di questi DMARD più vecchi è la lunghezza del tempo richiesto dal farmaco per iniziare l'azione, variante da settimane con il metotrexato, a mesi con i sali d'oro. Mentre remissioni complete avvengono solamente in circa un quarto dei pazienti, per quelli che non mostrano effetto non è generalmente possibile interrompere la terapia senza causare il rischio di una più violenta ricorrenza della malattia (vedi, per esempio, Smolen et al., 2003).

In anni recenti, il trattamento della RA è stato rivoluzionato con l'avvento di agenti biologici che colpiscono specifici percorsi infiammatori. Parecchi agenti biologici sono correntemente approvati per uso nella RA includendo biologici anti-IL-6 e IL-1 come

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

tocilizumab (Actemra®) e anakinra (Kineret®) (vedi, per esempio, Scott et al., 2010). Comunque, il primo e più importante degli agenti biologici sono le terapie anti-fattore di necrosi tumorale (anti-TNF).

Le terapie anti-TNFα sono i trattamenti primari sul mercato per RA. Una varietà di agenti anti-TNFα sono disponibili includenti anticorpi neutralizzanti come infliximab (Remicade®; J&J e Schering Plough) e adalimumab (Humira®; Abbott), o recettori esca come etanercept (Enbrel®; Amgen e Wyeth), entrambi i quali rappresentano trattamenti validati e altamente efficaci per RA così come per altre malattie come il morbo di Crohn e la psoriasi. Numerosi altri disturbi infiammatori e autoimmuni sono anche sotto investigazione come potenziali bersagli. Altri approcci per bloccare l'azione di TNFα comprendono il frammento anti-TNFα pegilato certolizumab (Cimzia®, UCB). Tutte queste terapie agiscono, in ultimo, per prevenire l'attivazione degli effettori a valle di TNFα descritti precedentemente, includendo NFκB. Comunque, nonostante il loro successo di mercato, le terapie anti-TNFα risentono di numerosi effetti collaterali includenti rischio aumentato di certe malignità come linfoma ed infezioni serie come Legionella e Listeria, così come aumentato rischio di insufficienza cardiaca, riattivazione dell'epatite B, e malattia demielinante.

Infine, e più recentemente, un inibitore della chinasi JAK, tofacitinib (Xeljanz®, Pfizer) ha supplementato la gamma di trattamenti per RA. Comunque, tofacitinib risente di numerosi

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

problemi di sicurezza includenti aumentato rischio di serie infezioni così come aumentato rischio di perforazioni gastrointestinali, danno epatico, e certi cancri, che plausibilmente limitano il suo uso nell'uomo (vedi, per esempio, O'Shea et al., 2013).

Come tale, rimane un bisogno per nuove e migliorate terapie per RA e altre malattie infiammatorie con particolare attenzione alla sicurezza migliorata.

Il sistema osteoimmune e disturbi dell'osso

Il sistema osteoimmune è il termine per l'interconnessione combinata e correlata tra il sistema immunitario e il sistema scheletrico.

In condizioni fisiologiche normali, il sistema scheletrico fornisce supporto, mobilità, protezione per organi vitali, e riserva minerale per il calcio e il fosfato. Allo scopo di ottenere e di adattarsi a queste funzioni, lo scheletro esiste in un equilibrio dinamico caratterizzato da continuo riassorbimento dell'osso mediato dagli osteoclasti e continua deposizione dell'osso mediata dagli osteoblasti (vedi, per esempio, Karsenty et al., 2002). Questo processo biologico è stato chiamato "rimodellazione" dell'osso e avviene in un modo accoppiato con gli osteoblasti producenti i fattori chiave di differenziazione degli osteoclasti, includendo RANKL, descritto precedentemente, e gli osteoclasti promuoventi la formazione dell'osso producendo mediatori osteoblastici come essi degradano l'osso.

Entrambe le cellule immunitarie innate e adattive esercitano

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

effetti sugli osteoclasti e osteoblasti tramite una varietà di mediatori di superficie cellulare secreti dalle cellule (vedi, per esempio, Takayanagi, 2009). L'attivazione del recettore di RANKL (RANK) sui precursori degli osteoclasti inizia una cascata di cambiamenti trascrizionali che determinano la formazione di osteoclasti e l'espressione del meccanismo necessario per il riassorbimento dell'osso includendo molecole necessarie per il legame all'osso, secrezione acida e proteolisi. Molti dei fattori di trascrizione importanti per la differenziazione degli osteoclasti sono regolatori chiave delle risposte immunitarie, come NFκB e il fattore nucleare delle cellule T attivate c1 (NFATc1), e questo processo è anche potenziato da fattori implicati nell'infiammazione come TNFα e IL-6.

In aggiunta al suo ruolo critico nella progressione e nella patogenesi di RA, il sistema osteoimmune gioca un ruolo critico in numerose altre malattie comprendenti osteoporosi e altri disturbi dell'osso e cancro (vedi, per esempio, Dallas et al., 2011).

L'osteoporosi è una malattia comune caratterizzata da ridotta densità dell'osso, deterioramento del tessuto osseo, e un aumentato rischio di frattura. Molti fattori contribuiscono alla patogenesi dell'osteoporosi includendo una dieta povera, mancanza di esercizio, fumo, eccessiva fruizione di alcol. L'osteoporosi si sviluppa anche in associazione con malattie infiammatorie come artrite reumatoide, malattie endocrine come tirotossicosi, e con certi trattamenti farmacologici come trattamento con glucocorticoidi. In verità, le

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

fratture da fragilità correlata ad osteoporosi rappresentano una delle complicanze più importanti che possono avvenire in pazienti con malattie reumatiche come RA, lupus sistemico eritematoso, e spondilite anchilosante.

Il morbo di Paget dell'osso è una condizione comune di causa ignota, caratterizzato da aumentato ricambio dell'osso e rimodellamento dell'osso disorganizzato, con aree di aumentata attività osteoclastica e osteoblastica. Anche se l'osso Pagetico è spesso più denso del normale, l'architettura anormale provoca una debolezza meccanica dell'osso, determinando deformità dell'osso e aumentata suscettibilità a frattura patologica.

La segnalazione di IL-6, TNFα, e RANKL è stata mostrata giocare un ruolo maggiore della sovra-attività degli osteoclasti e un aumento conseguente nella perdita ossea (vedi, per esempio, Tanaka et al., 2003; Roodman, 2006). L'uso di farmaci che influenzano questi percorsi è stato validato dal completamento di studi clinici dell'anticorpo monoclonale contro RANKL, AMG-162 (Denosumab®, Amgen), per il trattamento di osteoporosi/mieloma multiplo, così come da un crescente accumulo di evidenze che mostrano che terapie anti- TNFα e anti-IL-6 anche prevengono perdita dell'osso nelle malattie artritiche (vedi, per esempio, Ogata et al., 2012; Billau, 2010).

Il sistema osteoimmune e cancro

Molti tipi di cancro affliggono l'osso. Malattia ossea associata a cancro può essere manifesta dalla presenza di ipercalcemia o dallo sviluppo di metastasi osteolitiche e/o osteosclerotiche. L'aumentato

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

riassorbimento dell'osso osteoclastico gioca un ruolo chiave nella patogenesi di entrambe le condizioni. Mentre quasi tutti i cancri possono essere complicati da metastasi ossee, le fonti più comuni sono mieloma multiplo, carcinoma del seno, e carcinoma della prostata. I più comuni tumori associati con ipercalcemia sono mieloma multiplo, carcinoma del seno, e carcinoma del polmone.

Come descritto precedentemente, la segnalazione di RANK/RANKL è essenziale per la formazione degli osteoclasti e per il riassorbimento dell'osso che avviene durante il rimodellamento dello scheletro. Mentre livelli fisiologici della segnalazione di RANK/RANKL stimolano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare di cellule epiteliali mammarie, la segnalazione aberrante di RANK/RANKL in questi tessuti è stata recentemente mostrata influenzare la comparsa e la progressione della tumorigenesi del seno e il blocco della segnalazione di RANKL utilizzando denosumab (Xgeva®, Amgen) è stato mostrato essere efficace nel prevenire le complicanze secondarie delle metastasi ossee, come frattura patologica e ipercalcemia in pazienti con cancro del seno (vedi, per esempio, Steger et al., 2011).

Terapie che bloccano la segnalazione di RANK/RANKL possono anche diminuire la capacità dei cancri osteotropici di metastatizzare l'osso. La segnalazione tramite RANK sulla superficie delle cellule tumorali epiteliali umane così come delle cellule di melanoma è stata mostrata indurre una risposta chemiotattica in queste cellule tumorali mentre in un modello murino di metastasi da melanoma, il

trattamento terapeutico dei topi con osteoprotegrina, che neutralizza il recettore RANKL, RANK, riduce significativamente il carico tumorale all'interno delle ossa ma non in altri organi.

In aggiunta al ruolo per RANKL nel cancro, c'è evidenza crescente che l'attivazione di NFκB tramite molecole come TNFα può giocare un ruolo maggiore nella promozione e nella progressione sia di malignità ematologiche, come mieloma e linfomi, che di tumori solidi, come cancro del seno, della prostata e del polmone (vedi, per esempio, Baud et al., 2009). C'è anche una consapevolezza crescente del ruolo e dell'importanza dell'infiammazione e del sistema osteoimmune nel cancro e nello sviluppo di resistenza a radioterapia e ad agenti chemioterapici. Inoltre, è stato suggerito che l'infiammazione sia in effetti uno dei segnali basici del cancro (vedi, per esempio, Mantovani, 2009). Migliorando l'efficacia dei trattamenti anticancro con la prevenzione dell'attivazione di NFκB è pertanto una strategia promettente per aumentare gli esistenti regimi terapeutici ed è correntemente sotto studio, più notabilmente per il trattamento del mieloma multiplo.

Difetti nei percorsi apoptotici normali sono anche implicati nello sviluppo e nella progressione della crescita delle cellule tumorali così come nell'infiammazione. L'apoptosi (morte cellulare programmata) gioca un ruolo chiave nella rimozione di cellule anormali; difetti nella cascata di segnalazione, che porterebbero normalmente alla sua riduzione, giocano un ruolo chiave nella oncogenesi. La radioterapia e molti agenti chemioterapici agiscono

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

provocando danno cellulare, che normalmente indurrebbe apoptosi; difetti nel percorso ridurranno pertanto anche l'efficacia di tali agenti. Le molecole effettore più importanti nel percorso di segnalazione portante ad apoptosi sono note come caspasi, che possono essere attivate da numerosi stimoli, includendo TNAα legante il suo recettore. Mutazioni nei geni che codificano per le caspasi sono state trovate in numerosi tipi tumorali, includendo cancri gastrici, del seno, delle cellule renali, e cervicali così come comunemente nel linfoma linfoblastico delle cellule T e negli ameloblastomi delle cellule basali (vedi, per esempio, Philchenkov et al., 2004). Composti che attivano le caspasi, e così sensibilizzano le cellule verso l'apoptosi, sarebbero altamente efficaci come terapie per il cancro o come agenti singoli o nell'aumentare l'efficacia della chemioterapia e radioterapia per il cancro esistenti.

Agenti che prevengono l'infiammazione distruggono il sistema osteoimmune

Gli inventori hanno identificato nuovi composti che, per esempio, prevengono infiammazione e/o perdita ossea, e così possono essere utilizzati nel trattamento di malattie con una componente infiammatoria o autoimmune includendo, per esempio, artrite reumatoide, malattia dell'intestino infiammato, lupus sistemico eritematoso, aterosclerosi, asma, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), uveite, malattia infiammatoria pelvica, endometriosi, psoriasi e artrite psoriatica; malattie che implicano perdita ossea, includendo, per esempio, perdita ossea associata con artrite

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

reumatoide, osteoporosi, morbo di Paget dell'osso, e mieloma multiplo; così come cancro associato con l'attivazione di NFκB, con aberrante segnalazione del NFκB, o con infiammazione o sovra-produzione di IL-6, includendo malignità ematologiche come mieloma multiplo, leucemia, linfoma linfoblastico delle cellule T, e altri linfomi (per esempio, linfoma non-Hodgkin) e tumori solidi come cancro della vescica, cancro del seno (femminile e/o maschile), cancro del colon, cancro del rene, cancro del polmone, cancro pancreatico, cancro della prostata, cancro del cervello, cancro della pelle, cancro della tiroide e melanoma; cancro associato con l'inattivazione o l'impedimento della morte cellulare mediata da caspasi, come cancro gastrico, cancro del seno, cancro renale, cancro cervicale, e ameloblastomi delle cellule basali; condizioni associate con attività modulata di IRF-5 includendo la granulomatosi di Wegener e sclerosi sistemica; fibrosi associata con sovraproduzione di IL-6, come sclerosi sistemica o scleroderma; malattie neurodegenerative associate con sovraproduzione di IL-6, come morbo di Alzheimer; disturbi psichiatrici anche associati con sovraproduzione di IL-6, come depressione; malattie di angiogenesi associate con sovra-produzione di IL-6 come degenerazione maculare correlata all'età e retinopatia diabetica, iperplasie associate a IL-6 come il morbo di Castleman e certe vascolitidi rare associate con sovraproduzione di IL-6, come morbo di Behçet.

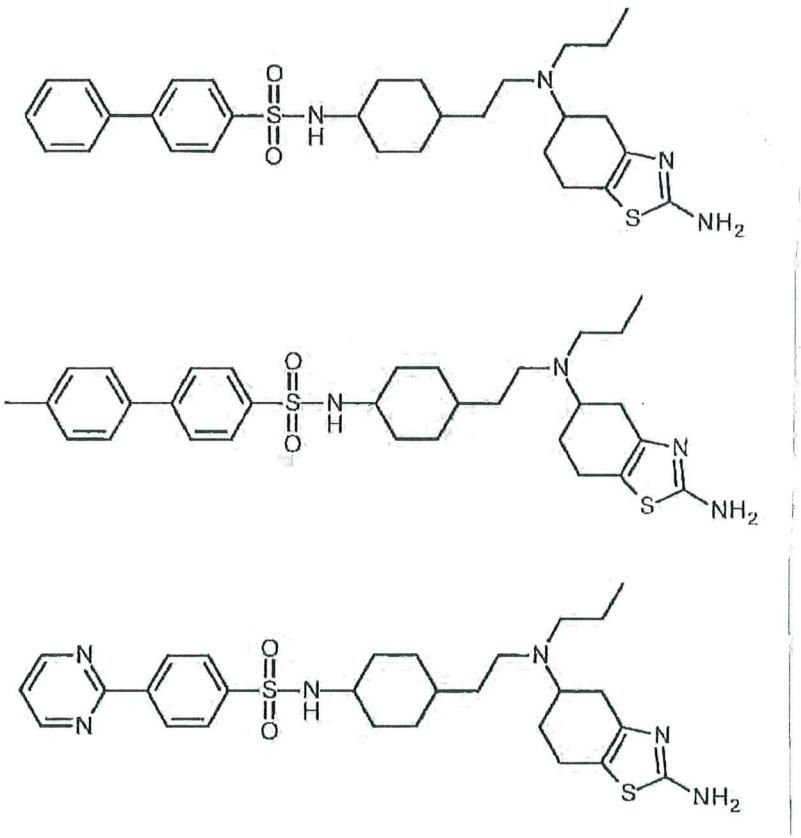
Senza voler essere legati a qualunque particolare teoria, gli inventori ritengono che l'azione possa essere tramite un meccanismo

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

che implica il blocco di TNFα, e/o della segnalazione di RANKL e/o l'attività di IRF e/o inibizione della produzione di IL-6.

Composti noti

Wang et al., 2010, descrivono certi composti che sono apparentemente completi agonisti del recettore D^3 della dopamina di alta affinità e selettivi. Esempi di composti mostrati là comprendono i seguenti (vedi, per esempio, pagine 18-19 e 48-50):

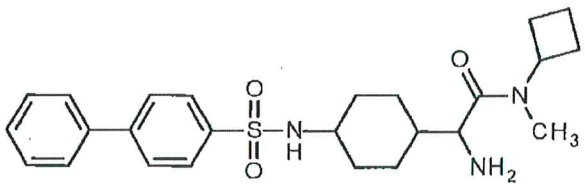


Chen et al., 2012, descrivono composti similari.

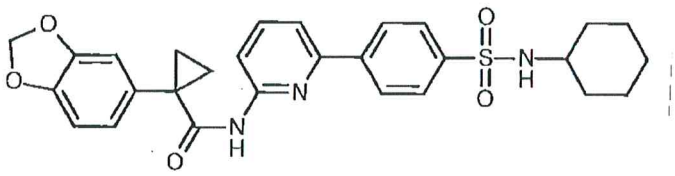
Tsutsumi et al., 2005, descrivono certi composti che apparentemente mostrano attività inibitoria di DPP-IV e apparentemente sono utili nel trattamento del diabete tipo II e obesità. Il seguente composto è mostrato nell'esempio 69 a pagina

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

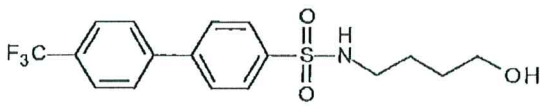
192:



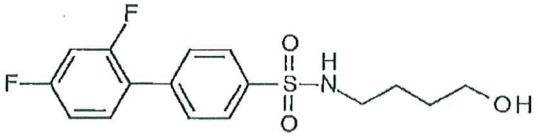
Hadida et al., 2007, descrivono certi composti che vengono dichiarati utili come modulatori dei trasportatori della cassetta legante ATP ("ABC") o loro frammenti, includendo il regolatore della conduttanza su transmembrana della fibrosi cistica ("CFTR"). Il seguente composto è mostrato come esempio 208 a pag. 77:



Ralston et al., 2005, descrivono certe ammidi bifenil-4-solfoniche per uso per inibire la sopravvivenza, formazione e/o attività degli osteoclasti; per inibire condizioni mediate da osteoclasti e/o caratterizzate da riassorbimento dell'osso; nel trattamento di disturbi dell'osso come osteoporosi, artrite reumatoide, malattia dell'osso associata a cancro, e morbo di Paget; e nel trattamento di condizioni associate con infiammazione o attivazione del sistema immunitario. Esempi dei composti mostrati lì comprendono i seguenti:

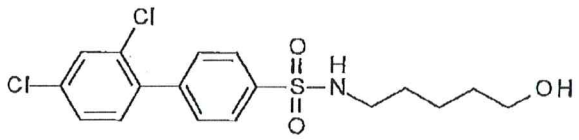


(ABD-246)

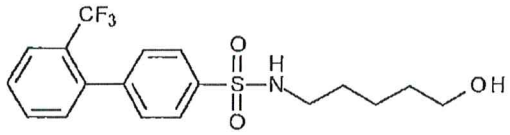


(ABD-256)

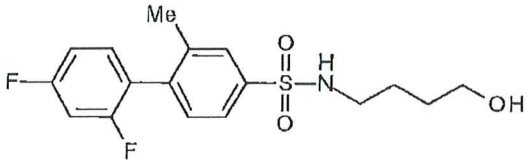
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001



(ABD-278)



(ABD-284)

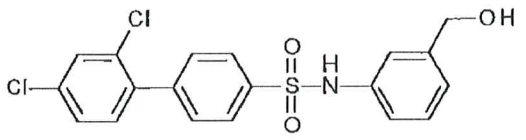


(ABD-295)

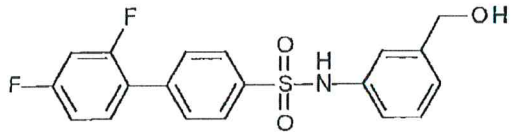
Greig et al., 2006, descrivono composti similari.

Greig et al., 2008, descrivono certe ammidi dell'acido bifenil-4-solfonico per il trattamento di infiammazione e/o distruzione dell'articolazione e/o perdita ossea; disturbi mediati da eccessiva e/o inappropriata e/o prolungata attivazione del sistema immunitario; disturbi infiammatori e autoimmuni, per esempio, artrite reumatoide, psoriasi, artrite psoriatica, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), aterosclerosi, malattia dell'intestino infiammato, e spondilite anchilosante; e disturbi associati con perdita ossea, come perdita ossea associata con eccessiva attività degli osteoclasti nell'artrite reumatoide, osteoporosi, malattia dell'osso associata a cancro, e morbo di Paget. Esempi dei composti mostrati lì comprendono i seguenti:

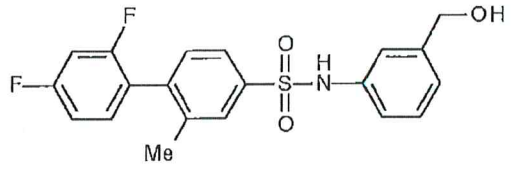
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001



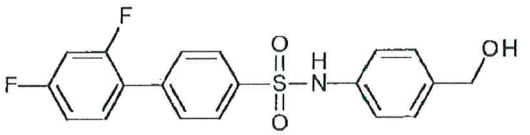
(ABD455)



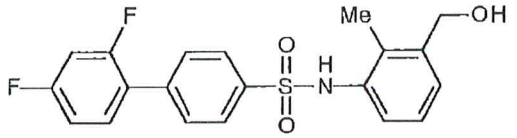
(ABD456)



(ABD465)



(ABD466)

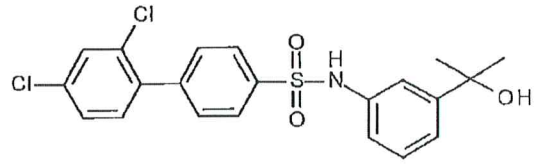


(ABD527)

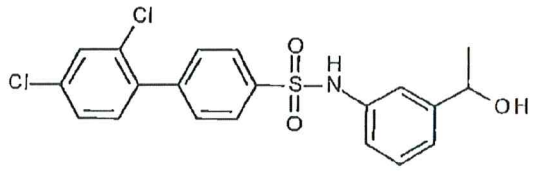
Greig et al., 2010b, descrivono certe ammidi dell'acido bifenil-4-solfonico per il trattamento di infiammazione e/o distruzione di articolazioni e/o perdita ossea; disturbi mediati da eccessiva e/o inappropriata e/o prolungata attivazione del sistema immunitario; disturbi infiammatori e autoimmuni, per esempio, artrite reumatoide, psoriasi, artrite psoriatica, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), aterosclerosi, malattia dell'intestino infiammato, e spondilite anchilosante; disturbi associati con perdita ossea, come perdita ossea associata con eccessiva attività degli osteoclasti nell'artrite reumatoide, osteoporosi, malattia ossea associata a cancro, e morbo di Paget; e cancro, come malignità ematoligica e un tumore solido. Esempi dei composti mostrati lì comprendono i

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

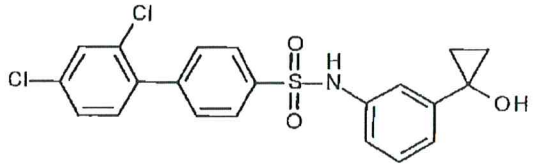
seguenti:



(ABD707)



(ABD708)



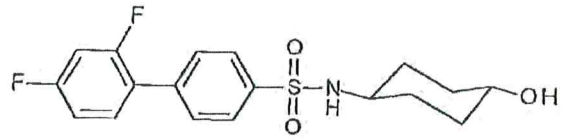
(ABD709)

Greig et al., 2013, descrivono composti simili.

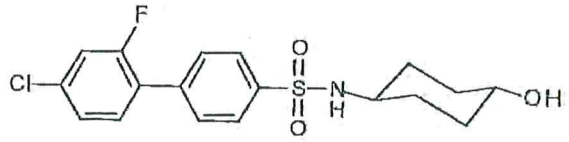
Greig et al., 2010a, descrivono certe ammidi dell'acido bifenil-4-solfonico per il trattamento di infiammazione e/o distruzione di articolazione e/o perdita ossea; disturbi mediati da eccessiva e/o inappropriata e/o prolungata attivazione del sistema immunitario; malattie infiammatorie e autoimmuni, per esempio, artrite reumatoide, psoriasi, artrite psoriatica, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), aterosclerosi, malattia dell'intestino infiammato, e spondilite anchilosante; disturbi associati con perdita ossea, come perdita ossea associata con eccessiva attività degli osteoclasti in artrite reumatoide, osteoporosi, malattia ossea associata a cancro, e morbo di Paget; e cancro, come malignità ematoligica e un tumore solido. Esempi di composti mostrati lì

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

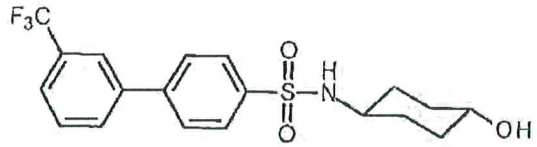
comprendono i seguenti:



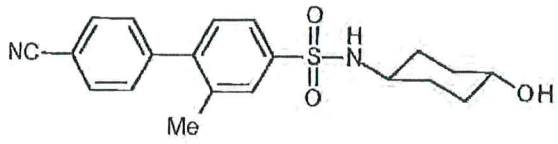
(ABD599)



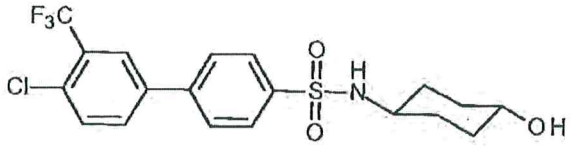
(ABD655)



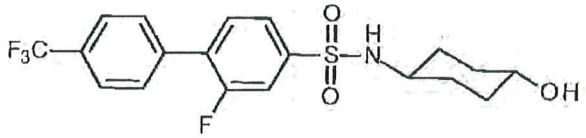
(ABD683)



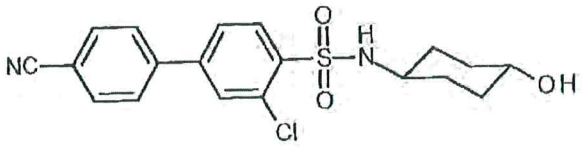
(ABD703)



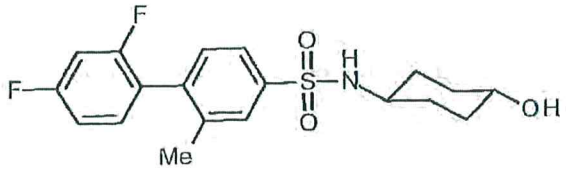
(ABD712)



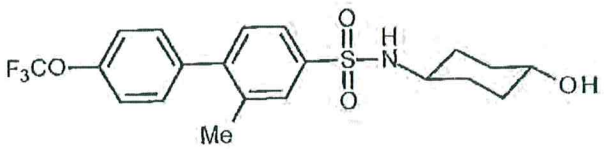
(ABD714)



(ABD732)

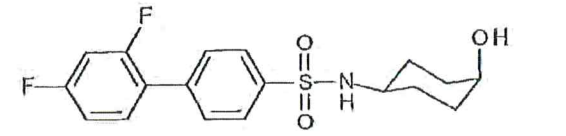


(ABD735)

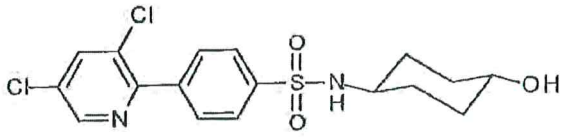


(ABD742)

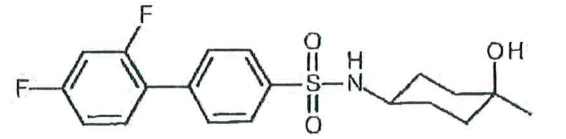
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001



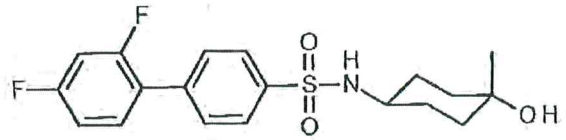
(ABD777)



(ABD836)



(ABD899)



(ABD900)

Nuovi composti con proprietà migliorate

I composti HMC descritti qui sono protetti contro diverse problematicità tossiche che sono presenti nei composti noti, specialmente quelli mostrati in Greig et al., 2010a, e mostrano un'efficacia migliorata in modelli di malattia.

Senza desiderare essere legati a qualunque particolare teoria, gli inventori ritengono che le particolari combinazioni di sostituenti e le loro posizioni sulla struttura dell'anello diarilico danno luogo a proprietà straordinarie. In aggiunta, a miglioramenti sostanziali nella tossicologia acuta *in vivo*, queste combinazioni proteggono i composti dalla citotossicità generale, genotossicità, e da certe propensioni tossiche cardiovascolari osservate nei composti noti. Specificatamente, i composti HMC descritti qui sono negativi per la genotossicità, mostrano un sostanziale miglioramento nella citotossicità generale, e sono sostanzialmente protetti contro

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

l'inibizione del gene umano correlato eter-a-go-go (hERG), che rappresenta una delle maggiori predisposizioni per la tossicità cardiovascolare.

Se un farmaco deve essere utilizzato in clinica, deve avere un idoneo profilo di sicurezza e di efficacia. Deve mostrare un'adeguata sicurezza acuta per permettere il dosaggio nell'uomo senza il pericolo di seri effetti collaterali generali. In aggiunta, non deve provocare danno genetico (genotossicità) poiché agenti che sono genotossici possono agire come carcinogeni nell'uomo. Un farmaco clinicamente accettabile dovrebbe anche non inibire hERG, un canale ionico che, quando inibito, può provocare un disturbo cardiaco fatale noto come sindrome QT lunga. Insieme a queste proprietà di sicurezza, il farmaco deve essere sufficientemente potente contro il bersaglio biologico per dare l'effetto terapeutico desiderato; deve avere una sufficiente solubilità per essere assorbito dal tratto gastro-intestinale; e deve avere sufficiente stabilità per rimanere in circolo abbastanza a lungo per raggiungere il bersaglio biologico.

I composti HMC descritti qui dimostrano efficacia migliorata in modelli di artrite reumatoide, per esempio, se confrontati con i composti mostrati in Greg et al., 2010a. Ciò è dimostrato sia da una maggior grandezza dell'effetto sulla malattia, così come una maggiore potenza, entrambe le quali sono osservate, e questo è molto importante, quando i composti HMC sono somministrati quando la malattia si è già instaurata. Ciò rispecchia l'ambiente clinico per l'uso di questi composti. Inoltre, questi effetti sono osservati

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

senza tossicità manifesta.

La riduzione delle proprietà tossicologiche (effetti negativi) di un farmaco è una barriera allo sviluppo di uguale sfida ed importanza in confronto all'ottimizzazione della farmacodinamica (azione del farmaco sul corpo) e proprietà farmacocinetica (azione del corpo sul farmaco). I composti HMC descritti qui forniscono sostanziali vantaggi come agenti terapeutici orali (in confronto ai composti noti) migliorando la tossicologia generale acuta *in vivo*, la sicurezza genotossica e citotossica, e la sicurezza cardiovascolare, con poco o nessun cambiamento nella farmacocinetica *in vivo* o perdita di potenza rispetto al bersaglio biologico.

I composti HMC descritti qui combinano le caratteristiche richieste di agenti oralmente attivi per il trattamento di, per esempio, condizioni infiammatorie croniche, perdita ossea, e cancro.

BREVE DESCRIZIONE DELLE TAVOLE

La figura 1 mostra sei grafici, ciascuno di un indice artritico medio come funzione del tempo (giorno di dosaggio) per il composto in saggio dosato a 10 mg/kg/giorno con somministrazione con sonda orale (circoletti vuoti) e controllo (circoletti pieni), per ciascuno di: (A) HMC-C-02-A (a sinistra in alto), (B) HMC-C-01-A (al centro in alto), (C) HMC-N-02-A (a destra in alto), (D) HMC-N-01-A (a sinistra in basso), (E) HMC-C-01-B (al centro in basso), (F) HMC-N-01-B (a destra in basso), come descritto nello studio biologico 6 seguente.

La figura 2 mostra due grafici, ciascuno di un indice artritico

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

medio come funzione del tempo (giorno di dosaggio) per il composto in saggio (circoletti vuoti, quadrati vuoti), controllo (circoletti pieni) e controllo positivo, il farmaco sul mercato etanercept (triangoletti), per ciascuno di: (A) ABD899 a 10 mg/kg/giorno (a sinistra), (B) HMC-C-01-A a 0,3 mg/kg/giorno e 3 mg/kg/giorno (destra), come descritto nello studio biologico 6 seguente.

La figura 3 mostra sei grafici, ciascuno dell'indice artritico medio come funzione del tempo (giorno di dosaggio) per il composto in saggio (circoletti vuoti), controllo (circoletti pieni) e controllo positivo, metotrexato (triangoletti), per ciascuno di: (A) ABD899 dosato a 3 mg/kg/giorno (a sinistra in alto), (B) HMC-C-01-A dosato a 3 mg/kg/giorno (al centro in alto), (C) HMC-N-01-A dosato a 3 mg/kg/ giorno (a sinistra in alto), (D) ABD899 dosato a 10 mg/kg/giorno (a sinistra in basso), (E) HMC-C-01-A dosato a 10 mg/kg/giorno (al centro in basso), e (F) HMC-N-01-A dosato a 10 mg/kg/giorno (a destra in basso), come descritto nello studio biologico 11 seguente.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Un aspetto dell'invenzione riguarda certi composti N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-fenil-benzensolfonammide e N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(2-piridil)benzensolfonammide sostituiti (riferiti collettivamente qui come composti HMC), come descritto qui.

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda una composizione (per esempio, una composizione farmaceutica) comprendente un composto HMC,

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

come descritto qui, e un veicolante o diluente farmaceuticamente accettabile.

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda un metodo per preparare una composizione (per esempio, una composizione farmaceutica) comprendente il passaggio di miscelare un composto HMC, come descritto qui, e un veicolante o diluente farmaceuticamente accettabile.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un composto HMC, come descritto qui, per uso in un metodo di trattamento del corpo umano o animale per terapia, per esempio, per uso in un metodo di trattamento di un disturbo (per esempio, una malattia) come descritto qui.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda l'uso di un composto HMC, come descritto qui, nella preparazione di un medicinale per il trattamento, per esempio, di un disturbo (per esempio, una malattia) come descritto qui.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un metodo di trattamento, per esempio, di un disturbo (per esempio, una malattia) come descritto qui, comprendente somministrare a un paziente in bisogno di trattamento una quantità terapeuticamente efficace di un composto HMC, come descritto qui, preferibilmente nella forma di una composizione farmaceutica.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda una confezione contenente (a) un composto HMC, come descritto qui, preferibilmente fornito come composizione farmaceutica e in un

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

contenitore idoneo e/o con confezionamento idoneo; e (b) istruzioni per l'uso, per esempio, istruzioni scritte su come somministrare il composto.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un composto HMC ottenibile con un metodo di sintesi come descritto qui, o un metodo comprendente un metodo di sintesi come descritto qui.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un composto HMC ottenuto con un metodo di sintesi come descritto qui, o un metodo comprendente un metodo di sintesi come descritto qui.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda nuovi intermedi, come descritti qui, che sono idonei per l'uso nei metodi di sintesi descritti qui.

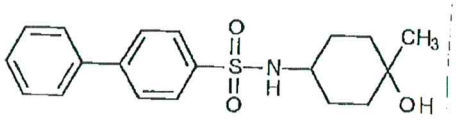
Un altro aspetto della presente invenzione riguarda l'uso di tali nuovi intermedi, come descritto qui, nei metodi di sintesi descritti qui.

Come sarà apprezzato da un esperto nella tecnica, caratteristiche e forme di realizzazione preferite di un aspetto dell'invenzione riguarderanno anche altri aspetti dell'invenzione.

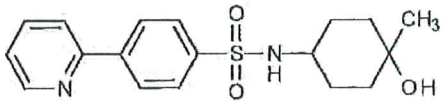
DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Composti

Un aspetto della presente invenzione riguarda certi composti che possono essere convenientemente descritti come composti N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-fenil-benzensolfonammide e N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(2-piridil)-benzensolfonammide sostituiti.

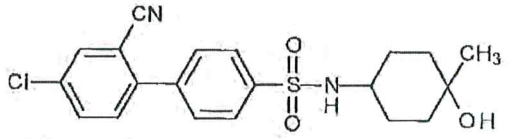
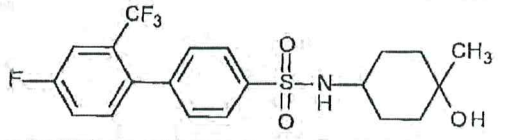
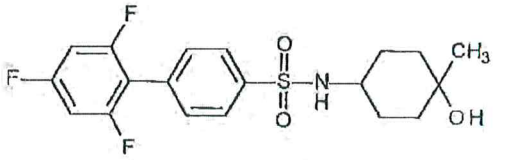


N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-fenil-benzensolfonammide



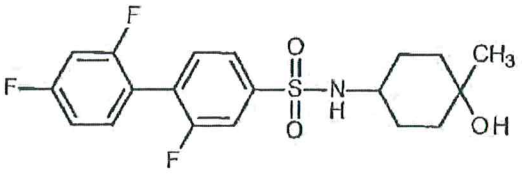
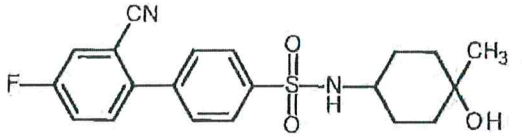
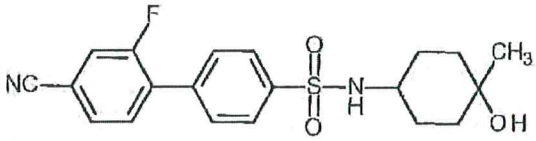
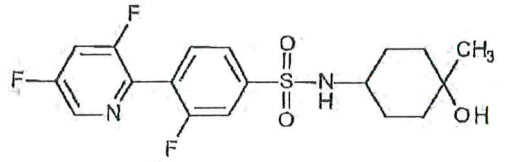
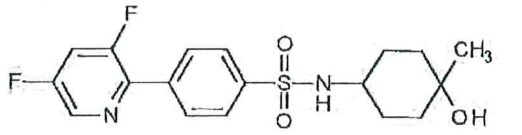
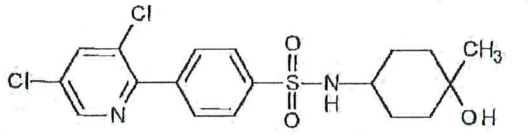
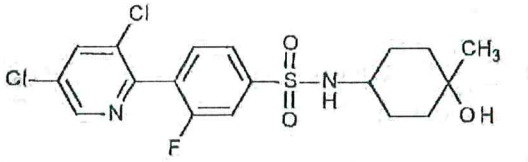
N-(4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(2-piridil)-benzensolfonammide

Così, un aspetto della presente invenzione è un composto scelto tra i composti delle formule seguenti, o loro sali, idrati, o solvatati farmaceuticamente accettabili (per convenienza, collettivamente riferiti qui come "composti HMC"):

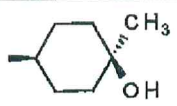
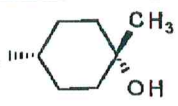
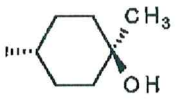
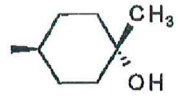
	HMC-C-01
	HMC-C-02
	HMC-C-03

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

(continua)

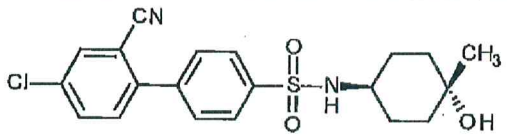
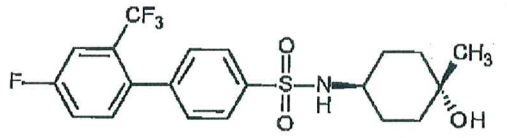
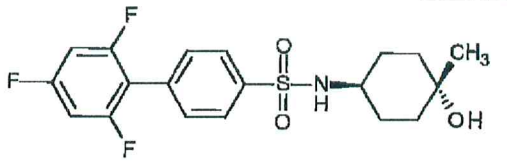
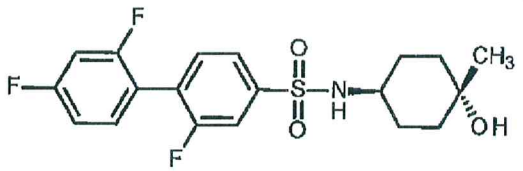
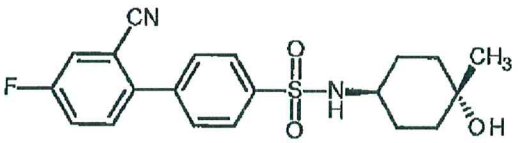
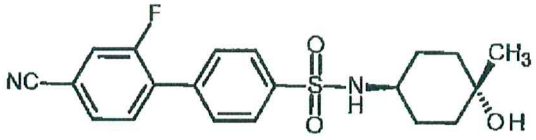
	HMC-C-04
	HMC-C-05
	HMC-C-06
	HMC-N-01
	HMC-N-02
	HMC-N-03
	HMC-N-04

Notare che i sostituenti su un lato dell'anello cicloesile (cioè, -OH e $-CH_3$ sul lato destro) possono essere posizionati "trans"/"cis" o "cis"/"trans" rispetto al resto della molecola (cioè, sull'anello cicloesile al quale sono uniti, rispetto al resto del composto che è legato alla posizione para dell'anello cicloesile).

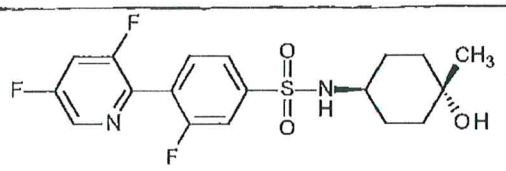
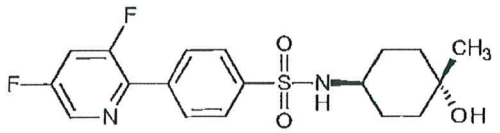
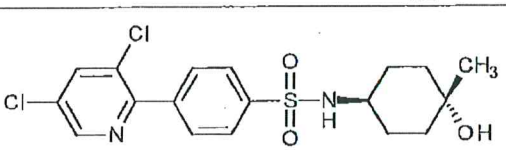
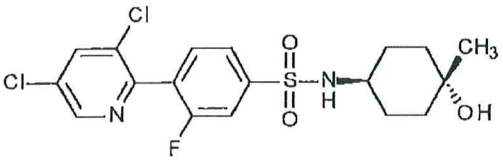
resto del composto  "*cis*-OH"	resto del composto  "*cis*-OH"
resto del composto  "*trans*-OH"	resto del composto  "*trans*-OH"

A meno che diversamente indicato, è inteso che tutte tali conformazioni siano comprese come riferimento a un composto che non specifica una particolare conformazione.

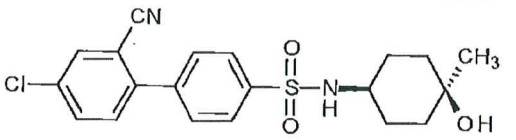
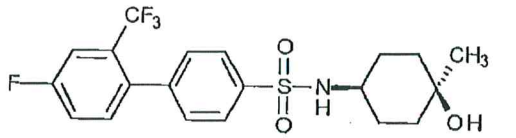
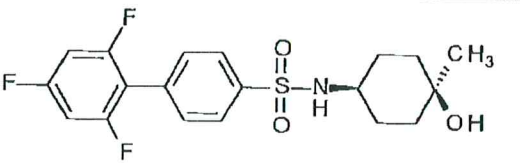
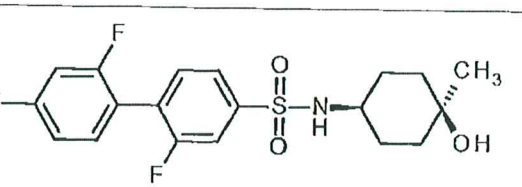
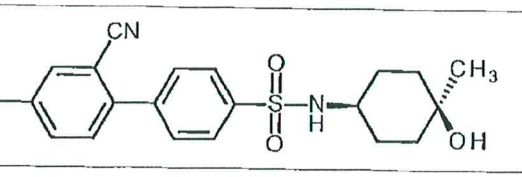
In una forma di realizzazione, il composto è nella conformazione "trans-OH" come, per esempio, i seguenti composti:

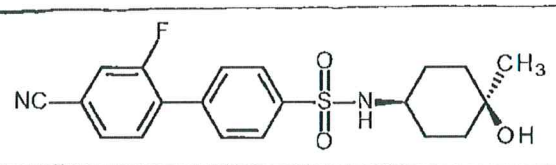
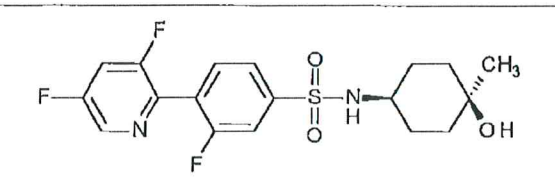
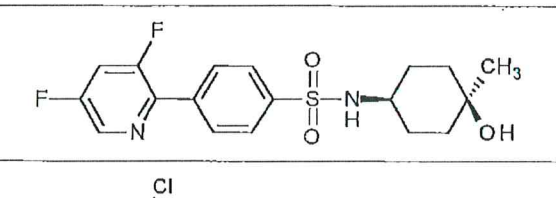
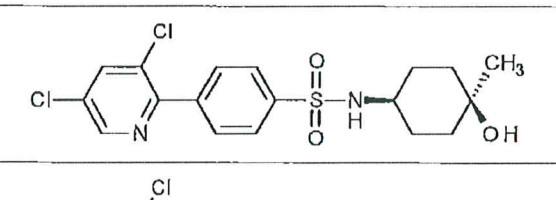
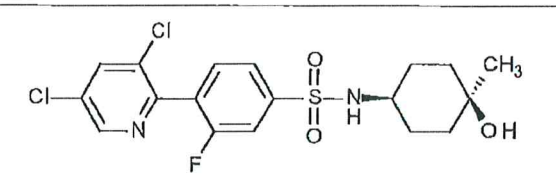
	HMC-C-01-A
	HMC-C-02-A
	HMC-C-03-A
	HMC-C-04-A
	HMC-C-05-A
	HMC-C-06-A

(continua)

	HMC-N-01-A
	HMC-N-02-A
	HMC-N-03-A
	HMC-N-04-A

In una forma di realizzazione, il composto è nella conformazione "cis-OH" come, per esempio, nei seguenti composti:

	HMC-C-01-B
	HMC-C-02-B
	HMC-C-03-B
	HMC-C-04-B
	HMC-C-05-B

	HMC-C-06-B
	HMC-N-01-B
	HMC-N-02-B
	HMC-N-03-B
	HMC-N-04-B

Notare che l'anello cicloesano può assumere una conformazione "a sedia", "a barca", o "avvitata", e che interconversione tra queste conformazioni è possibile. A meno che diversamente indicato, è inteso che tutte tali conformazioni (per esempio, "sedia", "barca", "avvitata", "OH è assiale", "OH è equatoriale", ecc.) sono comprese come riferimento a un composto che non specifica una particolare conformazione.

Forme sostanzialmente purificate

Un aspetto della presente invenzione riguarda composti HMC, come descritti qui, in una forma sostanzialmente purificata e/o in una

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

forma sostanzialmente priva di contaminanti.

In una forma di realizzazione, la forma sostanzialmente purificata è almeno 50% in peso, per esempio, almeno 60% in peso, per esempio, almeno 70% in peso, per esempio, almeno 80% in peso, per esempio, almeno 90% in peso, per esempio, almeno 95% in peso, per esempio, almeno 97% in peso, per esempio, almeno 98% in peso, per esempio, almeno 99% in peso.

A meno che specificato, la forma sostanzialmente purificata si riferisce al composto in qualunque forma conformazionale. Per esempio, in una forma di realizzazione, la forma sostanzialmente purificata si riferisce a una miscela di forme conformazionali, cioè, purificata rispetto ad altri composti. In una forma di realizzazione, la forma sostanzialmente purificata si riferisce a una forma conformazionale. In una forma di realizzazione, la forma sostanzialmente purificata si riferisce a una miscela di forme conformazionali. In una forma di realizzazione, la forma sostanzialmente purificata si riferisce a una miscela equimolare di forme conformazionali.

In una forma di realizzazione, i contaminanti rappresentano non più del 50% in peso, per esempio, non più del 40% in peso, per esempio, non più del 30% in peso, per esempio, non più del 20% in peso, per esempio, non più del 10% in peso, per esempio, non più del 5% in peso, per esempio, non più del 3% in peso, per esempio, non più del 2% in peso, per esempio, non più dell'1% in peso.

A meno che specificato, i contaminanti si riferiscono ad altri

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

composti, cioè, diversi dalle forme conformazionali. In una forma di realizzazione, i contaminanti si riferiscono ad altri composti e ad altre forme conformazionali.

In una forma di realizzazione, la forma sostanzialmente purificata è almeno 60% conformazionalmente pura (cioè, 60% del composto, su base molare, è la conformazione desiderata, e 40% è la forma conformazionale indesiderata), per esempio, almeno 70% conformazionalmente pura, per esempio almeno 60% conformazionalmente pura, per esempio, almeno 90% conformazionalmente pura, per esempio, almeno 95% conformazionalmente pura, per esempio almeno 97% conformazionalmente pura, per esempio, almeno 98% conformazionalmente pura, per esempio, almeno 99% conformazionalmente pura.

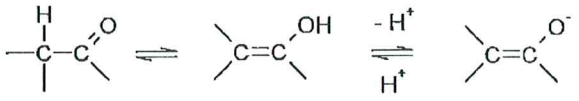
Isomeri

Certi composti possono esistere in una o più forme particolari geometriche, ottiche, enantiomeriche, diastereoisomeriche, epimeriche, atropiche, stereoisomeriche, tautomeriche, conformazionali o diverse, includendo, ma non limitate a, forme cis e trans; forme E e Z; forme c, t e r, forme endo ed eso; forme R, S e meso; forme D e L; forme d e l; (forme (+) e (-); forme cheto, enolo ed enolato; forme syn e anti; forme sinclinali e anticlinali; forme α e β; forme assiale ed equatoriale; forme a barca, sedia, avvitate, a inviluppo, e mezza sedia; e loro combinazioni, di qui in poi collettivamente riferite come "isomeri" (o "forme isomeriche").

Un riferimento a una classe di strutture può ben comprendere forme strutturalmente isomeriche ricadenti entro quella classe (per

esempio, C_{1-7}alchile comprende n-propile e iso-propile; butile comprende n-, iso- e terz-butile; metossifenile comprende orto-, meta- e para-metossifenile). Comunque, il riferimento a un gruppo specifico o specifico profilo di sostituzione non è inteso comprendere altri isomeri strutturali (o costituzionali) che differiscono rispetto alle connessioni tra gli atomi invece che per le posizioni nello spazio. Per esempio, un riferimento a un gruppo metossi, $-OCH_3$, non dev'essere considerato come riferimento al suo isomero strutturale, un gruppo idrossi metile, $-CH_2OH$. Similmente, un riferimento a un orto-clorofenile non dev'essere considerato come riferimento al suo isomero strutturale, meta-clorofenile.

L'esclusione di cui sopra non riguarda le forme tautomeriche, per esempio, forme cheto, enolo ed enolato, come, per esempio, nelle seguenti coppie tautomeriche: cheto/enolo (illustrato di seguito), immina/enammina, ammide/alcol imminico, amidina/amidina, nitroso/ossima, tiochetone/enetiolo, N-nitroso/idrossiazo, e nitro/aci-nitro.



Notare che specificamente inclusi nel termine "isomero" sono composti con una o più sostituzioni isotopiche. Per esempio, H può essere in qualunque forma isotopica, includendo ^{1}H, ^{2}H (D), e ^{3}H (T); C può essere in qualunque forma isotopica, includendo ^{11}C, ^{12}C, ^{13}C e

^{14}C; O può essere in qualunque forma isotopica, includendo ^{15}O, ^{16}O e ^{18}O; N può essere in qualunque forma isotopica, includendo ^{14}N e ^{15}N; F può essere in qualunque forma isotopica, includendo ^{18}F e ^{19}F, e simili.

A meno che diversamente specificato, un riferimento a un particolare composto comprende tutte tali forme isomeriche, includendo le sue miscele (per esempio miscele racemiche). Metodi per la preparazione (per esempio sintesi asimmetrica) e separazione (per esempio, cristallizzazione frazionata e mezzi cromatografici) di tali forme isomeriche sono o noti nella tecnica o prontamente ottenibili adattando i metodi insegnati qui, o metodi noti, in un modo noto.

Sali

Può essere conveniente o desiderabile preparare, purificare, e/o trattare un sale corrispondente del composto, per esempio, un sale farmaceuticamente accettabile. Esempi di sali farmaceuticamente accettabili sono discussi in Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts", J. Pharm. Sci. Vol. 66, pp. 1-19.

Per esempio, se il composto è anionico, oppure ha un gruppo funzionale che può essere anionico (per esempio, -COOH può essere $-COO^-$), allora un sale può formarsi con un catione idoneo. Esempi di cationi inorganici idonei comprendono, ma non sono limitati a, ioni di metalli alcalini come Na^+ e K^+, cationi alcalino-terrosi come Ca^{2+} e Mg^{2+}, e altri cationi come Al^{3+}. Esempi di cationi organici idonei comprendono, ma non sono limitati a, ione ammonio (cioè, NH_4^+) e ioni ammonio sostituiti (per esempio, NH_3R^+, $NH_2R_2^+$, NHR_3^+, NR_4^+). Esempi di

alcuni ioni ammonio adeguatamente sostituiti sono quelli derivati da: etilammina, dietilammina, dicicloesilammina, dietilammina, butil-ammina, etilendiammina, etanolammina, dietanolammina, piperazina, benzilammina, fenilbenzilammina, colina, meglumina, e trometammina, così come ammino acidi, come lisina e arginina. Un esempio di uno ione di ammonio quaternario comune è $N(CH_3)_4^+$.

Se il composto è cationico, o ha un gruppo funzionale che può essere cationico (per esempio, $-NH_2$ può essere $-NH_3^+$), allora un sale può essere formato con un anione idoneo. Esempi di anioni inorganici idonei comprendono, ma non sono limitati a, quelli derivati dai seguenti acidi inorganici: cloridrico, bromidrico, iodidrico, solforico, solforoso, nitrico, nitroso, fosforico e fosforoso. Esempi di anioni inorganici idonei comprendono, ma non sono limitati a, quelli derivati dai seguenti acidi organici: 2-acetilossibenzoico, acetico, ascorbico, aspartico, benzoico, canforsolfonico, cinnamico, citrico, edetico, etandisolfonico, etansolfonico, fumarico, glu-eptonico, gluconico, glutammico, glicolico, idrossimaleico, idrossi-naftalencarbossilico, isetionico, lattico, lattobionico, laurico, maleico, malico, metansolfonico, mucico, oleico, ossalico, palmitico, pamoico, pantotenico, fenilacetico, fenilsolfonico, propionico, piruvico, salicilico, stearico, succinico, solfanilico, tartarico, toluensolfonico, e valerico. Esempi di anioni organici polimerici idonei comprendono, ma non sono limitati a, quelli derivati dai seguenti acidi polimerici: acido tannico, carbossimetil cellulosa.

A meno che direttamente specificato, un riferimento a

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

particolare composto comprende anche le sue forme saline.

Solvatati e idrati

Può essere conveniente o desiderabile preparare, purificare e/o trattare un corrispondente solvatato del composto. Il termine "solvatato" è utilizzato qui nel senso convenzionale per riferirsi a un complesso del soluto (per esempio, composto, sale del composto) e un solvente. Se il solvente è acqua, il solvatato può convenientemente riferirsi come un idrato, per esempio, un mono-idrato, un di-idrato, un tri-idrato, ecc.

A meno che diversamente specificato, un riferimento a un particolare composto comprende anche le sue forme solvatato e idrato.

Forme chimicamente protette

Può essere conveniente o desiderabile preparare, purificare e/o trattare il composto in una forma chimicamente protetta. Il termine "forma chimicamente protetta" è utilizzato qui nel senso chimico convenzionale e riguarda un composto dove uno o più gruppi funzionali reattivi sono protetti da reazioni chimiche indesiderate in specifiche condizioni (per esempio, pH, temperatura, radiazione, solvente, e simili). In pratica, metodi chimici ben noti sono impiegati per rendere reversibilmente non reattivo un gruppo funzionale, che altrimenti sarebbe reattivo, in condizioni specifiche. In una forma chimicamente protetta, uno o più gruppi funzionali reattivi sono nella forma di un gruppo protetto o proteggente (anche noto come gruppo mascherato o mascherante o gruppo bloccato o bloccante). Proteggendo un gruppo funzionale reattivo, le

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

reazioni implicanti altri gruppi funzionali reattivi non protetti possono essere eseguite, senza influenzare il gruppo protetto; il gruppo proteggente può essere rimosso, usualmente in un passaggio successivo, senza sostanzialmente danneggiare il rimanente della molecola. Vedi, per esempio, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green e P. Wuts; 4ª edizione; John Wiley and Sons, 2006).

Un'ampia varietà di tali metodi "proteggenti", "bloccanti", o "mascheranti" sono ampiamente utilizzati e ben noti nella sintesi organica. Per esempio, un composto che ha due gruppi funzionali reattivi non equivalenti, entrambi i quali sarebbero reattivi nelle condizioni specificate, può essere derivatizzato per rendere uno dei gruppi funzionali "protetto", e pertanto non reattivo, nelle condizioni specificate; così protetto, il composto può essere utilizzato come un reattivo che ha effettivamente solamente un gruppo funzionale reattivo. Dopo che la reazione desiderata (implicante l'altro gruppo funzionale) è completata, il gruppo protetto può essere "deprotetto" per ritornare alla sua funzionalità originale.

Per esempio, un gruppo ammino può essere protetto, per esempio, con un'ammide (-NRCO-R) o un uretano (-NRCO-OR), per esempio, come: metil ammide (-NHCO-CH_3); una benzilossi ammide (-NHCO-$OCH_2C_6H_5$, -NH-Cbz); come una t-butossi ammide (-NHCO-$OC(CH_3)_3$, -NH-Boc); una 2-bifenil-2-propossi ammide (-NHCO-$OC(CH_3)_2C_6H_4C_6H_5$, -NH-Bpoc), come una 9-fluorenilmetossiammide (-NH-Fmoc), come una 6-nitroveratrilossi ammide (-NH-Nvoc), come una 2-trimetilsililetilossi ammide (-NH-Teoc), come una 2,2,2-tricloroetilossi ammide (-NH-Troc), come una

allilossi ammide (-NH-Alloc), come una 2-(fenilsolfonil)etilossi ammide (-NH-Psec); o, in casi idonei (per esempio, ammine cicliche), come un radicale nitrossido (>N-O•).

Profarmaci

Può essere conveniente o desiderabile preparare, purificare e/o trattare il composto nella forma di un profarmaco. Il termine "profarmaco", come utilizzato qui, riguarda un composto che, quando metabolizzato (per esempio, *in vivo*), dà il composto attivo desiderato. Tipicamente, il profarmaco è inattivo, o meno attivo del composto attivo desiderato, ma può fornire proprietà di trattamento, somministrazione, o metaboliche vantaggiose.

Sintesi chimica

Metodi per la sintesi chimica dei composti HMC sono descritti qui. Questi e/o altri metodi ben noti possono essere modificati e/o adattati in modi noti allo scopo di facilitare la sintesi di altri composti HMC descritti qui.

Composizioni

Un aspetto della presente invenzione riguarda una composizione (per esempio, una composizione farmaceutica) comprendente un composto HMC, come descritto qui, e un veicolante, diluente, o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

In una forma di realizzazione, la composizione comprende ulteriormente uno o più (per esempio, 1, 2, 3, 4) agenti terapeutici addizionali, come descritto qui.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un metodo

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

per preparare una composizione (per esempio, una composizione farmaceutica) comprendente miscelare un composto HMC, come descritto qui, e un veicolante, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un metodo per preparare una composizione (per esempio, una composizione farmaceutica) comprendente miscelare un composto HMC, come descritto qui, con uno o più (per esempio, 1, 2, 3, 4) agenti terapeutici addizionali, come descritto qui, e un veicolante, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

Usi

I composti HMC, come descritti qui, sono utili, per esempio, nel trattamento di disturbi (per esempio, malattie) includenti, per esempio, i disturbi (per esempio, malattie) descritti qui.

Uso in metodi di terapia

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un composto HMC, come descritto qui, per uso in un metodo di trattamento del corpo umano o animale con terapia, per esempio, per uso in un metodo di trattamento di un disturbo (per esempio, una malattia), come descritto qui.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un composto HMC, come descritto qui, in associazione con uno o più (per esempio, 1, 2, 3, 4) agenti terapeutici addizionali, come descritti qui, per uso in un metodo di trattamento del corpo umano o animale con terapia, per esempio, per uso in un metodo di trattamento di un

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

disturbo (per esempio, una malattia), come descritto qui.

Uso nella preparazione di medicinali

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda l'uso di un composto HMC, come descritto qui, nella preparazione di un medicinale per il trattamento, per esempio, trattamento di un disturbo (per esempio, una malattia), come descritto qui.

In una forma di realizzazione, il medicinale comprende il composto HMC.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda l'uso di un composto HMC, come descritto qui, e uno o più (per esempio, 1, 2, 3, 4) agenti terapeutici addizionali, come descritti qui, nella preparazione di un medicinale per il trattamento, per esempio, trattamento di un disturbo (per esempio, una malattia), come descritto qui.

In una forma di realizzazione, il medicinale comprende il composto HMC e uno o più (per esempio, 1, 2, 3, 4) agenti terapeutici addizionali.

Metodi di trattamento

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un metodo di trattamento, per esempio, di un disturbo (per esempio, una malattia), come descritto qui, comprendente somministrare a un paziente in bisogno di trattamento una quantità terapeuticamente efficace di un composto HMC, come descritto qui, preferibilmente nella forma di una composizione farmaceutica.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda un metodo di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

trattamento, per esempio, di un disturbo (per esempio, una malattia), come descritto qui, comprendente somministrare a un paziente in bisogno di trattamento una quantità terapeuticamente efficace di un composto HMC, come descritto qui, preferibilmente nella forma di una composizione farmaceutica, e uno o più (per esempio, 1, 2, 3, 4) agenti terapeutici addizionali, come descritto qui, preferibilmente in forma di una composizione farmaceutica.

Condizioni trattate

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo infiammatorio o un disturbo autoimmune.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo associato con infiammazione e/o attivazione del sistema immunitario.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo mediato da eccessiva e/o inappropriata e/o prolungata attivazione del sistema immunitario.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di infiammazione.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo associato con infiammazione o attivazione del sistema immunitario.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di artrite reumatoide; psoriasi; artrite psoriatica; malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD); asma; aterosclerosi; malattia dell'intestino infiammato; o spondilite anchilosante.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di artrite reumatoide.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di psoriasi.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di artrite psoriatica.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD).

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di asma.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di aterosclerosi.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di spondilite anchilosante.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di malattia dell'intestino infiammato.

In una forma di realizzazione, il trattamento è prevenzione di una risposta immunitaria portante a rigetto di organo o di innesto a seguito di trapianto.

In una forma di realizzazione, il trattamento è prevenzione di una condizione infiammatoria dove l'espressione o l'attività di IRF-5 è aberrante.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un tumore che sovra-esprime TNFα, IL-1, IL-6, RANKL, e/o NFκB.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

un tumore per il quale l'inibizione dell'espressione o attività o segnalazione di TNFα, IL-1, RANKL, NFκB, IRF come IRF-3, -5 o -7 e/o IL-6 facilita o migliora l'azione degli agenti citotossici tumoricidi.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di una malignità ematologica.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di mieloma multiplo.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di leucemia; per esempio, leucemia linfoblastica acuta.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di linfoma; per esempio, linfoma non-Hodgkin, linfoma delle cellule T (per esempio, linfoma linfoblastico T, linfoma delle cellule T extra-nodale, linfoma delle cellule T cutaneo, linfoma delle cellule grandi anaplastiche, linfoma delle cellule T angioimmunoblastiche), e linfoma delle cellule B (per esempio, linfoma Hodgkin, linfoma non-Hodgkin) (per esempio, linfoma delle cellule B grandi diffuso, linfoma follicolare, linfoma del tessuto linfatico associato a mucosa, linfoma linfocitico delle cellule piccole, linfoma delle cellule del mantello, linfoma delle cellule capellute e linfoma di Burkitt).

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un cancro di tumore solido, per esempio, cancro della vescica, cancro del seno (femminile e/o maschile), cancro del colon, carcinoma delle cellule renali, cancro del rene, cancro del polmone, cancro

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

pancreatico, cancro gastrico, cancro della prostata, cancro del cervello, cancro della pelle, cancro della tiroide, ameloblastoma delle cellule basali, o melanoma.

In una forma di realizzazione, la malignità ematologica (per esempio, mieloma multiplo, leucemia, linfoma, ecc.) e il cancro di tumore solido (per esempio, cancro della vescica, ecc.) sono associati con l'attivazione di NFκB con una aberrante segnalazione di NFκB, o con infiammazione.

In una forma di realizzazione, la malignità ematologica (per esempio, mieloma multiplo, leucemia, linfoma, ecc.) e il cancro di tumore solido (per esempio, cancro della vescica, ecc.) sono associati con l'inattivazione o l'impedimento dell'induzione della caspasi o con una aberrante segnalazione della caspasi.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo proliferativo, per esempio malattia di Castleman.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di una malattia o disturbo scelti tra: malattie aventi una componente infiammatoria o autoimmune, includendo asma, aterosclerosi, malattie allergiche, come atopia, rinite allergica, dermatite atopica, anafilassi, aspergillosi broncopolmonare allergica, e pneumonite a ipersensibilità (malattia degli allevatori di piccioni, malattia del polmone del fattore, malattia del polmone dell'umidificatore, malattia del polmone dei lavoratori del malto); allergie, includendo dermatite allergica da pulci in mammiferi come animali domestici, per esempio, cani e gatti, allergeni da contatto includendo morsi di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

zanzare o altre allergie da punture di insetti, edera velenosa, quercia velenosa, sumaco velenoso, o altre allergie della pelle; disturbi autoimmuni, includenti diabete di tipo I e complicanze associate, sclerosi multipla, artrite, lupus sistemico eritematoso, tiroidite autoimmune (di Hashimoto), malattie epatiche autoimmuni come epatite e cirrosi biliare primaria, ipertiroidismo (malattia di Graves; tirotossicosi), diabete resistente all'insulina, insufficienza renale autoimmune (morbo di Addison), oforite autoimmune, orchite autoimmune, anemia emolitica autoimmune, emoglobinuria fredda parossimale, morbo di Behçet, trombocitopenia autoimmune, neutropenia autoimmune, anemia perniciosa, anemia pura dei globuli rossi, coagulopatia autoimmune, endometriosi, diastenia grave, encefalomielite allergica sperimentale, polineurite autoimmune, penfigo e altre malattie bullose, cardite reumatica, sindrome di Goodpasture, sindrome da postcardiotomia, sindrome di Sjögren, polimiosite, dermatomiosite, e scleroderma; stati di malattia risultanti da inappropriata infiammazione, o locale o sistemica, per esempio sindrome dell'intestino irritabile o infiammato (Mazzucchelli et al., 1996), malattie della pelle come lichen planus, ipersensibilità di tipo ritardato, infiammazione polmonare cronica, per esempio, alveolite polmonare e granuloma polmonare, infiammazione gengivale, o altra malattia periodontale, e infiammazione ossea associata con lesioni di origine endodontica (Volejnikova et al., 1997), malattie del polmone da ipersensibilità come pneumonite da ipersensibilità (Sugiyama et al., 1995), e infiammazione correlata a

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

rilascio di istamina da basofili (Dvorak et al., 1996), come febbre da fieno, rilascio di istamina da mastociti (Galli et al., 1989), o tumori dei mastociti, tipi di reazione da ipersensibilità di tipo I (anafilassi, allergia cutanea, orticaria, gotta, rinite allergica, e gastroenterite allergica); colite ulcerosa o morbo di Crohn, malattia renale policistica indotta da TNFα (Li et al., 2008); o sindromi periodiche associate a criopirina, includendo la sindrome di Muckle-Wells.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo mediato da osteoclasti.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo caratterizzato da eccessivo riassorbimento dell'osso.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo associato con perdita ossea.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di perdita ossea.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di perdita ossea associata con infiammazione.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di perdita ossea non associata con infiammazione.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di perdita ossea associata con eccessiva attivazione degli osteoclasti.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di distruzione di articolazione.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

distruzione di articolazione associata con infiammazione.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di distruzione di articolazione associata con eccessiva attivazione degli osteclasti.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di perdita ossea associata con eccessiva attivazione di osteoclasti in artrite reumatoide, osteoporosi, malattia ossea associata a cancro, o morbo di Paget.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di perdita ossea associata con artrite reumatoide, osteoporosi, malattia ossea associata a cancro, o morbo di Paget dell'osso.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di artrite reumatoide, osteoporosi, malattia dell'osso associata a cancro, o morbo di Paget dell'osso.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di neoplasia delle ossa, o come tumore primario o come metastasi, includendo osteosarcoma e osteoma (vedi, per esempio, Zheng et al., 1998) e malattia dell'osso associata a cancro (per esempio, ipercalcemia di malignità, metastasi ossee, metastasi ossee osteolitiche, mieloma multiplo, carcinoma del seno).

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di ipercalcemia a causa di condizioni associate con aumentato riassorbimento dell'osso, includendo intossicazione da vitamina D, iperparatiroidismo primario o terziario, immobilizzazione, e sarcoidosi.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

In una forma di realizzazione, il trattamento è un trattamento di perdita asettica di impianti protesici (per esempio, articolazioni artificiali, per esempio, ginocchio, anca, ecc., possono rilasciarsi a causa di attività degli osteoclasti guidata da infiammazione locale) (vedi, per esempio, Childs et al., 2001).

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di osteopetrosi, osteoartrite, o formazione dell'osso ectopica.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di un disturbo associato con fibrosi, come sclerosi sistemica o scleroderma.

In una forma di realizzazione, il trattamento è trattamento di una vasculitide rara, come il mordo di Behçet.

Trattamento

Il termine "trattamento" come utilizzato qui nel contesto di trattare una condizione, riguarda in generale il trattamento e la terapia, o di un uomo o di un animale (per esempio, in applicazioni veterinarie) dove un certo effetto terapeutico desiderato è ottenuto, per esempio, l'inibizione del processo della condizione, e comprende una riduzione nella velocità del progresso, una fermata nella velocità del progresso, alleviazione dei sintomi della condizione, miglioramento della condizione, e cura della condizione. Il trattamento come misura profilattica (cioè, profilassi) è anche incluso. Per esempio, l'uso con pazienti che non hanno ancora sviluppato la condizione, ma che sono a rischio di sviluppare la condizione, è compreso dal termine "trattamento".

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Per esempio, il trattamento di infiammazione comprende la profilassi dell'infiammazione, riducendo l'incidenza della infiammazione, riducendo la gravità dell'infiammazione, alleviando i sintomi dell'infiammazione, ecc.

Il termine "quantità terapeuticamente efficace", come utilizzato qui, riguarda quella quantità di un composto, o di un materiale o composizione o forma di dosaggio comprendente un composto, che è efficace per produrre un certo effetto terapeutico desiderato, commensurato con un ragionevole rapporto beneficio/rischio, quando somministrato in accordo con un regime di trattamento desiderato.

Terapie in associazione

Il termine "trattamento" comprende trattamenti e terapie in associazione, dove due o più trattamenti e terapie sono associati, per esempio, in successione o simultaneamente. Per esempio, i composti descritti qui possono anche essere utilizzati in terapie di associazione, per esempio in associazione con altri agenti, per esempio, agenti antinfiammatori, ecc. Esempi di trattamenti e terapie comprendono chemioterapia (la somministrazione di agenti attivi, includendo, per esempio, farmaci, anticorpi (per esempio, come nella immunoterapia), profarmaci (per esempio, come nella terapia fotodinamica, GDEPT, ADEPT, ecc.); sinergia; terapia di radiazione; terapia fotodinamica; terapia genica; e diete controllate.

Un aspetto della presente invenzione riguarda un composto come descritto qui, in associazione con uno o più agenti terapeutici addizionali.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

La particolare combinazione sarebbe a discrezione del medico curante che selezionerebbe i dosaggi usando la sua conoscenza generale e dosaggi di regimi noti a un esperto.

Gli agenti (cioè, i composti descritti qui, più uno o più altri agenti) possono essere somministrati simultaneamente o in successione, e possono essere somministrati in regimi di dosaggio singolarmente varianti e tramite vie differenti. Per esempio, quando somministrati in successione, gli agenti possono essere somministrati a intervalli di tempo vicini (per esempio, in un periodo di 5-10 minuti) o a intervalli più lunghi (per esempio, 1, 2, 3 4 o più ore di distanza, o persino per periodi più lunghi quando richiesti), il preciso regime di dosaggio essendo commensurato con le proprietà degli agenti terapeutici.

Gli agenti (cioè, il composto descritto qui, più uno o più altri agenti) possono essere formulati insieme in una forma di dosaggio singola, o alternativamente, i singoli agenti possono essere formulati separatamente e presentati insieme nella forma di una confezione, opzionalmente con le istruzioni per il loro uso.

Altri usi

I composti HMC descritti qui possono anche essere utilizzati come parti di un saggio *in vitro*, per esempio, allo scopo di determinare se un ospite candidato plausibilmente beneficia dal trattamento con il composto in questione.

I composti HMC descritti qui possono anche essere utilizzati come un riferimento, per esempio, in un saggio, allo scopo di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

identificare altri composti, altri agenti anti-infiammazione, ecc.

Confezioni

Un aspetto dell'invenzione riguarda una confezione contenente (a) un composto HMC come descritto qui, o una composizione comprendente un composto HMC come descritto qui, per esempio, preferibilmente fornito in un contenitore idoneo e/o con un confezionamento idoneo; e (b) istruzioni per l'uso, per esempio, istruzioni scritte su come somministrare il composto o la composizione.

In una forma di realizzazione, la confezione ulteriormente comprende uno o più (per esempio, 1, 2, 3, 4) agenti terapeutici addizionali, come descritto qui.

Le istruzioni scritte possono anche contenere un elenco di indicazioni per le quali l'ingrediente attivo è un trattamento idoneo.

Vie di somministrazione

Il composto HMC o la composizione farmaceutica contenente il composto HMC possono essere somministrati a un soggetto con qualunque via di somministrazione conveniente, o sistemicamente/ perifericamente o topicamente (cioè, nel sito dell'azione desiderata).

Vie di somministrazione comprendono orale (per esempio, per ingestione); buccale; sublinguale; transdermica (includendo, per esempio, con un cerotto, bendaggio, ecc.); transmucosica (includendo, per esempio, con un cerotto, bendaggio, ecc.); intranasale (per

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

esempio, con uno spray nasale, gocce o da un atomizzatore o dispositivo di somministrazione di polvere secca); oculare (per esempio, con colliri); polmonare (per esempio, con terapia di inalazione o insufflazione utilizzando, per esempio, un aerosol, per esempio, tramite la bocca o naso); rettale (per esempio, con supposta o enema); vaginale (per esempio, con un pessario); parenterale (per esempio, per iniezione, includendo sottocutanea, intradermica, intramuscolare, endovenosa, intraarteriosa, intracardiaca, intratecale, intraspinale, intracapsulare, subcapsulare, intraorbitale, intraperitoneale, intratecale, subcuticolare, intraarticolare, subaracnoide, e intrasternale; per impianto di un deposito o riserva, per esempio, per via sottocutanea o intramuscolare.

In una forma di realizzazione preferita, la via di somministrazione è orale (per esempio, per ingestione).

In una forma di realizzazione preferita, la via di somministrazione è parenterale (per esempio, per iniezione).

Il soggetto/paziente

Il soggetto/paziente può essere un cordato, un vertebrato, un mammifero, un mammifero con placenta, un marsupiale (per esempio, canguro, wombato), un roditore (per esempio, una cavia, un criceto, un ratto, un topo), murino (per esempio, un topo), un lagomorfo (per esempio, un coniglio), ornitico (per esempio, un uccello), canino (per esempio, un cane), felino (per esempio, un gatto), equino (per esempio, un cavallo), suino (per esempio, un maiale), ovino (per esempio, una pecora), bovino (per esempio, una mucca), un primate

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

(per esempio, una scimmia o un gorilla), una scimmia (per esempio un uistiti, un babbuino), un gorilla (per esempio, gorilla, scimpanzé, orangotango, gibbone), o un uomo. Inoltre, il soggetto/ paziente può essere qualunque delle sue forme di sviluppo, per esempio, un feto.

In una forma di realizzazione preferita, il soggetto/paziente è l'uomo.

Formulazioni

Mentre è possibile che il composto HMC sia somministrato singolarmente, è preferibile presentarlo come una formulazione farmaceutica (per esempio, composizione, preparazione, medicinale) comprendente almeno un composto HMC, come descritto qui, insieme con uno o più altri ingredienti farmaceuticamente accettabili ben noti agli esperti nella tecnica, includendo veicolanti, diluenti, eccipienti, adiuvanti, riempitivi, tamponi, conservanti, anti-ossidanti, lubrificanti, stabilizzanti, solubilizzanti, tensioattivi (per esempio, agenti umettanti), agenti mascheranti, agenti coloranti, agenti aromatizzanti, e agenti dolcificanti farmaceuticamente accettabili. La formulazione può inoltre comprendere altri agenti attivi, per esempio, altri agenti terapeutici o profilattici.

Così, la presente invenzione ulteriormente fornisce composizioni farmaceutiche, come definite precedentemente, e metodi per preparare una composizione farmaceutica comprendente somministrare almeno un composto HMC, come descritto qui, insieme con uno o più altri ingredienti farmaceuticamente accettabili ben noti agli esperti nella

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

tecnica, per esempio, veicolanti, diluenti, eccipienti, ecc. Se formulata come unità discreta (per esempio, compresse, ecc.), ciascuna unità contiene una quantità predeterminata (dosaggio) del composto).

Il termine "farmaceuticamente accettabile", come utilizzato qui, riguarda composti, ingredienti, materiali, composizioni, forme di dosaggio, ecc., che sono, entro l'ambito di un giudizio medico corretto, idonei per usi in contatto con i tessuti del soggetto in questione (per esempio, uomo) senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica, o altro problema o complicanza, commisurata con un ragionevole rapporto beneficio/rischio. Ciascun veicolante, diluente, eccipiente, ecc., deve anche essere "accettabile" nel senso di essere compatibile con gli altri ingredienti della formulazione.

Veicolanti, diluenti, eccipienti, ecc., idonei possono essere rinvenuti in testi di farmaceutica convenzionali, per esempio, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edizione, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; e Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edizione, 2005.

Le formulazioni possono essere preparate con qualunque metodo ben noto nella tecnica farmaceutica. Tali metodi comprendono il passaggio di portare in associazione il composto con un veicolante il quale costituisce uno o più degli ingredienti accessori. In generale, le formulazioni sono preparate portando uniformemente e intimamente in associazione il composto con veicolanti (per esempio, veicolanti liquidi, veicolante solido finemente suddiviso, ecc.), e quindi dare

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

forma al prodotto, se necessario.

La formulazione può essere preparata per fornire un rilascio rapido o lento; un rilascio immediato, ritardato, temporizzato, o sostenuto; o una loro combinazione.

Le formulazioni possono adeguatamente essere nella forma di liquidi, soluzioni (per esempio, acquose, non-acquose), sospensioni (per esempio, acquose, non-acquose), emulsioni (per esempio, olio-in-acqua, acqua-in-olio), elisir, sciroppi, elettuari, collutori, gocce, compresse (includendo, per esempio, compresse rivestite), granuli, polveri, caramelle, pastiglie, capsule (includendo, per esempio, capsule di gelatina dura e molle), cachet, pillole, fiale, boli, supposte, pessari, tinture, gel, paste, pomate, creme, lozioni, oli, schiume, spray, impacchi, o aerosol.

Le formulazioni possono adeguatamente essere fornite come un cerotto, un gesso adesivo, una benda, un impacco, o simili, che è impregnato con uno o più composti e opzionalmente uno o più altri ingredienti farmaceuticamente accettabili, includendo, per esempio, favoritori di penetrazione, permeazione e assorbimento. Le formulazioni possono anche essere adeguatamente fornite nella forma di un deposito o riserva.

Il composto può essere disciolto in, sospeso in, o mescolato con uno o più altri ingredienti farmaceuticamente accettabili. Il composto può essere presentato in un liposoma o altro micro-particolato che è progettato per portare il composto, per esempio, verso i componenti del sangue o uno o più organi.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Formulazioni idonee per la somministrazione orale (per esempio, per ingestione) comprendono liquidi, soluzioni (per esempio, acquose, non-acquose), sospensioni (per esempio, acquose, non-acquose), emulsioni (per esempio, olio-in-acqua, acqua-in-olio), elisir, sciroppi, elettuari, compresse, granuli, polveri, capsule, cachet, pillole, fiale, boli.

Formulazioni idonee per la somministrazione buccale comprendono collutori, caramelle, pastiglie, così come cerotti, gessi adesivi, depositi e riserve. Le caramelle tipicamente comprendono il composto in una base aromatizzata, usualmente saccarosio e acacia o gomma adragante. Le pastiglie tipicamente comprendono il composto in una matrice inerte, come gelatina e glicerina, o saccarosio e acacia. I collutori tipicamente comprendono il composto in un veicolante liquido idoneo.

Formulazioni idonee per la somministrazione sublinguale comprendono compresse, caramelle, pastiglie, capsule, e pillole.

Formulazioni idonee per la somministrazione orale transmucosica comprendono liquidi, soluzioni (per esempio, acquose, non-acquose), sospensioni (per esempio, acquose, non-acquose), emulsioni (per esempio, olio-in-acqua, acqua-in-olio), collutori, caramelle, pastiglie, così come cerotti, gessi adesivi, depositi e riserve.

Formulazioni idonee per la somministrazione transmucosica non orale comprendono liquidi, soluzioni (per esempio, acquose, non-acquose), sospensioni (per esempio, acquose, non-acquose), emulsioni (per esempio, olio-in-acqua, acqua-in-olio), supposte, pessari, gel,

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

paste, pomate, creme, lozioni, oli, così come cerotti, gessi adesivi, depositi e riserve.

Formulazioni idonee per la somministrazione transdermica comprendono gel, paste, pomate, creme, lozioni, e oli, così come cerotti, gessi adesivi, bendaggi, impacchi, depositi e riserve.

Le compresse possono essere preparate con mezzi convenzionali, per esempio, compressione o stampaggio, opzionalmente con uno o più ingredienti accessori. Le compresse da compressione possono essere preparate comprimendo in una macchina idonea i composti in una forma liberamente scorrevole come una polvere o granuli, opzionalmente mescolati con uno o più leganti (per esempio, povidone, gelatina, acacia, sorbitolo, gomma adragante, idrossipropilmetil cellulosa); riempitivi o diluenti (per esempio, lattosio, cellulosa micro-cristallina, calcio idrogeno fosfato); lubrificanti (per esempio, magnesio stearato, talco, silice); disgreganti (per esempio, sodio amido glicolato, povidone reticolato, sodio carbossimetil cellulosa reticolato); agenti tensioattivi o disperdenti o umettanti (per esempio, sodio lauril solfato); conservanti (per esempio, metile p-idrossibenzoato, propile p-idrossibenzoato, acido sorbico); aromi, agenti miglioranti l'aroma e dolcificanti. Le compresse stampate possono essere preparate stampando in una macchina idonea una miscela del composto in polvere umidificato con un diluente liquido inerte. Le compresse possono opzionalmente essere rivestite o avere un nucleo e possono essere formulate così da fornire un rilascio lento o controllato del composto utilizzando, per esempio, idrossipropilmetil

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

cellulosa in proporzioni varianti per fornire il profilo di rilascio desiderato. Le compresse possono opzionalmente essere fornite di un rivestimento, per esempio, per influire sul rilascio, per esempio, un rivestimento enterico, per fornire il rilascio in parti del sistema gastrointestinale diverse dallo stomaco.

Le pomate sono tipicamente preparate dal composto e da una base per pomate paraffinica o miscibile con acqua.

Le creme sono tipicamente preparate dal composto e una base per creme olio-in-acqua. Se desiderato, la fase acquosa della base per creme può comprendere, per esempio, almeno circa il 30% p/p di un alcol poliidrico, cioè, un alcol avente due o più gruppi idrossile come propilene glicol, butan-1,3-diolo, mannitolo, sorbitolo, glicerolo e polietilene glicol e loro miscele. Le formulazioni topiche possono desiderabilmente comprendere un composto che migliora l'assorbimento o la penetrazione del composto attraverso la pelle o altre aree affette. Esempi di tali amplificatori di penetrazione dermica comprendono dimetilsolfossido e analoghi correlati.

Le emulsioni sono tipicamente preparate dal composto e da una fase oleosa, che può opzionalmente comprendere semplicemente l'emulsionante (altrimenti noto come emulgente), o può comprendere una miscela di almeno un emulsionante con un grasso o un olio o con entrambi un grasso e un olio. Preferibilmente, un emulsionante idrofilo è incluso insieme con un emulsionante lipofilo che agisce come stabilizzante. E' anche preferito includere sia un olio che un grasso. Insieme, l'emulsionante con o senza lo stabilizzante fornisce

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

la cosiddetta cera emulsionante, e la cera insieme con l'olio e/o il grasso fornisce la cosiddetta base per pomate emulsionanti che forma la fase oleosa dispersa delle formulazioni in crema.

Emulgenti e stabilizzanti per emulsioni idonee comprendono Tween 60, Span 80, cetostearile alcol, miristile alcol, glicerile monostearato e sodio lauril solfato. La scelta di oli o grassi idonei per la formulazione si basa sull'ottenere le proprietà cosmetiche desiderate, poiché la solubilità del composto e la maggior parte di oli plausibilmente da utilizzarsi nelle formulazioni in emulsione farmaceutica può essere molto bassa. Così la crema dovrebbe preferibilmente essere un prodotto non grasso, non macchiante e lavabile con una consistenza idonea per evitare perdite dai tubetti o altri contenitori. Esteri alchinile mono- o dibasici a catena lineare o ramificata come diisoadipato, isocetile stearato, propilene glicol diestere di acidi grassi da cocco, isopropile miristato, decile oleato, isopropile palmitato, butile stearato, 2-etilesile palmitato o una miscela di esteri a catena ramificata nota come Crodamol CAP possono essere utilizzati, gli ultimi tre essendo esteri preferiti. Questi possono essere utilizzati singolarmente o in associazione in funzione delle proprietà richieste. Alternativamente, lipidi ad alto punto di fusione come paraffina soffice bianca e/o paraffina liquida o altri oli minerali possono essere utilizzati.

Formulazioni idonee per la somministrazione intranasale, dove il veicolante è un liquido, comprendono, per esempio, spray nasali, gocce nasali, o somministrazione per aerosol con un nebulizzatore,

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

comprendono soluzioni acquose o oleose del composto.

Formulazioni idonee per la somministrazione intranasale, dove il veicolante è un solido, comprendono, per esempio, quelle presentate come una polvere grossolana avente una dimensione di particelle, per esempio, nell'intervallo da circa 20 a circa 500 micron che è somministrata in un modo con il quale si aspira una presa di tabacco, cioè, per rapida inalazione attraverso il passaggio nasale da un contenitore della polvere tenuto vicino al naso.

Formulazioni idonee per la somministrazione polmonare (per esempio, per terapia di inalazione o di insufflazione) comprendono quelle presentate come uno spray aerosol da una confezione pressurizzata, con l'uso di un idoneo propellente, come dicloro-difluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, carbonio diossido o altri gas idonei.

Formulazioni idonee per la somministrazione oculare comprendono colliri per occhi dove il composto è disciolto o sospeso in un veicolante idoneo, specialmente un solvente acquoso per il composto.

Formulazioni idonee per la somministrazione rettale possono essere presentate come una supposta con una base idonea comprendente, per esempio, oli naturali o induriti, cere, grassi, polioli semiliquidi o liquidi, per esempio, burro di cacao o un salicilato; o una soluzione o sospensione per il trattamento con enema.

Formulazioni idonee per la somministrazione vaginale possono essere presentate come pessari, tamponi, creme, gel, paste, schiume o formulazioni spray contenenti in aggiunta al composto, veicolanti

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

tali come noti nella tecnica essere appropriati.

Formulazioni idonee per la somministrazione parenterale (per esempio, per iniezione), comprendono liquidi acquosi o non acquosi, isotonici, apirogeni, sterili (per esempio, soluzioni, sospensioni), dove il composto è disciolto, sospeso, o altrimenti fornito (per esempio, in un liposoma o altro microparticolato). Tali liquidi possono addizionalmente contenere altri ingredienti farmaceuticamente accettabili, come antiossidanti, tamponi, conservanti, stabilizzanti, batteriostatici, agenti sospendenti, agenti ispessenti, e soluti che rendono la formulazione isotonica con il sangue (o altro liquido corporeo pertinente) del ricevente previsto. Esempi di eccipienti comprendono, per esempio, acqua, alcoli, polioli, glicerolo, oli vegetali e simili. Esempi di veicolanti isotonici idonei per uso in tali formulazioni comprendono soluzione di Ringer per iniezione di sodio cloruro, o iniezione di Ringer lattata. Tipicamente, la concentrazione del composto nel liquido è da circa 1 ng/ml a 10 ug/ml, per esempio, da circa 10 ng/ml a circa 1 ug/ml. Le formulazioni possono essere presentate in contenitori sigillati a dose unitaria o multidose, per esempio, fiale e flaconi, e possono essere conservate in una condizione liofilizzata che richiede solamente l'aggiunta del veicolante liquido sterile, per esempio acqua per iniezione, immediatamente prima dell'uso. Soluzioni e sospensioni per iniezioni estemporanee possono essere preparate da polveri, granuli, e compresse sterili.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Dosaggio

Sarà apprezzato da un esperto nella tecnica che i dosaggi appropriati dei composti HMC, e composizioni contenenti composti HMC, possono variare da paziente a paziente. La determinazione del dosaggio ottimale generalmente implicherà un equilibrio del livello del beneficio terapeutico rispetto a qualunque rischio o effetto collaterale dannoso. Il livello di dosaggio scelto dipenderà da una varietà di fattori includenti attività del particolare composto HMC, via di somministrazione, il tempo di somministrazione, la velocità di escrezione del composto HMC, durata del trattamento, altri farmaci, composti e/o materiali utilizzati in associazione, gravità della condizione, e la specie, sesso, età, peso, condizione, salute generale, e storia medica precedente del paziente. La quantità del composto HMC e la via di somministrazione saranno in ultima analisi a discrezione del medico curante, veterinario, o specialista, anche se generalmente il dosaggio sarà scelto per ottenere concentrazioni locali nel sito di azione che ottengono l'effetto desiderato senza provocare effetti collaterali sostanzialmente dannosi o pericolosi.

La somministrazione può essere effettuata in una dose, in continuo o intermittentemente (per esempio, in dosi suddivise a intervalli appropriati) durante il corso del trattamento. Metodi per determinare il mezzo più efficace del dosaggio di somministrazione sono ben noti agli esperti nella tecnica e varieranno con la formulazione utilizzata per la terapia, lo scopo della terapia, la cellula bersaglio da trattare, e il soggetto da trattare.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Somministrazioni singole o multiple possono essere eseguite con il livello e il profilo di dose essendo scelti dal medico curante, veterinario, o specialista.

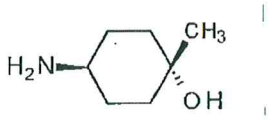
In generale, una dose idonea del composto di HMC è nell'intervallo da circa 50 µg a circa 20 mg (più specificamente da circa 100 µg a circa 10 mg) per chilogrammo di peso corporeo del soggetto al giorno. Per la somministrazione polmonare (per esempio, per inalazione), un dosaggio idoneo è nell'intervallo da circa 50 mg a circa 1 mg per chilogrammo di peso corporeo del soggetto al giorno. Quando il composto è un sale, un estere, un'ammide, un profarmaco, o simile, la quantità somministrata è calcolata sulla base del composto parentale e così il peso effettivo da utilizzarsi è aumentato in proporzione.

Sintesi chimica

Metodi per la sintesi chimica dei composti HMC sono descritti qui. Questi e/o altri metodi ben noti (vedi, per esempio, Greig et al., 2010a; Bahmanyar et al., 2010) possono essere modificati e/o adattati in modi noti allo scopo di fornire metodi alternativi o migliorati di sintesi.

Sintesi 1

(1r,4r)-4-ammino-1-metilcicloesan-1-olo



Palladio idrossido (50% umidificato con acqua; 2,0 g) fu

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

aggiunto a una soluzione agitata di (1r,4r)-4-(dibenzilammino)-1-metilcicloesanolo (7,5 g, 24,2 mmol) in metanolo (100 ml) in una autoclave da 300 ml. L'autoclave fu caricata con idrogeno (50 atm; circa 5 mPa) e scaldata a 80°C per 24 ore. La miscela fu raffreddata e il catalizzatore filtrato. Il filtrato fu riportato in autoclave e palladio idrossido (50% bagnato con acqua; 3,0 g) fu aggiunto. L'autoclave fu caricata con idrogeno (50 atm; circa 50 MPa) e scaldata a 80°C durante la notte. La miscela fu raffreddata e filtrata su celite e il filtrato fu concentrato per dare il composto del titolo come un solido gommoso biancastro (3,2 g, quant.).

^{1}H NMR: (400 MHz; $CDCl_3$) δ 2.86-2.76 (1H, m), 1.84-1.76 (2H, m), 1.75-1.63 (2H, m), 1.55-1.43 (2H, m), 1.30-1.17 (5H, m).

Sintesi 1A

(1s,4s)-4-ammino-1-metilcicloesan-1-olo

Quattro lotti uguali di (1s,4s)-4-dibenzilammino-1-metilcicloesan-1-olo (ciascun lotto era 15 g, totale 60 g) furono debenzilati separatamente come segue: a (1s,4s)-4-dibenzilammino-1-metilcicloesan-1-olo (15 g, 193,9 mmol) in etanolo (450 ml) fu aggiunto 10% palladio idrossido (15 g, 50% catalizzatore umido). Le miscele di reazione furono lavate con azoto seguito da gas idrogeno e agitate in atmosfera di idrogeno per 16 ore a temperatura ambiente. La soluzione fu filtrata su silice e fu lavata con altro etil acetato. I filtrati da tutti e quattro i lotti furono riuniti ed evaporati a pressione

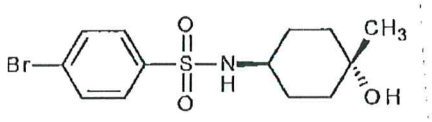
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

ridotta per dare il composto del titolo (23 g, 91,8% resa). Il composto fu utilizzato senza ulteriore purificazione nel passaggio successivo.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.6 (m, 1H), 1.74-1.56 (m, 4H), 1.5-1.3 (m, 7H), 1.21 (s, 3H).

Sintesi 2

4-bromo-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)benzensolfonammide



Diisopropiletilammina (24 ml, 137,8 mmol) fu aggiunta a una soluzione di (1r,4r)-4-ammino-1-metilcicloesanolo (3,6 g, 27,86 mmol) in diclorometano (150 ml) e la miscela di reazione fu raffreddata a 0°C. 4-bromobenzen-1-solfonilcloruro (7,63 g, 30,6 mmol) fu aggiunto come solido e la miscela di reazione fu lasciata agitare a temperatura ambiente per 4 ore. La miscela di reazione fu neutralizzata con 1 M acido cloridrico e il composto fu estratto in diclorometano. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio fosfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo ottenuto fu lavato con pentano, filtrato ed essiccato per dare il composto del titolo (7 g, 72%).

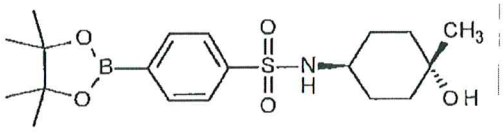
^{1}H NMR: (400 MHz; $CDCl_3$) δ 7.74 (2H, d), 7.65 (2H, d), 4.77-4.61 (1H, m), 3.33-3.23 (1 H, m), 1.85-1.75 (2H, m), 1.63-1.51 (2H, m), 1.49-1.30 (4H, m), 1.20 (3H, s).

LCMS: (tempo di corsa: 3,5 min); tempo di ritenzione: 1,33 min (97%, MS (ESI) *m/z* 346 $(M-H)^+$).

Sintesi 3

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

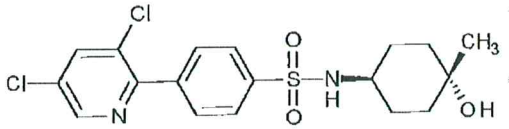
N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide



Una soluzione di 4-bromo-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-benzensolfonammide (9 g, 25,8 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-ottametil-2,2'-bi(1,3,2-diossaborolano) (9,87 g, 38,9 mmol) e potassio acetato (7,6 g, 77,5 mmol), in toluene (50 ml) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (1,8 g, 2,5 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e agitata a 100°C per 4 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta e il composto fu estratto in etil acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta per dare il composto del titolo (8 g, 78%, MS (ESI) *m/z* 394 $(M-H)^+$). Per lotti in grande scala, il composto fu utilizzato senza ulteriore purificazione. Quando questa preparazione fu eseguita su una scala più piccola, il residuo fu prelevato in etere, filtrato e il filtrato fu concentrato per dare il prodotto desiderato.

Sintesi 4

4-(3,5-dicloropiridin-2-il)-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilciclo-esil)benzensolfonammide (HMC-N-03-A)



Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Una miscela di diossano e acqua (3:1, 20 ml) fu degassata. 2,3,5-tricloropiridina (1,65 g, 9,0 mmol), N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzen solfonammide (1,8 g, 4,6 mmol), K_2CO_3 (1,24 g, 9,0 mmol) e [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (257 mg, 0,35 mmol) furono aggiunti e la miscela di reazione agitata a 120°C in un forno a microonde per 3 ore. La miscela di reazione fu concentrata, diluita con etil acetato e lavata con acqua. Gli estratti organici furono essiccati ($MgSO_4$) e concentrati per dare un residuo grezzo che fu purificato con colonna flash (eluente: da 40 a 50% etil acetato in eptano). Il prodotto fu purificato ulteriormente per cristallizzazione tre volte (etil acetato/eptano) per dare il composto del titolo (284 mg, 15%).

^{1}H NMR: (400 MHz; $CDCl_3$) δ 8.59 (1H, m), 7.97 (2H, d), 7.92-7.85 (3H, m), 4.62-4.55 (1 H, m), 3.38-3.28 (1 H, m), 1.92-1.76 (2H, m), 1.8-1.35 (7H, m), 1.22 (3H, s).

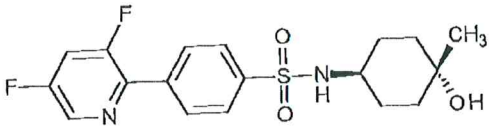
LCMS: fase mobile A: 0,05% acido trifluoroacetico in acqua, fase mobile B: 0,05% acido trifluoroacetico in acetonitrile; colonna: YMC ODS AA, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; velocità di flusso: 1,2 ml/min; temperatura: ambiente. Tempo di corsa: 4,5 mi - solvente di partenza 20:80 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 3 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 0,5 minuti quindi immediatamente ritornato a 20:80 B:A per gli ultimi 1,5 minuti. Tempo di ritenzione: 2,50 minuti, *m/z* 415 $(M+H)^+$.

Sintesi 5

4-(3,5-difluoropiridin-2-il)-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilciclo-

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

esil)benzensolfonammide (HMC-N-02-A)



Una soluzione agitata di diossano:acqua (9:1; 100 ml), N((1r, 4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (20 g, 50,6 mmol), 2-bromo-3,5-difluoropiridina (14,73 g, 75,94 mmol) e sodio carbonato (10,73 g, 101,2 mmol) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (3,7 g, 5,06 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e agitata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta e il composto fu estratto in etil acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna di gel di silice e le frazioni furono concentrate a un volume minimo e quindi filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con 20% di etil acetato in esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo (8 g, 41%).

^{1}H NMR: (400 MHz; metanolo -d_4) δ 8.54 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.74 (m, 1 H), 3.20 (m, 1 H), 1.83 - 1.27 (m, 8H), 1.18 (s, 3H).

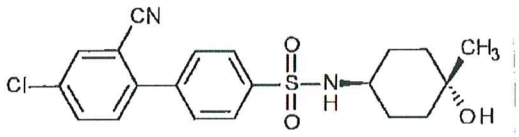
LCMS: fase mobile A: 10 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; colonna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; velocità di flusso: 1,4 ml/min; tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 1,75 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1 minuto, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 1,25 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione: 1,88 minuti, *m/z* 381 $(M-H)^+$.

Sintesi 6

4'-cloro-2'-ciano-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-bifenil-4-solfonammide (HMC-C-01-A)



Una soluzione agitata di diossano:acqua (9:1; 100 ml), N((1r, 4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (12 g, 30,4 mmol), 2-bromo-5-cloro-benzonitrile (9,86 g, 45,5 mmol) e sodio carbonato (6,44 g, 60,8 mmol) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (2,21 g, 3,0 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e agitata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta e il composto fu estratto in etil acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta seguito da lavaggio con n-pentano (due volte) ed essiccato sottovuoto a 45-50°C per dare il composto del titolo (5,7 g, 46,5%).

^{1}H NMR (400 MHz, metanolo-d_4) δ 8.01 (d, J= 8.1 Hz, 2H), 7.95 (m, 1 H), 7.83-7.74 (m, 3H), 7.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 3.25 - 3.17 (m, 1 H), 1.8-1.54 (m, 4H), 1.47-1.34 (m, 4H), 1.18 (s, 3H).

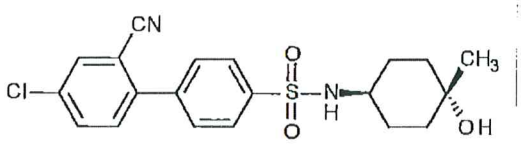
LCMS: fase mobile A: 10 mM ammonio formiato in acqua + 0,1%

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; colonna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; velocità di flusso: 1,4 ml/min; tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2,5 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 0,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 1 minuto e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione: 2,167 minuti, *m/z* 403 $(M-H)^+$.

Sintesi 6A

4'-cloro-2'-ciano-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-bifenil-4-solfonammide (HMC-C-01-A)



In un pallone da 10 l furono caricati (1r,4r)-4-ammino-1-metilcicloesan-1-olo (123,7 g, 0,957 moli) finemente suddiviso e diclorometano (2400 ml). Trietilammina (534 ml, 3,830 mol) fu aggiunta goccia a goccia. La sospensione raffreddata a meno di 5°C e 4-(4-cloro-2-cianofenil)benzen-1-solfonil cloruro (298,9 g, 0,957 mol) in diclorometano (768 ml) aggiunto goccia a goccia mantenendo la temperatura al disotto di 25°C. La miscela di reazione fu lasciata riscaldare a temperatura ambiente e agitata per 40 ore. La miscela di reazione fu raffreddata sotto 10°C e 2 M di acido cloridrico acquoso (2090 ml) fu aggiunto goccia a goccia mantenendo la temperatura a meno di 25°C (aggiunta esotermica e fumi bianchi osservati). Le fasi furono separate e lo strato organico fu lavato con acqua (2090 ml).

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Gli organici furono essiccati su magnesio solfato anidro, filtrati, e il residuo fu lavato con diclorometano (2 x 50 ml). I filtrati riuniti furono quindi riuniti con il prodotto grezzo da una reazione simile in scala più piccola di 4-(4-cloro-2-cianofenil)benzen-1-solfonil cloruro (50 g) e (1r,4r)-4-ammino-1-metilcicloesan-1-olo, tutti i materiali riuniti assorbiti direttamente su silice (800 g). Questi furono purificati con cromatografia su silice (8000 g) eluendo inizialmente con etil acetato:diclorometano 20:80, e quindi in successione con miscele di etil acetato:diclorometano 30:70, 40:70, 50:50, seguite da etil acetato puro. Le frazioni contenenti il prodotto furono riunite e concentrate per dare un solido giallo. Questo materiale fu essiccato in stufa sottovuoto durante la notte a 40°C per dare il composto del titolo (406,8 g; resa totale 88%). L'analisi NMR indicò una purezza di >97%.

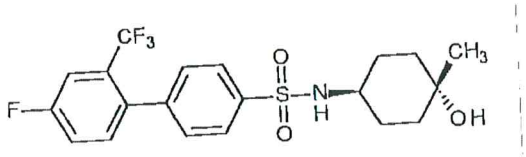
^{1}H NMR: (270 MHz; $CDCl_3$) δ 8.02 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.73-7.63 (m, 3H), 7.49 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 4.89 (d, J = 7 Hz, 1 H), 3.38 (m, 1 H), 1.98-1.75 (m, 2H), 1.75-1.3 (m, 7H, m), 1.23 (s, 3H).

HPLC: fase mobile A: acqua purificata + 0,1% acido trifluoracetico, fase mobile B: acetonitrile + 0,1% acido trifluoroacetico; colonna: Fortis C18 4,6 x 150 mm, 3 µM; velocità di flusso: 1,0 ml/min; tempo di corsa: 30 minuti - solvente di partenza 5:95 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 15 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per i finali 15 minuti. Tempo di ritenzione: 12,0 minuti. Spettro di massa: Bruker Esquire 3000 Plus Ion Trap MS; polarità ionica positiva, ESI: *m/z* 403 $(M-H)^+$.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Sintesi 7

4'-fluoro-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-2'-(trifluoro-metil)bifenil-4-solfonammide (HMC-C-02-A)



Una soluzione agitata di diossano:acqua (9:1; 100 ml), N((1r, 4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossa-borolan-2-il)benzensolfonammide (20 g, 50,6 mmol), 1-bromo-4-fluoro-2-(trifluorometil)benzene (18,45 g, 75,9 mmol) e sodio carbonato (10,73 g, 101,2 mmol) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (3,7 g, 5,06 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e agitata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta e il composto fu estratto in etil acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice e le frazioni furono concentrate e quindi filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con un volume minimo di diclorometano seguito da lavaggio con n-pentano (due volte) ed essiccato sottovuoto a 45-50°C per dare il composto del titolo (10,2 g, 47%).

^{1}H NMR (400 MHz, metanolo-d_4) δ 7.93 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.20 (m, 1 H), 1.79 - 1.51 (m, 4H), 1.49 - 1.30 (m, 4H), 1.18 (s, 3H).

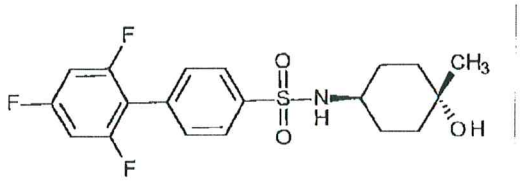
LCMS: fase mobile A: 10 mM ammonio formiato in acqua + 0,1%

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; colonna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; velocità di flusso: 1,4 ml/min; tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 1,75 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1 minuto, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 1,25 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione: 2,16 minuti, *m/z* 430 $(M-H)^+$.

Sintesi 8

2'-4'-6'-trifluoro-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-bifenil-4-solfonammide (HMC-C-03-A)



Una miscela di diossano:acqua (3:1; 20 ml) fu degassata. 1-bromo-2,4,6-trifluorobenzene (1,91 g, 9,1 mmol), N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (1,8 g, 4,6 mmol), K_2CO_3 (1,24 g, 9,0 mmol) e [1,1-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (257 mg, 0,35 mmol) furono aggiunti e la miscela di reazione agitata a 120°C in un forno a microonde per 3 ore. La miscela di reazione fu concentrata, diluita con etil acetato e lavata con acqua. Gli estratti organici furono essiccati ($MgSO_4$) e concentrati per dare un residuo grezzo che fu purificato con colonna flash (eluente: da 40 a 50% etil acetato in eptano). Il prodotto fu purificato ulteriormente per cristallizzazione (etil acetato/eptano) per dare il composto del

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

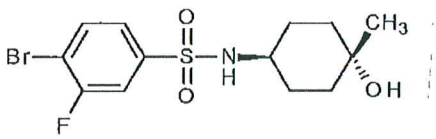
titolo (620 mg, 34%).

^{1}H NMR: (400 MHz; $CDCl_3$) δ 7.95 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 6.80 (l, 2H), 4.62-4.52 (m, 1H), 3.41-3.30 (m, 1H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.66-1.34 (m, 6H), 1.22 (s, 3H).

LCMS: fase mobile A: 10 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; colonna: YMC Triart, C18 (50 x 4,6 mm) 3 µM; velocità di flusso: 1,4 ml/min; tempo di corsa: 5,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2,5 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1 minuto, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 1,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione: 2,40 minuti *m/z* 400 $(M+H)^+$.

Sintesi 9

4-bromo-3-fluoro-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)benzen-solfonammide



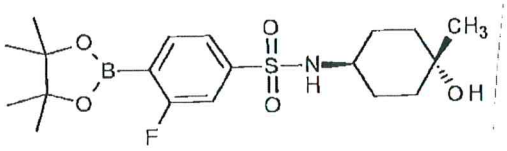
Diisopropiletilammina (20 ml, 116,2 mmol) fu aggiunta a una soluzione di (1r,4r)-4-ammino-1-metilcicloesanolo (3 g, 23,2 mmol) in diclorometano (150 ml) e la miscela di reazione fu raffreddata a 0°C. 4-bromo-3-fluorobenzen-1-solfonilcloruro (6,98 g, 25,5 mmol) fu aggiunto come solido e la miscela di reazione fu lasciata agitare a temperatura ambiente per 4 ore. La miscela di reazione fu neutralizzata con 1 M acido cloridrico e il composto fu estratto in diclorometano. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

fosfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo ottenuto fu lavato con n-pentano, filtrato ed essiccato per dare il composto del titolo (7 g, 82%). MS (ESI) *m/z* 368 $(M+H)^+$.

Sintesi 10

3-fluoro-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide

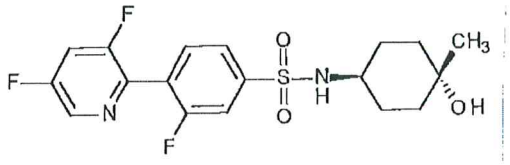


Una soluzione agitata di toluene (50 ml), 4-bromo-3-fluoro-N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil) benzensolfonammide (9 g, 24,6 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-ottametil-2,2'-bi(1,3,2-diossaborolano) (9,33 g, 36,7 mmol) e potassio acetato (7,23 g, 73,7 mmol) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenil-fosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (1,8 g, 2,5 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e agitata a 110°C per 4 ore. La miscela di reazione fu raffreddata a temperatura ambiente e filtrata su celite. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta per dare il composto del titolo (10 g, 98%). Per lotti di grande scala, il composto fu utilizzato senza ulteriore purificazione. Quando questa preparazione fu eseguita su una scala più piccola, il residuo fu ripreso in etere, filtrato e il filtrato fu concentrato per dare il prodotto desiderato. MS (ESI) *m/z* 412 $(M-H)^+$.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Sintesi 11

4'-(3,5-difluoropiridin-2-il)-3-fluoro-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-benzensolfonammide (HMC-N-01-A)



Una soluzione agitata di diossano (50 ml), 3-fluoro-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (18 g, 43,6 mmol), 2-bromo-3,5-difluoro-piridina (12,68 g, 65,37 mmol) e cesio carbonato (35,52 g, 109,0 mmol) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (3,2 g, 4,4 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e quindi agitata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta e il composto fu estratto in etil acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice seguito da lavaggio con n-pentano per dare il composto del titolo (8,19 g, 47%).

^{1}H NMR (400 MHz, metanolo-d_4) δ 8.55 (d, J = 2.1 Hz, 1 H), 7.87 - 7.71 (m, 4H), 3.24 (m, 1 H), 1.8-1.7 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 2H), 1.51 - 1.34 (m, 4H), 1.19 (s, 3H).

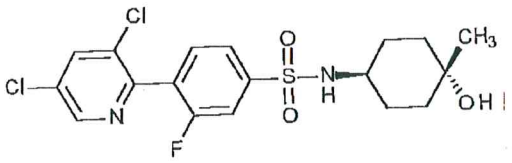
LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2,5 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 0,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 1 minuto e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 1,88 minuti, m/z 399 $(M-H)^+$.

Sintesi 12

4-(3,5-dicloropiridin-2-il)-3-fluoro-N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metil-cicloesil)benzensolfonammide (HMC-N-04-A)



Una soluzione di 3-fluoro-N((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (0,338 g, 0,82 mmol) in dimetossietano (10 mL) fu spurgata con argon per 15 minuti. 2-bromo-3,5-dicloropiridina (0,185 g, 0,82 mmol) e sodio carbonato (0,175 g, 1,65 mmol) in acqua furono aggiunti e degassati utilizzando argon per 30 minuti. [1,1-bis(difenilfosfino) ferrocene]dicloropalladio(II) (0,12 g, 0,16 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e quindi agitata a 80°C per 2 ore. La miscela di reazione fu raffreddata e filtrata su celite. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta e il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando 50% etile acetato in esano per dare il composto del titolo (0,04 g, 11%).

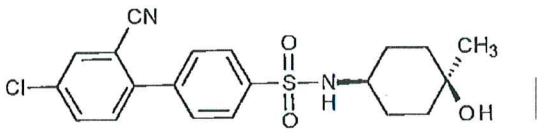
^{1}H NMR (400 MHz, metanolo-d_4) δ 1.19 (3H, s), 1.33 - 1.52 (4H, m), 1.54-1.66 (2H, m), 1.69 - 1.82 (2H, m), 3.25 (1 H, m), 7.68 (1 H, m), 7.75 (1 H, m), 7.82 (1 H, m), 8.20 (1 H, d, J = 2.1 Hz), 8.65 (1 H, d, J = 2.1 Hz).

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

LCMS: fase mobile A: 10 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,2 mL/minuto. Tempo di corsa: 5 minuti - solvente di partenza 35:65 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2,5 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,3 minuti, ridotto immediatamente a 35:65 per i finali 1,2 minuti. Tempo di ritenzione 2,59 minuti, m/z 431 $(M-H)^+$.

Sintesi 13

4'-cloro-2'-ciano-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (HMC-C-01-B)



Una soluzione di N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrameil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (17 g, 43,0 mmol), 2-bromo-5-clorobenzonitrile (14 g, 64,7 mmol), e sodio carbonato (9,1 g, 86 mmol) in diossano:acqua (240 mL, 9:1) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenilfosfino)-ferrocene]dicloropalladio(II) (3,14 g, 4,3 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta e il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

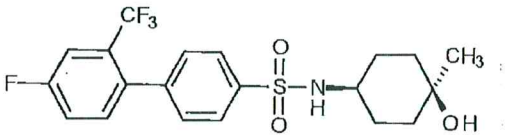
fosfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando gel di silice da 100-200 mesh usando 20-40% etile acetato in esano come eluente. Le frazioni furono concentrate a 1/10 del volume (85 mL) e quindi filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con 20% etile acetato in esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo. Resa: 5,8 g, 33% (in 2 passaggi).

^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 8.04 - 7.97 (m, 2H), 7.79 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.69-7.64 (m, 3H), 7.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.45 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 3.3-3.15 (br, 1 H), 1.74 - 1.51 (m, 6H), 1.45-1.35 (m, 2H), 1.20 (s, 3H), 1.00 (s, 1 H).

LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,62 minuti, m/z 403,30 [M-1].

Sintesi 14

4'-fluoro-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (HMC-C-02-B)



Una soluzione di N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (13,5

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

g, 34,1 mmol), 1-bromo-4-fluoro-2-(trifluorometil)benzene (12,45 g, 51,2 mmol), e sodio carbonato (7,24 g, 68,3 mmol) in diossano:acqua (230 mL, 9:1) fu degassato utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (2,49 g, 3,4 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato, e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando gel di silice da 100-200 mesh usando 20-40% etile acetato in esano come eluente. Le frazioni furono concentrate a 1/10 del volume (80 mL) e quindi filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con 20% etile acetato in esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo. Resa: 5,6 g, 20% (in 2 passaggi).

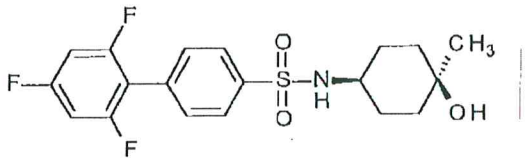
^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 7.97 - 7.88 (m, 2H), 7.52 - 7.40 (m, 3H), 7.31 (dd, *J* = 7.0, 2.4 Hz, 2H), 4.40 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 3.25-3.12 (br, 1H), 1.70-1.50 (m, 6H), 1.45-1.33 (m, 2H), 1.20 (s, 3H), 1.00 (bs, 1H).

LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,79 minuti, m/z 430 [M-1].

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Sintesi 15

2',4',6'-trifluoro-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (HMC-C-03-B)



Una soluzione di N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (15 g, 37,9 mmol), 2-bromo-1,3,5-trifluorobenzene (12 g, 56,9 mmol) e sodio carbonato (8,03 g, 75,8 mmol) in diossano:acqua (250 mL, 9:1) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenil-fosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (2,77 g, 3,8 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta, e il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio fosfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando gel di silice da 100-200 mesh usando 20-40% etile acetato in esano come eluente. Le frazioni furono concentrate a 1/10 del volume (90 mL) e quindi filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con 20% etile acetato in esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo. Resa: 4,98 g, 18% (in 2 passaggi).

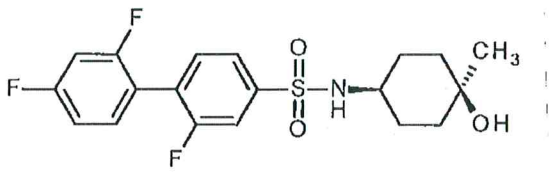
^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 7.99 - 7.92 (m, 2H), 7.61 - 7.53 (m, 2H), 6.80 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 3.25-3.12 (br, 1 H), 1.75 - 1.51 (m, 6H), 1.48 - 1.33 (m, 2H), 1.20 (s, 3H), 0.99 (s, 1 H).

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuto e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,65 minuti, m/z 398 [M-1].

Sintesi 16

2,2',4'-trifluoro-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (HMC-C-04-B)



Una soluzione di 3-fluoro-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzen-solfonammide (3,1 g, 7,5 mmol), 1-bromo-2,4-difluorobenzene (2,1 g, 10,9 mmol), e sodio carbonato (1,6 g, 15,0 mmol) in diossano:acqua (60 mL, 5:1) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (0,548 g, 0,75 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

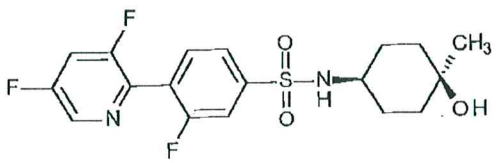
separato, essiccato su sodio fosfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando gel di silice da 100-200 mesh usando 20-40% etile acetato in esano come eluente per dare il composto del titolo. Resa: 0,6 g, 18% (in 2 passaggi).

^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 7.73-7.69 (m, 2H), 7.56-7.47 (m, 1H), 7.44-7.32 (m, 1H), 7.06 - 6.91 (m, 2H), 4.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 3.27-3.14 (br, 1 H), 1.76 - 1.52 (m, 6H), 1.48 - 1.35 (m, 2H), 1.21 (s, 3H), 0.97 (s, 1 H).

LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,70 minuti, m/z 398 [M-1].

Sintesi 17

4-(3,5-difluoropiridin-2-il)-3-fluoro-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metil-cicloesil)benzensolfonammide (HMC-N-01-B)



Una soluzione di 3-fluoro-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzen-solfonammide (22 g, 53,2 mmol), 2-bromo-3,5-difluoropiridina (15,5 g, 79,9 mmol) e cesio carbonato (52,0 g, 159,6 mmol) in diossano:acqua

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

(100 mL) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (3,9 g, 5,3 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio fosfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando gel di silice da 100-200 mesh usando 20-40% etile acetato in esano come eluente. Le frazioni furono concentrate a 1/10 del volume (110 mL) e filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con 20% etile acetato in esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo. Resa: 5,6 g, 26% (in 2 passaggi).

^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 8.50 (m, 1H),7.83 - 7.67 (m, 3H), 7.41-7.33 (m, 1 H), 4.43 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 3.28-3.13 (m, 1 H), 1.74 - 1.52 (m, 6H), 1.46-1.35 (m, 2H), 1.21 (s, 3H), 0.97 (s, 1 H).

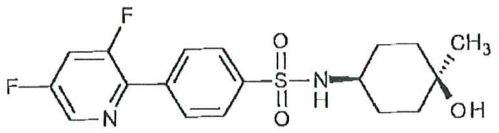
LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,42 minuti, m/z 399 [M-1].

Sintesi 18

4-(3,5-difluoropiridin-2-il)-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

benzensolfonammide (HMC-N-02-B)



Ad una soluzione agitata di N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il) benzensolfonammide (26,5 g, 67,0 mmol), 2-bromo-3,5-difluoropiridina (19,5 g, 100,5 mmol), e sodio carbonato (14,22 g, 134,2 mmol) in diossano:acqua (250 mL, 9:1) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (4,90 g, 6,70 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio fosfato e concentrato a pressione ridotta per ottenere un residuo. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando gel di silice da 100-200 mesh usando 20-40% etile acetato in esano come eluente. Le frazioni furono concentrate a 1/10 del volume (100 mL) e quindi filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con 20% etile acetato in esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo. Resa: 5,9 g, 26% (in 2 passaggi).

^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 8.48 (d, *J*= 2.4 Hz, 1 H), 8.13 - 8.06 (m, 2H), 7.98 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H), 7.39-7.31 (m, 1 H), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 3.25-3.1 (br, 1 H), 1.72 - 1.5 (m, 6H), 1.42-1.32 (m, 2H), 1.19 (s, 3H), 0.96 (s, 1H).

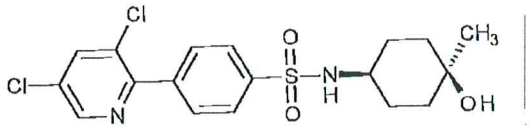
LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1%

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,41 minuti, m/z 381 [M-1].

Sintesi 19

4-(3,5-dicloropiridin-2-il)-N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-benzensolfonammide (HMC-N-03-B)



Una soluzione di N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (1,5 g, 3,8 mmol), 2-bromo-3,5-dicloropiridina (1,3 g, 5,7 mmol), e sodio carbonato (0,805 g, 7,6 mmol) in diossano:acqua (18 mL, 5:1) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)-ferrocene]dicloropalladio(II) (0,277 mg, 0,38 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Una ulteriore soluzione di N-((1s,4s)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (4 g, 10,1 mmol), 2-bromo-3,5-dicloropiridina (3,44 g, 15,2 mmol), e sodio carbonato (2,14 g, 20,2 mmol) in diossano:acqua (54 mL, 5:1) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II)

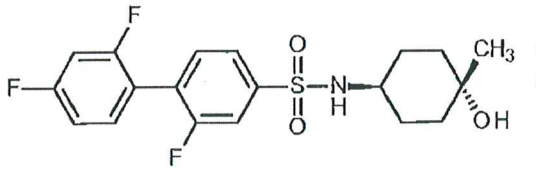
(0,739 g, 1,0 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Entrambi i lotti di cui sopra furono riuniti. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio fosfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice utilizzando gel di silice da 100-200 mesh usando 20-40% etile acetato in esano come eluente. Le frazioni furono concentrate a 1/10 del volume (30 mL) e quindi filtrate. Il residuo ottenuto fu lavato con 20% etile acetato in esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo. Resa: 0,79 g, 14% (in 2 passaggi).

^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 8.59 (m, 1 H), 8.02 - 7.94 (m, 2H), 7.90 - 7.83 (m, 3H), 4.47 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 3.25-3.1 (br, 1 H), 1.73 - 1.5 (m, 6H), 1.44-1.32 (m, 2H), 1.19 (s, 3H), 1.01 (s, 1 H).

LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,69 minuti, m/z 413 [M-1].

Sintesi 20

2,2',4'-trifluoro-N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (HMC-C-04-A)



Una soluzione di 3-fluoro-N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metil-cicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzen-solfonammide (3,5 g, 8,4 mmol), 1-bromo-2,4-difluorobenzene (2,44 g, 12,7 mmol), e sodio carbonato (1,79 g, 16,9 mmol) in diossano:acqua (60 mL, 5:1)) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis-(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (0,619 g, 0,85 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti. La miscela di reazione fu scaldata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, acqua fu aggiunta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con purificazione SFC: Fase Mobile:CO2:Metanolo (05-50 in 5 minuti), Colonna: Silice-2-etilpiridina (250x4,6 mm, 5 µ), Flusso:3 mL/minuto, Lunghezza d'onda:210-400 nm per dare il composto del titolo. Resa: 0,7 g, 19% (in 2 passaggi).

^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 7.78-7.64 (m, 2H), 7.62-7.45 (m, 1H), 7.44-7.34 (m, 1 H), 7.06 - 6.91 (m, 2H), 4.51 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H), 3.40-3.35 (br, 1 H), 1.95 - 1.83 (m, 2H), 1.67 - 1.37 (m, 6H), 1.25 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H), 1.13 (s, 1 H).

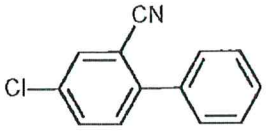
LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 4,5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,56 minuti, m/z 398 [M-1].

Sintesi 21

5-cloro-2-fenilbenzonitrile



2-bromo-5-cloro-benzonitrile (297,0 g, 1,372 mol), acido fenil boronico (184,0 g, 1,509 mol), sodio carbonato (436,3 g, 4,116 mol), 1,2-dimetossietano (4455 mL) e acqua (1485 mL) furono aggiunti in un pallone sotto azoto. Il pallone fu degassato tre volte con azoto e tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (79,3 g, 0,069 mol) fu aggiunto. Il pallone fu degassato tre volte con azoto e fu agitato e scaldato a 70°C e quindi agitato a quella temperatura per 24 ore. Ulteriore acido fenil boronico (36,8 g, 0,302 mol), sodio carbonato (87,3 g, 0,824 mol) e tetrakis(trifenilfosfina)palladio (15,9 g, 0,014 mol) furono aggiunti e la miscela agitata per ulteriori 16 ore. La reazione fu raffreddata a temperatura ambiente e la sospensione fu filtrata ed il solido lavato con etil acetato (2x2000 mL). I filtrati riuniti furono separati e lo strato organico fu lavato con acqua e sale satura (2x2000 mL). Lo strato organico fu essiccato su magnesio solfato anidro, filtrato ed il solido lavato con etil acetato (1000 mL). I filtrati riuniti furono concentrati assorbendoli su gel di silice (600 g). Il materiale grezzo fu purificato su gel di silice (6

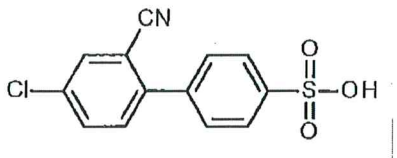
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

kg) eluendo con 25-50% toluene in eptano. Le frazioni pure furono riunite e concentrate per dare un solido bianco. Il solido fu distillato in condizioni azeotropiche con eptano (8x800 mL) per rimuovere qualunque toluene residuo e dare il composto previsto. Resa = 215,9 g (73,6%).

1H NMR (270 MHz, DMSO d_6) δ 8.18 - 8.12 (m, 1 H), 7.86 (dd, J = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.7 - 7.45 (m, 6 H).

Sintesi 22

Acido 4-(4-cloro-2-cianofenil)benzen-1-solfonico



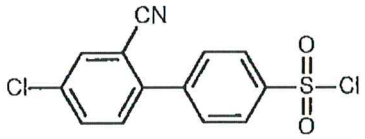
In un pallone da 5 L furono caricati 5-cloro-2-fenilbenzonitrile grezzo (407,8 g, 1,909 mol) e cloroformio (2325 mL). La soluzione giallo chiaro fu raffreddata a meno di 5°C e acido clorosolfonico (343 mL, 5,15 mol) fu aggiunto, mantenendo la temperatura a meno di 10°C. La miscela di reazione fu lasciata riscaldare a temperatura ambiente e la soluzione marrone scuro fu agitata a temperatura ambiente durante la notte. La miscela di reazione fu concentrata a 20°C ed il residuo fu disciolto in etil acetato (2325 mL) - un'esotermia a 33°C fu osservata. Acqua (490 mL) fu aggiunta (esotermia a 64°C) seguita da acqua e sale satura (1920 mL), e la miscela fu raffreddata a 19°C. La densa sospensione fu filtrata (filtrazione molto lenta) ed il residuo lavato con acqua (2x1 L) ed etil acetato (2x1,5 L). Il precipitato su filtro fu essiccato sotto vuoto a 40°C per 64 ore per dare 435 g di un materiale come un solido

giallo. Questo fu sospeso in etil acetato (1740 mL) a temperatura ambiente per 20 minuti. La sospensione fu filtrata ed il residuo fu lavato con etil acetato (435 mL). Il precipitato su filtro fu essiccato sotto vuoto a 40-60°C per due notti per dare un solido crema (366,3 g), contenente 289 g del composto del titolo (52% resa). L'analisi di Karl Fischer mostrò che il prodotto conteneva 4,3% acqua.

^{1}H NMR (270 MHz, DMSO d_6) δ 8.16 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 2.3 Hz, 8.5 Hz, 1 H), 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz. 1 H), 7.54 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H).

Sintesi 23

4-(4-cloro-2-cianofenil)benzen-1-solfonile cloruro



In un pallone da 5 L furono caricati acido 4-(4-cloro-2-cianofenil)benzen-1-solfonico grezzo (366,3 g, contenente 289 g di acido 4-(4-cloro-2-cianofenil)benzene-1-solfonico, 0,98 mol) e toluene (3000 mL). Tionil cloruro (423 mL, 5,83 mol) fu aggiunto goccia a goccia seguito da dimetilformammide (5 mL, 0,0646 mol). La miscela di reazione fu scaldata a 75°C e agitata durante la notte. La miscela di reazione fu raffreddata, concentrata sotto vuoto, il residuo fu ripartito tra etile acetato (3000 mL) e acqua (15900 mL) e lo strato organico lavato con acqua e sale satura (1500 mL). Lo strato organico fu essiccato su magnesio solfato anidro (50 g) e filtrato. Il residuo fu lavato con etil acetato (2x100 mL) e gli strati organici riuniti concentrati per dare il composto del titolo (297,6 g, 93% resa) come solido giallo. L'analisi con NMR indicò una

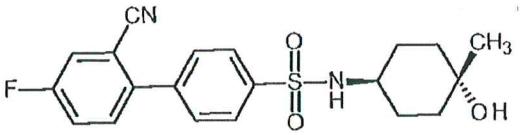
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

purezza di circa 95%.

^{1}H NMR (270 MHz, DMSO d_6) δ 8.16 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 2.1 Hz, 8.2 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz. 1 H), 7.54 (d, J= 8.3 Hz, 2H).

Sintesi 24

2'-ciano-4'-fluoro-N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (HMC-C-05-A)



Una soluzione agitata di N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (1,6 g, 4,05 mmol), 2-bromo-5-fluorobenzonitrile (2,03 g, 10,15 mmol), sodio carbonato (1,07 g, 10,1 mmol) in diossano:acqua (30:3 mL) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenil-fosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (0,296 g, 0,405 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e agitata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato, e concentrato a pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice. Il residuo ottenuto fu lavato con esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo come solido bianco. Resa: 1,1 g, 70%.

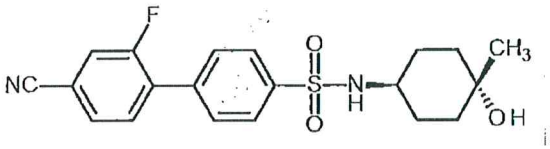
^{1}H NMR (400 MHz, cloroformio-d) δ 8.04 - 7.97 (m, 2 H), 7.71 - 7.64 (m, 2 H), 7.55 - 7.49 (m, 2 H), 7.39 - 7.46 (m, 1 H), 4.46 (d, J=6.6 Hz, 1 H), 3.45 - 3.32 (m, 1 H), 1.92 - 1.82 (m, 2 H), 1.65 - 1.35 (m, 6 H), 1.23 (s, 3H), 1.11 (brs, 1 H).

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2,50 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,50 minuti (ESI) m/z 387 [M-1].

Sintesi 25

4'-ciano-2'-fluoro-N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-[1,1'-bifenil]-4-solfonammide (HMC-C-06-A)



Una soluzione agitata di N-((1r,4r)-4-idrossi-4-metilcicloesil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzensolfonammide (1,6 g, 4,05 mmol), 4-bromo-3-fluorobenzonitrile (2,03 g, 10,1 mmol), sodio carbonato (1,07 g, 10,1 mmol) in diossano:acqua (30:3 mL) fu degassata utilizzando argon per 10 minuti. [1,1-bis(difenil-fosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) (0,296 g, 0,405 mmol) fu aggiunto e la miscela di reazione fu degassata per altri 10 minuti e agitata a 110°C per 6 ore. Il solvente fu evaporato a pressione ridotta, ed il composto fu estratto in etile acetato. Lo strato organico fu separato, essiccato su sodio solfato, e concentrato a

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

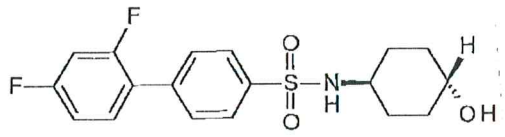
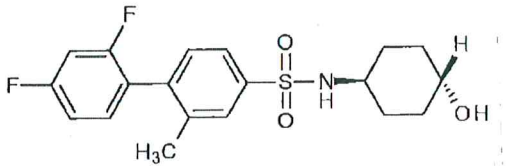
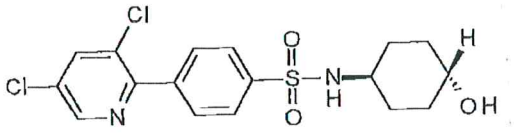
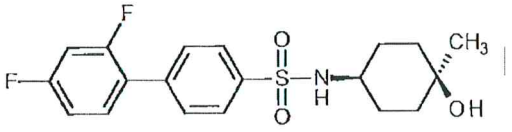
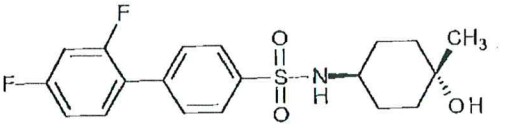
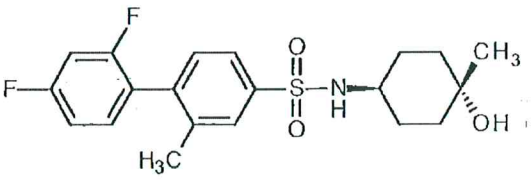
pressione ridotta. Il residuo fu purificato con cromatografia su colonna su gel di silice flash. Il residuo ottenuto fu lavato con esano seguito da n-pentano per dare il composto del titolo come solido bianco. Resa: 1,19 g, 75,79%.

^{1}H NMR (400 MHz, **cloroformio**-*d*) δ 8.03 - 7.96 (m, 2 H), 7.73 - 7.66 (m, 2 H), 7.62 - 7.56 (m, 2 H), 7.54 - 7.48 (m, 1 H), 4.51 (d, J=6.65 Hz, 1 H), 3.42 - 3.30 (m, 1 H), 1.95 - 1.82 (m, 2 H), 1.66 - 1.55 (m, 2 H) 1.53 - 1.37 (m, 4 H), 1.23 (s, 3H), 1.12 (brs, 1 H).

LCMS: fase mobile A: 5 mM ammonio formiato in acqua + 0,1% ammoniaca, fase mobile B: acetonitrile + 5% fase mobile A + 0,1% ammoniaca; Colonna: YMC Triat, C18 (50x4,6 mm) 3 µM; Velocità di flusso: 1,4 mL/minuto. Tempo di corsa: 5 minuti - solvente di partenza 30:70 B:A è aumentato linearmente a 95:5 B:A nei primi 2,50 minuti, mantenuto a 95:5 B:A per 1,5 minuti, ridotto linearmente a 30:70 B:A in 0,5 minuti e mantenuto a 30:70 B:A per i finali 0,5 minuti. Tempo di ritenzione 2,52 minuti (ESI) m/z 387 [M-1].

Composti addizionali

I seguenti composti furono anch'essi preparati per l'uso come composti di riferimento negli studi biologici descritti qui:

Codice	Struttura
ABD599	
ABD735	
ABD836	
ABD899	
ABD900	
REF001	

Studi biologici

La potenza fu determinata utilizzando un saggio di vitalità basato sulla sopravvivenza della linea cellulare di macrofagi J774. I macrofagi sono strettamente correlati agli osteoclasti e sono stati utilizzati precedentemente come sistema modello per la sopravvivenza

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM.CPI 001

degli osteoclasti (vedi, per esempio, Luckman et al., 1998, "Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages", J. Bone Miner. Res., Vol.13, pp.1668-1678). Il modello è indicativo sia degli effetti della protezione dell'osso in malattie come osteoporosi, osteoartrite e artrite reumatoide, che degli effetti sull'infiammazione poichè, come gli osteoclasti, i macrofagi J774 sono dipendenti per la sopravvivenza da una attivazione continuata di NFκB.

La stabilità metabolica fu misurata determinando la velocità di scomparsa del composto in presenza di preparazioni microsomiali di fegato umano, come quantificato da cromatografia liquida spettrometria di massa e spettrometria di massa convenzionale (LC-MS/MS).

La solubilità fu misurata equilibrando il composto in un liquido intestinale simulato in stato di digiuno (FaSSIF) e quantificato con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Gli effetti antiinfiammatori furono ulteriormente caratterizzati determinando la produzione di interleuchina-6 (IL-6) con macrofagi derivati da Thp-1 umani stimolati con stimolo pro-infiammatorio di lipopolisaccaride batterico (LPS). LPS agisce con un recettore di superficie cellulare, il recettore-4 tipo Toll per attivare i percorsi di NFκB e IRF per produrre IL-6. La riduzione di IL-6 in questo saggio stimolato è indicativa di effetti antiinfiammatori con

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

l'utilità nel trattamento di condizioni dove la produzione di IL-6 è aberrante.

Studi *in vivo* furono anche eseguiti per valutare il potenziale di questi composti come farmaci.

Le farmacocinetiche furono determinate nei ratti e gli effetti sulla malattia furono determinati in un modello murino di artrite indotta da collagene.

Studio biologico 1

Saggi di vitalità di macrofagi J774 con resazurina

La potenza *in vitro* dei composti in saggio fu determinata incubando con macrofagi J774 e successiva determinazione della vitalità cellulare utilizzando resazurina.

Resazurina è un colorante redox comunemente utilizzato come indicatore di vitalità in cellule coltivate (vedi, per esempio, Anoopkumar-Dukie, 2005, British Journal of Radiology, Vol.78, pp.945-947). Non è tossico per le cellule e stabile nel mezzo di coltura, permettendo la continua misura della continua proliferazione cellulare *in vitro* o con saggi cinetici o di traguardo. Il saggio si basa sulla capacità di cellule vitali, metabolicamente attive di ridurre resazurina (che è blu e non fluorescente) a resorufina e diidroresorufina (che sono rosse e fluorescenti) utilizzando elettroni da specie riducenti, come nicotinammide adenina dinucleotide (NADPH) e flavina adenina dinucleotide (FADH). Questa trasformazione, dalla forma ossidata alla forma ridotta, può essere misurata o colorimetricamente o fluorometricamente. Danni che

bloccano la vitalità cellulare e la proliferazione influenzano anche la capacità delle cellule di ridurre resazurina, e la velocità della riduzione del colorante è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti.

Per misure di fluorescenza, lunghezze d'onda di eccitazione di 530-560 nm e di emissione di 590 nm sono tipicamente utilizzate. Per le misure colorimetriche, assorbanza a 570 nm (forma ridotta) e 600 nm (forma ossidata) è tipicamente misurata. Un semplice calcolo è eseguito per determinare le quantità relative delle due specie: un alto rapporto tra resorufina (la forma ridotta) e resazurina (la forma ossidata) è un indicatore che le cellule sono proliferanti e vitali. Un basso rapporto indica che le cellule sono quiescenti o non vitali.

Cellule J774 furono piastrate a 10^4 cellule per pozzetto in 100 µL di αMEM (Mezzo di Eagle Modificato α) in piastre da 96 pozzetti e lasciate aderire durante la notte. Il giorno seguente, i composti in saggio furono preparati come soluzioni da 100 mM in DMSO. Queste soluzioni madre furono diluite in DMSO e quindi diluite 1000x in mezzo di coltura (αMEM) prima di essere aggiunte direttamente ai pozzetti così da dare la concentrazione del composto finale desiderata. Dopo un'incubazione di 72 ore a 37°C/5% CO_2, resazurina (Alamar Blue, Biosource International) fu aggiunta a ciascun pozzetto (1:10 v/v, 10 µL). La piastra fu quindi incubata a 37°C per 3 ore e la fluorescenza fu misurata a 590 nm con una larghezza di banda di 25 nm.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

I risultati medi per ciascun composto in saggio furono espressi come percento (%) del valore di controllo medio che riflette la vitalità cellulare. I valori medi lungo le concentrazioni saggiate furono quindi riportati in grafico e l'IC_{50} fu calcolata inserendo i dati in un'equazione a 4 parametri di IC_{50} utilizzando il programma da Grafit (Erithacus Software). Ciascun esperimento fu ripetuto due volte e i dati sono presentati come media di IC_{50} da entrambi gli esperimenti.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 1
Saggio di vitalità di macrofagi J774 con resazurina

Composto	IC_{50} (µM) [1]	IC_{50} (µM) [2]
ABD599	0,19	0,41
ABD735	0,10	0,07
ABD836	0,28	1,45
ABD900	0,56	3,64
ABD899	0,08	0,27
REF001	0,12	0,05
HMC-C-01-A	0,13	1,89
HMC-C-02-A	0,26	14,7
HMC-C-03-A	0,14	0,41
HMC-C-04-A		0,50
HMC-C-05-A		2,46
HMC-C-06-A		0,71
HMC-N-01-A	0,13	2,66
HMC-N-02-A	0,18	4,59
HMC-N-03-A	0,17	0,62
HMC-N-04-A	0,18	
HMC-C-01-B		0,16
HMC-C-02-B		1,74
HMC-C-03-B		0,20
HMC-C-04-B		0,06
HMC-N-01-B		0,14

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM-CPI 001

Tabella 1
Saggio di vitalità di macrofagi J774 con resazurina

HMC-N-02-B		0,36
HMC-N-03-B		0,08

(1)Risultati da saggio di vitalità dei macrofagi con resazurina eseguito in un intervallo di concentrazione di 6 punti da 10 μM a 10 nM con n=3 replicati per concentrazione. I dati sono la media da 2 esperimenti indipendenti.
(2)Risultati da saggio di vitalità dei macrofagi con resazurina eseguito in un intervallo di concentrazione di 12 punti da 10 μM a 0,5 n, con n=4 replicati per concentrazione. I dati sono la media da 3 esperimenti indipendenti.

Questi dati dimostrano che i composti HMC descritti qui, e particolarmente HMC-C-01-A e HMC-C-01-B; HMC-C-03-A e HMC-C-03-B; HMC-C-04-A e HMC-C-04-B; HCM-C-06-A; HMC-N-01-B; HMC-N-02-B; e HMC-N-03-B mostrano un'eccellente potenza nel saggio di vitalità dei macrofagi con resazurina e nessuna perdita di potenza, in confronto a composti di riferimento.

Studio biologico 2

Stabilità microsomiale in fegato umano

La stabilità metabolica dei composti in saggio fu misurata determinando la velocità di scomparsa del composto quando incubato in presenza di microsomi epatici umani. Microsomi epatici sono preparati dal reticolo endoplasmatico di epatociti e sono la fonte primaria degli enzimi più importanti (citocromo P450) implicati nel metabolismo dei farmaci. Lo studio di stabilità dei farmaci in presenza di microsomi epatici è accettato come un modello valido che permette la rapida previsione della stabilità del farmaco *in vivo*.

Microsomi epatici umani furono ottenuti da fonte commerciale. I composti in saggio (1 μM) furono incubati con microsomi epatici

mescolati (maschi e femmine). I campioni furono incubati per un periodo di 60 minuti e rimossi in 6 punti di tempo e analizzati con LC-MS/MS per la percentuale/quantità dei composti in saggio.

I microsomi (concentrazione finale della proteina 0,25 o 0,5 mg/mL), 0,1 M tampone fosfato pH 7,4, e il composto in saggio (concentrazione finale 1 µM; diluito da una soluzione madre 10 mM per dare una concentrazione finale DMSO di 0,1%) furono incubati a 37°C prima dell'aggiunta di nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH, concentrazione finale 1 mM) per iniziare la reazione. Il volume di incubazione finale era 100 µL. Un'incubazione di controllo fu inclusa per ciascun composto saggiato, dove 0,1 M tampone fosfato pH 7,4 fu aggiunto invece di NADPH. Il controllo positivo terfenadina fu incluso in ciascun esperimento e tutte le incubazioni furono eseguite una volta per ciascun composto.

Ciascun composto fu incubato per 0, 5, 15, 30, 45 o 60 minuti. Le reazioni furono fermate con l'aggiunta di 100 µL di acetonitrile raffreddato in ghiaccio contenente il riferimento interno (0,001 mM glipizide) negli appropriati punti di tempo. Le piastre di incubazione furono centrifugate a 4000 rpm per 15 minuti a 4°C per precipitare la proteina e le aliquote da 0,1 mL furono analizzate utilizzando LC-MS/MS, con le condizioni mostrate nella tabella seguente.

Tabella 2
Condizioni LC-MS/MS

HPLC:	Schimadzu Agilent
MS/MS:	API 4000, API 4000 Q-Trap
Software:	Analyst 1,5

(continuazione)

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Tabella 2 Condizioni LC-MS/MS	
Modo di ionizzazione:	Turbo spray, ionizzazione in modo positivo
Modo di scansione:	Monitoraggio di reazione multipla (MRM)
Colonna:	Waters, Xterra, MS-C18(2) 5 µm 50x3,0 mm
Temperatura colonna (°C):	40
Fase A:	0,1% acido formico in acqua
Fase B:	0,1% acido formico in acetonitrile
Iniezioni di riferimento (µL):	1, 2, 3, 5, 7, 10
Iniezioni di saggio (µL)	1, 2, 3, 10, 20, 50
Velocità di flusso (mL/minuto):	0,8-1

Da un grafico del logaritmo naturale del rapporto delle aree dei picchi (cioè, il rapporto area picco composto: area picco riferimento interno) rispetto al tempo, il gradiente della linea fu determinato. Successivamente, l'emi-vita ($t_{1/2}$) e l'escrezione intrinseca (CL_{int}) furono calcolate utilizzando le seguenti equazioni, dove V = Volume di incubazione (µL/mg proteina microsomiale):

Costante di velocità di eliminazione (k) = (-Gradiente)

Emi-vita ($t_{1/2}$) (minuto) = 0,063/k

Escrezione intrinseca (CL_{int}) (µL/minuto/milioni cellule) =

$(Vx0,693)/t_{1/2}$

I dati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 3 Stabilità in microsomi epatici umani		
Composto	$T_{1/2}$(minuti)) [1]	$T_{1/2}$(minuti) [2]
ABD599	287	
ABD735	524	
ABD836	>900	
ABD899	72	105
ABD900		87
REF001	43	
HMC-C-01-A	82	

Ing. Marco MONTEBELLI

Tabella 3
Stabilità in microsomi epatici umani

HMC-C-02-A	55	
HMC-C-03-A	84	
HMC-C-04-A		100
HMC-C-05-A		123
HMC-C-06-A		240
HMC-N-01-A	175	
HMC-N-02-A	367	
HMC-N-03-A	258	
HMC-N-04-A	156	
HMC-C-01-B		70
HMC-C-02-B		18
HMC-C-03-B		48
HMC-C-04-B		107
HMC-N-01-B		127
HMC-N-02-B		168
HMC-N-03-B		70

(1)I composti furono incubati con microsomi epatici umani ad una concentrazione finale della proteina di 0,25 mg/mL con campionamento in 5 punti di tempo: 0, 5, 15, 30 e 60 minuti. Un replicato fu eseguito per punto di tempo.
(2)I composti furono incubati con microsomi epatici umani ad una concentrazione finale della proteina di 0,5 mg/mL con campionamento in 6 punti di tempo; 0, 5, 15, 30, 45 e 60 minuti. Due replicati furono eseguiti per punto di tempo.

I dati dimostrano che i composti HMC descritti qui mostrano una stabilità metabolica equivalente a quella dei composti di riferimento.

Studio biologico 3

Solubilità in acqua

La solubilità in acqua fu misurata equilibrando i composti con un liquido intestinale simulato in stato di digiuno (FaSSIF) e quantificata spettrofotometricamente.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

FaSSIF fu preparato come descritto di seguito:

Preparazione del bianco FaSSIF: 0,21 g di gocce di sodio idrossido (NaOH), 1,97 g di diidrogeno sodio fosfato ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) e 3,09 g di sodio cloruro (NaCl) furono disciolti in 400 mL di acqua deionizzata. Il pH fu corretto a 6,5 utilizzando 1 M acido cloridrico e ulteriore acqua deionizzata aggiunta ad un volume finale di 500 mL.

Preparazione di FaSSIF: 0,056 g di SIF in polvere (contenente sodio taurocolato e lecitina) (Phares AG) furono disciolti in 25 mL di bianco FaSSIF e agitati sino a che la polvere fu completamente disciolta. La soluzione fu lasciata a sè per 2 ore durante le quali divenne opalescente; fu utilizzata entro 24 ore. La composizione della soluzione finale fu caratterizzata come segue:

Sodio taurocolato: 3 mM

Lecitina: 0,75 mM

Osmolarità: 270±10 mOsmol

pH: 6,5.

La solubilità in acqua fu determinata aggiungendo una concentrazione nota del composto in saggio (disciolto in DMSO) in FaSSIF proseguendo con incubazione per 16 ore. La densità ottica fu misurata al termine del periodo di incubazione per i composti del saggio ed un riferimento utilizzato per determinare la solubilità. In breve, due campioni furono preparati per ciascuna determinazione: un campione di riferimento consistente in una soluzione madre del composto del saggio in DMSO diluita nella soluzione del sistema (un tampone di basso assorbimento privo di fosfati) e propanolo; e un

campione di saggio (preparato in triplicato) consistente in 0,5 mL FaSSAIF addizionato con il composto in saggio a 0,2 mM. Ciascun campione fu incubato a temperatura ambiente per 16 ore con sbattimento costante a 250 rpm. Al termine del periodo di incubazione, 0,3 mL di ciascun campione furono filtrati su una piastra filtrante pION (pION, Woburn MA), diluiti 1:1 con propanolo e scanditi utilizzando spettrofotometria UV a λ_{max} (190-400 nM) utilizzando un Spectra Max Plus - Versione 2.100 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), con un programma di determinazione della solubilità µSOL Explorer (pION, Woburn, MA).

La solubilità in FaSSIF fu calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Solubilità FaSSIF, } \frac{mg}{mL} = \frac{\left[\frac{150}{75}\right] * \left[\frac{\text{OD del campione}}{\text{OD di riferimento}}\right] * Cr * \text{peso molecolare}}{10^6}$$

dove:

"OD" è la densità ottica;

"Cr" è la concentrazione del riferimento (33,4 µM); e

"peso molecolare" è per il composto in saggio (per esempio, 381,44 per ABD735).

I dati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 4
Solubilità in FaSSIF

Composto	Solubilità (mg/mL)[1]	Solubilità (mg(mL)[2]
ABD599	0,03	
ABD735	0,02	
ABD836	0,03	
ABD899	0,06	0,13
ABD900		0,12
REF001	0,05	
HMC-C-01-A	0,06	
HMC-C-02-A	0,04	
HMC-C-03-A	0,03	
HMC-C-04-A		0,08
HMC-C-05-A		0,19
HMC-C-06-A		0,11
HMC-N-01-A	0,03	
HMC-N-02-A	0,02	
HMC-N-03-A	>0,08	
HMC-N-04-A	0,06	
HMC-C-01-B		0,08
HMC-C-02-B		0,07
HMC-C-03-B		0,15
HMC-C-04-B		0,13
HMC-N-01-B		0,12
HMC-N-02-B		0,12
HMC-N-03-B		0,10

[1]Tre replicati furono eseguiti per studio a pH 6,5.
[2]Due replicati furono eseguiti per studio a pH 6,8.

I dati dimostrano che i composti HMC descritti qui hanno una solubilità equivalente a quella dei composti di riferimento.

Studio biologico 4

Studio di rilascio di IL-6 in macrofagi Thp1

La potenza *in vitro* dei composti in saggio in cellule umane fu determinata per incubazione con macrofagi Thp1 e successiva

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

stimolazione con uno stimolo infiammatorio (lipopolisaccaride batterico (LPS)) seguito da misura del rilascio cellulare di interleuchina-6 (IL-6).

Il saggio è fortemente indicativo degli effetti sull'infiammazione. LPS è un ligando per il recettore 4 tipo Toll (TLR4), che è un componente della famiglia di recettori tipo Toll di recettori di superficie cellulare. Questo recettore è importante nella attivazione del sistema immunitario innato, le maggiori funzioni del quale sono:

(a) reclutamento di cellule immunitarie in siti di infezione attraverso la produzione di citochine come IL-6;

(b) attivazione della cascata del complemento, per identificare batteri, attivare cellule e eliminare sia le cellule morte che i complessi anticorpali;

(c) attivazione della rimozione delle sostanze estranee da parte delle cellule come macrofagi e cellule dendritiche; e

(d) attivazione della presentazione agli antigeni, parte del sistema immunitario adattivo.

TLR4 esercita i suoi effetti attivando una cascata di segnalazione che determina l'attivazione di parecchi fattori trascrizionali includenti NFκB e i componenti 3, 5 e 7 della famiglia dei fattori di trascrizione regolatori di interferone (IRF) (IRF-3, IRF-5 e IRF-7). L'attivazione di questi fattori di trascrizione, e particolarmente NFκB e IRF-5 porta alla sintesi e alla secrezione di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM-CPI 001

citochine come interleuchina 6 (IL-6).

La sovraproduzione/espressione di IL-6 è associata con una gamma di disturbi, includendo autoimmunità, infiammazione e cancro. IL-6 è predominantemente sintetizzata dai macrofagi e dalle cellule T ed è pesantemente implicata nel governare la transizione da infiammazione acuta a infiammazione cronica. Fa ciò modificando la composizione dell'infiltrato dei globuli bianchi nello spazio infiammatorio, passandolo da neutrofili a monociti/macrofagi (vedi, per esempio, Gabay, 2006). In aggiunta, IL-6 esercita effetti stimolatori sulle cellule T e B (favorendo così le risposte infiammatorie croniche) così come sugli osteoclasti (promuovendo così il ricambio dell'osso). Questi effetti sono implicati nella patologia di parecchie malattie includendo osteoporosi, artrite reumatoide, diabete, aterosclerosi, depressione, morbo di Alzheimer, lupus sistemico eritematoso, morbo di Behçet, mieloma multiplo e cancro della prostata. Inoltre, pazienti con cancro avanzato o metastatico hanno livelli circolanti di IL-6 più elevati del normale. Diminuire i livelli di IL-6 nei macrofagi è pertanto un beneficio terapeutico.

Cellule Thp1 furono piastrate ad una concentrazione di $1x10^5$ cellule/pozzetto o $1,7x10^5$ cellule/pozzetto in 500 µL o 150 µL mezzo completo RPMI contenente 1% penicillina-streptomicina e 10% siero bovino fetale inattivato al calore in piastre da 24 pozzetti o da 96 pozzetti, rispettivamente e lasciate aderire durante la notte. Il giorno seguente, le cellule sono stimolate con acido forbolo miristico (PMA) ad una concentrazione finale di 100 nM (piastre da 24

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

pozzetti) o 200 nM (piastre da 96 pozzetti) per indurre differenziazione e mantenute sino a 8 giorni con un cambio del mezzo a 5 giorni se le cellule erano coltivate sino a 8 giorni. I composti in saggio furono preparati come soluzioni da 100 nM in DMSO e quindi diluiti in serie in DMSO prima della diluizione in mezzo di coltura.

I composti diluiti furono aggiunti alle colture 1 ora prima della stimolazione con 100 ng/mL LPS. Dopo una incubazione di 16 o 18 ore a 37°C/5%CO_2, il mezzo di coltura cellulare fu raccolto e saggiato per i livelli di IL-6 umana utilizzando la dotazione duo-set ELISA per IL-6 umana (R&D Systems). I risultati medi per ciascun composto in saggio (n=3) furono espressi come percentuale (%) del valore di controllo medio. I valori medi lungo le concentrazioni saggiate furono quindi riportati in grafico e la IC_{50} per l'inibizione della IL-6 fu calcolata inserendo i dati in una equazione di IC_{50} a 4 parametri utilizzando il programma da Grafit versione 6.0.12 (Erithacus Software Ltd., di Dr. Robin Leatherbarrow) o GraphPad Prism, versione 5.04 per Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, www.graphad.com). Ciascun esperimento fu ripetuto due volte e i dati sono presentati come IC_{50} medie per entrambi gli esperimenti.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 5

Dati di saggio di rilascio di IL-6 da macrofagi

Composto	IC_{50} (μM) [1]	IC_{50} (μM) [2]
ABD599		0,07
ABD899		0,03
ABD900		0,09
HMC-C-01-A	0,04	0,18
HMC-C-02-A	0,001	0,97
HMC-C-03-A	0,004	0,05
HMC-C-04-A		0,13
HMC-C-05-A		1,02
HMC-C-06-A		0,19
HMC-N-01-A	0,13	0,28
HMC-N-02-A	0,15	0,29
HMC-N-03-A	0,05	
HMC-C-01-B		0,06
HMC-C-02-B		0,29
HMC-C-03-B		0,02
HMC-C-04-B		0,03
HMC-N-01-B		0,03
HMC-N-02-B		0,02
HMC-N-03-B		0,02

[1]Cellule Thp1 furono piastrate ad una concentrazione di $1x10^5$ cellule/pozzetto in 500 μM mezzo RPMI completo contenente 1% penicillina-streptomicina e 10% siero bovino fetale inattivato al calore in piastre da 24 pozzetti per 8 giorni con un cambiamento di mezzo a 5 giorni. I composti furono saggiati in triplicato in una curva concentrazione risposta di 6 punti a concentrazioni di 10, 1, 0,1 0,01, 0,001 e 0,0001 μM, con livelli di IL6 misurati 16 ore dopo la stimolazione con LPS. Le IC_{50} furono calcolate utilizzando Grafit, versione 6.0.12 (Erithacus Software).

[2]Cellule Thp1 furono piastrate ad una concentrazione di $1,7x10^5$ cellule/pozzetto in 150 μM mezzo RPMI completo contenente 1% penicillina-streptomicina e 10% siero bovino fetale inattivato al calore in piastre da 96 pozzetti per 3 giorni. I composti furono saggiati in triplicato in una curva concentrazione risposta di 9 punti a concentrazioni di 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, e 0,001 μM, con livelli di IL6 misurati 18 ore dopo la stimolazione con LPS. Le IC_{50} furono calcolate utilizzando GraphPad Prism, versione 5.04 per Window (GraphPad Software).

Questi dati dimostrano che i composti HMC descritti qui mostrano

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM-CPI 001

un'eccellente potenza nell'inibire il rilascio di IL6 da macrofagi umani, indicando la loro utilità nel trattamento di disturbi dove Il-6 è sovraregolata. I composti HMC-C-01-A, HMC-C-03-A, HMC-C-06-A, HMC-C-01-B, HMC-C-03-B, HMC-C-04-B, HMC-C-04-B, HMC-N-01-B, HMC-N-02-B e HMC-N-03-B mostrano un'attività particolarmente buona nel ridurre il rilascio di IL-6.

Studio biologico 5

Studi di farmacocinetica in roditori

L'assorbimento e la stabilità metabolica furono studiati utilizzando un saggio di farmacocinetica *in vivo*.

Tre ratti Sprague-Dawley maschio, dell'età di 8-12 settimane furono dosati con i composti in saggio somministrati o oralmente o per via endovenosa (livello di dose di 1 mg/kg peso corporeo per endovena o 5 mg/kg peso corporeo oralmente). I composti in saggio furono formulati in 0,5% carbossimetilcellulosa (CMS)/0,1% Tween-80 per la somministrazione tramite la via orale, o in 5% DMSO/10% solutolo in salina per la somministrazione tramite la via endovenosa. Per il composto HMC-C-01-A la somministrazione orale è stata formulata in 2% dimetilacetammide/20% idrossipropil-β-ciclodestrina in acqua. Gli animali ricevettero libero accesso al cibo lungo tutto lo studio eccetto per un digiuno notturno e sino a 2 ore dopo la dose nel giorno del dosaggio.

Campioni di sangue furono prelevati dal plesso retro-orbitale nei seguenti punti di tempo e posti in microprovette contenenti 20% soluzione K_2EDTA:

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Dosaggio orale: predose; 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 ore dopo la dose.

Dosaggio endovenoso: pre-dose; 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 ore dopo la dose.

I campioni di sangue furono centrifugati per ottenere plasma, che fu trasferito in un contenitore separato e congelato a -20°C.

Per l'analisi, i campioni furono scongelati a temperatura ambiente e preparati per precipitazione delle proteine con acetonitrile addizionato con il riferimento interno (500 ng/mL glipizide) nel rapporto 1:4 con plasma. I campioni furono quindi agitati per 5 minuti e centrifugati per 10 minuti a 20600xg a 4°C. 100 µL del surnatante furono raccolti per l'analisi. I campioni di riferimento furono preparati similmente, dopo aver aggiunto al bianco dei campioni di plasma di ratto 10 µL di analita.

La concentrazione del composto in saggio nei campioni di plasma di ratto fu determinata utilizzando LC-MS/MS, con le condizioni illustrate nella tabella seguente.

Tabella 6
Condizioni LC-MS/MS

HPLC:	Schimadzu Agilent
MS/MS:	API 4000
Software:	Analyst 1,5
Modo di ionizzazione:	Turbo spray, modo negativo
Modo di scansione:	Monitoraggio di reazione multipla (MRM)
Colonna:	Waters, Xterra, MS-C18(2) 5 µm 50x3,0 mm; Discovery Grace Smart RP 183 µ, 150x2,1, 3 µM; Waters Symmetry Shelf C1875x4,6, 3,5 µM; Agilent Zorbax XDB, 150x4,6, 5 µM
Temperatura colonna (°C):	40
Fase A:	Acetonitrile
Fase B:	0,1% acido formico
Velocità di flusso (mL/minuto):	0,8-12

I parametri farmacocinetici per i composti in saggio furono calcolati con Phoenix WinNonlin, versione 6,3 (Pharsight Corp, CA) utilizzando metodi convenzionali non-compartimentali. Le concentrazioni del plasma di picco (C_{max}) e il tempo della concentrazione plasmatica di picco (T_{max}) furono i valori osservati. L'area sotto la curva concentrazione plasmatica-tempo (AUC) fu determinata con l'uso della regola trapezoidale delle aree fino all'ultima concentrazione misurabile (AUC_{last}) e quindi per estrapolazione della fase di eliminazione terminale all'infinito (AUC_{inf}). La costante di velocità dell'eliminazione terminale (k_{el}) fu determinata con analisi di regressione della porzione terminale lineare della curva log concentrazione plasmatica-tempo. L'emi-vita ($t_{1/2}$) in fase di eliminazione fu calcolata come $0,693/k_{el}$. La biodisponibilità orale tentativa (F) fu calcolata dividendo la AUC

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

(0-24 ore) dopo somministrazione orale per la AUC corretta (0-8 ore) dopo somministrazione endovenosa (cioè, F = AUC(p.o.) x Dose(i.v.) / AUC(i.v.) x Dose(p.o.)) e riportata come percentuale (%).

I dati di farmacocinetica sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 7
Dati di farmacocinetica

Composto	Bio-disponibilità, F(%)	i.v. AUC (ng/mL/minuto)	p.o. AUC (ng/mL/minuto)	$T_{1/2}$ (ora)
ABD735	83	1081	8965‡	3,8
ABD836	55	2142	5927	5,3
ABD899	50	2133	10740‡	10,8
REF001	50	963	4766‡	7,2
HMC-C-01-A	89	900	4002	6,2
HMC-C-02-A	39	546	1069	3,2
HMC-C-03-A	55	1427	3910	2,4
HMC-N-01-A	64	740	1408	13,4
HMC-N-02-A	43	3053†	3303	6,3
HMC-N-03-A	8	5102†	962	3,1
HMC-N-04-A	66	1279	4203	2,9
HMC-C-01-B	67	1539	5121	5,7
HMC-C-03-B	116	816*	9432	8,3
HMC-C-04-B	59	1589*	9360	5,5
HMC-N-01-B	60	2824	8454	9,1
HMC-N-02-B	66	1931	6412	6,0
HMC-N-03-B	84	1380*	11609	7,4

†Dosato a 2 mg/kg per via endovenosa.
*Dosato a 0,5 mg/kg per via endovenosa.
‡Dosato a 10 mg/kg oralmente.

Questi dati dimostrano che i composti HMC descritti qui hanno eccellenti proprietà farmacocinetiche orali equivalenti a quelle dei composti di riferimento. Ciò li rende idonei per uso come farmaci orali.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPL001

Studio biologico 6

Artrite indotta da collagene nel topo

Topi DBA/1j maschio di da sette a otto settimane di età furono utilizzati per tutte le procedure. Gli animali furono stabulati in gruppi di 10, e furono mantenuti a 21°C±2°C su un ciclo di 12 ore luce/buio con cibo e acqua a volontà. Adiuvante completo di Freund (CFA) fu preparato emulsionando collagene bovino tipo II a 4 mg/ml con 4 mg/ml sospensione di micobacterium tubercolosis H37Ra in adiuvante incompleto di Freund (IFA) (0,85 mL olio di paraffina e 0,15 mL mannide monooleato) in un rapporto di 1:1 (v/v). Tutti i topi furono immunizzati sotto cute con 200 µg di collagene bovino tipo II in CFA. 21 giorni dopo, tutti i topi furono immunizzati sotto cute con 100 µg di collagene bovino tipo II in IFA.

I topi iniziarono a sviluppare segni e sintomi di artrite dopo l'immunizzazione di 'richiamo'.

Per la determinazione macroscopica dell'artrite, i seguenti segni furono monitorati in ciascuna zampa di ciascun topo tre volte alla settimana e sommati per generare l'indice artritico (AI) (il massimo AI per un animale è 16):

0 = nessun effetto visibile di artrite

1 = edema e/o eritema in 1 dito

2 = edema e/o eritema in 2 dita

3 = edema e/o eritema in più di 2 dita

4 = artrite grave dell'intera zampa e delle dita.

Gli animali furono suddivisi in gruppi di trattamento con un

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

indice artritico medio di 2,5 e quindi dosati una volta giornalmente per 14 giorni con il composto per somministrazione orale per i composti in saggio, o con iniezione sottocutanea ad una dose di 10 mg/kg per il controllo positivo, etanercept. Dopo completamento dell'esperimento, i topi furono sacrificati.

I dati furono analizzati generando una media dell'indice artritico lungo ciascun gruppo di trattamento. L'indice artritico medio era quindi confrontato con l'indice artritico degli animali di controllo (non trattati) utilizzando la seguente formula per generare una inibizione in percentuale della malattia.

$$\%\ \text{inibizione di malattia} = 100 - \left[\frac{\text{indice artritico medio: animali trattati}}{\text{indice artritico medio: animali non trattati}} * 100 \right]$$

I dati sono riassunti nella seguente tabella.

Tabella 8
Inibizione dell'artrite

Composto	Dose (mg/kg/giorno)	% inibizione di malattia
ABD735	10	44
ABD899	10	77
HMC-C-01-A	10	40
HMC-C-01-A	3	60
HMC-C-01-A	1	50
HMC-C-01-A	0,3	60
HMC-N-01-A	10	45
HMC-C-02-A	10	61
HMC-N-02-A	10	36
HMC-C-01-B	10	26
HMC-N-01-B	10->1 (*)	38

(*) Ridotta da 10 a 1 mg/kg/giorno a causa di mortalità.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

I dati per parecchi dei composti sono anche illustrati nelle Figure 1 e 2.

Figura 1 mostra sei grafici, ciascuno di un indice artritico medio come funzione del tempo (giorno di dosaggio) per il composto in saggio dosato a 10 mg/kg/giorno per somministrazione con sonda orale (circoletti vuoti) e per il controllo (circoletti pieni), per ciascuno di: (A) HMC-C-02-A (in alto a sinistra), (B) HMC-C-01-A (in alto in mezzo), (C) HMC-N-02-A (in alto a destra), (D) HMC-N-01-A (in basso a sinistra), (E) HMC-C-01-B (in basso in mezzo), (F) HMC-N-01-B (in basso a destra).

Figura 2 mostra due grafici, ciascuno di un indice artritico come funzione del tempo (giorno di dosaggio) per il composto in saggio (circoletti vuoti, quadretti vuoti), controllo (circoletti pieni) e un controllo positivo, il farmaco commercializzato etanercept (triangoletti), per ciascuno di (A) ABD899 a 10 mg/kg/giorno (sinistra), (B) HMC-C-01-A a 0,3 mg/kg/giorno e 3 mg/kg/giorno (destra).

Questi dati indicano che i composti HMC descritti qui mostrano una eccellente attività orale *in vivo* nel prevenire la progressione di artrite confermata, grave.

Inoltre, i dati mostrano l'attività eccezionale del composto HMC-C-01-A, che mostra una maggiore efficacia rispetto al trattamento di mercato, etanercept, a dosi basse. Questa attività è particolarmente sorprendente poichè HMC-C-01-A non è il composto più attivo sia nello Studio Biologico 1 o nello Studio Biologico 4.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Addizionalmente, l'attività di HMC-C-01-A è maggiore di quella del composto strettamente correlato, HMC-C-01-B, che è più attivo di HMC-C-01-A negli studi biologici 1 e 4, mostrando che la dimostrazione che l'identificazione dei composti con efficacia superiore non è nè triviale nè predittibile.

Studio biologico 7

Massima dose tollerata

La sicurezza acuta dei composti fu determinata in ratti allo scopo di permettere la determinazione della massima dose tollerata (MTD), un indice della sicurezza di un composto negli animali. Maggiore è la MTD, maggiore è la sicurezza potenziale del composto da saggiare.

Due ratti maschi e due ratti femmina Sprague-Dawley, dell'età di 8-12 settimane, furono dosati a ciascun livello di dose in un progetto di studio di dose crescente. I composti in saggio furono somministrati oralmente come sospensione formulata in 0,5% carbossimetilcellulosa (CMC)/0,1% Tween 80 in un volume di dosi di 10 mL/kg. Agli animali fu dato libero accesso al cibo lungo tutto lo studio.

Gli animali furono osservati in almeno due occasioni durante la prima ora dopo il dosaggio, approssimativamente 30 minuti di intervallo, e in seguito ad intervalli di un'ora per il rimanente del giorno di dosaggio per almeno 4 ore. Nei giorni successivi, gli animali furono osservati almeno una volta al mattino e una volta verso la fine della giornata. La natura e la gravità, dove

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

appropriato, dei segni clinici e il tempo furono registrati per ciascuna osservazione. Le osservazioni includevano cambiamenti nella pelle, pelo, occhi, e membrane mucosiche, ed anche nel sistema respiratorio, circolatorio, autonomico e nervoso centrale, così come attività somatomotoria e profilo di comportamento. Particolare attenzione fu diretta verso l'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma.

Dopo il completamento dello studio, i risultati furono espressi come la massima dose tollerata per ciascun composto, essendo questa la più alta di ciascuno senza tossicità inaccettabile.

La dose massima senza effetti collaterali inaccettabili fu determinata essere la MTD (espressa in mg/kg).

I dati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 9
Massima dose tollerata

Composto	Massima dose tollerata (mg/kg)	
	Femmine	Maschi
ABD735	20	10
ABD899	30	30
REF001	7,5	10
HMC-C-03-A	30	30
HMC-N-03-A	50	50
HMC-C-01-A[1]	70	70
HMC-C-01-A[2]	>500	>500
HMC-N-01-A	80	80
HMC-C-02-A	>200	>200
HMC-N-02-A	>200	>200

[1]Dosato in ratti Sprague-Dawley come descritto.
[2]Dosato in ratti Han Wistar.

Questi dati dimostrano che i composti HMC descritti qui mostrano

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

una sicurezza grandemente aumentata in confronto ai composti di riferimento ABD375, AD899 e REF001.

I dati dimostrano anche che il miglioramento della sicurezza acuta non è nè triviale nè predicibile e che profili di sostituzione similari, per esempio, quelli rinvenuti in REF001 possono portare ad una diminuzione nella sicurezza acuta. Inoltre, i dati mostrano l'eccezionale sicurezza dei composti HMC-C-01A, HMC-C-02-A, HMC-N-01-A e HMC-N-02-A, e particolarmente di HMC-C-01-A.

Gli aumenti nella dose massima tollerata osservati con i composti HMC descritti qui forniscono un margine di sicurezza migliorato in confronto ai composti di riferimento e sottolineano il potenziale dei composti HMC come farmaci orali.

Studio biologico 8

Saggi di genotossicità e di citotossicità GreenScreen HC

GreenScreen HC è un saggio basato su cellule di mammifero per misurare la genotossicità e la citotossicità di composti chimici e miscele.

Il termine genotossico è utilizzato per descrivere sostanze che sono in grado di provocare danno al materiale genetico (DNA) entro una cellula, che può alla fine avere effetti mutageni, carcinogeni o teratogeni nell'uomo.

Il saggio GreenScreen riporta il danno genotossico come un aumento in fluorescenza da un derivato geneticamente modificato della linea cellulare linfoblastoide umana TK6 p53-competente. Nelle cellule modificate, sequenze di DNA regolatorio che promuove una

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

trascrizione del gene GADD45a controllano l'espressione della Proteina Verde Fluorescente (GFP). GADD45a ha un ruolo centrale nell'integrità del genoma, e il danno genotossico induce la sua trascrizione. Esposizione ad un composto genotossico pertanto aumenta l'espressione di GFP, che è osservata come un aumento nella fluorescenza che è monitorata da rilevazione fluorescente utilizzando un lettore di piastre o un citometro a flusso. Nel saggio GreenScreen HC la fluorescenza è normalizzata alla misura dell'assorbanza ottica per correggere la variazione nella resa cellulare provocata da perdita di vitalità cellulare o citotossicità. La soglia statisticamente definita per un risultato positivo nel saggio GreenScreen HC è 1,5, cioè, 50% di induzione sopra e sotto il basale per il controllo trattato con il veicolo.

La citotossicità è misurata nel saggio GreenScreen insieme alla genotossicità e i risultati della determinazione di citotossicità sono utilizzati per normalizzare le misure di genotossicità come descritto precedentemente.

Nel saggio GreenScreen HC, la vitalità cellulare è determinata utilizzando il saggio di captazione di propidio ioduro. Propidio ioduro è un agente intercalante e una molecola fluorescente che può essere utilizzata per colorare le cellule. E' comunemente utilizzato per determinare quantitativamente il contenuto di DNA per valutare la vitalità della cellula o il contenuto di DNA nell'analisi di ciclo cellulare e può essere utilizzato per differenziare cellule necrotiche, apoptotiche e normali (vedi, per esempio, Dengler et al.,

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

1995, Anticancer Drugs, Vol.6, n.4, pp.522-532). Esposizione a un composto citotossico aumenta l'assunzione di propidio ioduro, che è monitorata con assorbanza ottica ed è proporzionale alla proliferazione cellulare. I composti citotossici sono quelli che mostrano una diminuzione osservata nella sopravvivenza della popolazione relativa al di sotto di una soglia significativa impostata al 90% in confronto al controllo trattato con il veicolo, ad una o più concentrazioni del saggio.

Una serie di diluizioni di ciascun composto in saggio è generata in parallelo in una micropiastra nera da 96 pozzetti con una base otticamente trasparente. Un composto genotossico di riferimento (metile metansolfonato, MMS) è aggiunto come controllo di qualità intra-piastra. Le piastre sono analizzate a punti di tempo di 24 ore e 48 ore utilizzando un lettore per micropiastre, che fornisce misure di assorbanza di luce e di fluorescenza per cellule e soluzioni nei pozzetti delle micropiastre.

In aggiunta alle misure di vitalità cellulare e di genotossicità descritte precedentemente, il saggio GreenScreen incorpora una determinazione degli effetti dell'attivazione metabolica nel saggio, il "saggio GreenScreen HC S9". Per realizzare ciò, le cellule sono incubate sia in presenza che in assenza dell'estratto di fegato surnatante post-mitocondriale (noto come "S9"). S9 è normalmente utilizzato nella tossicologia genetica per supplementare le cellule in esame con metabolismo di fase I di mammifero. Per determinare l'attivazione metabolica, i composti sono incubati con il ceppo TK6

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

in presenza di 1% v/v frazione S9 miscelate per 3 ore con un tempo di recupero successivo di 45 ore. Dopo il periodo di recupero, il segnale di fluorescenza GFP e la vitalità cellulare (determinata con assorbimento di propidio ioduro) sono misurati utilizzando un citometro a flusso. Ciclofosfammide, un controllo comunemente utilizzato in studi di genotossicità utilizzante attivazione metabolica, è utilizzata come controllo positivo nel saggio. Nel saggio GreenScreen HC S9, la genotossicità è valutata dall'induzione nell'espressione di GFP quantificato utilizzando la fluorescenza media del campione e la citotossicità utilizzando il saggio di assunzione di propidio ioduro descritto precedentemente. La soglia statisticamente definita per un risultato di genotossicità positivo è 1,3, cioè, 30% di induzione sopra e al disotto della linea di base per il controllo trattato con il veicolo e il risultato è riportato come positivo o negativo. I composti citotossici sono quelli che mostrano una diminuzione osservata nella sopravvivenza della popolazione relativa al di sotto di una soglia significativa impostata al 90% in confronto con il controllo trattato con il veicolo, ad una o più concentrazioni di saggio.

Linee cellulari reporter stabilmente tranfettate furono derivate da una linea cellulare TK6 linfoblastoide umana p53-competente. La linea cellulare reporter porta un plasmide episomialmente replicante portante la regione promotore a monte e altre sequenze regolatorie del gene umano GADD45a legato al gene della proteina fluorescente verde (GFP) ottimizzato umano. La linea cellulare di controllo porta

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

un plasmide identico eccetto per la rimozione di 4 coppie di basi alla partenza del gene EGFP, così che GFP non è prodotta. Entrambi i plasmidi portano anche un gene conferente resistenza alla igromicina B alla linea cellulare, permettendo la selezione continuata per la presenza del plasmide (200 µg/mL igromicina B; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Entrambe le linee cellulari furono mantenute in mezzo di coltura completo (RPMI 1640 con GlutaMAX™ e 25 mM acido N-2-idrossietilpiperazin-N'-2-etansolfonico (Invitrogen Corporation) supplementato con 10% (v/v) siero di cavallo donatore inattivato al calore (Lonza Wokingham Ltd., Wokingham, UK), 10 mM sodio piruvato (Invitrogen Corporation) e 5000 U/ml penicillina G sodica con 5000 µg/ml streptomicina solfato (Invitrogen Corporation)) a 37°C con 5% CO_2 in atmosfera umidificata.

Ciascuna piastra di saggio è preparata per determinare ciascun composto di saggio lungo nove diluizioni seriali di due volte, con entrambi il ceppo reporter e la linea cellulare di controllo che contiene le medesime modificazioni genetiche come il ceppo di saggio, ma non produce GFP a causa di un minor cambiamento nella sequenza all'inizio del gene GFP inserito. Esposizioni di quarantotto ore furono eseguire in micropiastre da 96 pozzetti di polistirene con fondo piatto otticamente trasparenti, con pareti nere sterili. Pozzetti in duplicato sia di concentrazioni 'alte' (50 µg/mL) che 'basse' (10 µg/mL) di metile metansolfonato furono inclusi come controlli positivi intrapiastra per fornire l'accettabilità dei dati. Altri pozzetti di controllo includevano cellule trattate col veicolo

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

(1% v/v DMSO) come controllo negativo, il mezzo di saggio solo per controllare la contaminazione, e il composto in saggio con un mezzo di saggio per determinare qualunque fluorescenza e/o assorbanza ottica intrinseca a causa del colore o della precipitazione.

Membrane traspiranti (BreathEasy, Diversified Biotech, USA) furono applicate alle micropiastre prima di un vigoroso sbattimento (20 secondi). Questo fu seguito da incubazione statica per 48 ore a 37°C e 5% CO_2 in atmosfera umidificata. Dopo 48 ore, le micropiastre furono sbattute vigorosamente per 10 secondi per ri-sospendere le cellule prima dell'acquisizione dei dati spettrofotometrici. I dati di fluorescenza furono normalizzati ai dati di assorbanza per dare un valore di 'lucentezza' relativo alla media dei controlli trattati col veicolo e riportati in grafico rispetto alla concentrazione del composto. Un aumento nella lucentezza del 50% fu classificato come risultato positivo per la genotossicità: ciò riflette un aumento maggiore di tre volte la deviazione standard nei dati di fluorescenza da cellule trattate col veicolo e non trattate con genotossina. I dati di assorbanza furono normalizzati al controllo trattato col veicolo e riportati in grafico come citotossicità. Una citotossicità del 90% riflette una caduta statisticamente significativa nella resa cellulare ed è registrata come un effetto tossico inibitorio della crescita.

I dati grezzi raccolti da micropiastre del saggio GreenScreen HC, utilizzando la micropiastra furono automaticamente analizzati

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

utilizzando un modello del programma GreenScreen HC per produrre un riassunto dei risultati per i seguenti parametri: concentrazioni efficaci più basse (LEC) che inducono risultati positivi nel saggio di esclusione del propidio ioduro (cioè, perdita di vitalità cellulare) a 24 ore e a 48 ore in presenza e in assenza della frazione S9; effetti negativi o positivi sulla genotossicità.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Tabella 10
Citotossicità e genotossicità

Composto	Citotossicità, LEC (μM)			Genotossicità
	24 ore	48 ore, -S9	49 ore, +S9	
ABD735	0,31	0,31	5	Negativo
ABD836	0,04	0,01	40	Positivo
ABD899[1]	<0,001	<0,001	0,32	Positivo
ABD899[2]	0,64	0,08	81,9	Negativo
ABD900	0,29	0,07	74,1	Negativo
REF001	0,039	0,039	0,63	Positivo
HMC-C-01-A	0,47	0,12	60	Negativo
HMC-C-02-A	>1000	60	120	Negativo
HMC-C-03-A	0,24	0,06	15	Negativo
HMC-N-01-A	0,94	0,12	60	Negativo
HMC-N-02-A	0,94	0,47	120	Negativo
HMC-N-03-A	0,94	0,24	30	Negativo
HMC-N-04-A	0,47	0,12	30	Negativo
HMC-C-01-B	0,08	0,005	4,82	Negativo
HMC-C-03-B	0,17	0,08	10,8	Positivo
HMC-N-01-B	0,01	0,05	5,85	Negativo
HMC-N-02-B	0,04	0,01	10,2	Negativo

[1]Un lotto in scala laboratorio fu saggiato nell'intervallo da 1,3 mM a 0,3 pM.
[2]Un lotto in scala media fu saggiato nell'intervallo da 164 μ, a 0,003 μM.

Questi dati indicano che i composti HMC descritti qui mostrano una citotossicità ed una genotossicità migliorate o almeno simili ai composti di riferimento e sono marcatamente migliori di ABD836 e REF001 in particolare.

I dati dimostrano anche i cambiamenti richiesti per migliorare i profili di citotossicità o di genotossicità non sono nè triviali nè predicibili. Ciò è particolarmente evidenziato dai profili dei composti strettamente correlati ABD836 e HMC-N-02-A.

Inoltre, i dati mostrano l'eccezionale sicurezza rispetto alla

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

citotossicità generale dei composti HMC-C-02-A, HMC-C-01-A, HMC-N-02-A, e HMC-N-01-A.

Studio biologico 9

Saggio dei canali ionici hERG

L'inibizione del canale ionico umano del gene correlato etere-a-go-go (hERG) media la ri-polarizzazione della corrente IKr nel potenziale di azione cardiaco, indicando pertanto che contribuisce all'attività elettrica che coordina il battito cardiaco. Quando la capacità di hERG di condurre una corrente elettrica lungo la membrana cellulare è inibita o compromessa ciò può determinare un disturbo potenzialmente fatale chiamato sindrome QT lunga. Questa associazione tra hERG e la sindrome QT lunga ha reso l'inibizione di hERG un importante anti-bersaglio che deve essere vitato durante lo sviluppo di un farmaco.

L'attività dei composti contro il canale ionico hERG fu saggiata. Il saggio fu eseguito utilizzando il metodo Q-patch del blocco d'area automatizzato utilizzando cellule di ovaio di criceto cinese stabilmente transfettate (hERG-CHO). Le cellule hERG-CHO furono coltivate in mezzo miscela nutriente di Kaighn F-12 (Invitrogen) più 10% FBS a 37°C per 1-3 giorni. Le cellule furono mantenute a 30°C per da 24 a 48 ore prima del blocco d'area allo scopo di aumentare l'ampiezza della corrente hERG. Successivamente, le cellule furono raccolte per tripsinizzazione, e mantenute in mezzo privo di siero (SFM) nello stato di preparazione delle cellule Q-patch sino a 6 ore a temperatura ambiente prima di essere lavate e

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

ri-sospese in soluzione extracellulare e applicate ai siti del blocco d'area per la registrazione dei dati.

Il protocollo di voltaggio del blocco d'area: dopo che l'intera configurazione delle cellule fu ottenuta, la cellula fu mantenuta a -80 mV. Un impulso di 50 millisecondi a -40 mV fu somministrato per misurare la corrente di perdita, che fu sottratta dalla corrente di coda in-linea. Quindi la cellula fu depolarizzata a +20 mV per 2 secondi, seguiti da un impulso da 1 secondo a -40 mV per rivelare la corrente di coda di hERG. Questo paradigma fu somministrato una volta ogni 5 secondi per monitorare l'ampiezza della corrente.

Soluzione extracellulare: 137 mM NaCl, 4 M KCl, 1,8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM D(+)-glucosio, 10 mM tampone HEPES (pH corretto a 7,4 con NaOH).

Dopo che l'intera configurazione della cellula fu ottenuta, la soluzione extracellulare (controllo) fu applicato per prima e la cellula fu stabilizzata per 2 minuti in soluzione extracellulare. Il composto del saggio fu quindi applicato da basse concentrazioni ad alte concentrazioni in maniera cumulativa. La cellula fu incubata con ciascuna concentrazione di saggio per 5 minuti. Durante ciascuna incubazione, la cellula fu ripetutamente stimolata utilizzando il protocollo di voltaggio descritto precedentemente, e l'ampiezza della corrente di coda fu continuamente monitorata.

Criteri di accettabilità:

(1) Corrente di coda di picco > 100 pA nel controllo

(2) Corsa iniziale <30% e la corsa iniziale si ferma prima

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

della prima applicazione del composto in saggio

(3) Correnti di perdita <50% delle correnti di coda di picco del controllo in qualunque tempo

(4) rs <20 MQ lungo tutto l'esperimento.

Il grado di inibizione (%) fu ottenuto misurando l'ampiezza della corrente di coda, indotta da un impulso di saggio di un secondo a -40 mV dopo un impulso di 2 secondi a +20 mV, prima e dopo l'incubazione con il composto in saggio. La differenza nella corrente fu normalizzata al controllo e moltiplicata per 100 allo scopo di ottenere l'inibizione percentuale.

Curve concentrazione (log) risposta furono inserite in una equazione logistica (tre parametri assumendo completo blocco della corrente alle concentrazioni molto alte del composto in saggio) per generare stime della concentrazione inibitoria al 50% (IC_{50}). La relazione concentrazione-risposta di ciascun composto fu costruita dalle riduzioni percentuali dell'ampiezza della corrente con concentrazioni sequenziali.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 11
Inibizione del canale ionico hERG

Composto	IC_{50} (pM) [1]	% inibizione a 30 µM
ABD599	4,9	85
ABD735	-	62,5
ABD836	-	50
ABD899	2,9	100[2]
ABD899		53[3]
ABD900		51
REF001	-	60
HMC-C-01-A	19,3	79
HMC-C-02-A	25	57
HMC-C-03-A	>30	45
HMC-C-04-A		69
HMC-N-01-A	183	2
HMC-N-02-A	231	31
HMC-N-03-A	>30	13
HMC-N-04-A	>30	26
HMC-C-01-B		74
HMC-C-02-B		94
HMC-C-03-B		36
HMC-N-01-B		27
HMC-N-02-B		23
HMC-N-03-B		47
HMC-N-04-B		60

[1] IC_{50} furono calcolati utilizzando l'equazione logaritmica a quattro parametri calcolata automaticamente in Grafit, versione 6.0.12 (Erithacus Software Ltd., da Dr. Robin Leatherbarrow).
[2] Un lotto in scala di laboratorio fu saggiato.
[3] Un lotto in scala media fu saggiato.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

I dati dimostrano che i composti HMC descritti qui hanno proprietà di sicurezza cardiaca richieste per un farmaco oralmente attivo, ed hanno vantaggi di sicurezza in confronto ai composti di riferimento, come ABD599 e ABD899, con HMC-N-01-A, HMC-N-02-A e HMC-N.03-A mostranti un profilo particolarmente positivo.

Studio biologico 10

Studi di leucociti primari umani

Il sistema immunitario umano interessa un complesso gruppo di cellule e organi che possono essere negativamente influenzati da farmaci o sostanze chimiche. Ciò determinata una aumentata suscettibili a infezioni, tumori, risposte allergiche, reazioni autoimmuni o altre forme di malattia del sistema immunitario. La determinazione della immunotossicità è, pertanto, un componente importante della valutazione di sicurezza di nuovi farmaceutici, e il profilo ideale per un farmaco potenziale antiinfiammatorio che agisce modulando il sistema immunitario è uno che dimostra selettività per certi sotto-insiemi di cellule del sistema immunitario con nessun effetto sulle altre, evitando pertanto l'attivazione o la soppressione immunitaria generale. Per esempio, un farmaco che riduce la vitalità o l'attività dei monociti con nessun effetto sui neutrofili sarebbe ritenuto possedere proprietà antiinfiammatorie con applicazione in numerose malattie senza compromettere la capacità di un paziente di rispondere a, e liberarsi delle infezioni.

La capacità di un composto di riferimento (ABD735) di influenzare la vitalità dei globuli bianchi umani fu investigata

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

utilizzando cellule derivate da sangue intero umano. Gli effetti di un composto di riferimento (ABD735) furono saggiati sui seguenti tipi di globuli bianchi umani: neutrofili, monociti, B-linfociti e T-linfociti, comprendenti sia popolazioni CD4-positive (T-helper) che CD8-positive (T-citotossiche). Ciascuno di questi tipi cellulari ha una differente funzione nel sistema immunitario umano.

I neutrofili sono anche noti come granulociti. Essi sono i globuli bianchi più abbondanti nell'uomo e formano parte del sistema immunitario innato. I neutrofili agiscono come la risposta primaria contro la fase acuta dell'infiammazione provocata dall'infezione batterica.

I monociti sono parte del sistema immunitario innato rinvenuto nel circolo. I monociti di sangue periferico si differenziano per formare macrofagi, che sono i precursori di numerose cellule implicate nel modulare la risposta immunitaria, includendo le cellule dendritiche. La funzione primaria dei monociti-macrofagi è di agire come cellule effettore immunitarie. Essi sono pesantemente implicati nella patogenesi di parecchie condizioni infiammatorie croniche includenti artrite reumatoide e sclerosi multipla.

I linfociti T sono parte del sistema immunitario adattivo e svolgono un ruolo centrale nell'immunità. Ci sono parecchi sotto-gruppi di linfociti T, ciascuno dei quali possiede una differente funzione nel sistema immunitario. I linfociti T citotossici sono anche noti come cellule T CD8+ a seguito della presenza di una molecola chiamata CD8 sulla loro superficie. Il loro ruolo è di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

distruggere le cellule infette e le cellule tumorali, ma in condizioni di infiammazione, essi possono anche esacerbare la malattia. I linfociti T-helper sono anche noti come cellule T CD4+ a seguito della presenza di una molecola chiamata CD4 sulla loro superficie. La funzione delle cellule T-helper è di assistere la maturazione dei linfociti B e di attivare le cellule T citotossiche.

I linfociti B sono parte del sistema immunitario adattativo. Le loro principali funzioni sono di preparare anticorpi e di agire come cellule presentanti antigene, il che permette ai linfociti T di riconoscere antigeni estranei.

Gli effetti del composto di riferimento (ABD735) sulla vitalità dei neutrofili, monociti, e cellule T CD4+ e CD8+ e linfociti B furono determinati sia in condizioni di riposo che stimolate. Le condizioni di riposo furono utilizzate per determinare effetti plausibili sulle cellule normali rinvenute nel sangue umano, e le condizioni stimolate furono utilizzate per determinare gli effetti del composto in condizioni di malattia.

Gli effetti sulla vitalità cellulare furono determinati utilizzando citometria di flusso. La citometria di flusso è una tecnologia biofisica basata su laser impiegata nella conta delle cellule, separazione delle cellule e rilevazione di bio-marcatori, sospendendo le cellule in una corrente di liquido e passandole da uno strumento di rilevazione elettronico. Permette l'analisi simultanea di molti parametri delle caratteristiche chimiche e fisiche fino a migliaia di particelle per secondo. La separazione di cellule

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

utilizzando citometria di flusso richiede l'uso di specifici marcatori cellulari. Per quantificare i numeri delle cellule, sferette di conta sono utilizzate come riferimento interno. Le sferette di conta sono una sospensione calibrata di microsferette che sono aggiunte ad un volume noto di campione così che il volume del campione per sferetta è noto. Ciò permette la determinazione assoluta del numero di cellule in un campione. In aggiunta, per i linfociti B e T, la proliferazione cellulare fu misurata utilizzando un colorante noto come colorante di proliferazione cellulare (eFluor® 450). eFluor® 450 è un colorante organico che può essere coniugato a marcatori cellula-specifici. Fluoresce quando eccitato da un laser in un modo proporzionale al numero di cellule legate dal coniugato. Il suo segnale pertanto fornisce un indice della proliferazione di specifici tipi cellulari.

Isolamento dei neutrofili e determinazione dell'impatto sulla sopravvivenza

I neutrofili furono isolati da sangue intero (raccolto da donatori sani) con un gradiente di densità in due passaggi Histopaque® 1077 e Histopaque® 1119. Cellule polimorfonucleari furono lavate in mezzo RPMI supplementato con antibiotici (penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL) e ri-sospese a $2x10^6$ cellule/mL in RPMI supplementato con 10% siero di vitello fetale (FCS) e antibiotici (penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL). Quindi, 50 µL della sospensione cellulare furono aggiunti ad una piastra da 96 pozzetti, con o senza composto di riferimento (ABD735) (a 30, 10,

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

3, 1 o 0,3 µM) o controllo (0,3% DMSO), con o senza dexametasone (1 µM) e incubate a 37°C/5% CO_2 per 24 ore. Dopo l'incubazione, le cellule furono fissate e un volume estratto di sferette di conta fu aggiunto a ciascuna provetta per calcolare il numero di cellule vive.

Isolamento di monociti e determinazione dell'impatto sulla sopravvivenza

PBMC (cellule mononucleari di sangue periferico) furono raccolte da donatori sani (tutti maschi) e isolate per centrifugazione su uno strato di Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Le cellule furono quindi ri-sospese ($3x10^6$ cellule/mL in RPMI supplementato con 10% FCS ed antibiotici (penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL) e 1 mL di sospensione cellulare furono aggiunti ad una piastra da 48 pozzetti, che fu quindi incubata per 1 ora a 37°C/5% CO_2. Successivamente, il surnatante fu aspirato per rimuovere le cellule non aderenti, che fu seguito da due passaggi di lavaggio per assicurare la rimozione delle cellule non aderite. Le cellule aderite (monociti) furono quindi stimolate o con LPS (10 ng/mL), TNFα (10 ng/mL) o fattore stimolante colonie dei macrofagi (M-CSF) (10 ng/mL) in assenza (controllo) o presenza del composto di riferimento (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) per 48 ore a 37°C/5% CO_2. Successivamente, le piastre furono centrifugate e i monociti lavati in PBS prima dell'aggiunta di PBS più EDTA (10 mM) e incubazione a 4°C per 20 minuti per aiutare il distacco delle cellule, che fu facilitato da pipettazione. I monociti furono aggiunti a provette Falcon e lavati per centrifugazione con PBS prima che un volume esatto di sferette di conta venisse aggiunto

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

a ciascuna provetta per calcolare il numero di cellule vive.

Isolamento di linfociti B e determinazione dell'impatto sulla sopravvivenza

PBMC (cellule mononucleari di sangue periferico) furono raccolte da donatori sani (tutti femmina) e isolate per centrifugazione su uno strato di Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Le cellule furono quindi ri-sospese in RPMI supplementato con 10% FCS ed antibiotici (penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL). La sospensione cellulare fu aggiunta ad una piastra da 96 pozzetti con o senza composto di riferimento (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o controllo (0,3% DMSO) con o senza una combinazione di *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) e interleuchina-2 (SAC/IL-2) (1:10.000 e 2 ng/mL) e incubate a 37°C/5% CO_2 per 48 ore. Dopo incubazione, le cellule furono colorate con CD19 anti-uomo prima che un volume esatto di sferette di conta fosse aggiunto a ciascuna provetta per calcolare il numero di cellule vive.

Isolamento di cellule B e determinazione dell'impatto sulla proliferazione

PBMC (cellule mononucleari di sangue periferico) furono raccolte da donatori sani (tutti femmina) e isolate per centrifugazione su uno strato di Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Le cellule furono quindi colorate con il colorante di proliferazione cellulare, che misura la proliferazione delle cellule (eFluor® 450) e ri-sospese in RPMI supplementato con 10% FCS ed antibiotici (penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL). La sospensione cellulare fu aggiunta ad una

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

piastra da 96 pozzetti con o senza il composto di riferimento (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o controllo (0,3% DMSO) con o senza una combinazione di *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) e interluechina-2 (SAC/IL-2) (1:10.000 e 2 ng/mL) e incubate a 37°C/5% CO_2 per 5 giorni. Dopo incubazione, le cellule furono colorate con CD19 anti-uomo, un marcatore di B-linfociti, prima di essere analizzate su un citometro a flusso. Le cellule che erano e450 basse furono ritenute avere proliferato.

Isolamento delle cellule T e determinazione dell'impatto sulla sopravvivenza

PBMC (cellule mononucleari di sangue periferico) furono raccolte da donatori sani (tutti femmine) e isolate per centrifugazione su uno strato di Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Le cellule furono quindi ri-sospese a $2x10^6$ cellule/mL in RPMI supplementato con 10% FCS ed antibiotici (penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL). La sospensione cellulare fu aggiunta ad una piastra da 96 pozzetti con o senza il composto di riferimento (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o controllo (0,3% DMSO) con o senza fitoemagglutinina (PHA, 5 µg/mL) e incubati a 37°C/5% CO_2 per 48 ore. Dopo incubazione, le cellule furono colorate con anti-CD8 o CD4 umana prima che un volume esatto di sferette di conta fosse aggiunto a ciascuna provetta per calcolare il numero delle cellule vive.

Isolamento di cellule T e determinazione dell'impatto sulla proliferazione

PBMC (cellule mononucleari di sangue periferico) furono raccolte

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

da donatori sani (tutti femmina) e isolate per centrifugazione su uno strato di Ficoll Paque (GE Healthcare, UK). Le cellule furono quindi colorate con il colorante di proliferazione cellulare (eFluor® 450) e ri-sospese in RPMI supplementato con 10% FCS ed antibiotici (penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/mL). La sospensione cellulare fu aggiunta ad una piastra da 96 pozzetti con o senza il composto di riferimento (ABD735) (a 30, 10, 3, 1, o 0,3 µM) o controllo (0,3% DMSO) con o senza fitoemagglutinina (PHA, 5 µg/mL) e incubate a 37°C/5% CO_2 per 5 giorni. Dopo incubazione, le cellule furono colorate con anti-CD8 o CD4 umana prima di essere analizzate su un citometro a flusso. Le cellule che erano e450 basse furono ritenute avere proliferato.

I risultati medi (n=3) per il composto di riferimento (ABD735) furono espressi come un numero di cambiamento rispetto al valore di controllo medio. I dati furono quindi riportati in grafico utilizzando un programma da Grafit (Erithacus Software). Ciascun esperimento fu ripetuto tre volte e i dati sono presentati come media di tutti gli esperimenti.

I risultati sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Tabella 12
Vitalità cellulare in presenza di ABD735 (3 µM)

Tipo cellula	Stimolazione	Cambiamento nella vitalità
Neutrofili	-	1,0
	Desametasone	0,8
Linfociti B	-	0,9
	SAC/IL-2	1,1
Linfociti T CD4+	-	0,9
	fitoemagglutinina	0,6
Linfociti T CD8+	-	0,8
	fitoemagglutinina	0,7
Monociti	-	0,7
	M-CSF	1,1
	LPS	1,0
	TNFα	0,5

Tabella 13
Proliferazione cellulare in presenza di ABD735 (3 µM)

Tipo cellula	Stimolazione	Cambiamento nella proliferazione
Linfociti B	-	0,9
	SAC/IL-2	0,6
Linfociti T CD4+	-	1
	fitoemagglutinina	0,6
Linfociti T CD8+	-	0,7
	fitoemagglutinina	0,3

I risultati da una singola alta concentrazione (3 µM) del composto di riferimento (ABD735) lungo i tipi di leucociti sono mostrati precedentemente. In questo saggio, un cambiamento di 0,5 o inferiore è significativo per la perdita di vitalità, ed un cambiamento di 0,6 o inferiore è significativo per riduzioni nella proliferazione.

Può essere osservato da questi dati che il composto di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

riferimento (ABD735) riduce selettivamente la vitalità dei monociti in presenza del solo TNFα, e non in presenza o di M-CSF o di LPS. In aggiunta, il composto di riferimento (ABD735) ha un effetto molto piccolo sulla vitalità dell'altra popolazione di leucociti indicando che i composti da questa serie non sono generalmente immuno-soppressori. Il composto di riferimento (ABD735) è anche mostrato ridurre la proliferazione dei linfociti, con gli effetti più profondi osservati nei linfociti T CD8+ stimolati. Un profilo come questo, con riduzione selettiva nella proliferazione delle sotto-popolazioni di microciti è un profilo meccanicistico attraente per il trattamento di malattie dell'infiammazione come artrite reumatoide, lupus sistemico eritematoso, morbo di Crohn, e sclerosi multipla, così come per il trattamento delle leucemie, includendo il linfoma delle cellule T, come il linfoma delle cellule T extranodale, il linfoma delle cellule T cutaneo, linfoma delle cellule grandi anaplastiche e linfoma delle cellule T angioimmunoblastico; linfoma delle cellule B, come linfomi di Hodgkin, e non-Hodgkin, includendo linfoma delle cellule B grandi diffuso, linfoma follicolare, linfoma del tessuto linfatico associato alla mucosa, linfoma linfocitico delle cellule piccole, linfoma delle cellule a mantello, e linfoma di Burkitt; ed altre leucemie, come leucemia linfocitica cronica e mieloma multiplo.

Studio biologico 11

Studio di artrite indotta da pristano nel ratto

Ratti Lewis femmina furono utilizzati per tutte le procedure. Gli animali furono stabulati in gruppi di 5, e furono mantenuti a

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

21°C ±2°C su un ciclo di 12 ore luce/buio con cibo e acqua a volontà. L'artrite fu indotta dalla somministrazione di 0,3 mL di pristano per via intradermica alla base della coda. I ratti iniziarono a sviluppare segni e sintomi dell'artrite approssimativamente sette giorni dopo l'iniezione di pristano.

Per la determinazione macroscopica dell'artrite, i seguenti segni furono monitorati in ciascuna zampa di ciascun topo tre volte alla settimana e sommati per generare l'indice artritico (AI) (il massimo AI per un animale è 16):

0 = nessun effetto visibile di artrite

1 = edema e/o eritema in 1 dito

2 = edema e/o eritema in 2 dita

3 = edema e/o eritema in più di 2 dita

4 = artrite grave dell'intera zampa e dita includendo deformazione degli arti e anchilosi dell'articolazione.

Gli animali furono suddivisi in gruppi di trattamento prima della somministrazione del pristano e dosati una volta al giorno per 28 giorni con il composto in saggio a dosi di 3 e 10 mg/kg/giorno per somministrazione con sonda orale, o per iniezione intraperitoneale ad una dose di 0,05 mg/kg per il controllo positivo, metotrexato. Dopo il completamento dell'esperimento, i ratti furono sacrificati.

I dati furono analizzati generando una media dell'indice artritico lungo ciascun gruppo di trattamento. L'indice artritico medio fu quindi confrontato con l'indice artritico degli animali di

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

controllo (non trattati) utilizzando la seguente formula per generare una inibizione in percentuale della malattia.

$$\% \text{ inibizione di malattia} = 100 - \left[\frac{\text{indice artritico medio: animali trattati}}{\text{indice artritico medio: animali non trattati}} * 100 \right]$$

I dati sono riassunti nella seguente tabella.

Tabella 14
Inibizione dell'artrite

Composto	Dose (mg/kg/giorno)	% inibizione della malattia
ABD899	3	21
ABD899	10	ND[1]
HMC-C-01-A	3	40
HMC-C-02-A	10	67
HMC-N-01-A	3	39
HMC-N-01-A	10	60

[1]Il dosaggio fu terminato nel giorno 10 a seguito di effetti negativi.

I dati per parecchi dei composti sono illustrati anche nella Figura 3.

La Figura 3 mostra sei grafici, ciascuno dell'indice artritico medio come funzione del tempo (giorno di dosaggio) per il composto in saggio (circoletti vuoti), controllo (circoletti pieni), e controllo positivo, metotrexato (triangolini) per ciascuno di: (A) ABD899 dosato a 3 mg/kg/giorno (in alto a sinistra), (B) HMC-C-01-A dosato a 3 mg/kg/giorno (in alto in mezzo), (C) HMC-N-01-A dosato a 3 mg/kg/giorno (in alto a destra), (D) ABD899 dosato a 10 mg/kg/giorno (in basso a sinistra), (E) HMC-C-01-A dosato a 10 mg/kg/giorno (in basso in mezzo) e (F) HMC-N-01-A dosato a 10 mg/kg/giorno (in basso a

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

destra).

Questi dati indicano che i composti HMC descritti qui mostrano eccellenti attività orali *in vivo* nel prevenire la progressione dell'artite indotta da pristano, mentre il composto ABD899 ha un effetto limitato sulla malattia in questo modello, nonostante la buona attività nello studio biologico 6. In aggiunta, i composti HMC-C-01-A e HMC-N-01-A furono tollerati bene dagli animali durante il dosaggio esteso, mentre ABD899 fu modestamente tollerato così che fu necessario terminare il dosaggio e rimuovere gli animali che lo ricevevano dallo studio (mostrato in Figura 3, riquadro D). Inoltre, il composto HMC-C-01-A mostrò un'efficacia particolarmente buona nel modello, che era equivalente a quello della terapia di prima linea sul mercato per l'artrite reumatoide, metotrexato.

I dati mostrano ulteriormente che l'identificazione di composti con efficacia superiore non è nè triviale nè predicibile.

Quanto sopra ha descritto i principi, le forme di realizzazione preferite, e modi operativi della presente invenzione. Comunque, l'invenzione non dovrebbe essere considerata come limitata dalle particolari forme di realizzazione discusse. Invece, le forme di realizzazione discusse precedentemente dovrebbero essere considerate come illustrative invece che restrittive. Dovrebbe essere apprezzato che variazioni possono essere apportate in quelle forme di realizzazione da esperti nell'arte senza allontanarsi dall'ambito della presente invenzione.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

RIFERIMENTI

Un numero di pubblicazioni sono citate qui allo scopo di descrivere più completamente e divulgare l'invenzione e lo stato dell'arte alla quale l'invenzione appartiene. Citazioni complete di queste pubblicazioni sono fornite di seguito. Ciascuna di queste pubblicazioni è incorporata qui come riferimento interamente nella presente divulgazione, nella stessa misura come se ciascuna singola pubblicazione fosse specificatamente e singolarmente incorporata per riferimento.

Akahoshi et al., 2008, "Promoter polymorphisms in the IRF3 gene confer protection against systemic lupus erythematosus", Lupus, Vol. 17 pp. 568-574.
Astry et al., 2011, "A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis", J Interferon Cytokine Res., Vol. 31, pp.927-940.
Bahmanyar *et al.*, 2010, "Aminotriazolopyridines and their use as kinase inhibitors", international patent publication number WO 2010/027500 A1 published 11 March 2010.
Baud et al., 1999, "Signalling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain", Genes Dev., Vol. 13, pp. 1297-1308.
Baud et al., 2009, "Is NFκB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls", Nat. Rev. Drug Disc., Vol. 8, pp. 33-40.
Billiau, 2010, "Etanercept improves linear growth and bone mass acquisition in MTX-resistant polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis", Rheumatology (Oxford), Vol. 49, pp. 1550-1558.
Bladh *et al.*, 2006, "Novel sulphonamide derivatives as glucocorticoid receptor modulators for the treatment of inflammatory diseases", international patent publication number WO 2006/046916 A1 published 04 May 2006.
Brennan et al., 1992, "Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints", Eur. J. Immunol., Vol. 22, pp. 1907-1912.
Brennan et al., 1996, "Cytokines in autoimmunity", Curr. Opin. Immunol., Vol. 8, pp. 872-877.
Chen et al., 2012, "High-affinity and selective dopamine D3 receptor full agonists", Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 22, pp. 5612-5617.
Childs, L.M., et al., 2001, "Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis", Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 16, No. 2, pp. 338-347.
Dallas et al., 2011, "Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis, cancer, and infection", J. Clin. Invest., Vol. 121, pp. 2534-2542.
Dimitris et al., 1998, "The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease", Ann Intern Med., Vol. 128, No. 2, pp. 127-137.
Dvorak et al., 1996, "Comparative ultrastructural morphology of human basophils stimulated to release histamine by anti-IgE, recombinant IgE-dependent histamine-releasing factor, or monocyte chemotactic protein-1", Journal of Allergy and Clinical Immunology, Vol. 98, pp. 355-370.
Feldmann et al., 1994, "TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis," Circ. Shock, Vol. 43, pp. 179-184.
Feldmann et al., 1996, "Rheumatoid arthritis", Cell, Vol. 85, pp. 307-310.
Feldmann et al., 2001, "The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis," Curr. Dir. Autoimmun., Vol. 3, pp. 188-199.
Firestein, 2005 "Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", J. Clin. Rheumatol., Vol. 11. pp. S39-S44.
Fu et al., 2011, "Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus", Arthritis Rheum., Vol. 63, pp. 749-754.
Gabay, 2006, "Interleukin-6 and chronic inflammation", Arthritis Research & Therapy, Vol. 8 (Suppl 2), S3.
Galli et al., 1989, "IgE, Mast Cells and the Allergic Response", Ciba Foundation Symposium, Vol. 147, pp. 53-73.
Gottlieb, 2005, "Psoriasis: Emerging Therapeutic Strategies", Nat. Rev. Drug Disc., Vol. 4, pp. 19-34.
Greig et al., 2006, "Development and characterization of biphenylsulfonamides as novel inhibitors of bone resorption", J. Med. Chem., Vol 49: pp 7487-7492.
Greig *et al.*, 2008, "Biphenyl-4-yl-sulfonic acid arylamides and their use as therapeutic agents", international patent publication number WO 2008/114022 A1 published 25 September 2008.
Greig *et al.*, 2010a, "Aryl-phenyl-sulfonamido-cycloalkyl compounds and their use", international patent publication number WO 2010/032009 A1 published 25 March 2010.
Greig *et al.*, 2010b, "Aryl-phenyl-sulfonamido-phenylene compounds and their use", international patent publication number WO 2010/032010 A1 published 25 March 2010.
Greig et al., 2013, "Development of triarylsulfonamides as novel anti-inflammatory agents", Bioorg. & Med. Chem.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

Lett., Vol. 23, pp. 816-820.
Hadida *et al.*, 2007, "Heterocyclic modulators of ATP-binding cassette transporters", international patent publication number WO 2007/056341 A1 published 18 May 2007.
Hu et al., 2011, "A meta-analysis of the association of IRF5 polymorphism with systemic lupus erythematosus International", Journal of Immunogenetics, Vol. 38, pp. 411-417.
Jimi et al., 2004, "Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo", Nat. Med., Vol. 10, pp. 617-624.
Joosten et al., 1996, "Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra," Arthritis Rheum., Vol. 39, pp. 797-809.
Karsenty et al., 2002, "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development", Dev. Cell., Vol. 2, pp. 389-406.
Klareskog et al., 2006, "Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis," Nat. Clin. Pract. Rheumatol., Vol. 2, pp. 425-433.
Korzenik et al., 2006, "Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease," Nat. Rev. Drug Disc., Vol. 5, pp. 197-209.
Krausgruber et al., 2011, "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses", Nat. Immunol., Vol. 12, pp. 231-238.
Li et al., 2008, "A tumor necrosis factor-α-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease", Nature Medicine, Vol. 14, No. 8, pp. 863-868.
Liu, 2005, "Molecular mechanism of TNF signalling and beyond," Cell Res., Vol. 15, pp. 24-27.
Long, 2012, "Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling", Bone Key Rep., Vol. 1, p. 59.
Malemud et al., 2010, "Myeloid-related protein activity in Rheumatoid Arthritis", International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research, Vol. 2, pp. 97-111.
Mantovani, 2009, "Inflaming metastasis", Nature, Vol. 457, pp. 36-37.
Mazzucchelli et al., 1996, "Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease", J. Pathol., Vol. 178, No. 2, pp. 201-206.
McInnes et al., 2007, "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis", Nat. Rev. Immunol., Vol. 7, pp. 429-442.
Minamino et al., 2012, "IRF-2 regulates B-cell proliferation and antibody production through distinct mechanisms", Int Immunol., Vol. 24, pp. 573-581.
Mount et al., 2005, "Rheumatoid arthritis market", Nat. Rev. Drug Disc., Vol. 2, pp. 11-12.
O'Shea et al., 2013, "Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases", Annals of Rheumatic Disease, Vol. 72, Supplement 2, pp. 111-115.
Ogata et al., 2012, "Safety and Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis", Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord., Vol. 5, pp. 27-42.
Parameswaran et al., 2010, "Tumor necrosis factor-α signaling in macrophages", Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., Vol. 20, pp. 87-103.
Philchenkov et al., 2004, "Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities", Exp. Oncol., Vol 26, pp 82-97.
Pisetsky, 2012, "Advances in the treatment of inflammatory arthritis", Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., Vol. 26. pp.251-261.
Ralston *et al.*, 2005, "Aryl alkyl sulfonamides as therapeutic agents for the treatment of bone conditions", international patent publication number WO 2005/118528 A2 published 15 December 2005.
Rincon, 2012 "Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases", Trends in Immunology, Vol. 33, No. 11, pp. 571-577.
Roodman, 2006, "Regulation of osteoclast differentiation", Ann. N. Y. Acad. Sci. , Vol. 1068, pp. 100-109.
Scott et al., 2010, "Rheumatoid Arthritis", Lancet, Vol. 376, pp. 1094-1108.
Sharif et al., 2012, "IRF5 polymorphism predicts prognosis in patients with systemic sclerosis", Annals of the Rheumatic Diseases, Vol. 71, pp. 1197-1202.
Smolen et al., 2003, "Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis", Nat. Rev. Drug Disc. , Vol. 2, pp. 473-488.
Steger et al., 2011, "Denosumab for the treatment of bone metastases in breast cancer: evidence and opinion", Ther. Adv. Med. Oncol., Vol. 3, pp. 233-243.
Sugiyama et al., 1995, "Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis", Eur. Respir. J., Vol. 8, pp. 1084-1090.
Sun, 2010, "Mechanical loading, cartilage degradation and arthritis", Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 1211, pp. 37-50.
Takaoka et al., 2005, "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors", Nature, Vol. 434, pp. 243-249.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM-CPI 001

Takayanagi, 2009, "Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone", Nature Reviews Rheumatology, Vol. 5, pp. 667-676.

Tanaka et al., 2003, "Signal transduction pathways regulating osteoclast differentiation and function", J. Bone Miner. Metab., Vol. 21, pp. 123-133.

Tsutsumi *et al.*, 2005, "Dipeptidyl peptidase IV inhibitor", international patent publication number WO 2005/025554 A2 published 24 March 2005.

van den Berg et al., 1999, "Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-l", Baillieres Best Pract. Res. Clin. Rheumatol., Vol. 13, pp. 577-597.

van den Berg, 2002, "Is there a rationale for combined TNF and IL-1 blocking in arthritis?", Clin. Exp. Rheumatol. , Vol. 20, pp. S21-S25.

Volejnikova et al., 1997, "Monocyte recruitment and expression of monocyte chemoattractant protein-1 are developmentally regulated in remodeling bone in the mouse", Am. J. Pathol., Vol. 150, No. 5, pp. 1711-1721.

Wang *et al.*, 2010, "Selective ligands for the dopamine 3 (D_3) receptor and methods of using same", international patent publication number WO 2010/025235 A1 published 04 March 2010.

Zhang et al., 2012 "Regulation of T helper cell differentiation by interferon regulatory factor family members", Immunol. Res., Vol. 54 pp. 169-176.

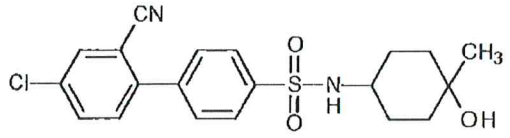
Zheng et al., 1998, "Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in giant cell tumors of bone osteoclastoma: Possible involvement in CD68+ macrophage-like cell migration", Journal of Cellular Biochemistry, Vol. 70, No. 1, pp. 121-129.

* * * * *

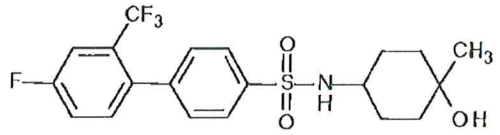
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

R I V E N D I C A Z I O N I

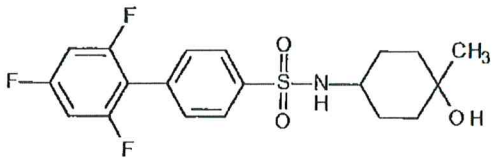
1. Composto scelto tra i composti delle seguenti formule, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



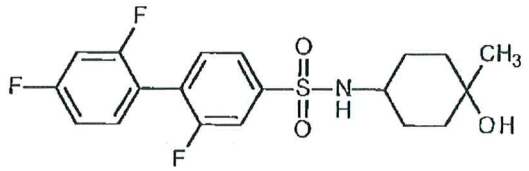
(HMC-C-01),



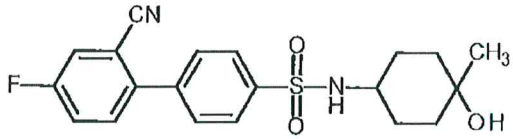
(HMC-C-02),



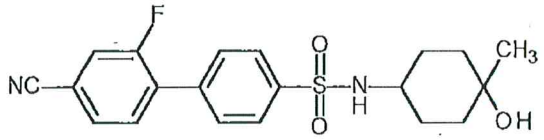
(HMC-C-03),



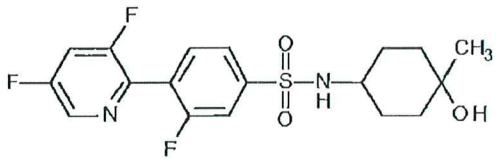
(HMC-C-04),



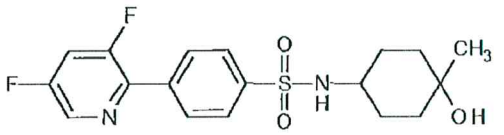
(HMC-C-05),



(HMC-C-06),

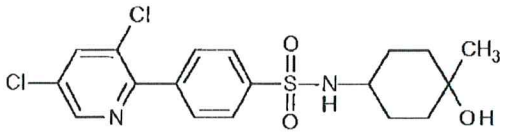


(HMC-N-01),



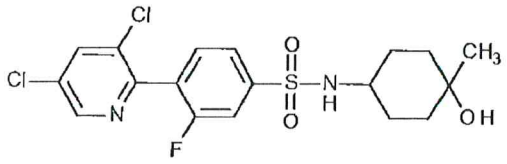
(HMC-N-02),

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001



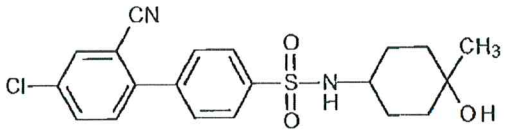
(HMC-N-03),

e



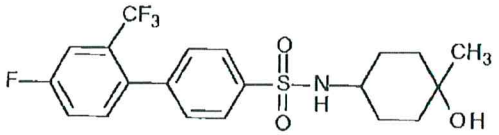
(HMC-N-04).

2. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



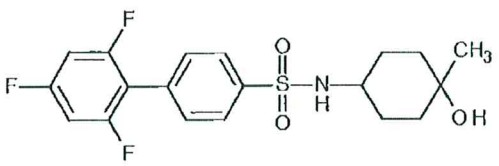
(HMC-C-01).

3. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-02).

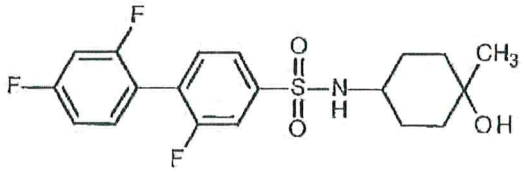
4. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-03).

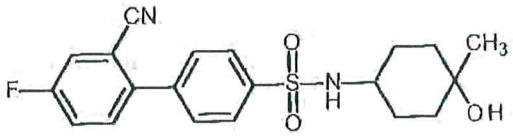
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

5. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



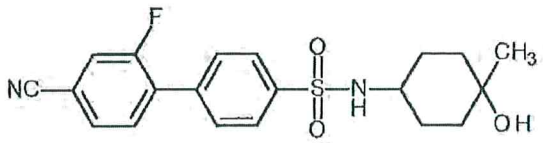
(HMC-C-04).

6. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



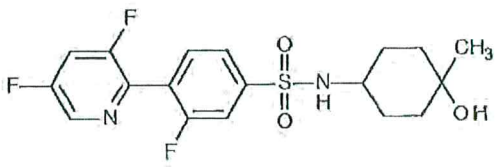
(HMC-C-05).

7. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-06).

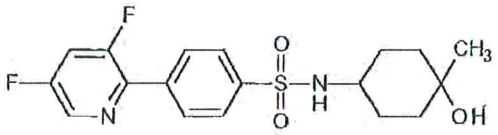
8. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-N-01).

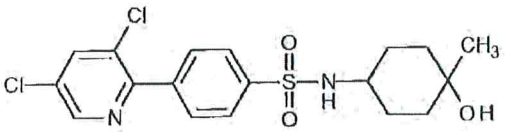
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

9. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



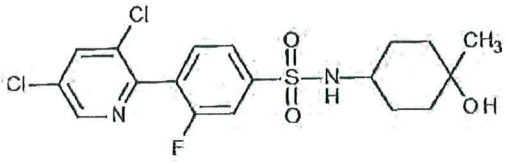
(HMC-N-02).

10. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:



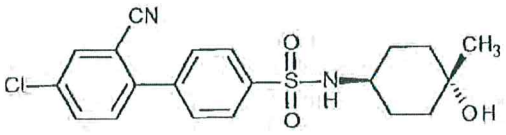
(HMC-N-03).

11. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato, solvatato farmaceuticamente accettabile:

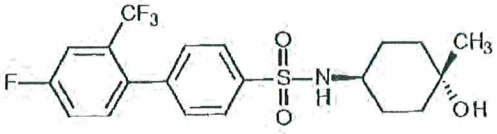


(HMC-N-04).

12. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto scelto tra i composti delle seguenti formule, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:

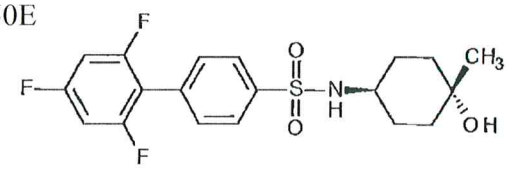


(HMC-C-01-A),

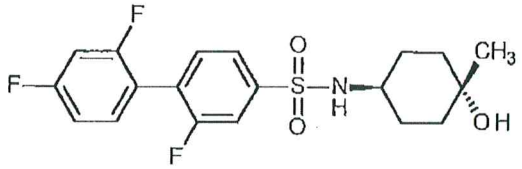


(HMC-C-02-A),

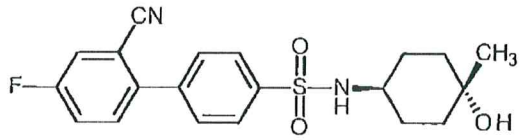
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001



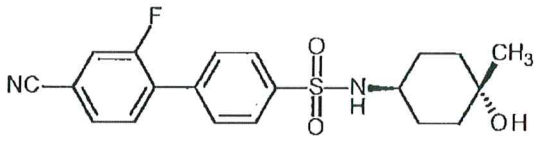
(HMC-C-03-A),



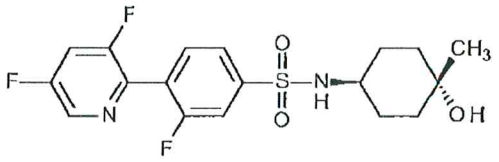
(HMC-C-04-A),



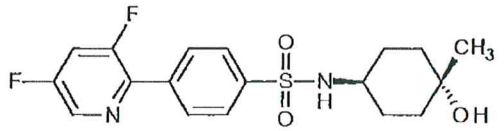
(HMC-C-05-A),



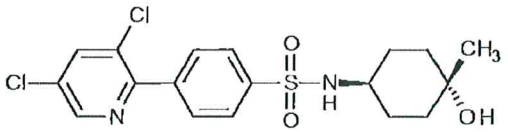
(HMC-C-06-A),



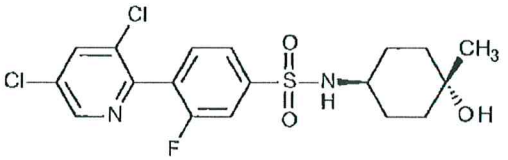
(HMC-N-01-A),



(HMC-N-02-A),

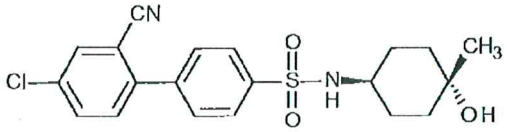


(HMC-N-03-A),
e



(HMC-N-04-A).

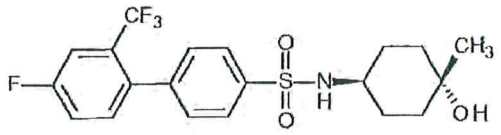
13. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-01-A).

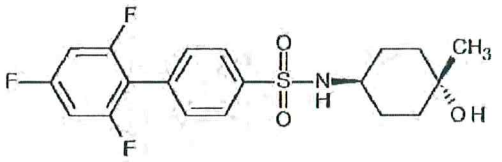
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

14. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



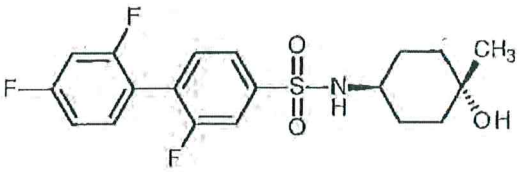
(HMC-C-02-A).

15. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



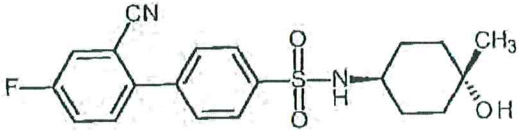
(HMC-C-03-A).

16. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-04-A).

17. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:

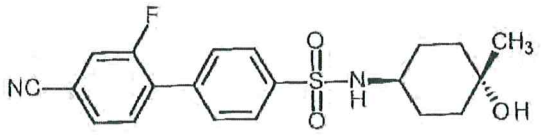


(HMC-C-05-A).

18. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto

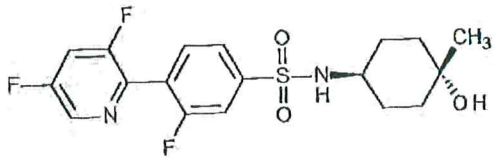
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



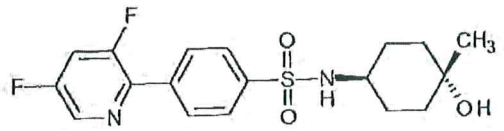
(HMC-C-06-A).

19. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



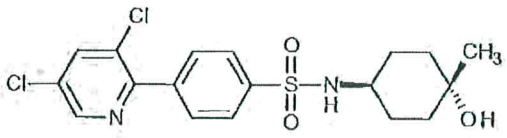
(HMC-N-01-A).

20. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-N-02-A).

21. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:

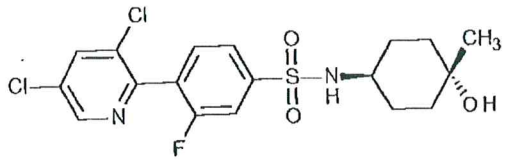


(HMC-N-03-A).

22. Composto secondo la rivendicazione 12, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato

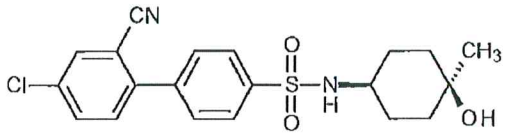
Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

farmaceuticamente accettabile:

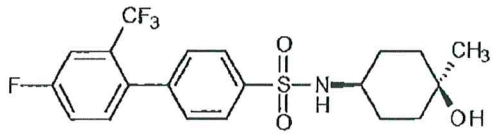


(HMC-N-04-A).

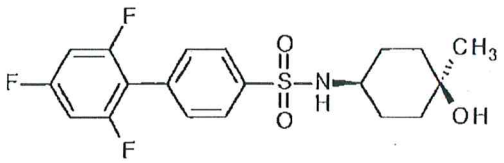
23. Composto secondo la rivendicazione 1, che è un composto scelto tra i composti delle seguenti formule, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



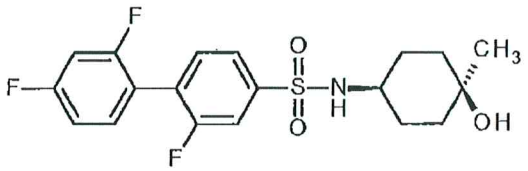
(HMC-C-01-B),



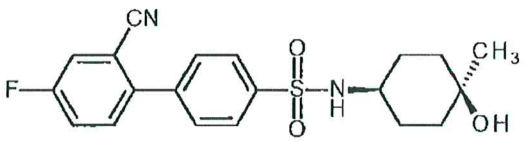
(HMC-C-02-B),



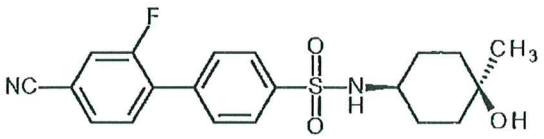
(HMC-C-03-B),



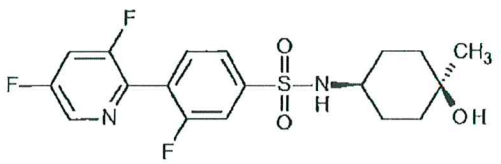
(HMC-C-04-B),



(HMC-C-05-B),

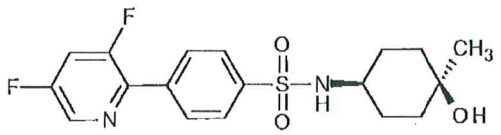


(HMC-C-06-B),

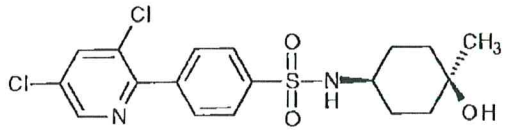


(HMC-N-01-B),

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

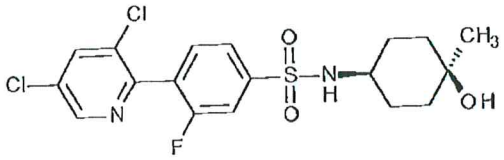


(HMC-N-02-B),



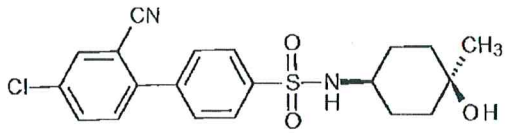
(HMC-N-03-B),

e



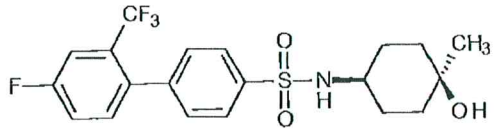
(HMC-N-04-B).

24. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-01-B).

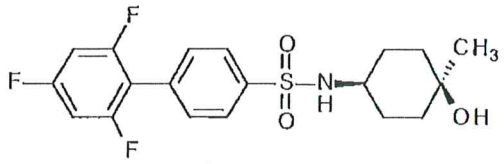
25. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-02-B).

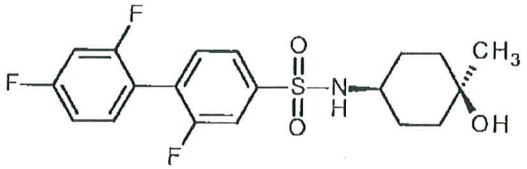
26. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001



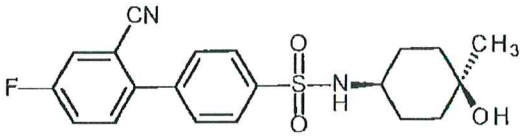
(HMC-C-03-B).

27. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



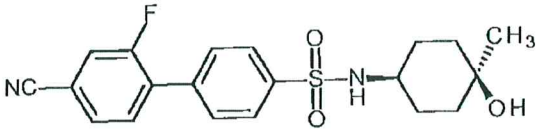
(HMC-C-04-B).

28. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-05-B).

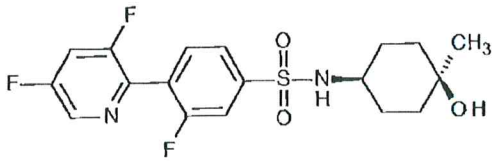
29. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-C-06-B).

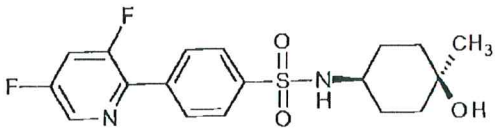
30. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001



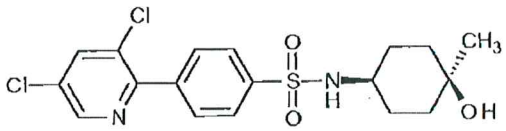
(HMC-N-01-B).

31. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



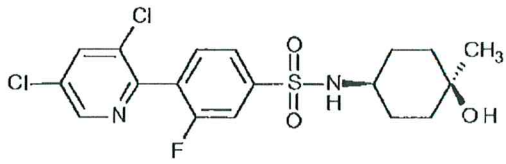
(HMC-N-02-B).

32. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-N-03-B).

33. Composto secondo la rivendicazione 23, che è un composto della formula seguente, o suo sale, idrato o solvatato farmaceuticamente accettabile:



(HMC-N-04-B).

34. Composizione contenente un composto secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 33 ed un veicolante o diluente farmaceuticamente accettabile.

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

35. Metodo per preparare una composizione comprendente il passaggio di miscelare il composto secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 33 ed un veicolante o diluente farmaceuticamente accettabile.

36. Composto secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 33 per uso nel trattamento del corpo umano o animale con terapia.

37. Composto per uso secondo la rivendicazione 36, dove il trattamento è il trattamento di:

artrite reumatoide; psoriasi; artrite psoriatica; malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD); asma; aterosclerosi; malattia dell'intestino infiammato; spondilite anchilosante;

sclerosi multipla; lupus sistemico eritematoso; sindrome di Sjögren;

un disturbo associato con perdita ossea, come perdita ossea associata con eccessiva attività degli osteoclasti nell'artrite reumatoide, osteoporosi, malattia ossea associata al cancro, o morbo di Paget;

cancro, come una malignità ematologica, come mieloma multiplo, leucemia o linfoma, o un cancro di tumore solido, come cancro della vescica, cancro del seno (femminile e/o maschile), cancro del colon, carcinoma delle cellule renali, cancro del rene, cancro del polmone, cancro del pancreas, cancro gastrico, cancro della prostata, cancro del cervello, cancro della pelle, cancro

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

della tiroide, ameloblastoma delle cellule basali, o melanoma;

disturbo associato con fibrosi, come sclerosi sistemica o scleroderma; o

una vasculitide rata, come il bordo di Behçet.

38. Composto per uso secondo la rivendicazione 36, dove il trattamento è trattamento di:

artrite reumatoide; psoriasi; artrite psoriatica; malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD); asma; aterosclerosi; malattia dell'intestino infiammato; o spondilite anchilosante.

39. Composto per uso secondo la rivendicazione 36, dove il trattamento è trattamento di:

sclerosi multipla; lupus sistemico eritematoso; o sindrome di Sjögren.

40. Composto per uso secondo la rivendicazione 36, dove il trattamento è trattamento di:

disturbo associato con perdita ossea, come perdita ossea associata con eccessiva attività degli osteoclasti nell'artrite reumatoide, osteoporosi, malattia ossea associata a cancro, o morbo di Paget.

41. Composto per uso secondo la rivendicazione 36, dove il trattamento è trattamento di:

cancro, come una malignità ematologica, come mieloma multiplo, leucemia o linfoma, o un cancro di tumore

Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

solido, come cancro della vescica, cancro del seno (femminile e/o maschile), cancro del colon, carcinoma delle cellule renali, cancro del rene, cancro del polmone, cancro del pancreas, cancro gastrico, cancro della prostata, cancro del cervello, cancro della pelle, cancro della tiroide, ameloblastoma delle cellule basali, o melanoma.

42. Composto per uso secondo la rivendicazione 36, dove il trattamento è trattamento di:

disturbo associato con fibrosi, come sclerosi sistemica o scleroderma.

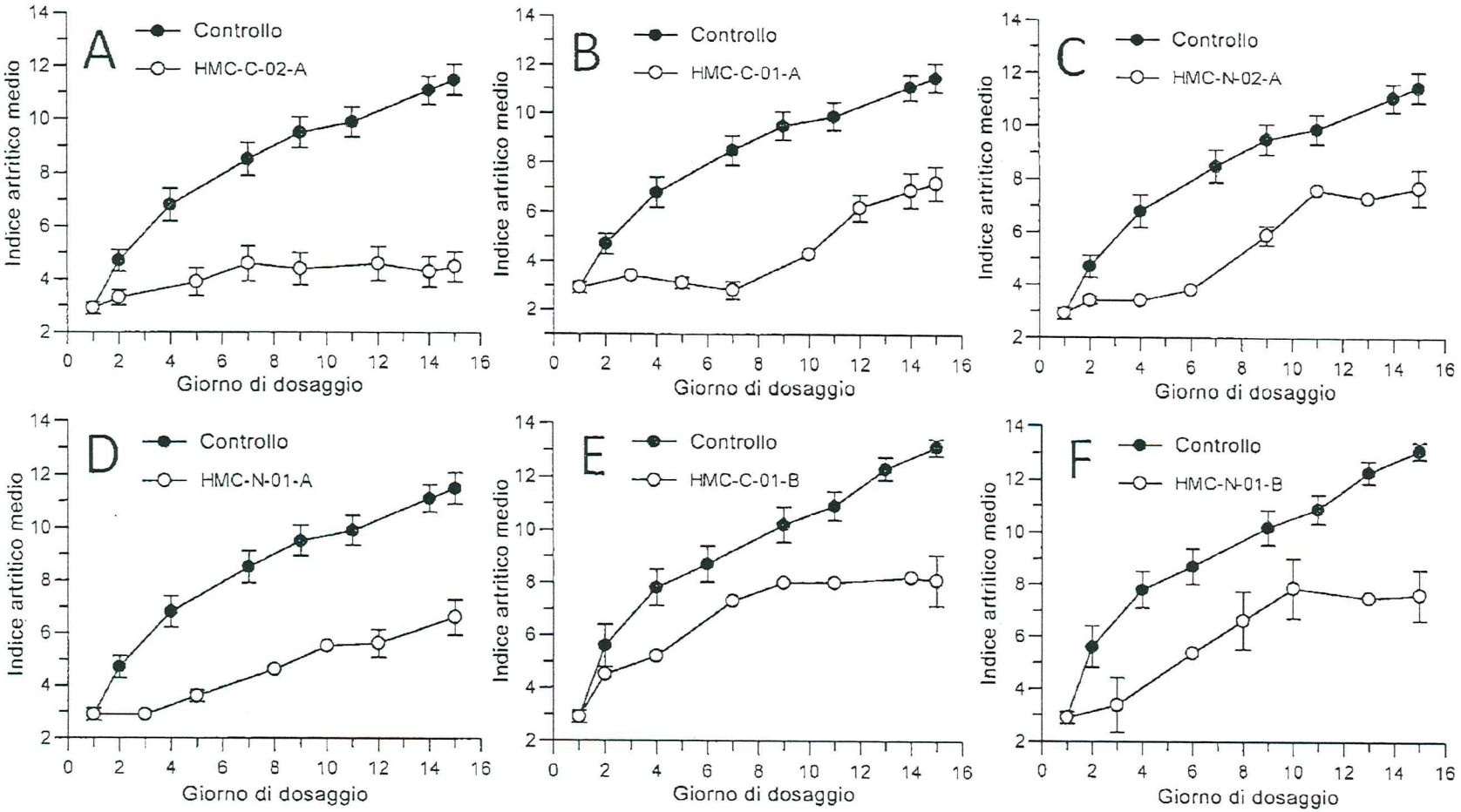
43. Composto per uso secondo la rivendicazione 36, dove il trattamento è trattamento di:

una vascolitide rara, come il borbo di Behçet.

Dogana, 24/10/2017

In fede
Il Mandatario
Ing. Marco Montebelli
USBM CPI 001

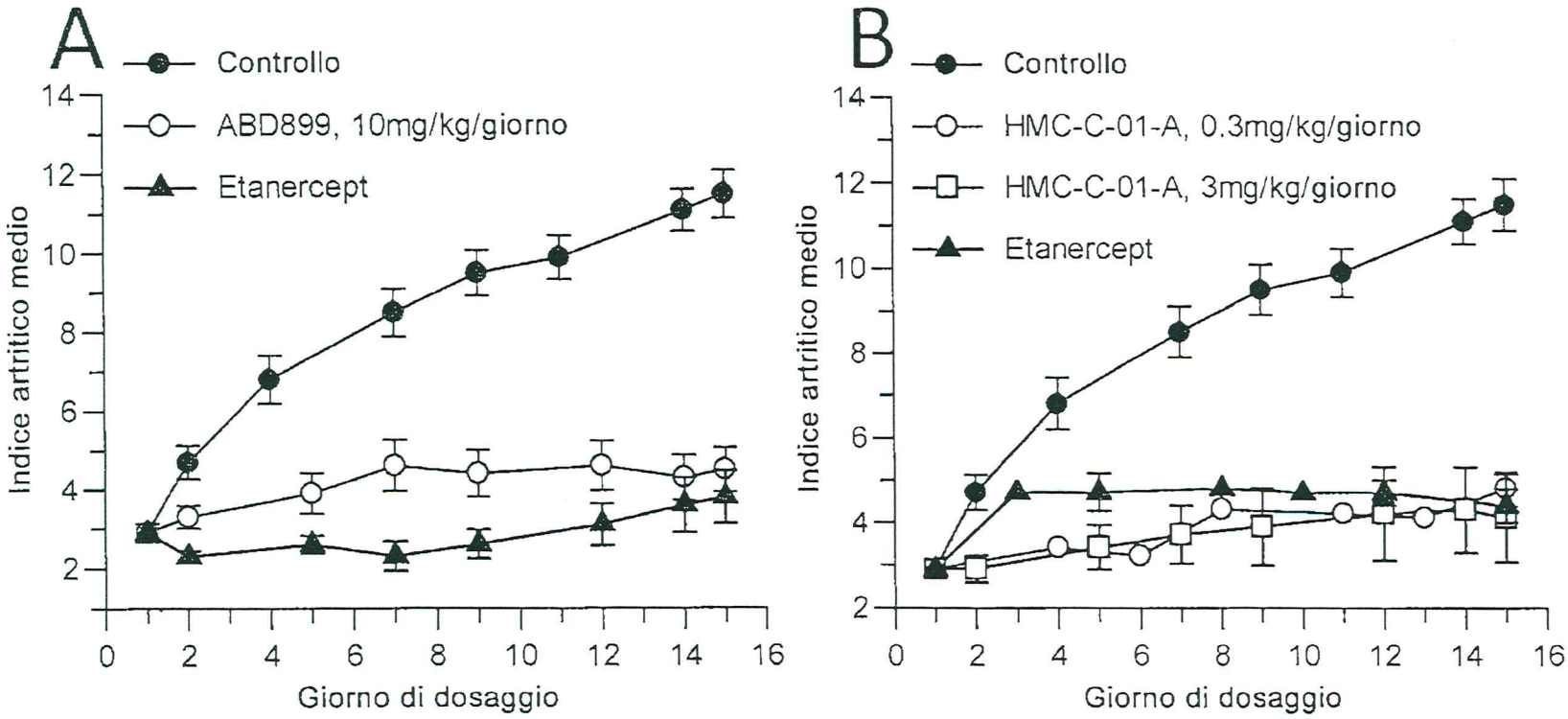
FIGURA 1



Ing. Marco MONTEBELLI

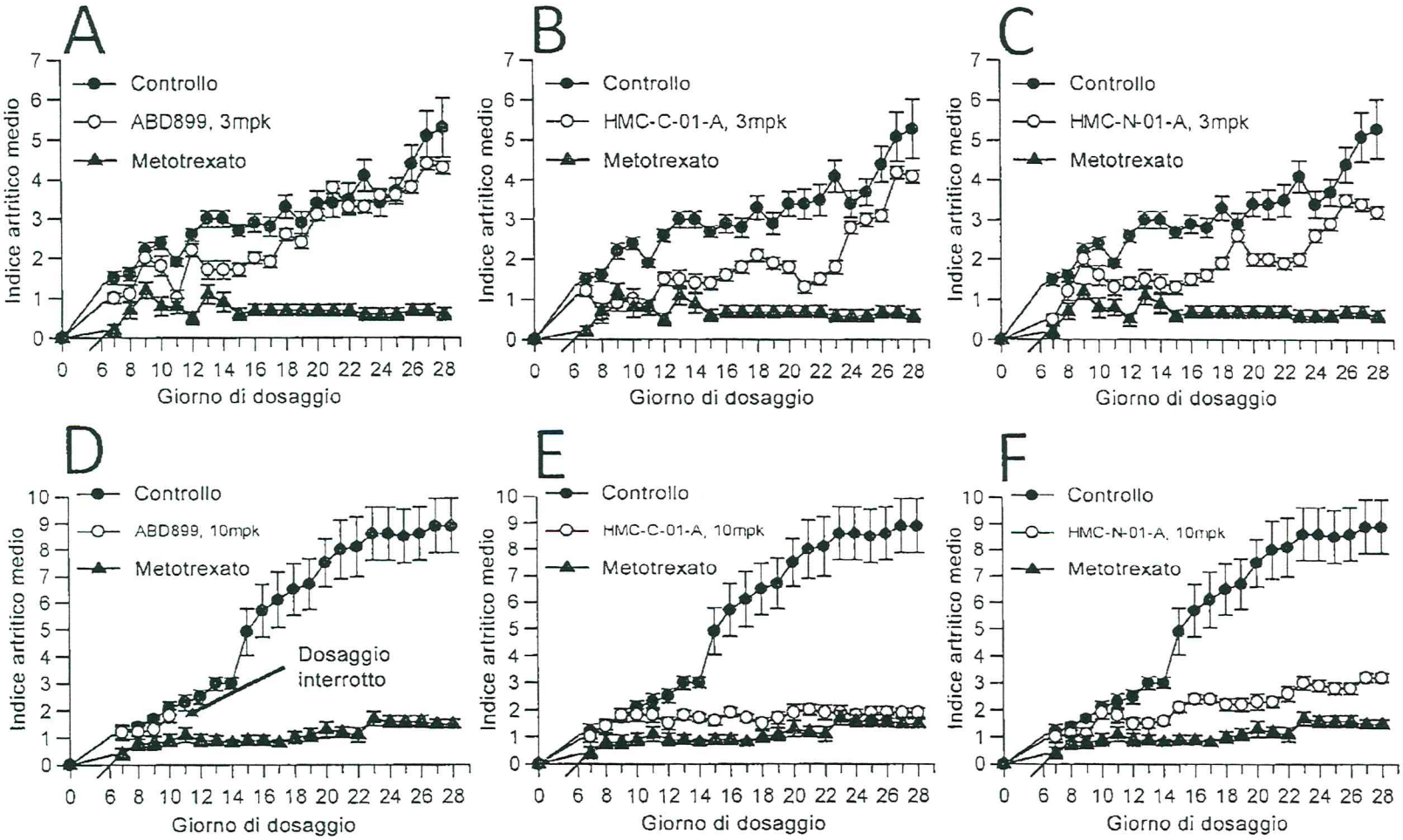
USBM CPI 001

FIGURA 2



Ing. Marco MONTEBELLI
USBM CPI 001

FIGURA 3



Ing. Marco MONTEBELLI

USBM CPI 001