

Derivati di 2,2-difluoropropionammide di bardoxolone metile, composizioni farmaceutiche e loro polimorfi per l'uso nel trattamento di determinate condizioni

5 SFONDO DELL'INVENZIONE

I. Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce al composto:

N-((4a*S*,6a*R*,6b*S*,8a*R*,12a*S*,14a*R*,14b*S*)-11-ciano-2,2, 6a,6b,9,9,12a-eptametil-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,

10 6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-ottadecaidropicen-4a-il)-2,2-difluoropropanammide, anche qui descritto come RTA 408, 63415, o PP415, nonché alle sue forme polimorfiche, per l'uso in terapia come definito ulteriormente nelle rivendicazioni.

II. Descrizione della tecnica relativa

15 L'attività anti-infiammatoria e anti-proliferativa del triterpenoide presente in natura, acido oleanolico, è stata migliorata mediante modificazioni chimiche. Per esempio, sono stati sviluppati l'acido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) e i composti correlati. Vedi Honda *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1998; 20 Honda *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 2000a; Honda *et al.*, 2000b; Honda *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 1999; Place *et al.*, 2003; Liby *et al.*, 2005; e i brevetti U.S. 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799, e 7.943.778. L'estere metilico, bardoxolone metile (CDDO-Me), è stato valutato in sperimentazioni cliniche di fase II e III 25 per il trattamento e la prevenzione della nefropatia diabetica e la

malattia renale cronica. Vedi Pergola *et al.*, 2011.

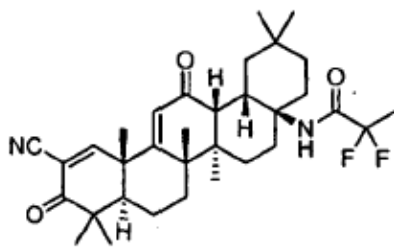
Analoghi dei triterpenoidi di sintesi dell'acido oleanolico sono stati inoltre evidenziati per essere inibitori dei procedimenti infiammatori cellulari, come l'induzione mediante IFN- γ della sintesi
5 inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) e di COX-2 in macrofagi di topo. Vedi Honda *et al.*, (2000a), Honda *et al.* (2000b), Honda *et al.* (2002), e i brevetti U.S. 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799, e 7.943.778. Composti derivati da acido oleanolico hanno mostrato di influire sulla funzione di bersagli multipli delle proteine e modu-
10 lare così l'attività di diversi importanti percorsi di segnalazione cellulare correlati a stress ossidativo, controllo del ciclo cellulare e infiammazione (ad esempio, Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008; Liby *et al.*, 2007a, e i brevetti U.S. 8.129.429, 7.915.402, 8.124.799, e 7.943.778).

15 Dato che i profili dell'attività biologica di noti derivati di triterpenoidi variano, e in considerazione dell'ampia varietà delle malattie che possono essere trattate o prevenute con i composti aventi potenti effetti antiossidanti ed anti-infiammatori, e il grado elevato di necessità mediche non soddisfatte rappresentate in
20 questa varietà di malattie, è desiderabile sintetizzare nuovi composti con differenti profili di attività biologica per il trattamento o la prevenzione di una o più indicazioni.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

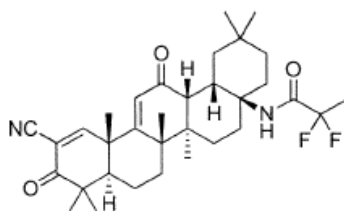
La presente invenzione si riferisce ai seguenti punti:

25 1. Un composto della formula:

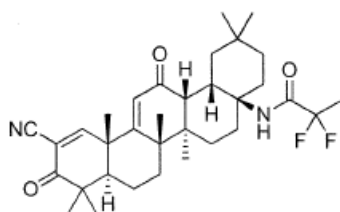


o un suo sale farmaceuticamente accettabile,
per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del cancro, in cui il
composto è da somministrare in combinazione con una immunoterapia.

- 5 2. Il composto per l'uso secondo il punto 1, che è un composto
della formula:



3. Una forma polimorfica di un composto avente la formula:



- 10 per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del
cancro, in cui la forma polimorfica è da somministrare in combina-
zione con una immunoterapia; e
in cui la forma polimorfica ha un modello di diffrazione della pol-
vere ai raggi X (CuK α) comprendente un picco alo a circa 14 °2 θ , op-
15 pure
la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione

della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 5,6, 7,0, 10,6, 12,7, e 14,6 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,0,

5 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (doppio picco), 14,2, e 16,0 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un emisolvato di acetonitrile avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,5, 11,4, 15,6, e 16,6 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione
10 della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, e 15,6 °2 θ .

4. Una composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del cancro, la composizione farmaceutica comprendendo:

- 15
- un componente attivo costituito da un composto come definito nel punto 1 o 2 o una forma polimorfica come definita nel punto 3; e
 - un veicolo farmaceuticamente accettabile;

in cui la composizione farmaceutica è da somministrare in combinazione con una immunoterapia.

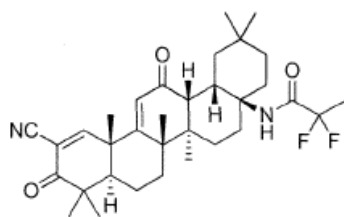
20 5. Il composto per l'uso secondo i punti 1 o 2 o la forma polimorfica per l'uso secondo il punto 3 o la composizione farmaceutica per l'uso secondo il punto 4, in cui l'immunoterapia è una immunoterapia mirata per il cancro, una immunoterapia a base di cellule dendritiche, o una immunoterapia delle cellule adottive T.

6. Il composto per l'uso secondo i punti 1 o 2, o la forma polimorfica per l'uso secondo il punto 3, o la composizione farmaceutica per l'uso secondo il punto 4, in cui l'immunoterapia è un anticorpo mirato per il cancro che è scelto tra trastuzumab, alemtuzumab, be-
5 vacizumab, cetuximab, panitumumab, ibritumomab tiuxetan, tositumomab, brentuximab vedotin, adotrastuzumab emtansine, e denileukin dititox.

7. Il composto per l'uso secondo il punto 6, o la forma polimorfica per l'uso secondo il punto 6, o la composizione farmaceutica per
10 l'uso secondo il punto 6, in cui il cancro è un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma multiplo o seminoma.

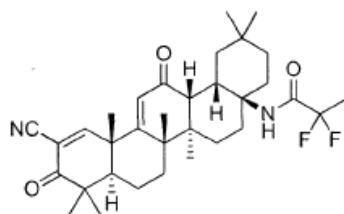
8. Il composto per l'uso secondo il punto 6, o la forma polimorfica per l'uso secondo il punto 6, o la composizione farmaceutica per
15 l'uso secondo il punto 6, in cui il cancro è della vescica, del sangue, delle ossa, del cervello, della mammella, del sistema nervoso centrale, della cervice, del colon, dell'endometrio, esofago, cistifellea, genitali, tratto genitourinario, testa, reni, laringe, fegato, polmone, tessuto muscolare, collo, mucosa orale o nasale, ovaio,
20 pancreas, prostata, pelle, milza, intestino tenue, intestino crasso, stomaco, testicolo, o tiroide.

9. Un composto della formula

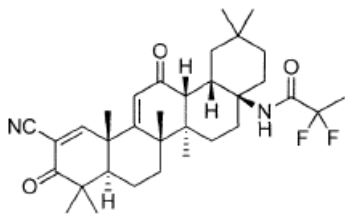


o un suo sale farmaceuticamente accettabile,
per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione associata con stress ossidativo causato da disfunzione mitocondriale.

- 5 10. Il composto per l'uso secondo il punto 9, che è un composto della formula:



11. Una forma polimorfica di un composto avente la formula:



- 10 per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione associata con stress ossidativo causato da disfunzione mitocondriale; in cui la forma polimorfica ha un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente un picco a circa 14 °2 θ , oppure
- 15 la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 5,6, 7,0, 10,6, 12,7, e 14,6 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente picchi a circa 7,0, 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (doppio picco), 14,2, e 16,0 $^{\circ}2\theta$, oppure

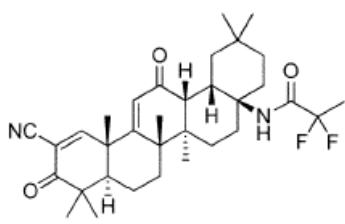
la forma polimorfica è un emisolvato di acetonitrile avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente
5 picchi a circa 7,5, 11,4, 15,6, e 16,6 $^{\circ}2\theta$, oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente picchi a circa 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, e 15,6 $^{\circ}2\theta$.

10 12. Una composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione associata con stress ossidativo causato da disfunzione mitocondriale, la composizione farmaceutica comprendendo:

un componente attivo costituito da un composto come definito nel
15 punto 9 o 10 o una forma polimorfica come definita nel punto 11; e
un veicolo farmaceuticamente accettabile.

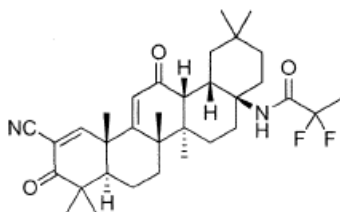
13. Un composto della formula



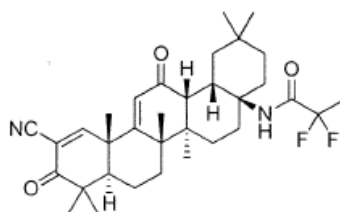
o un suo sale farmaceuticamente accettabile,
20 per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di un disturbo convulsivo.

14. Il composto per l'uso secondo il punto 13, che è un composto

della formula:



15. Una forma polimorfica di un composto avente la formula:



5 per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di un disturbo convulsivo;

in cui la forma polimorfica ha un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente un picco a circa 14 °2 θ , oppure

10 la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 5,6, 7,0, 10,6, 12,7, e 14,6 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,0,

15 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (doppio picco), 14,2, e 16,0 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un emisolvato di acetonitrile avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,5, 11,4, 15,6, e 16,6 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione

della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente picchi a circa 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, e 15,6 °2 θ .

16. Una composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di un disturbo convulsivo, la composizione farmaceutica

5 comprendendo:

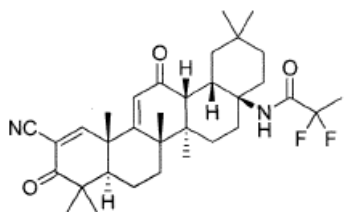
un componente attivo costituito da un composto come definito nel punto 13 o 14 o una forma polimorfica come definita nel punto 15; e un veicolo farmaceuticamente accettabile.

17. Il composto per l'uso secondo il punto 13 o 14, o la forma polimorfica per l'uso secondo il punto 15, o la composizione farmaceutica per l'uso secondo il punto 16, in cui il disturbo convulsivo è epilessia.

La descrizione seguente si riferisce alla presente invenzione come definita nei punti riportati qui sopra (e nelle rivendicazioni), e anche a forme di realizzazione di riferimento.

Inoltre, qualsiasi riferimento a un metodo di trattamento nella descrizione seguente è da intendersi come relativo al rispettivo composto o alla rispettiva composizione per l'uso nel trattamento corrispondente.

20 In alcuni aspetti è fornito un composto della formula (indicata nella presente anche come RTA 408, 63415, o PP415):



Philippe Montel

o un suo sale farmaceuticamente accettabile. In alcune realizzazioni, il composto non è sotto forma di un sale.

In un altro aspetto sono fornite forme polimorfiche del summenzionato composto. In alcune realizzazioni, la forma polimorfica ha un Modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente un picco a θ di circa 14° . In alcune realizzazioni, il modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) ulteriormente comprende un picco di spalla a θ di circa 8° . In alcune realizzazioni, il modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) è sostanzialmente come mostrato nella FIG. 59. In alcune realizzazioni, la forma polimorfica ha una T_g da circa 150°C a circa 155°C , comprendente per esempio, una T_g di circa 153°C o una T_g di circa 150°C . In alcune realizzazioni, la forma polimorfica ha una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) comprendente un'endoterma centrata da circa 150°C a circa 155°C . In alcune realizzazioni, l'endoterma è centrata a circa 153°C . In alcune realizzazioni, l'endoterma è centrata a circa 150°C . In alcune realizzazioni, la curva della calorimetria a scansione differenziale (DSC) è sostanzialmente come mostrato nella FIG. 62.

In alcune realizzazioni, la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente picchi a θ di circa $5,6$, $7,0$, $10,6$, $12,7$, e $14,6^\circ$. In alcune realizzazioni, il modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) è sostanzialmente come mostrato nella FIG. 75, struttura superiore.

In alcune realizzazioni, la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente picchi a circa 7,0, 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (doppio picco), 14,2, e 16,0 $^{\circ}2\theta$. In alcune realizzazioni, il modello di diffrazione ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) è sostanzialmente come mostrato nella FIG. 75, seconda struttura dalla parte superiore.

In alcune realizzazioni, la forma polimorfica è un emisolvato di acetonitrile avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente picchi a circa 7,5, 11,4, 15,6 e 16,6 $^{\circ}2\theta$. In alcune realizzazioni, il modello di diffrazione ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) è sostanzialmente come mostrato nella FIG. 75, seconda struttura dal basso. In alcune realizzazioni, la forma polimorfica ha una T_g di circa 196 $^{\circ}\text{C}$. In alcune realizzazioni, la forma polimorfica ha una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) comprendente un'endoterma centrata a circa 196 $^{\circ}\text{C}$. In alcune realizzazioni, la curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) è sostanzialmente come mostrata nella FIG. 116.

In alcune realizzazioni, la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) comprendente picchi a circa 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, e 15,6 $^{\circ}2\theta$. In alcune realizzazioni, il modello di diffrazione ai raggi X ($\text{CuK}\alpha$) è sostanzialmente come mostrato nella FIG. 75, struttura in basso.

In un altro aspetto, sono fornite composizioni farmaceutiche comprendenti un componente attivo costituito dal summenzionato composto o da una sua forma polimorfica (come, ad esempio, una qualsia-

si delle forme polimorfiche qui descritte sopra e di seguito), e un veicolo farmaceuticamente accettabile. In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è formulata per somministrazione: per via orale, intraadiposa, intraarteriosa, intraarticolare, intracraniale, intradermica, intralesionale, intramuscolare, intranasale, intraoculare, intrapericardica, intraperitoneale, intrapleurica, intraprostatica, intrarettale, intratecale, intratracheale, intratumorale, intraombelicale, intravaginale, intravenosa, intravescicolare, intravitreale, liposomale, locale, mucosale, parenterale, rettale, subcongiuntivale, sottocutanea, sublinguale, topica, transboccale, transdermica, vaginale, in creme, in composizioni lipidiche, mediante un catetere, mediante un lavaggio, mediante infusione continua, mediante infusione, mediante inalazione, mediante iniezione, mediante rilascio locale o mediante perfusione localizzata. In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è formulata per somministrazione orale, intraarteriosa; intravenosa, o topica. In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è formulata per somministrazione orale.

In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è formulata come una capsula dura o morbida, una compressa, uno sciroppo, una sospensione, un'emulsione, una soluzione, una dispersione solida, un wafer, o un elisir. In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica ulteriormente comprende un agente che aumenta la solubilità e la capacità di dispersione. (Per esempio, agenti che aumentano la solubilità e la capacità di dispersione comprendono, ma non sono li-



mitati a, PEG, ciclodestrani, e derivati di cellulosa.) In alcune realizzazioni, il composto o forma la polimorfica sono sospesi in olio di sesamo.

In altre realizzazioni, la composizione farmaceutica è formulata per somministrazione topica. In altre realizzazioni, la composizione farmaceutica è formulata come una lozione, una crema, un gel, un olio, un unguento, un linimento, un'emulsione, una soluzione, o una sospensione. In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è formulata come una lozione, come una crema, o come un gel. In alcune realizzazioni, la quantità di componente attivo è da circa lo 0,01% a circa il 5% in peso, da circa lo 0,01% a circa il 3% in peso, o di 0,01%, 0,1%, 1%, o 3% in peso.

In un altro aspetto sono forniti metodi per il trattamento o la prevenzione di una condizione associata con infiammazione o stress ossidativo in un paziente avente necessità, comprendente la somministrazione al paziente di una quantità terapeuticamente efficace della composizione farmaceutica come descritto sopra o di seguito. È qui fornito ugualmente il composto *N*-((4a*S*,6a*R*,6b*S*,8a*R*,12a*S*,14a*R*,14b*S*)-11-ciano-2,2,6a,6b,9,9,12a-eptametil-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14, 14a,14b-ottadecaidropicen-4a-il)-2,2-difluoropropanammide (o RTA 408) o un suo sale farmaceuticamente accettabile, o un forma polimorfica di tale composto (come, ad esempio, una qualsiasi delle forme polimorfiche qui descritte sopra o di seguito), o una composizione farmaceutica comprendente una qualsiasi delle entità sopra menzionate e un veicolo farmaceuti-

camente accettabile (comprendente, ad esempio, le composizioni farmaceutiche descritte sopra), per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione associata con infiammazione o stress ossidativo. È qui inoltre fornito l'uso del summenzionato composto, forma polimorfica o composizione farmaceutica per o di un medicamen-
 5 to per il trattamento o la prevenzione di una condizione associata con infiammazione o stress ossidativo. In alcune realizzazioni, la condizione è associata con infiammazione. In altre realizzazioni, la condizione è associata con stress ossidativo. In alcune realizzazio-
 10 ni, la condizione è una malattia o un disturbo della pelle, sepsi, dermatite, osteoartrite, cancro, infiammazione, una malattia autoimmune, una malattia infiammatoria intestinale, una complicazione da esposizione localizzata o totale del corpo a radiazioni ionizzanti, mucosite, insufficienza d'organo acuta o cronica, malattia epatica, pancreatite, un disturbo dell'occhio, una malattia polmonare o dia-
 15 bete.

E' qui inoltre fornito il composto N-
 ((4aS,6aR,6bS,8aR,12aS,14aR,14bS)-11-ciano-2,2,6a,6b,9,9,12a-
 eptametil-10,14-dioxo-1,2,3,4,4a,
 20 5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-ottadecaidropicen-4a-il)-2,2-
 difluoropropanammide (o RTA 408) o un suo sale farmaceuticamente ac-
 cettabile, o una forma polimorfica di tale composto (come, ad esem-
 pio, una qualsiasi delle forme polimorfiche qui descritte sopra o di
 seguito), o una composizione farmaceutica comprendente una qualsiasi
 25 delle entità sopra menzionate e un veicolo farmaceuticamente accet-

tabile (comprendente, ad esempio, le composizioni farmaceutiche descritte sopra), per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione scelta da una malattia o un disturbo della pelle, sepsi, dermatite, osteoartrite, cancro, infiammazione, una malattia autoimmune, malattia infiammatoria intestinale, una complicazione da esposizione localizzata o totale del corpo a radiazioni ionizzanti, mucosite, insufficienza d'organo acuta o cronica, malattia epatica, pancreatite, un disturbo dell'occhio, una malattia polmonare, o diabete. Di conseguenza, è qui fornito l'uso del summenzionato composto, forma polimorfica o composizione farmaceutica per la preparazione di un medicamento per il trattamento o la prevenzione di una condizione scelta da una malattia o un disturbo della pelle, sepsi, dermatite, osteoartrite, cancro, infiammazione, una malattia autoimmune, malattia infiammatoria intestinale, una complicazione da esposizione localizzata o totale del corpo a radiazioni ionizzanti, mucosite, insufficienza d'organo acuta o cronica, malattia epatica, pancreatite, un disturbo dell'occhio, una malattia polmonare, o diabete. È qui inoltre fornito un metodo per il trattamento o la prevenzione di una condizione scelta da una malattia o un disturbo della pelle, sepsi, dermatite, osteoartrite, cancro, infiammazione, una malattia autoimmune, malattia infiammatoria intestinale, una complicazione da esposizione localizzata o totale del corpo a radiazioni ionizzanti, mucosite, insufficienza d'organo acuta o cronica, malattia epatica, pancreatite, un disturbo dell'occhio, una malattia polmonare, o diabete in un paziente avente necessità, il metodo com-



prendente la somministrazione al paziente di una quantità terapeuti-
camente efficace del summenzionato composto, forma polimorfica o
composizione farmaceutica. In alcune realizzazioni, la condizione è
una malattia o un disturbo della pelle come dermatite, un'ustione
5 termica o chimica, una ferita cronica, acne, alopecia, altri distur-
bi dei follicoli dei capelli, epidermolisi bollosa, scottature sola-
ri, complicazioni di scottature solari, disturbi di pigmentazione
della pelle, una condizione della pelle correlata all'età; una feri-
ta post-chirurgica, una cicatrice da un danno alla pelle o ustione,
10 psoriasi, una manifestazione dermatologica di una malattia autoimmu-
ne o una malattia dell'ospite verso l'innesto, cancro della pelle, o
un disturbo implicante l'iperproliferazione delle cellule della pel-
le. In alcune realizzazioni, la malattia o il disturbo della pelle è
dermatite. In alcune realizzazioni, la dermatite è dermatite aller-
15 gica, dermatite atopica, dermatite dovuta a esposizione chimica, o
dermatite indotta da radiazioni. In altre realizzazioni, la malattia
o il disturbo della pelle è una ferita cronica. In alcune realizza-
zioni, la ferita cronica è un'ulcera diabetica, una piaga da decubi-
to, o un'ulcera venosa. In altre realizzazioni, la malattia o il
20 disturbo della pelle è alopecia. In alcune realizzazioni, l'alopecia
è scelta da calvizie o alopecia indotta da farmaco. In altre rea-
lizzazioni, la malattia o il disturbo della pelle è un disturbo del-
la pigmentazione della pelle. In alcune realizzazioni, il disturbo
della pigmentazione della pelle è vitiligine. In altre realizzazio-
25 ni, la malattia o il disturbo della pelle è un disturbo implicante

l'iperproliferazione delle cellule della pelle. In alcune realizzazioni, il disturbo implicante l'iperproliferazione delle cellule della pelle è ipercheratosi.

In altre realizzazioni, la condizione è una malattia autoimmune, come artrite reumatoide, lupus, morbo di Crohn, o psoriasi. In altre realizzazioni, la condizione è una malattia epatica, come una malattia del fegato grasso o epatite.

In altre realizzazioni, la condizione è un disturbo dell'occhio, come uveite, degenerazione maculare, glaucoma, edema maculare diabetico, blefarite, retinopatia diabetica, una malattia o un disturbo dell'endotelio corneale, infiammazione post-chirurgica, occhio secco, congiuntivite allergica o una forma di congiuntivite. In alcune realizzazioni, il disturbo dell'occhio è degenerazione maculare. In alcune realizzazioni, la degenerazione maculare è la forma secca. In altre realizzazioni, la degenerazione maculare è la forma umida. In alcune realizzazioni, la malattia o il disturbo dell'endotelio corneale è distrofia corneale endoteliale di Fuchs.

In altre realizzazioni, la condizione è una malattia polmonare, come infiammazione polmonare, fibrosi polmonare, COPD, asma, fibrosi cistica, o fibrosi polmonare idiopatica. In alcune realizzazioni, COPD è indotta da fumo di sigaretta.

In altre realizzazioni, la condizione è sepsi. In altre realizzazioni, la condizione è mucosite derivante da radioterapia o chemioterapia. In alcune realizzazioni, la mucosite si presenta per via orale. In altre realizzazioni, la condizione è associata con l'espo-

sizione a radiazioni. In alcune realizzazioni, l'esposizione alle radiazioni porta alla dermatite. In alcune realizzazioni, l'esposizione alle radiazioni è acuta. In altre realizzazioni, l'esposizione alle radiazioni è frazionata.

5 In altre realizzazioni, la condizione è cancro. In alcune realizzazioni, il cancro è un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma multiplo, o seminoma. In altre realizzazioni, il cancro è della vescica, del sangue, delle ossa, del cervello, della mammella, del sistema nervoso centrale, della cervi-
10 ce, del colon, dell'endometrio, esofago, cistifellea, genitali, tratto genitourinario, testa, reni, laringe, fegato, polmone, tessuto muscolare, collo, mucosa orale o nasale, ovaio, pancreas, prostata, pelle, milza, intestino tenue, intestino crasso, stomaco, testicolo, o tiroide.

15 In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata prima o immediatamente dopo che un soggetto è trattato con radioterapia o chemioterapia dove la chemioterapia non comprende RTA 408 o le sue forme polimorfiche. In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata sia prima sia dopo che il sog-
20 getto è trattato con radioterapia, chemioterapia o entrambe. In alcune realizzazioni, il trattamento riduce gli effetti collaterali della radioterapia o della chemioterapia. In alcune realizzazioni, l'effetto collaterale è mucosite e dermatite. In alcune realizzazioni, il trattamento aumenta l'efficacia della radioterapia o della
25 chemioterapia. In alcune realizzazioni, la chemioterapia comprende

la somministrazione al paziente di una quantità terapeuticamente efficace di 5-fluorouracile o docetaxel.

L'addizionale terapia di trattamento in combinazione è inoltre contemplata dalla presente descrizione. Per esempio, in alcune realizzazioni, i metodi di trattamento del cancro in un soggetto, comprendenti la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto della presente descrizione, i metodi possono ulteriormente comprendere uno o più trattamenti scelti nel gruppo costituito dalla somministrazione di una quantità farmaceuticamente efficace di un secondo farmaco, radioterapia, immunoterapia, terapia genica, e chirurgia. In alcune realizzazioni, i metodi possono ulteriormente comprendere (1) il contatto di una cellula tumorale con il composto prima del contatto della cellula tumorale con il secondo farmaco, (2) il contatto di una cellula tumorale con il secondo farmaco prima del contatto della cellula tumorale con il composto, o (3) il contatto di una cellula tumorale con il composto e il secondo farmaco contemporaneamente. Il secondo farmaco, in alcune realizzazioni, può essere un antibiotico, un anti-infiammatorio, un anti-neoplastico, un anti-proliferativo, un anti-virale, un immunomodulatore, o un immunosoppressore. In altre realizzazioni, il secondo farmaco può essere un agente alchilante, un modulatore del recettore degli androgeni, un disgregante citoscheletrico, un modulatore del recettore degli estrogeni, un inibitore della istone-deacetilasi, un inibitore della HMG-CoA riduttasi, un inibitore della prenil-proteina trasferasi, un modulatore del recet-



tore retinoide, un inibitore della topoisomerasi, o un inibitore della tirosinchinasi. In alcune realizzazioni, il secondo farmaco è 5-azacitidina, 5-fluorouracile, acido 9-cis-retinoico, actinomicina D, alitretinoina, tutti gli acidi trans-retinoici, annamicina, axitinib, belinostat, bevacizumab, bexarotene, bosutinib, busulfan, capecitabina, carboplatino, carmustina, CD437, cediranib, cetuximab, chlorambucil, cisplatino, ciclofosfamide, citarabina, dacarbazina, dasatinib, daunorubicina, decitabina, docetaxel, dolastatin-10, doxifluridina, doxorubicina, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etoposide, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicin, esametilmelamina, idarubicina, ifosfamide, imatinib, irinotecan, isotretinoina, ixabepilone, lapatinib, LBH589, lomustina, mecloretamina, melphalan, mercaptopurina, methotrexate, mitomicina, mitoxantrone, MS-275, neratinib, nilotinib, nitrosourea, oxaliplatin, paclitaxel, plicamicina, procarbazine, semaxanib, semustina, sodio butirrato, sodio fenilacetato, streptozotocina, acido suberoilanolide idrossamico, sunitinib, tamoxifen, teniposide, thiotepa, tioguanina, topotecan, TRAIL, trastuzumab, tretinoina, tricostatina A, acido valproico, valrubicina, vandetanib, vinblastina, vincristina, vindesine, o vinorelbina.

Sono inoltre contemplati metodi per il trattamento o la prevenzione di una malattia con un componente infiammatorio in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto della presente descrizione. In alcune realizzazioni, la malattia può essere, per esempio,

lupus o artrite reumatoide. In altre realizzazioni, la malattia può essere una malattia infiammatoria intestinale, come morbo di Crohn o colite ulcerativa. In altre realizzazioni, la malattia con un componente infiammatorio può essere una malattia cardiovascolare. In altre realizzazioni, la malattia con un componente infiammatorio può essere diabete, come diabete di tipo 1 o di tipo 2. In altre realizzazioni, RTA 408, i suoi polimorfi, e le composizioni farmaceutiche possono inoltre essere usati per trattare complicazioni associate col diabete. Tali complicazioni sono ben note a una persona esperta nella tecnica e comprendono, ma non sono limitate a, per esempio, obesità, ipertensione, aterosclerosi, malattie coronariche, ictus, malattie vascolari periferiche, ipertensione, nefropatia, neuropatia, miocardiosi, retinopatia e sindrome metabolica (sindrome X). In altre realizzazioni, la malattia con un componente infiammatorio può essere una malattia della pelle, come psoriasi, acne, o dermatite atopica. La somministrazione di RTA 408, dei suoi polimorfi, e delle composizioni farmaceutiche nei metodi di trattamento di tali malattie della pelle può essere, ma non è limitata a, per esempio, quella topica o orale.

In altre realizzazioni, la malattia con un componente infiammatorio può essere una sindrome metabolica (sindrome X). Un paziente avente questa sindrome è caratterizzato per avere tre o più sintomi scelti dal seguente gruppo di cinque sintomi: (1) obesità addominale; (2) ipertrigliceridemia; (3) basso livello di colesterolo lipoproteico ad alta densità (HDL); (4) elevata pressione sanguigna; e

(5) elevato glucosio a digiuno, che può essere nell'intervallo caratteristico del diabete di tipo 2 se il paziente è anche diabetico. Ognuno di questi sintomi è definito in Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III, o ATP III), National Institutes of Health, 2001, NIH Publication No. 01-3670. I pazienti con sindrome metabolica, sia che abbiano, sia che non abbiano o sviluppino il diabete mellito, hanno un rischio aumentato di sviluppare le complicazioni macrovascolari e microvascolari che sono elencate sopra che compaiono con il diabete di tipo 2, come aterosclerosi e malattie coronariche.

Un altro metodo generale della presente descrizione implica un metodo per il trattamento o la prevenzione di una malattia cardiovascolare in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto della presente descrizione. In alcune realizzazioni, la malattia cardiovascolare può essere, ma non limitata a, per esempio, aterosclerosi, cardiomiopatia, malattia coronarica congenita, insufficienza cardiaca congestizia, miocardite, malattia reumatica del cuore, valvulopatia, malattia delle arterie coronariche, endocardite, o infarto del miocardio. La terapia in combinazione è inoltre contemplata per i metodi di trattamento o di prevenzione di una malattia cardiovascolare in un soggetto. Per esempio, tali metodi possono ulteriormente comprendere la somministrazione di una quantità farmaceuticamente efficace di uno o più farmaci cardiovascolari. Il farmaco cardiovascola-

re può essere, ma non limitato a, per esempio, un farmaco che abbassa il colesterolo, un anti-iperlipidemico, un bloccante i canali del calcio, un anti-ipertensivo, o un inibitore della HMG-CoA riduttasi. In alcune realizzazioni, esempi non limitativi di farmaci cardiovascolari comprendono amlodipina, aspirina, ezetimibe, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina o nitrendipina. In altre realizzazioni, altri esempi non limitativi di farmaci cardiovascolari comprendono atenololo, bucindololo, carvedilolo, clonidina, doxazosin, indoramin, labetalolo, metildopa, metoprololo, nadololo, oxprenololo, fenossibenzamina, fen-
10 tolamina, pindololo, prazosina, propranololo, terazosina, timololo o tolazolina. In altre realizzazioni, il farmaco cardiovascolare può essere, per esempio, una statina, come atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina,
15 rosuvastatina o simvastatina.

Metodi per il trattamento o la prevenzione di una malattia neurodegenerativa in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto della presente descrizione sono inoltre contemplati. In alcune realizzazioni, la malattia neurodegenerativa può essere scelta, per
20 esempio, nel gruppo costituito da morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer, sclerosi multipla (MS), morbo di Huntington e sclerosi laterale amiotrofica. In particolari realizzazioni, la malattia neurodegenerativa è morbo di Alzheimer. In particolari realizzazioni, la
25 malattia neurodegenerativa è MS, come MS progressiva primaria, pro-

gressiva secondaria di remissione ricorrente o progressiva ricorrente. In alcune realizzazioni, il soggetto può essere, per esempio, un primate. In alcune realizzazioni, il soggetto può essere un soggetto umano.

5 In particolari realizzazioni di metodi per il trattamento o la prevenzione di una malattia neurodegenerativa in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto della presente descrizione, il trattamento sopprime la demielinazione dei neuroni nel cervello o
10 nella corteccia spinale del soggetto. In alcune realizzazioni, il trattamento sopprime la demielinazione infiammatoria. In alcune realizzazioni, il trattamento sopprime la transezione degli assoni neuronali nel cervello o nella corteccia spinale del soggetto. In alcune
15 realizzazioni, il trattamento sopprime la transezione delle neuriti nel cervello o nella corteccia spinale del soggetto. In alcune realizzazioni, il trattamento sopprime l'apoptosi neuronale nel cervello o nella corteccia spinale del soggetto. In alcune realizzazioni,
20 il trattamento stimola la rimielinazione degli assoni neuronali nel cervello o nella corteccia spinale del soggetto. In alcune realizzazioni, il trattamento ristabilisce la perdita della funzione dopo un attacco MS. In alcune realizzazioni, il trattamento previene un nuovo attacco MS. In alcune realizzazioni, il trattamento previene una disabilità derivante da un attacco MS.

Un aspetto generale della presente descrizione contempla un metodo
25 per il trattamento o la prevenzione di un disturbo caratteriz-

zato dalla sovraespressione dei geni iNOS in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di RTA 408, forme polimorfiche, o una composizione farmaceutica della presente descrizione.

5 Un altro aspetto generale della presente descrizione contempla un metodo di inibizione della produzione di ossido nitrico IFN- γ -indotta nelle cellule di un soggetto, comprendente la somministrazione a detto soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di RTA 408, forme polimorfiche, o una composizione farmaceutica della
10 presente descrizione.

Ancora un altro metodo generale della presente descrizione contempla un metodo per il trattamento o la prevenzione di un disturbo caratterizzato dalla sovraespressione dei geni COX-2 in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di RTA 408, forme polimorfiche, o una composizione farmaceutica della presente descrizione.
15

Metodi di trattamento della malattia renale/dei reni (RKD) in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto della presente descrizione sono inoltre contemplati. Vedi il brevetto U.S. 8.129.429. RKD può derivare, per esempio, da un insulto tossico. L'insulto tossico può derivare da, ma non limitato a, per esempio, un agente di imaging o un farmaco. Il farmaco può essere un chemioterapico, per esempio. RKD può derivare da un danno di ischemia/riperfusione, in
20 alcune realizzazioni. In alcune realizzazioni, RKD deriva da diabete
25

o ipertensione. In alcune realizzazioni, RKD può derivare da una malattia autoimmune. RKD può essere inoltre definito come RKD cronico o RKD acuto.

In alcuni metodi di trattamento della malattia renale/dei reni (RKD) in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un composto della presente descrizione, il soggetto ha subito o è in fase di dialisi. In alcune realizzazioni, il soggetto ha subito o è candidato a essere sottoposto a trapianto renale. Il soggetto può essere un primate. Il primate può essere un soggetto umano. Il soggetto in questo o in un altro metodo può essere, per esempio, una mucca, un cavallo, un cane, un gatto, un maiale, un topo, un ratto o una cavia.

Inoltre, contemplato dalla presente descrizione è un metodo per migliorare la velocità glomerulare-di filtrazione o la clearance della creatinina in un soggetto, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di RTA 408, forme polimorfiche, o una composizione farmaceutica della presente descrizione.

In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata in una singola dose giornaliera. In altre realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata in più di una dose giornaliera. In alcune realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata in una quantità farmaceuticamente efficace.

In alcune realizzazioni, la dose è da circa 1 mg/kg a circa 2000 mg/kg. In altre realizzazioni, la dose è da circa 3 mg/kg a circa

100 mg/kg. In altre realizzazioni, la dose è di circa 3, 10, 30, o 100 mg/kg.

In altre realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata per via topica. In alcune realizzazioni, la somministrazione topica è somministrata alla pelle. In altre realizzazioni, la somministrazione topica è somministrata all'occhio.

In altre realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata per via orale. In altre realizzazioni, la composizione farmaceutica è somministrata intraocularmente.

10 BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

I seguenti disegni formano parte della presente descrizione e sono inclusi per dimostrare ulteriormente alcuni aspetti della presente descrizione. Una o più parole tedesche si possono trovare nei disegni comprendenti "Masseänderung" e "temperatur", che significano "variazione nella massa" e "temperatura", rispettivamente. L'invenzione può essere meglio compresa con riferimento a uno di questi disegni in combinazione con la descrizione dettagliata delle specifiche realizzazioni qui presentate.

FIG. 1 - Effetto di RTA 408 sulla produzione di ossido nitrico IFN γ -indotta e vitalità cellulare in cellule RAW264.7.

FIGG. 2a & b - Effetto di RTA 408 sull'attivazione della risposta antiossidante dell'elemento (ARE): (a) attività di luciferasi NQO1-ARE; (b) attività di luciferasi GSTA2-ARE.

FIGG. 3a-f - Aumento relativo di Nrf2 GST ARE dopo trattamento cellulare con (a) RTA 402; (b) 63415 (RTA 408); (c) 63170; (d) 63171;

(e) 63179; e (f) 63189. I grafici inoltre mostrano la vitalità delle cellule come saggiate usando reagente di proliferazione cellulare WST1 e misurando l'assorbanza dopo 1 ora. Tutti i farmaci furono somministrati in DMSO e le cellule furono coltivate a 10.000 cellule/pozzetto in piastre a 384 pozzetti in DMEM a basso contenuto di glucosio arricchito col 10% di FBS, 1% di Penicillina Streptomicina, e 0,8 mg/ml di Geneticina.

FIGG. 4a-d - Effetto di RTA 408 sull'espressione del gene in bersaglio Nrf2 in fibroblasti di polmone HFL1. (a) NQ01; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

FIGG. 5a-d - Effetto di RTA 408 sull'espressione del gene in bersaglio Nrf2 in cellule epiteliali bronchiali BEAS-2B. (a) NQ01; (b) HMOX1; (c) GCLM; (d) TXNRD1.

FIGG. 6a & b - Effetto di RTA 408 sui livelli di proteina in bersaglio Nrf2. (a) cellule SH-SY5Y; (b) SH-SY5Y BV2.

FIG. 7 - Effetto di RTA 408 sull'attività enzimatica di NQ01 in cellule RAW264.7.

FIG. 8 - Effetto di RTA 408 sui livelli totali di glutatione nella linea cellulare di epatocita AML-12.

FIG. 9 - Effetto di RTA 408 sull'assorbanza WST-1 come marcatore di NADPH.

FIGG. 10a-d - Effetto di RTA 408 sull'espressione dei geni implicati nella sintesi di NADPH. (a) H6PD; (b) PGD; (c) TKT; (d) ME1.

FIGG. 11a & b - (a) Effetto di RTA 408 sull'attivazione TNF- α -indotta di un reporter di luciferasi NF- κ B nella linea cellulare di

topo NIH3T3 con sovrapposizione della vitalità WST1 e della vitalità WST1/2. (b) Attivazione TNF- α -indotta di un reporter di luciferasi NF- κ B nella linea cellulare di topo NIH3T3. Il grafico mostra il cambiamento relativo in funzione della variazione logaritmica nella
5 concentrazione di RTA 408.

FIG. 12 - Effetto di (RTA 408 sull'attivazione TNF- α -indotta di un costruito di un reporter di luciferasi NF- κ B.

FIGG. 13a & b - (a) Effetto di RTA 408 sull'attivazione TNF- α -indotta di un reporter di luciferasi NF- κ B nella linea cellulare
10 A549 umana con la sovrapposizione della vitalità di WST1 e della vitalità WST1/2. (b) Attivazione TNF- α -indotta di un reporter di luciferasi NF- κ B nella linea cellulare A549 umana. Il grafico mostra il cambiamento relativo in funzione della variazione logaritmica nella concentrazione di RTA 408.

15 **FIG. 14** - Effetto di RTA 408 sulla fosforilazione TNF- α -indotta di I κ B α .

FIGG. 15a-d - Effetto di RTA 408 sull'espressione del gene della transaminasi: (a) ALT1 (GPT1); (b) ALT2 (GPT2); (c) AST1 (GOT1); (d) AST1 (GOT2). Gli asterischi indicano una differenza statisticamente
20 significativa dal gruppo di controllo (* P < 0,05; ** P < 0,01).

FIG. 16 - Effetto di RTA 408 sui livelli di piruvato in cellule di muscolo coltivate (* P < 0.05).

FIG. 17 - Effetto di 63415 in un modello di infiammazione polmonare LPS-mediata (% di variazione nelle citochine pro-infiammatorie ri-
25 spetto al trattamento LPS). Il composto 63415 fu somministrato_QDX3

ai tempi 0, 24, e 48 h seguito da LPS un'ora dopo l'ultima dose di 63415 in topi femmina BALB/c. Gli animali furono sacrificati 20 h dopo la somministrazione di LPS. BALF fu esaminato per espressione delle citochine pro-infiammatorie. Il composto 63415 riduceva le citochine pro-infiammatorie in un modo dose-dipendente, con riduzioni dei picchi varianti dal 50% all'80% in TNF- α , IL-6, e IL-12.

FIGG. 18a & b - Effetto di RTA 408 sull'infiammazione polmonare LPS-indotta nei topi. (a) citochine infiammatorie; (b) Bersagli Nrf2. RTA 408 fu somministrato a topi femmina BALB/c (n = 10) QD36 ai tempi 0, 24, 48, 72, 96, e 120 h seguito da LPS a 121 h con gli animali sacrificati a 141 h. Espressione della proteina di citochine pro-infiammatorie saggiata in BALF. Biomarcatori Nrf2 saggiati nel polmone. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa dal gruppo di controllo salino (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

FIGG. 19a & b - Effetto di 63415 su infiltrati BALF nell'infiammazione polmonare bleomicina-indotta: (a) conteggio delle cellule di fluido BAL; (b) peso corporeo. Il composto 63415 fu somministrato QDX39 ai giorni - 10 a 28 in topi C57BL/6. Bleomicina fu somministrata al giorno 0. I pesi furono misurati giornalmente. I conteggi delle cellule BALF furono ottenuti al momento del sacrificio. Fu osservata una notevole riduzione negli infiltrati infiammatori. Non fu osservato alcun miglioramento significativo nel punteggio dell'infiammazione cronica, della fibrosi interstiziale o nel numero di foci fibrotici.

FIGG. 20a & b - Effetto di RTA 408 su fibrosi polmonare bleomicina-indotta nei ratti: (a) PMN; (b) Idrossiprolina. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa dal gruppo di controllo della bleomicina ($*P < 0.05$).

5 **FIG. 21** - Effetto di RTA 408 sugli enzimi in bersaglio Nrf2 in polmoni da ratti con fibrosi polmonare bleomicina-indotta. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa dal gruppo di controllo salino ($*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0.001$).

FIGG. 22a-e - Effetto di RTA 408 su COPD indotta da fumo di sigaretta nei topi. (a) KC; (b) IL-6; (c) TNF- α ; (d) IFN- γ ; (e) RANTES. RTA 408 (63415) fu esaminato a livelli di dose di 3 mg/kg (bassa), 10 mg/kg (media), e 30 mg/kg (elevata). Un analogo di AIM (63355) fu esaminato nello stesso studio per confronto. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa dal gruppo di controllo CS.

10
15

FIG. 23 - Effetto di RTA 408 sugli enzimi in bersaglio Nrf2 in polmoni da topi con COPD indotta da fumo di sigaretta. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa dal gruppo di controllo salino ($*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$). Le croci rappresentano una differenza statisticamente significativa da topi esposti a fumo di sigaretta e al veicolo somministrato ($\dagger P < 0,05$).

20

FIGG. 24a-d - Effetti di 63415 (RTA 408) sul peso corporeo in un modello di sepsi di topo BALB/c. LPS fu somministrato a tutti gli animali al giorno 0. (a) Peso corporeo: 63415 (RTA 408); (b) Peso corporeo: RTA 405; (c) LPS sistemico: % di sopravvivenza: 63415 (RTA

25

408); (d) LPS sistemico: % di sopravvivenza: RTA 405. Sia RTA 405 sia 63415 (RTA 408) furono somministrati QDX5 ai giorni da -2 a 2. Il composto 63415 (RTA 408) migliorava la sopravvivenza. Il peso corporeo in funzione del tempo nei topi BALB/c 63415-trattati serve
5 come un modello per la sepsi.

FIG. 25 - Effetto di 63415 in un modello di mucosite orale indotta da radiazioni. RTA 405 o 63415 (RTA 408) fu somministrato BID320 ai giorni da -5 a -1 e ai giorni da 1 a 15 a criceti Syrian Golden maschi. La radiazione si presentava al giorno 0. I punteggi della mu-
10 cosite variavano da 0 a 5 in base alle manifestazioni cliniche (0: completamente sani; 1-2: eritema da leggero a grave; 3-5: gradi varianti di ulcerazione). 63415 migliorava la mucosite a 30 mg/kg e 100 mg/kg con una riduzione fino al 36% nell'ulcerazione.

FIG. 26 - Effetto di 63415 sull'induzione del gene in bersaglio Nrf2 in uno studio di tossicità del topo al giorno 14 in topi C57BL/6. mRNAs dei geni in bersaglio Nrf2 furono valutati nei fegati dei topi
15 trattati con PO QDx14. Furono osservati sostanziali aumenti nell'espressione di mRNA per i geni in bersaglio multipli Nrf2 ed erano consistenti con l'esposizione dei tessuti.

FIGG. 27a & b - Effetto di 63415 sull'induzione del gene in bersaglio Nrf2 nei fegati di ratti: (a) Geni in bersaglio; (b) Regolatori negativi. mRNAs dei geni in bersaglio Nrf2 furono valutati nei fegati di ratti trattati con PO QDX14.

FIGG. 28a & b - Effetto di 63415 su geni in bersaglio Nrf2 in tessuti di scimmia: (a) Fegato; (b) Polmone. mRNAs di geni in bersaglio
25

Nrf2 furono saggiati in scimmie trattate PO QDX14 usando la tecnologia Panomics QuantiGene® 2.0 Plex.

FIGG. 29a & b - Effetto di 63415 sull'attività enzimatica in bersaglio Nrf2 in fegato di topo: (a) attività NQO1; (b) attività GST.

5 L'attività enzimatica in bersaglio Nrf2 fu valutata in fegati di topi trattati PO QDX14. Le attività degli enzimi NQO1 e GST furono indotte in un modo dose-dipendente.

FIGG. 30a & b - Effetto di 63415 sull'attività enzimatica in bersaglio Nrf2 in fegato di ratto: (a) attività NQO1; (b) attività GST.

10 L'attività enzimatica in bersaglio Nrf2 fu valutata nei fegati di ratti trattati PO QDX14. Le attività enzimatiche NQO1 e GST furono indotte in un modo dose-dipendente.

FIGG. 31a & b - Effetti di 63415 sull'induzione dell'attività enzimatica in bersaglio Nrf2 in vari tessuti di scimmie cynomolgus: (a)

15 attività NQO1; (b) attività GSR.

FIGG. 32a & b - Concentrazione di RTA 408 in fegato, polmone, e cervello di topo, e attività NQO1 in fegato di topo dopo 14 giorni di somministrazione orale giornaliera. (a) Distribuzione nei tessuti di RTA 408 nei topi dopo 14 giorni di somministrazione orale giornaliera.

20 I dati rappresentano la media $\pm$ SD delle concentrazioni di RTA 408 in tessuto raccolto 4 h dopo la dose finale dello studio. I numeri al di sopra delle barre di errore sono rappresentativi della media. (b) Correlazione del contenuto di RTA 408 in fegato di topo con L'attività dell'enzima NQO1. Il contenuto nel fegato di RTA 408
25 nei singoli fegati di ratto fu rappresentato in un diagramma contro

la singola attività enzimatica da questo rapporto.

FIGG. 33a & b - Concentrazione RTA 408 in plasma, fegato, polmone, e cervello di ratto, e attività NQ01 in fegato di ratto dopo 14 giorni di somministrazione orale giornaliera. (a) Distribuzione nei tessuti di RTA 408 in ratti dopo 14 giorni di somministrazione orale giornaliera. I dati rappresentano la media $\pm$ SD delle concentrazioni di RTA 408 in tessuto raccolto 4 h dopo la dose finale dello studio. I numeri al di sopra delle barre di errore sono rappresentativi della media. *Due valori furono esclusi dal calcolo della media in quanto anormali, definiti come valori che provocavano la serie di dati che ricadevano nel test di normalità Shapiro-Wilk. (b) Correlazione del contenuto di RTA 408 nel fegato di ratto con l'attività dell'enzima NQ01. Il contenuto di RTA 408 nel fegato di singoli ratti fu riportato in un diagramma contro la singola attività enzimatica da questo rapporto. I tessuti dal gruppo di dose di 100 mg/kg di RTA 408 furono raccolti al giorno 6, e le tossicità osservate in questo gruppo precludevano le valutazioni dell'attività enzimatica di NQ01.

FIGG. 34a & b - Effetto del trattamento di 63415 sull'attivazione di Nrf2 in PBMC di scimmia: (a) PBMC NQ01 vs. Concentrazione plasmatica; (b) Polmone NQ01 vs. PBMC NQ01.

FIG. 35 - Sommario degli studi di tossicità di 63415 nelle scimmie al giorno 14. Tutte le dosi furono ben tollerate senza segnali clinici negativi. I dati di chimica clinica non suggerivano una tossicità evidente.

FIG. 36 - Effetto del tempo di dosaggio sulla concentrazione plasma-

tica di RTA 408 dopo somministrazione topica oculare e orale. La concentrazione plasmatica di RTA 408 fu inoltre misurata dopo 5 giorni di somministrazione oculare topica giornaliera di RTA 408 e determinata per rimanere relativamente consistente dalle misurazioni prese dopo il primo giorno.

FIGG. 37a & b - Correlazione dell'esposizione a RTA 408 in plasma di scimmia con espressione di mRNA di NQO1 e SRXN1 in PBMCs: (a) NQO1; (b) SRXN1.

FIG. 38 - Concentrazione di RTA 408 in vari tessuti o fluidi nell'occhio in funzione del tempo dopo 5 giorni di dosaggio oculare topico. La concentrazione di RTA 408 nel plasma fu inoltre misurata dopo somministrazione oculare topica.

FIG. 39 - Effetto di RTA 408 sull'incidenza della dermatite di grado 3 provocata dall'esposizione acuta a radiazioni per differenti concentrazioni di RTA 408 somministrato per via topica.

FIG. 40 - Effetto di RTA 408 sull'incidenza della dermatite di grado 2 provocata dall'esposizione acuta a radiazioni per un corso di trattamento di 30 giorni per differenti concentrazioni di RTA 408 somministrato per via topica.

FIG. 41 - Effetto di RTA 408 sull'incidenza della dermatite di grado 2 provocata dall'esposizione acuta a radiazioni per un corso di trattamento di 28 giorni per differenti concentrazioni di RTA 408 somministrato per via orale.

FIGG. 42a & b - (a) Analisi dell'area sotto la curva del punteggio clinico della dermatite in funzione del tempo per ciascuno dei dif-

ferenti gruppi di controllo comprendenti tutti gli animali usati nel test. (b) L'analisi dell'area sotto la curva dei punteggi clinici della dermatite in funzione della durata di tali punteggi per ciascuno dei differenti gruppi di controllo comprendenti soltanto gli animali che completavano tutti i 30 giorni di sperimentazione.

FIG. 43 - Media del primo punteggio cieco della dermatite da radiazione acuta in funzione del tempo per non trattato, non trattato senza esposizione a radiazioni, veicolo soltanto e tre quantità orali di RTA 408 a 3, 10, e 30 mg/kg. Il punteggio della dermatite era basato su una scala dove 0 era completamente sano, 1-2 mostrava un eritema da blando a moderato con una desquamazione da minima a leggera, 3-4 mostrava un eritema da moderato a grave e desquamazione, e 5 mostrava un'ulcera evidente.

FIG. 44 - Punteggio medio della dermatite da radiazione acuta in funzione del tempo per non trattato, non trattato senza esposizione a radiazioni, veicolo soltanto, e tre quantità orali di RTA 408 a 3, 10, e 30 mg/kg misurato ogni due giorni dal giorno 4 al giorno 30. Il punteggio della dermatite era basato su una scala dove 0 era completamente sano, 1-2 mostrava un eritema da blando a moderato con una desquamazione da minima a leggera, 3-4 mostrava un eritema da moderato a grave e desquamazione, e 5 mostrava un'ulcera evidente.

FIG. 45 - Punteggio medio della dermatite da radiazione acuta in funzione del tempo per non trattato, non trattato senza esposizione a radiazioni, veicolo soltanto, e tre quantità orali di 408 a 0,01%, 0,1%, e 1% misurato ogni due giorni dal giorno 4 al giorno 30. Il

punteggio della dermatite era basato su una scala dove 0 era completamente sano, 1-2 mostravano un eritema da blando a moderato con una desquamazione da minima a leggera, 3-4 mostravano un eritema da moderato a grave e desquamazione, e 5 mostrava un'ulcera evidente.

5 **FIG. 46** - Punteggi clinici della dermatite da radiazione frazionale tracciati verso il tempo e le variazioni nel punteggio della dermatite per ciascun gruppo del test. Il punteggio della dermatite era basato su una scala dove 0 era completamente sano, 1-2 mostravano un eritema da blando a moderato con una desquamazione da minima a leggera, 3-4 mostravano un eritema da moderato a grave e desquamazione,
10 e 5 mostrava un'ulcera evidente.

FIG. 47 - Grafico dell'analisi AUC analisi che mostra il punteggio della dermatite (gravità 3 giorni) per ciascuno dei gruppi del test rispetto all'intero periodo di osservazione. I punteggi della dermatite furono valutati ogni due giorni dal giorno 4 al giorno 30 dello studio.
15

FIGG. 48a & b - (a) Grafico dell'assorbanza a 595 nm per la linea cellulare LNCaP di cancro della prostata trattata che mostra un effetto citotossico relativo sulle cellule trattate con un agente chemioterapico RTA 408 rispetto a RTA 408 da solo. (b) Grafico dell'assorbanza a 595 nm per la linea cellulare DU-145 di cancro della prostata trattata che mostrava un effetto citotossico relativo sulle cellule trattate con un chemioterapico e RTA 408 rispetto RTA 408 da solo.
20

25 **FIG. 49** - Versione in bianco e nero di fotografie a colori di topi

visualizzati che mostravano l'attività di luciferasi di tumori per tre topi: un animale di controllo senza trattamento, un animale sottoposto solamente a radiazioni ionizzanti (singola dose, 18 Gy), e un animale sottoposto sia a radiazioni ionizzanti (singola dose, 18 Gy, giorno 0) e RTA 408 (17,5 mg/kg i.p., una volta al giorno ai giorni da -3 a -1, poi singole dosi ai giorni 1, 3, e 5). I colori indicati dalle frecce sono indicativi dell'intensità, le intensità essendo rappresentate da rosso, giallo, verde e blu in ordine dall'intensità più elevata a quella più bassa.

FIG. 50 - Riduzione delle concentrazioni di proteina dell'umore acqueo per differenti formulazioni RTA 408 (barre scure) in confronto con i valori della letteratura per MaxiDex® (0.1% desametasone) e mapracorat (barre chiare) dopo induzione di paracentesi.

FIG. 51 - Soppressione dose-dipendente di NO *in vivo* mediante 63415. Topi CD-1 (n = 6) furono dosati con DMSO o AIM alimentandoli mediante sonda gastrica. LPS (5 mg/kg) fu somministrato 24 h dopo. Ventiquattrore dopo la somministrazione LPS, il sangue intero fu raccolto per il saggio NO. L'inibizione NO fu determinata mediante la reazione di Griess da plasma ridotto, deproteinizzato.

FIG. 52 - Distribuzione estesa di 63415 (RTA 408) in tessuti di topo. I topi furono dosati PO QDX3 con o 25 mg/kg 63415 (RTA 408) o 25 mg/kg RTA 405. Sangue (plasma e il sangue intero) e tessuti (cervello, fegato, polmone, e reni) furono raccolti 6 h dopo l'ultima dose. Fu eseguita l'analisi semi-quantitativa del contenuto di farmaco. Furono osservati livelli notevoli nel CNS.

FIG. 53 - Induzione dell'attività NQ01 in fegato, polmone, e reni di topo mediante 63415. Topi furono dosati PO QDX3 con 25 mg/kg. Tessuti furono raccolto 6 h dopo l'ultima dose, e fu eseguita l'analisi dell'attività di NQ01. Fu osservata un'attivazione significativa di NQ01 in tessuti multipli.

FIG. 54 - Sommario di studi di tossicità nel topo di 63415 al giorno 14. Topi C57BL/6 furono dosati PO QDX14. I punti finali comprendevano sopravvivenza, peso e chimiche cliniche. Tutti gli animali sopravvivevano al giorno 14. Non si presentavano variazioni di peso significative in confronto col gruppo del veicolo, e non c'era evidenza di tossicità a qualsiasi dose in base alle chimiche cliniche.

FIG. 55 - Studi di tossicità nel topo della distribuzione nei tessuti di 63415 al giorno 14 in topi C57BL/6. Campioni di cervello, polmone, e fegato furono raccolti 4 h dopo la dose finale e fu quantificato il contenuto di 63415 usando un metodo sensibile a LC/MS/MS. Le esposizioni a 10 e 100 mg/kg nel polmone superavano la IC50 *in vitro* per l'induzione di NO di 55- e 1138-volte, rispettivamente. L'esposizione a 10 e 100 mg/kg nel cervello superava la IC50 *in vitro* per l'induzione di NO di 29- e 541-volte, rispettivamente.

FIG. 56 - Distribuzione nei tessuti di 63415 in ratti Sprague Dawley. I tessuti furono raccolti per quattro ore dopo un dosaggio finale al giorno 14 o al giorno 6 (100 mg/kg), estratti, e determinati quantitativamente per il contenuto di 63415 usando un metodo sensibile LC/MS/MS. Il composto 63415 si distribuisce bene nei tessuti in bersaglio. L'esposizione a 10 mg/kg nel polmone e nel cervello supe-

rava la IC50 *in vitro* per l'inibizione NO di 294- e 240-volte, rispettivamente.

FIG. 57 - Distribuzione nei tessuti in bersaglio del composto 63415 in scimmie cynomolgus. I tessuti furono raccolti quattro ore dopo il dosaggio finale al giorno 14. Il contenuto del composto 63415 fu estratto e determinato quantitativamente usando un metodo sensibile LC/MS/MS.

FIG. 58 - Spettro FT-Raman (3400-50 cm⁻¹) del campione PP415-P1, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1).

10 **FIG. 59** - PXRD (1.5-55.5 °2θ) modello del campione PP415-P1, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1).

FIG. 60 - Termogramma TG-FTIR (25-350°C) del campione PP415-P1, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1).

15 **FIG. 61** - Spettro ¹H-NMR in DMSO-d₆ del campione PP415-P1, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1).

FIG. 62 - Termogramma DSC del campione PP415-P1, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1).

FIG. 63 - Isoterma DVS del campione PP415-P1, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1).

20 **FIG. 64** - Spettro FT-Raman del campione PP415-P1, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1), dopo che la misurazione DVS (top) è invariata in confronto al materiale prima della misurazione DVS (in basso). Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

25 **FIG. 65** - Modello PXRD del campione PP415-P1, che corrisponde alla

forma amorfa (Classe 1), dopo che la misurazione DVS (in alto) è invariata in confronto al materiale prima della misurazione DVS (in basso). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono stati allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

5 **FIG. 66** - Modello PXRD del campione PP415-P40 (in alto) corrisponde al modello della forma del solvato (Classe 2) (in basso, campione PP415-P19). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 67 - Modelli PXRD dei campioni di stabilità PP415-P2a (in alto), PP415-P3a (secondo dall'alto), PP415-P4a (nel mezzo), e PP415-P5a (secondo dal basso), che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1), dopo una settimana non mostrano differenze in confronto al materiale di partenza al punto temporale t_0 (in basso, campione PP415-P1). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono allungati
10 nella direzione y- per scopo di confronto.
15

FIG. 68 - Modelli PXRD dei campioni di stabilità PP415-P2b (in alto), PP415-P3b (secondo dall'alto), PP415-P4b (nel mezzo), e PP415-P5b (secondo dal basso), che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1), dopo due settimane non mostrano differenze in confronto al materiale di partenza al punto temporale t_0 (in basso, campione PP415-P1). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono allungati
20 nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 69 - Modelli PXRD dei campioni di stabilità PP415-P2c (in alto), PP415-P3c (secondo dall'alto), PP415-P4c (nel mezzo), e PP415-P5c (secondo dal basso), che corrisponde alla forma amorfa (Classe
25

1), dopo quattro settimane non mostrano differenze in confronto al materiale di partenza al punto temporale t_0 (in basso, campione PP415-P1). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

5 **FIG. 70** - Spettri FT-Raman ($2400-50\text{ cm}^{-1}$) di campioni della forma del solvato (Classe 2) (PP415-P7: in alto; PP415-P8: secondo dall'alto; PP415-P9: terzo dall'alto; PP415-P10: quarto dall'alto; PP415-P11: nel mezzo; PP415-P 15: quarto dall'alto; PP415-P17: terzo dal basso; PP415-P21: secondo dal basso; PP415-P24: in basso). Gli spettri sono
10 stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 71 - Lo spettro FT-Raman ($1750-1000\text{ cm}^{-1}$) della forma del solvato (Classe 2) (PP415-P7: in alto) differisce chiaramente dallo spettro della forma amorfa (Classe 1) (PP415-P1: in basso). Gli spettri
15 sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 72 - Spettri FT-Raman ($1750-1000\text{ cm}^{-1}$) di classe 2 (campione PP415-P19: in alto), classe 3 (campione PP415-P6: secondo dall'alto), classe 4 (campione PP415-P13: secondo dal basso), e classe 5
20 (campione PP415-P 14: in basso) differiscono significativamente l'uno dall'altro. Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 73 - Modelli PXRD ($2-32\text{ }^{\circ}2\theta$) di campioni della forma del solvato (Classe 2) (PP415-P7: in alto; PP415-P8: secondo dall'alto; PP415-P10: terzo dall'alto; PP415-P15: quarto dall'alto; PP415-P17:
25

nel mezzo; PP415-P18: quarto dall'alto; PP415- P19: terzo dal basso; PP415-P21: secondo dal basso; PP415-P24: in basso). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

5 **FIG. 74** - Modelli PXRD ($11-21^\circ 2\theta$) di alcuni campioni della forma del solvato (Classe 2) (PP415-P7: in alto; PP415-P8: secondo dall'alto; PP415-P10: nel mezzo; PP415-P21: secondo dal basso; PP415-P24: in basso). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

10 **FIG. 75** - Modelli PXRD ($2-32^\circ 2\theta$) di classe 2 (campione PP415-P19: in alto), classe 3 (campione PP415-P6: secondo dall'alto), classe 4 (campione PP415-P13: secondo dal basso), e classe 5 (campione PP415-P14: in basso) sono distintamente differenti. I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.
15

FIG. 76 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P7, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 77 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P21, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

20 **FIG. 78** - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P24, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 79 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P29, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 80 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P47, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).
25

FIG. 81 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P48, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 82 - Spettri FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) della forma del solvato (Classe 2) (in basso, campione PP415-P7) e della forma anidra di solvato (Classe 2) (in alto, campione PP415-P30) sono simili e mostrano soltanto piccole differenze che possono essere difficilmente distinte nel grafico. Gli spettri sono in scala per scopo di confronto.

FIG. 83 - Modello PXRD della forma anidra di solvato (Classe 2), campione PP415-P30 (in alto) in confronto al modello della forma del solvato (Classe 2), campione PP415-P7 (in basso). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 84 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P30 anidro, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 85 - Spettro FT-Raman del campione PP415-P18 anidro (grigio chiaro) è identico allo spettro del campione originale PP415-P15 (grigio scuro) sono simili e mostrano soltanto piccole differenze che possono essere difficilmente distinte nel grafico. Gli spettri sono stati disposti in scala per scopo di confronto.

FIG. 86 - Modello PXRD del campione PP415-P18 anidro (in alto) mostra piccole differenze dal modello del campione originale PP415-P15 (in basso), pur essendo entrambe forme di solvato (Classe 2). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 87 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P18, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 88 - Spettro FT-Raman del campione PP415-P17 (in alto) è quasi identico allo spettro dei campioni anidri PP415-P19 (nel mezzo) e PP415-P32 (in basso) e mostrano soltanto piccole differenze che possono essere difficilmente distinte nel grafico. Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 89 - Modello PXRD del campione PP415-P19 anidro (nel mezzo) è differente dal modello del campione originale PP415-P17 (in alto) ma ancora corrisponde alla forma della classe 2. Il modello del dell'ulteriore campione PP415-P32 anidro (in basso) mostra picchi più ampi con un rapporto S/N inferiore. Il materiale è meno cristallino, ma ancora corrisponde alla forma della classe 2. I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 90 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P19, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 91 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P32A, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 92 - Spettro FT-Raman del campione PP415-P21 (in alto) è identico allo spettro dei campioni anidri PP415-P28 (nel mezzo) e PP415-P34 (in basso). Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 93 - Modelli PXRD dei campioni anidri PP415-P28 (nel mezzo) e

PP415-P34 (in basso) mostrano picchi più ampi con un rapporto S/N inferiore, indicando una cristallinità inferiore dei campioni in confronto al modello del campione originale PP415-P21 (in alto). I modelli sono alquanto differenti ma ancora corrispondono alla forma della classe 2. Sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 94 - Termogramma TG-FTIR del campione anidro PP415-P28, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 95 - Termogramma TG-FTIR del campione anidro PP415-P34, che corrisponde a una forma di solvato (Classe 2).

FIG. 96 - Spettri FT-Raman ($2400-50\text{ cm}^{-1}$) dei campioni della forma del solvato (Classe 3) (PP415-P6: in alto; PP415-P12: nel mezzo; PP415-P20: in basso). Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 97 - Spettri FT-Raman ($1750-1000\text{ cm}^{-1}$) dei campioni della forma del solvato (Classe 3) (PP415-P6: in alto; PP415-P12: secondo dall'alto; PP415-P20: secondo dal basso) sono molto simili fra di loro con soltanto piccole differenze, ad esempio, a $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$, ma sono chiaramente differenti dalla classe 1 (PP415-P1: in basso). Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 98 - Modelli PXRD ($2-32^\circ 2\theta$) dei campioni della forma del solvato (Classe 3) (PP415-P6: in alto; PP415-P12: nel mezzo; PP415-P20: in basso). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 99 - Modelli PXRD ($13.5-18.5^\circ 2\theta$) dei campioni della forma di solvato (Classe 3) (PP415-P6: in alto; PP415-P12: nel mezzo; PP415-P20: in basso) mostrano piccole differenze. I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 100 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P6, che corrisponde alla forma del solvato (Classe 3).

FIG. 101 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P12, che corrisponde alla forma del solvato (Classe 3).

FIG. 102 - Termogramma TG-FTIR della forma anidra di solvato (Classe 3), campione PP415-P25.

FIG. 103 - Termogramma TG-FTIR dell'ulteriore forma anidra di solvato (Classe 3), campione PP415-P33.

FIG. 104 - Spettri FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) della forma del solvato (Classe 3) (in alto, campione PP415-P6), della forma anidra di solvato (Classe 3) (nel mezzo, campione PP415-P25), e dell'ulteriore forma anidra di solvato (Classe 3) (in basso, campione PP415-P33) sono identici. Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 105 - Modelli PXRD ($4-24^\circ 2\theta$) della forma del solvato (Classe 3) (in alto, campione PP415-P6), della forma anidra di solvato (Classe 3) (nel mezzo, campione PP415-P25), e dell'ulteriore forma anidra di solvato (Classe 3) (in basso, campione PP415-P33). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 106 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P13, che corrisponde a una forma di un solvato di acetonitrile (Classe 4).

FIG. 107 - Spettri FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) di un solvato di acetonitrile (Classe 4) (grigio scuro, campione PP415- P13) e del materiale anidro di una forma di solvato di acetonitrile (Classe 4) (grigio chiaro, campione PP415-P26) sono identici e si sovrappongono perfettamente. Gli spettri sono stati disposti in scala per scopi di confronto.

FIG. 108 - Modello PXRD della forma anidra di solvato di acetonitrile (Classe 4), campione PP415-P26 (in basso), in confronto al modello di riferimento di solvato di acetonitrile (Classe 4), campione PP415-P13 (in alto). I modelli non sono stati disposti in scala, ma furono allungati nella direzione y- per scopi di confronto.

FIG. 109 - Termogramma TG-FTIR della forma anidra di solvato di acetonitrile (Classe 4), campione PP415-P26.

FIG. 110 - Spettri FT-Raman ($1800-700\text{ cm}^{-1}$) di un solvato di acetonitrile (Classe 4) (in alto, campione PP415-P35), e della forma anidra di solvato di acetonitrile (Classe 4) (nel mezzo, campione PP415-P36 e in basso, campione PP415-P37) corrispondono fra di loro. Gli spettri sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopi di confronto.

FIG. 111 - Modelli PXRD ($4-24\text{ }^{\circ}2\theta$) di un solvato di acetonitrile (Classe 4) (in alto, campione PP415-P35) e della forma anidra di solvato di acetonitrile (Classe 4) (nel mezzo, campione PP415-P36 e in basso, campione PP415-P37) sono in accordo fra di loro. I modelli

sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 112 - Termogramma TG-FTIR della forma anidra di solvato di acetonitrile (Classe 4), campione PP415-P36.

5 **FIG. 113** - Termogramma TG-FTIR della forma anidra di solvato di acetonitrile (Classe 4), campione PP415-P37.

FIG. 114 - Isoterma DVS della forma desolvatata del solvato di acetonitrile (Classe 4) campione PP415-P37).

10 **FIG. 115** - Modello PXRD del campione PP415-P37, una forma di solvato di acetonitrile (Classe 4) dopo la misurazione DVS (in basso) è invariata in confronto al materiale prima della misurazione DVS (in alto). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono stati allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

15 **FIG. 116** - Termogramma DSC della forma desolvatata del solvato di acetonitrile (Classe 4) (campione PP415-P37).

FIG. 117 - Termogramma DSC di una miscela ~1:1 della forma amorfa (Classe 1), campione PP415-P1, con la forma desolvatata del solvato di acetonitrile (Classe 4), campione PP415-P36.

20 **FIG. 118** - Termogramma DSC di una miscela ~1:1 della forma amorfa (Classe 1), campione PP415-P1, con la forma desolvatata del solvato di acetonitrile (Classe 4), campione PP415-P36 (esperimento numero: PP415-P39). La scansione di riscaldamento (Stadio 1) fu arrestata per 30 min a 173°C (Stadio 2) e poi ripresa (Stadio 3).

25 **FIG. 119** - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P14, che corrisponde a una forma di solvato di THF (Classe 5).

FIG. 120 - Spettri FT-Raman ($1800-1100\text{ cm}^{-1}$) di una forma di solvato di THF (Classe 5) (linea tratteggiata, campione PP415-P14), materiale anidro di una forma di solvato di THF (Classe 5) (linea punteggiata, campione PP415-P27), e della forma amorfa (Classe 1) (linea continua, campione PP415-P1). Gli spettri sono stati disposti in scala per scopo di confronto e mostrano piccole variazioni nella grandezza ma una piccola variazione corrispondente nella forma spettrale.

FIG. 121 - Modello PXRD della forma anidra del solvato di THF (Classe 5), campione PP415-P27 (in alto) in confronto al modello della forma del solvato di THF (Classe 5), campione PP415-P14 (in basso). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono stati allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 122 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P27, che corrisponde a un solvato anidro di THF (Classe 5).

FIG. 123 - Modello PXRD del campione PP415-P41 (in alto) corrisponde al modello della forma del solvato di THF (Classe 5) (nel mezzo, campione PP415-P14) e non al modello della forma di solvato in eptano, (Classe 2) (in basso, campione PP415-P19). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopi di confronto.

FIG. 124 - Modello PXRD del campione PP415-P45 (in alto) corrisponde al modello della forma del solvato di THF (Classe 5) (nel mezzo, campione PP415-P14) e non al modello della forma di solvato in eptano (Classe 2) (in basso, campione PP415-P19). I modelli sono stati

disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 125 - Modello PXRD del campione PP415-P41 (in alto) corrisponde a una forma di solvato di THF (Classe 5). Dopo essiccamento del campione PP415-P41 per 1 giorno (secondo dall'alto, campione: PP415-P44), il materiale è principalmente amorfo. Rimangono alcuni grandi picchi con bassa intensità. Dopo ulteriore essiccamento durante la notte (secondo dal basso, campione PP415-P44a) l'intensità di questi ampi picchi è ulteriormente ridotta. La forma amorfa (Classe 1) è mostrata come riferimento (in basso, campione: PP415-P42). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono stati allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 126 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P44a, che corrisponde alla forma amorfa (Classe 1).

FIG. 127 - Modello PXRD del campione PP415-P45 (in alto) corrisponde a una forma di solvato di THF (Classe 5). Dopo essiccamento del campione PP415-P45 per 1 giorno (secondo dall'alto, campione PP415-P46), il materiale è principalmente amorfo. Rimangono alcuni ampi picchi con bassa intensità. Dopo un totale di 4 giorni di essiccamento (secondo dal basso, campione PP415-P46a), il modello rimane invariato. La forma amorfa (Classe 1) è mostrata come riferimento (in basso, campione PP415-P42). I modelli non sono stati disposti in scala, ma sono stati allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 128 - Termogramma TG-FTIR del campione PP415-P46a, che corri-

sponde alla forma amorfa (Classe 1).

FIG. 129 - Modello PXRD del campione PP415-P42 (in alto) corrisponde al modello della forma amorfa (Classe 1) (in basso, campione PP415-P1). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 130 - Modello PXRD del campione PP415-P43 (in alto) corrisponde al modello della forma isostrutturale del solvato (Classe 2) (in basso, campione PP415-P19) e non al modello della forma del solvato di THF (Classe 5) (nel mezzo, campione PP415-P14). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 131 - I modelli PXRD dei campioni PP415-P47 (in alto) e PP415-P48 (nel mezzo) corrispondono essenzialmente al modello delle forme isostrutturali del solvato (Classe 2) (in basso, campione PP415-P19), anche se ci sono alcune differenze. I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

FIG. 132 - Modello PXRD di campione PP415-P49 (in alto) corrisponde al modello della forma amorfa (Classe 1) (in basso, campione PP415-P1). I modelli sono stati disposti in scala e allungati nella direzione y- per scopo di confronto.

DESCRIZIONI DI REALIZZAZIONI ILLUSTRATIVE

[0041] La presente invenzione fornisce in un aspetto il composto:

N-((4a*S*, 6a*R*, 6b*S*, 8a*R*, 12a*S*, 14a*R*, 14b*S*)-11-ciano-2, 2, 6a, 6b, 9, 9, 12a-eptametil-10, 14-dioxo-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6,

Giulio Montebelli

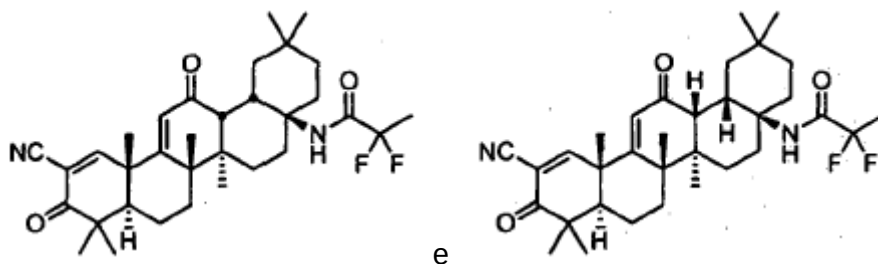
6a,6b,7,8,8a,9,10,12a,14,14a,14b-ottadecaidropicen-4a-il)-2,2-difluoropropanammide, che è anche qui descritto come RTA 408, 63415, o PP415. In altri aspetti non limitativi, sono inoltre qui fornite le loro forme polimorfiche, comprendenti i loro solvati. In altri
5 aspetti non limitativi, sono inoltre qui forniti i loro sali farmaceuticamente accettabili. In altri aspetti non limitativi, sono inoltre forniti metodi di preparazione, composizioni farmaceutiche, e kit e articoli di produzione di questi composti e delle loro forme polimorfiche.

10 I. Definizioni

Quando usato nel contesto di un gruppo chimico: "idrogeno" significa -H; "idrossi" significa -OH; "oxo" significa =O; "carbonile" significa -C(=O)-; "carbossi" significa -C(=O)OH (anche scritto come -COOH o -CO₂H); "alo" significa indipendentemente -F, -Cl, -Br o -I;
15 "ammino" significa -NH₂; "idrossiammino" significa -NHOH; "nitro" significa -NO₂; immino significa =NH; "ciano" significa -CN; "isocianato" significa -N=C=O; "azido" significa -N₃; in un contesto monovalente "fosfato" significa -OP(O)(OH)₂ o una loro forma deprotonata; in un contesto bivalente "fosfato" significa -OP(O)(OH)O- o una sua
20 forma deprotonata; "mercapto" significa -SH; e "tio" significa =S; "solfonile" significa -S(O)₂-; e "solfinile" significa -S(O)-. Una qualsiasi valenza non definita su un atomo di una struttura mostrata in questa domanda implicitamente rappresenta un atomo di idrogeno legato all'atomo.

25 Nel contesto di questa descrizione, le formule:





rappresentano le stesse strutture. quando un punto è messo su un atomo di carbonio, il punto indica che l'atomo di idrogeno attaccato a tale carbonio esce dal piano delle pagine.

5 L'uso della parola "un" o "uno," quando usato assieme con il termine "comprendente" nelle rivendicazioni nella descrizione può significare "uno", ma è consistente anche col significato di "uno o più," "almeno uno," e "uno o più di uno".

Per tutta questa domanda, il termine "circa" è usato per indicare che un valore comprende la variazione inerente di errore per il
 10 dispositivo, il metodo essendo impiegato per determinare il valore, o la variazione che esiste fra i soggetti dello studio. Quando usato nel contesto della diffrazione della polvere ai raggi X, il termine "circa" è usato per indicare un valore $60.2^{\circ}2\theta$ dal valore riportato,
 15 to, preferibilmente un valore di $60.1^{\circ}2\theta$ dal valore riportato. Quando usato nel contesto di calorimetria a scansione differenziale o di temperature di transizione vetrosa, il termine "circa" è usato per indicare un valore di $\pm 10^{\circ}\text{C}$ rispetto al massimo del picco, preferibilmente un valore di $\pm 2^{\circ}\text{C}$ rispetto al massimo del picco. Quando
 20 usato in altri contesti, il termine "circa" è usato per indicare un valore di $\pm 10\%$ del valore riportato, preferibilmente un valore di

Philip Montali

$\pm 5\%$ del valore riportato. È da comprendere che, ogni volta che è usato il termine "circa", un riferimento specifico all'esatto valore numerico indicato è inoltre compreso.

I termini "comprendere," "avere" e "includere" sono verbi di
5 collegamento indeterminati. Qualsiasi forma o tempo di uno o più di questi verbi, come "compreso", "comprendente", "ha", "avente", "include" e "includente, sono inoltre indeterminati. Per esempio, qualsiasi metodo che "comprende", "ha" o "include" uno o più stadi non è limitato dal possedere soltanto questi uno o più stadi e inoltre co-
10 pre altri stadi non elencati.

Il termine "effettivo," come tale termine è usato nella descrizione e/o nelle rivendicazioni, significa adeguato a ottenere un risultato desiderato, previsto o inteso. "Quantità efficace", "quantità
15 terapeuticamente efficace" o "quantità farmaceuticamente efficace", quando usati nel contesto del trattamento di un paziente o di un soggetto con un composto significa che la quantità di composto che, quando somministrata a un soggetto o un paziente per il trattamento di una malattia, è sufficiente ad effettuare tale trattamento per la malattia.

20 Il termine "picco di alogeno" nel contesto di diffrazione della polvere ai raggi X, dovrebbe significare un picco ampio, che si estende spesso $>10^\circ 2\theta$ in un diffrattogramma delle polveri ai raggi X, tipicamente caratteristico di un solido o un sistema amorfo.

Il termine "idrato" quando usato come modificatore di un composto
25 sto significa che il composto ha meno di una (ad esempio, emiidra-



to), una (ad esempio, monoidrato), o più di una (ad esempio, diidrato) molecole di acqua associate con ciascuna molecola del composto, come in forme solide del composto.

Come qui usato, il termine "IC₅₀" si riferisce a una dose inibitoria che è del 50% della risposta massima ottenuta. Questa misura quantitativa indica quanto di un particolare farmaco o un'altra sostanza (inibitore) è necessario per inibire un dato procedimento biologico, biochimico o chimico (o un componente di un processo, cioè un enzima, una cellula, un recettore cellulare o un microorganismo) della metà.

Un "isomero" di un primo composto è un composto separato in cui ciascuna molecola contiene gli stessi atomi costituenti come il primo composto, ma dove la configurazione di quegli atomi differisce nelle tre dimensioni.

Come qui usato, il termine "paziente" o "soggetto" si riferisce a un organismo mammifero vivente, come un soggetto umano, una scimmia, una mucca, una pecora, una capra, un cane, un gatto, un topo, un ratto, una cavia, o loro specie transgeniche. In alcune realizzazioni, il paziente o soggetto è un animale non umano. In alcune realizzazioni, il paziente o soggetto è un primate. In alcune realizzazioni, il paziente o soggetto è un soggetto umano. Esempi non limitativi di soggetti umani sono adulti, giovani, neonati e feti.

Come qui generalmente usato, "farmaceuticamente accettabile" si riferisce a quei composti, materiali, composizioni, e/o forme di dosaggio che sono compresi nella finalità del giudizio medico, appro-

priati per l'uso nel contatto con i tessuti, gli organi e/o i fluidi corporei di soggetti umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica o altri problemi o complicazioni commisurati con un ragionevole rapporto beneficio/rischio.

5 "Sali farmaceuticamente accettabili" significa sali del composto per l'uso secondo la presente invenzione che sono farmaceuticamente accettabili, come definito sopra, e che possiedono la desiderata attività farmacologica. Tali sali comprendono sali di addizione con
10 acidi formati con acidi inorganici come acido cloridrico, acido bromidrico, acido solforico, acido nitrico, acido fosforico, e simili; o con acidi organici come acido 1,2-etandisolfonico, acido 2-idrossietansolfonico, acido 2-naftalensolfonico, acido 3-fenilpropionico, acido 4,4'-metilenbis(3-idrossi-2-ene-1-carbossilico), acido 4-metilbicciclo[2.2.2]ott-2-en-1-carbossilico,
15 acido acetico, acidi mono e bicarbossilici alifatici, acidi solforici alifatici, acidi solforici aromatici, acido benzensolfonico, acido benzoico, acido canforsolfonico, acido carbonico, acido cinnammico, acido citrico, acido ciclopentanpropionico, acido etansolfonico, acido fumarico, acido glucoeptonico, acido gluconico, acido glutamico,
20 acido glicolico, acido eptanoico, acido esanoico, acido idrossinaftoico, acido lattico, acido laurilsolforico, acido maleico, acido malico, acido malonico, acido mandelico, acido metansolfonico, acido muconico, acido *o*-(4-idrossibenzoil)benzoico, acido ossalico, acido *p*-clorobenzensolfonico, acidi alcanici fenil-sostituiti, acido
25 propionico, acido *p*-toluensolfonico, acido piruvico, acido sali-



cilico, acido stearico, acido succinico, acido tartarico, acido terziariobutilacetico, acido trimetilacetico e simili. Sarebbe da comprendere che il particolare anione formante una parte di qualsiasi sale di questa invenzione non è critico, purché il sale, come complesso, sia farmacologicamente accettabile. Esempi addizionali di sali farmaceuticamente accettabili e i loro metodi di preparazione e d'uso sono presentati in Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P.H. Stahl & C.G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002).

10 "Prevenzione" o "prevenire" comprende: (1) l'inibizione dei sintomi iniziali di una malattia in un soggetto o paziente che può essere a rischio e/o predisposti alla malattia ma ancora non subiscono o evidenziano una qualsiasi o tutte le patologie o sintomatologie della malattia, e/o (2) il rallentamento dei sintomi iniziali della
15 patologia o sintomatologia di una malattia in un soggetto o paziente che può essere a rischio e/o predisposto alla malattia ma ancora non subiscono o evidenziano una qualsiasi o tutte le patologie o sintomatologie della malattia.

Uno "stereoisomero" o "isomero ottico" è un isomero di un dato
20 composto in cui gli stessi atomi sono legati a altri atomi simili, ma dove la configurazione di quegli atomi differisce in tre dimensioni. Gli "enantiomeri" sono stereoisomeri di un dato composto che sono immagini speculari l'uno dell'altro, come la mano sinistra e la mano destra. I "diastereomeri" sono stereoisomeri di un dato composto
25 sto che non sono enantiomeri. Le molecole chirali contengono un cen-



tro chirale, anche descritto come stereocentro o centro stereogenico, che è un qualsiasi punto, sebbene non necessariamente un atomo, in una molecola contenente gruppi tali che un interscambio di uno qualsiasi dei due gruppi porta a uno stereoisomero. Nei composti organici, il centro chirale è tipicamente un atomo di carbonio, fosforo o zolfo, sebbene sia anche possibile per altri atomi essere stereocentri in composti organici e inorganici. Una molecola può avere stereocentri multipli, fornendo molti stereoisomeri. Nei composti in cui lo stereoisomerismo è dovuto ai centri stereogenici tetraedrici (ad esempio un carbonio tetraedrico), il numero totale degli stereoisomeri ipoteticamente possibili non supererà 2^n , dove n è il numero degli stereocentri tetraedrici. Molecole con simmetria hanno frequentemente un numero inferiore rispetto al numero massimo possibile di stereoisomeri. Una miscela 50:50 di enantiomeri è descritta come miscela racemica. Alternativamente, una miscela di enantiomeri può essere enantiomericamente arricchita in modo tale che un enantiomero sia presente in una quantità maggiore del 50%. Tipicamente, gli enantiomeri e/o i diastereomeri possono essere risolti o separati usando tecniche note nella tecnica. È contemplato che, per qualsiasi stereocentro o asse di chiralità per cui la stereochimica non è stata definita, tale stereocentro o asse di chiralità può essere presente nella sua forma *R*, o nella forma *S*, o come miscela delle forme *R* e *S*, comprendenti le miscele racemiche e non-racemiche. Come qui usata, la frase "sostanzialmente privo di altri stereoisomeri" significa che la composizione contiene $\leq 15\%$, più preferibilmente

$\leq 10\%$, anche più preferibilmente $\leq 5\%$, o ancor più preferibilmente $\leq 1\%$ di un altro stereoisomero(i).

"Trattamento" o "trattare" comprende (1) l'inibizione un malattia in un soggetto o paziente che subisce o evidenzia la patologia o la sintomatologia della malattia (ad esempio, arresto dell'ulteriore sviluppo della patologia e/o sintomatologia), (2) il miglioramento di un malattia in un soggetto o paziente che subisce o evidenzia la patologia o la sintomatologia della malattia (ad esempio, invertire la patologia e/o sintomatologia), e/o (3) effettuare una qualsiasi diminuzione misurabile in una malattia in un soggetto o paziente che subisce o evidenzia la patologia o la sintomatologia della malattia.

Le definizioni summenzionate sostituiscono una qualsiasi definizione che sia in conflitto con qualsiasi riferimento qui citato. Il fatto che alcuni termini siano definiti, comunque, non dovrebbe essere considerato come indicativo che tale termine non definito sia indefinito. Piuttosto, si ritiene che tutti i termini usati descrivano l'invenzione nei termini cosicché una persona di normale capacità possa apprezzare la finalità e l'esecuzione della presente invenzione.

20 **II. RTA 408 e Metodi di sintesi**

RTA 408 può essere preparato secondo i metodi descritti nella sezione Esempi che segue. Questi metodi possono ulteriormente essere modificati e ottimizzati usando i principi e le tecniche della chimica organica, come applicati da un esperto nella tecnica. Tali principi e tecniche sono descritti, per esempio, in March's Advanced

Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure (2007).

Sarebbe da riconoscere che il particolare anione formante parte di qualsiasi sale per l'uso secondo questa invenzione non è critico, purché tale sale, nel complesso, sia farmacologicamente accettabile.

5 Esempi addizionali di sali farmaceuticamente accettabili e dei loro metodi di preparazione e d'uso sono presentati in Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (2002).

In aggiunta, gli atomi costituenti di RTA 408 per l'uso secondo la presente invenzione vogliono comprendere tutte le forme isotopiche di tali atomi. Isotopi, come qui usati, comprendono quegli atomi
10 aventi lo stesso numero atomico, ma differenti numeri di massa. A titolo di esempio generale e senza limitazione, gli isotopi dell'idrogeno comprendono trizio e deuterio, e gli isotopi del carbonio comprendono ^{13}C e ^{14}C .

15 RTA 408 e la sua forma polimorfica possono inoltre avere il vantaggio che possono essere più efficaci di, meno tossici di, agiscono più a lungo di, sono più potenti di, producono minori effetti collaterali di, sono più facilmente assorbiti di, e/o hanno un profilo farmacocinetico migliore (ad esempio, biodisponibilità orale più
20 elevata e/o clearance inferiore) di, e/o hanno altri utili vantaggi farmacologici, fisici o chimici, rispetto ai composti noti nella tecnica precedente per l'uso nelle indicazioni qui definite.

III. Forme polimorfiche di RTA 408

In alcune realizzazioni, la presente invenzione fornisce differenti forme solide di RTA 408 per l'uso secondo l'invenzione, com-
25



prendenti i loro solvati. Fu eseguito uno studio di preformulazione e di polimorfismo preliminare, e si è trovato che RTA 408 ha una tendenza elevata alla formazione di solvati. Le forme cristalline delle classi 2, 3, 4, e 5 sono consistenti con i solvati. Per una
5 descrizione delle classi, vedi la Tabella 1 di seguito. Tentativi per essiccare le classi 2 e 3 (due gruppi di solvati isostrutturali) non hanno avuto successo, il che è consistente con molecole di solvente saldamente legate. In alcune realizzazioni, l'essiccamento di un solido di classe 4 (solvato di acetonitrile) porta a una forma
10 desolvatata isostrutturale. In alcune realizzazioni, l'essiccamento di un solido di classe 5 (solvato di THF) portava alla forma amorfa della classe 1. Forme non solvate di RTA 408 comprendono la forma amorfa (classe 1) e il solvato desolvatato cristallino della classe 4 (isostrutturale alla classe 4 di solvato di acetonitrile). In al-
15 cune realizzazioni, la forma amorfa ha un'elevata transizione vetro-
sa con $T_g \approx 153^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,72 \text{ J/g}^\circ\text{C}$) ed è soltanto leggermente igroscopica ($\Delta m = +0,4\% \text{ } 50\% \rightarrow 85\% \text{ r.h.}$). In alcune realizzazioni, la forma amorfa è stabile per almeno quattro settimane in condizioni di temperatura e umidità elevate (cioè, aperta a $40^\circ\text{C}/\sim 75\% \text{ r.h.}$ o chiusa a
20 80°C). In alcune realizzazioni, la forma amorfa (classe 1) fu preparata con successo da materiale della classe 2 in un procedimento a due stadi (trasformazione in classe 5 e successivo essiccamento della classe 5 per ottenere la forma amorfa), come pure in un metodo a singolo stadio diretto (precipitazione da una soluzione in acetone
25 in un bagno di acqua fredda). Il solvato desolvatato cristallino di

classe 4 (isostrutturale al solvato della classe 4) è leggermente igroscopico (aumento della massa di $\sim 0,7\%$ in peso da 50% r.h. a 85% r.h.) e ha un eventuale punto di fusione a $196,1^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 29,31 \text{ J/g}$).

Un campione della forma amorfa di 63415, classe 1, fu caratterizzato dalla spettroscopia FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, titolazione Karl Fischer, $^1\text{H-NMR}$, DSC, e DVS (vedi La sezione degli Esempi per dettagli aggiuntivi). Si trovò che il campione contiene $\sim 0,9\%$ in peso EtOH con tracce di H_2O (secondo TG-FTIR). Un contenuto di acqua dello $0,5\%$ in peso fu determinato mediante titolazione Karl Fischer.

La DSC mostra un'elevata temperatura di transizione vetrosa con $T_g \approx 153^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,72 \text{ J/g}^\circ\text{C}$). Secondo DVS, il materiale è leggermente igroscopico ($\Delta m = +0,4\%$ 50% $\rightarrow$ 85% r.h.). Non fu osservata cristallizzazione negli esperimenti DSC o DVS.

La stabilità chimica della forma amorfa fu studiata nei solventi organici, comprendenti acetone, EtOAc, MeOH, e MeCN, come pure differenti mezzi acquosi (ad esempio, Tween 80 acq. all'1%, SDS acq. all'1%, CTAB acq. all'1%) a una concentrazione di 1 mg/ml ai punti di tempo di 6 h, 24 h, 2 giorni, e 7 giorni. La decomposizione $\geq 1\%$ fu osservata soltanto per le soluzioni in MeCN dopo 7 giorni e per le sospensioni nel mezzo Tween 80 acquoso all'1% (a tutti i punti di tempo a 254 nm e dopo 24 h, 2 giorni, e 7 giorni a 242 nm).

In aggiunta, la stabilità della forma amorfa fu studiata mediante stoccaggio in condizioni di temperatura e umidità elevate (aperto a $25^\circ\text{C}/62\%$ r.h. e $40^\circ\text{C}/75\%$ r.h. e chiuso a 60°C e 80°C). Dopo una settimana, due settimane, e quattro settimane, i campioni stoccati



furono analizzati mediante PXRD. Nessuno dei campioni differiva dal materiale di partenza amorfo.

Furono eseguiti più di 30 esperimenti di cristallizzazione ed essiccamento, comprendenti equilibrare della sospensione, lento
5 raffreddamento, evaporazione e precipitazione. Furono ottenute quattro nuove forme cristalline (classi 2, 3, 4, e 5) in aggiunta alla forma amorfa (classe 1).

Le quattro nuove forme (classi 2, 3, 4, e 5) erano caratterizzate dalla spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TGFTIR. Tutte le forme
10 corrispondono ai solvati (Tabella 1). Gli esperimenti di essiccamento sotto vuoto o in atmosfera di N₂ furono eseguiti allo scopo di ottenere una forma cristallina, non solvatata, di 63415.

Tabella 1. Sommario delle classi ottenute

Classe	Caratteristiche	Risultati degli esperimenti di essiccamento
Classe 1	forma amorfa	--
Classe 2	solvati isostrutturali (ad esempio, eptano)	essiccamento senza successo
Classe 3	solvati isostrutturali (ad esempio, etanolo)	essiccamento senza successo
Classe 4	solvato MeCN & solvato desolvato	essiccamento con successo, struttura invariata
Classe 5	solvato di THF	l'essiccamento portava a una forma amorfa

15 **Classe 2:** La maggior parte degli esperimenti di cristallizzazione

che furono eseguiti portava al materiale solido della classe 2 (vedi la sezione degli Esempi che segue). I suoi membri possono corrispondere a solvati isostrutturali, non stechiometrici ($<0,5$ eq.) (di eptano, cicloesano, isopropil etero, 1-butanolo, trietilammina, e eventualmente altri solventi, come esano, altri eteri, ecc.) con molecole di solvente saldamente legate. Gli spettri Raman e i modelli PXRD in questa classe sono molto simili fra di loro, pertanto le strutture possono essere essenzialmente identiche con soltanto piccole differenze dovute ai differenti solventi che furono incorporati.

10 Gli esperimenti di essiccamento sui campioni della classe 2 non hanno portato a una forma cristallina, non solvatata. Anche elevate temperature (80°C) e un vuoto elevato ($<1 \times 10^{-3}$ mbar) non potevano rimuovere completamente le molecole di solvente saldamente legate; un contenuto di solvente $>2\%$ in peso rimaneva sempre. La cristallinità
15 di questi campioni parzialmente essiccati è ridotta, ma non fu osservata nessuna trasformazione in una struttura differente né una sostanziale amorfizzazione.

Classe 3: Il materiale solido della classe 3 può essere ottenuto da diverse cristallizzazioni (vedi la sezione degli Esempi che segue). I campioni della classe 3 sono probabilmente solvati isostrutturali di 2PrOH, EtOH, e probabilmente acetone con molecole di solvente saldamente legate. Possono corrispondere sia a emisolvati stechiometrici, sia a solvati non stechiometrici con un contenuto di solvente di $\sim 0,5$ eq. come con la classe 2, gli spettri Raman e i modelli PXRD in questa classe sono molto simili fra di loro, indi-
25

cando strutture similari che incorporano differenti solventi.

Similmente alla classe 2, gli esperimenti di essiccamento non ebbero successo. Le molecole di solvente saldamente ben legate possono essere rimosse soltanto parzialmente (cioè, da ~5,4% in peso a ~4,8% in peso dopo fino a 3 giorni a 1×10^{-3} mbar e 80°C). I modelli PXRD rimanevano invariati.

Classe 4 può essere ottenuta da un sistema solvente 7:3 MeCN/H₂O (vedi la sezione degli Esempi che segue). Il più probabilmente corrisponde a un emisolvato cristallino di acetonitrile. Mediante essiccamento (sotto vuoto o in corrente di N₂ a elevate temperature) la maggior parte delle molecole di solvente poté essere rimossa senza variazione o distruzione della struttura cristallina (PXRD rimaneva invariata). Pertanto, fu ottenuta una forma cristallina, non solvatata (o piuttosto un solvato desolvato). È leggermente igroscopica (aumento della massa di ~0,7% in peso da 50% r.h. a 85% r.h.) e ha un eventuale punto di fusione a $196,1^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 29,31$ J/g).

Classe 5 può essere ottenuta da un sistema solvente ~1:1 THF/H₂O. La classe 5 contiene THF legato (e può essere H₂O). Dal momento che il contenuto dei due componenti non può essere facilmente quantificato separatamente, la natura esatta di questo solvato cristallino non è stata determinata.

L'essiccamento della classe 5 portava a una desolvatazione significativa e alla trasformazione nella direzione della forma amorfa (classe 1). In alcune realizzazioni, la forma amorfa di RTA 408 può essere preparata sospendendo la classe 2 di solvato di eptano in 1:1

THF/H₂O per formare un solido della classe 5, con successivo essiccamento e amorfizzazione.

Furono eseguiti esperimenti allo scopo di preparare la forma amorfa (classe 1) usando materiale di partenza della classe 2. Materiale principalmente amorfo (classe 1) fu preparato partendo da materiale della classe 2 in un procedimento a due stadi mediante la classe 5 su una scala di 100-mg e 3-g (essiccamento a 100 mbar, 80°C, per diversi giorni). Si trovò che la preparazione di materiale completamente amorfo (classe 1) era possibile in un procedimento a stadio singolo evitando il solvente THF mediante precipitazione diretta della forma amorfa (classe 1) da una soluzione in acetone del materiale della classe 2 in un bagno di acqua fredda.

IV. Malattie Associate con Infiammazione e/o Stress ossidativo

L'infiammazione è un procedimento biologico che fornisce resistenza alle infezioni o agli organismi parassitari ed esegue la riparazione dei tessuti danneggiati. L'infiammazione è comunemente caratterizzata da vasodilatazione localizzata, rossore, rigonfiamento e dolore, il reclutamento dei leucociti al sito dell'infezione o dei danni, la produzione di citochine infiammatorie, come TNF- α e IL-1, e produzione di specie ossigeno- o azoto-reattive, come perossido di idrogeno, superossido, e perossinitrito. Negli ultimi stadi dell'infiammazione, si possono verificare il rimodellamento dei tessuti, l'angiogenesi e la formazione di cicatrici (fibrosi) come parte del processo di guarigione delle ferite. In situazioni normali, la risposta infiammatoria è regolata, temporaneamente, ed è risolta in

modo orchestrato una volta che l'infezione o i danni sono stati affrontati adeguatamente. Comunque, l'infiammazione acuta può divenire eccessiva e messa in rilievo se il meccanismo regolatorio fallisce. Alternativamente, l'infiammazione può divenire cronica e provocare danni cumulativi ai tessuti o complicazioni sistemiche. In base almeno all'evidenza qui presentata, RTA 408 può essere usato nel trattamento o nella prevenzione dell'infiammazione o delle malattie associate con l'infiammazione.

Molte malattie umane gravi e intrattabili implicano una disregolazione dei procedimenti infiammatori, comprendenti malattie come cancro, aterosclerosi, e diabete, che tradizionalmente non sono considerati come condizioni infiammatorie. Nel caso del cancro, i procedimenti infiammatori sono associati con procedimenti che comprendono la formazione di tumori, la progressione, la metastasi e la resistenza alla terapia. In alcune realizzazioni, RTA 408 può essere usato nel trattamento o nella prevenzione di cancro comprendente carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma multiplo, o seminoma, o cancro di vescica, sangue, ossa, cervello, mammella, sistema nervoso centrale, cervice, colon, endometrio, esofago, cistifellea, genitali, tratto genitourinario, testa, reni, laringe, fegato, polmone, tessuto muscolare, collo, mucosa orale o nasale, ovaio, pancreas, prostata, pelle, milza, intestino tenue, intestino crasso, stomaco, testicolo, o tiroide. L'aterosclerosi, a lungo considerata come un disturbo del metabolismo lipidico, è ora intesa per essere principalmente una condizione infiammatoria, con i



macrofagi attivati che hanno un ruolo importante nella formazione e nell'eventuale rottura delle placche aterosclerotiche. L'attivazione dei percorsi di segnalazione infiammatori ha evidenziato inoltre un ruolo nello sviluppo della resistenza all'insulina, come pure nei
5 danni dei tessuti periferici associati con l'iperglicemia diabetica. L'eccessiva produzione di specie ossigeno-reattive e specie azoto-reattive, come superossido, perossido di idrogeno, ossido nitrico, e perossinitrito, è un segno caratteristico delle condizioni infiammatorie. L'evidenza della produzione disregolata di perossinitrito è
10 stata descritta in un'ampia varietà di malattie (Szabo *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2008; Forstermann, 2006; Pall, 2007).

Le malattie autoimmuni come artrite reumatoide, lupus, psoriasi, e sclerosi multipla implicano un'attivazione inappropriata e cronica di procedimenti infiammatori nei tessuti interessati, derivante dal-
15 la disfunzione dei meccanismi di auto rispetto a non-auto riconoscimento e risposta nel sistema immunitario. Nelle malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson, il danno neuronale è correlato con l'attivazione dei microglia e di livelli elevati di proteine pro-infiammatorie, come la sintasi dell'ossido nitrico inducibile (iNOS). L'insufficienza d'organo cronica, come
20 insufficienza renale, insufficienza cardiaca, insufficienza epatica e la malattia polmonare ostruttiva cronica, sono associate strettamente con la presenza di stress ossidativi cronici e infiammazione, che portano allo sviluppo di fibrosi e alla perdita finale delle
25 funzioni d'organo. Lo stress ossidativo nelle cellule endoteliali

vascolari, quale linea maggiore e minore dei vasi sanguigni, può portare alla disfunzione endoteliale e si pensa che sia un importante fattore che contribuisce allo sviluppo di malattie cardiovascolari sistemiche, complicazioni diabetiche, malattie renali croniche e
5 altre forme di insufficienza d'organo, e numerose altre malattie correlate all'invecchiamento, comprendenti le malattie degenerative del sistema nervoso centrale e della retina.

Molti altri disturbi implicano stress ossidativo e infiammazione nei tessuti interessati, comprendenti la malattia infiammatoria in-
10 testinale; malattie infiammatorie della pelle; mucosite e dermatite correlate a radioterapia e chemioterapia; malattie degli occhi, come uveite, glaucoma, degenerazione maculare, e varie forme di retinopatia; insufficienza e rigetto del trapianto; danni ischemici-di ri-
15 perfusione, dolore cronico; condizioni degenerative di ossa e articolazioni, comprendenti osteoartrite e osteoporosi; asma e fibrosi cistica; disturbi convulsivi; e condizioni neuropsichiatriche, comprendenti schizofrenia, depressione, disturbi bipolari, disturbi da stress post-traumatico, disturbi da deficit di attenzione, disturbi dello spettro dell'autismo, e disturbi dell'alimentazione, come ano-
20 ressia nervosa. Si pensa che la disregolazione dei percorsi di segnalazione infiammatori sia un fattore preponderante nella patologia delle malattie di deperimento muscolare, comprendenti la distrofia muscolare e le varie forme di cachessia.

Svariati disturbi acuti che minacciano la vita inoltre implicano
25 la segnalazione infiammatoria disregolata, comprendente l'insuffi-

cienza acuta d'organo implicante pancreas, reni, fegato, o polmoni, infarto del miocardio o sindrome coronarica acuta, ictus, shock settico, traumi, ustioni gravi, e anafilassi.

Molte complicazioni di malattie infettive inoltre comprendono la
5 disregolazione delle risposte infiammatorie. Sebbene una risposta
infiammatoria possa distruggere i patogeni invadenti, un'eccessiva
risposta infiammatoria può anche essere abbastanza distruttiva e, in
alcuni casi, può essere una fonte primaria di danni nei tessuti in-
fettati. Ulteriormente, un'eccessiva risposta infiammatoria può
10 inoltre portare a complicazioni sistemiche a causa della sovrappro-
duzione delle citochine infiammatorie, come TNF- α e IL-1. Si pensa
che questo sia un fattore nella mortalità derivante da una grave in-
fluenza, una grave sindrome respiratoria acuta e sepsi.

L'espressione aberrante o eccessiva sia di iNOS sia della ci-
15 cloossigenasi-2 (COX-2) è stata implicata nella patogenesi di molti
processi di malattia. Per esempio, è evidente che NO è un potente
mutageno (Tamir e Tannebaum, 1996), e che l'ossido nitrico può inol-
tre attivare COX-2 (Salvemini *et al.*, 1994). Ulteriormente, c'è un
aumento marcato in iNOS nei tumori del colon di ratto indotto dal
20 carcinogeno, azossimetano (Takahashi *et al.*, 1997). Una serie di
analoghi di triterpenoidi di sintesi dell'acido oleanolico hanno
evidenziato di essere potenti inibitori dei procedimenti infiammato-
ri cellulari, come l'induzione mediante IFN- γ della sintesi inducibi-
le dell'ossido nitrico (iNOS) e di COX-2 in macrofagi di topo. Vedi
25 Honda *et al.* (2000a), Honda *et al.* (2000b), e Honda *et al.* (2002).

In un aspetto, RTA 408 qui descritto è in parte caratterizzato dalla sua capacità a inibire la produzione di ossido nitrico in cellule RAW 264.7 derivate da macrofagi indotta dall'esposizione a γ interferone. RTA 408 è inoltre caratterizzato dalla sua capacità a indurre l'espressione di proteine antiossidanti, come NQO1, e ridurre l'espressione di proteine pro-infiammatorie, come GOX-2 e sintasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS). Queste proprietà sono rilevanti nel trattamento di un ampio intervallo di malattie e disturbi implicanti lo stress ossidativo e la disregolazione dei procedimenti infiammatori, comprendenti cancro, complicazioni da esposizione localizzata o totale del corpo a radiazioni ionizzanti, mucosite e dermatite derivante da radioterapia o chemioterapia, malattie autoimmuni, malattie cardiovascolari, comprendenti aterosclerosi, danni da ischemia-riperfusione, insufficienza d'organo acuta e cronica, comprendente insufficienza renale e insufficienza cardiaca, malattie respiratorie, diabete e complicazioni del diabete, gravi allergie, rigetto del trapianto, malattia dell'innesto verso l'ospite, malattie neurodegenerative, malattie dell'occhio e della retina, dolore acuto e cronico, malattie degenerative delle ossa, comprendenti osteoartrite e osteoporosi, malattia infiammatoria intestinale, dermatite e altre malattie della pelle, sepsi, ustioni, disturbi convulsivi, e disturbi neuropsichiatrici.

In un altro aspetto, RTA 408 può essere usato per trattare un soggetto avente una condizione come malattie degli occhi. Per esempio, uveite, degenerazione maculare (sia la forma secca e sia la

forma umida), glaucoma, edema maculare diabetico, blefarite, retinopatia diabetica, malattie e disturbi dell'endotelio corneale come distrofia corneale endoteliale di Fuchs, infiammazione post-chirurgica, occhio secco, congiuntivite allergica e altre forme di
5 congiuntivite sono esempi non limitativi di malattie degli occhi che possono essere trattati con RTA 408.

In un altro aspetto, RTA 408 può essere usato per trattare un soggetto avente una condizione come malattie o disturbi della pelle. Per esempio, dermatite, comprendente dermatite allergica, dermatite
10 atopica, dermatite dovuta a esposizione chimica, e dermatite indotta da radiazioni; ustioni termiche o chimiche; ferite croniche comprendenti ulcere diabetiche, piaghe da decubito, e ulcere venose; acne; alopecia comprendente calvizie e alopecia indotta da farmaco; altri disturbi dei follicoli dei capelli; epidermolisi bollosa; scottature
15 solari e loro complicazioni; disturbi di pigmentazione della pelle comprendenti vitiligine; condizioni della pelle correlate all'invecchiamento; guarigione delle ferite post-chirurgiche; prevenzione o riduzione delle cicatrici da danni della pelle, chirurgia, o ustioni; psoriasi; manifestazioni dermatologiche di malattie autoimmuni o
20 malattia dell'ospite verso l'innesto; prevenzione o trattamento di cancro della pelle; disturbi implicanti iperproliferazione di cellule della pelle come ipercheratosi che è un esempio non limitativo di malattie della pelle che possono essere trattate con RTA 408.

Senza voler essere legati dalla teoria, si pensa che l'attivazione del percorso antiossidante/anti-infiammatorio Keap1/Nrf2/ARE
25

sia implicata nelle proprietà sia anti-infiammatorie sia anticarcinogeniche del composto qui descritto.

In un altro aspetto, RTA 408 può essere usato per trattare un soggetto avente una condizione provocata da livelli elevati di stress ossidativo in uno o più tessuti. Lo stress ossidativo deriva da livelli anormalmente alti o prolungati di specie di ossigeno reattivo, come superossido, perossido di idrogeno, ossido nitrico, e perossinitrito (formato dalla reazione di ossido nitrico e superossido). Lo stress ossidativo può essere accompagnato da infiammazione o acuta o cronica. Lo stress ossidativo può essere causato da una disfunzione mitocondriale, mediante attivazione di cellule immuni, come macrofagi e neutrofili, da esposizione acuta a un agente esterno, come radiazioni ionizzanti o un agente chemioterapico citotossico (ad esempio, doxorubicina), da traumi o altri danni acuti ai tessuti, da ischemia/riperfusione, da scarsa circolazione o anemia, da ipossia o iperossia localizzata o sistemica, da livelli elevati di citochine infiammatorie e altre proteine correlate all'infiammazione e/o da altri stati fisiologici anormali, come iperglicemia o ipoglicemia.

Nei modelli animali di molte di tali condizioni, l'espressione stimolante dell'eme-ossigenasi inducibile (HO-1), un gene in bersaglio del percorso Nrf2, ha evidenziato di avere un effetto terapeutico significativo compreso nei modelli di infarto del miocardio, insufficienza renale, insufficienza e rigetto del trapianto, ictus, malattie cardiovascolari, e malattie autoimmuni (ad esempio, Sacer-

doti *et al.*, 2005; Abraham & Kappas, 2005; Bach, 2006; Araujo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Ishikawa *et al.*, 2001; Kruger *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2005; Morse e Choi, 2005; Morse e Choi, 2002). Questo enzima scinde l'eme libero in ferro, monossido di carbonio (CO), e biliverdina (che è successivamente trasformata in una potente molecola antiossidante, bilirubina).

In un altro aspetto, RTA 408 può essere usato per prevenire o trattare danni ai tessuti o insufficienza d'organo, acuta e cronica, derivante da stress ossidativo aggravato dall'infiammazione. Esempi di malattie che ricadono in questa categoria comprendono insufficienza cardiaca, insufficienza epatica, insufficienza e rigetto del trapianto, insufficienza renale, pancreatite, malattie fibrotiche polmonari (fibrosi cistica, COPD, e fibrosi polmonare idiopatica, fra le altre), diabete (comprendente le complicazioni), aterosclerosi, danni da ischemia-riperfusione, glaucoma, ictus, malattie autoimmuni, autismo, degenerazione maculare, e distrofia muscolare. Per esempio, nel caso di autismo, gli studi suggeriscono che un aumentato stress ossidativo nel sistema nervoso centrale può contribuire allo sviluppo della malattia (Chauhan e Chauhan, 2006).

L'evidenza inoltre lega lo stress ossidativo e l'infiammazione nello sviluppo e nella patologia di molti altri disturbi del sistema nervoso centrale, comprendenti disturbi psichiatrici, come psicosi, depressione maggiore, e disturbi bipolari; disturbi convulsivi, come epilessia; dolore e sindromi sensoriali, come emicrania, dolore neuropatico, o tinnitus; e sindromi comportamentali, come i disturbi da

deficit di attenzione. Vedi, ad esempio, Dickerson *et al.*, 2007; Hanson *et al.*, 2005; Kendall-Tackett, 2007; Lencz *et al.*, 2007; Dudgeonkar *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2002; Ruster *et al.*, 2005; McIver *et al.*, 2005; Sarchielli *et al.*, 2006; Kawakami *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2003. Per esempio, elevati livelli di citochine infiammatorie, comprendenti TNF- α , interferone- γ , e IL-6, sono associati con le principali malattie mentali (Dickerson *et al.*, 2007). L'attivazione dei microglia è stata inoltre legata a una grave malattia mentale. Pertanto, la sottoregolazione delle citochine infiammatorie e l'inibizione dell'attivazione eccessiva dei microglia può essere utile in pazienti con schizofrenia, depressione grave, disturbi bipolari, disturbi dello spettro dell'autismo, e altri disturbi neuropsichiatrici.

Di conseguenza, nelle patologie implicanti stress ossidativo da solo o stress ossidativo aggravato dall'infiammazione, il trattamento può comprendere la somministrazione a un soggetto di una quantità terapeuticamente efficace di un composto di questa invenzione, come quelli descritti sopra o per tutta questa descrizione. Il trattamento può essere somministrato preventivamente, prima di uno stato prevedibile di stress ossidativo (ad esempio, trapianto d'organo o somministrazione di radioterapia a un paziente affetto da cancro), o può essere somministrato terapeuticamente in situazioni implicanti stress ossidativo stabilito e infiammazione. In alcune realizzazioni, quando un composto della presente invenzione è usato per trattare un paziente ricevente radioterapia e/o chemioterapia, il composto

dell'invenzione può essere somministrato prima, contemporaneamente, e/o dopo la radiazione o la chemioterapia, o il composto può essere somministrato in combinazione con altre terapie. In alcune realizzazioni, il composto dell'invenzione può prevenire e/o ridurre la gravità degli effetti collaterali associati con la radioterapia o la chemioterapia (usando un agente differente) senza ridurre gli effetti anticancro della radioterapia o della chemioterapia. Poiché tali effetti collaterali possono essere dose-limitanti per la radioterapia e/o la chemioterapia, in alcune realizzazioni, il composto della presente invenzione può essere usato per consentire un dosaggio più elevato e/o più frequente della radioterapia e/o della chemioterapia, per esempio, portando a una maggiore efficacia del trattamento. In alcune realizzazioni, il composto dell'invenzione, quando somministrato in combinazione con la radioterapia e/o la chemioterapia può aumentare l'efficacia di una data dose di radiazioni e/o chemioterapia. In alcune realizzazioni, il composto dell'invenzione, quando somministrato in combinazione con la radioterapia e/o la chemioterapia, può aumentare l'efficacia di una data dose di radiazioni e/o chemioterapia e ridurre (o, al minimo, non aggiungere a) gli effetti collaterali delle radiazioni e/o della chemioterapia. In alcune realizzazioni, e senza voler essere legati dalla teoria, questa efficacia combinatoriale può derivare dall'inibizione dell'attività del fattore di trascrizione pro-infiammatorio NF- κ B mediante il composto dell'invenzione. NF- κ B è spesso attivato cronicamente nelle cellule del cancro, e tale attivazione è associata con la resistenza

alla terapia e la promozione della progressione del tumore (ad esempio, Karin, 2006; Aghajan *et. al.*, 2012). Altri fattori di trascrizione che promuovono l'infiammazione e il cancro, come STAT3 (ad esempio, He e Karin 2011; Grivennikov e Karin, 2010), possono inoltre essere inibiti dal composto dell'invenzione in alcune realizzazioni.

RTA 408 può essere usato per trattare o prevenire condizioni infiammatorie, come sepsi, dermatite, malattie autoimmuni, e osteoartrite. RTA 408 può inoltre essere usato per trattare o prevenire il dolore infiammatorio e/o dolore neuropatico, per esempio, inducendo Nrf2 e/o inibendo NF- κ B.

RTA 408 può inoltre essere usato per trattare o prevenire malattie, come cancro, infiammazione, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, sclerosi multipla, autismo, sclerosi laterale amiotrofica, morbo di Huntington, malattie autoimmuni, come artrite reumatoide, lupus, morbo di Crohn, e psoriasi, malattia infiammatoria intestinale, tutte le altre malattie la cui patogenesi si pensa sia implicata in una eccessiva produzione sia di ossido nitrico sia di prostaglandine, e patologie implicanti stress ossidativo da solo o stress ossidativo aggravato dall'infiammazione. RTA 408 può essere usato nel trattamento o nella prevenzione di cancro comprendenti carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma, mieloma multiplo, o seminoma, o cancro di vescica, sangue, ossa, cervello, mammella, sistema nervoso centrale, cervice, colon, endometrio, esofago, cistifellea, genitali, tratto genitourinario, testa, reni, laringe,

fegato, polmone, tessuto muscolare, collo, mucosa orale o nasale, ovaio, pancreas, prostata, pelle, milza, intestino tenue, intestino crasso, stomaco, testicolo, o tiroide.

Un altro aspetto dell'infiammazione è la produzione di prostaglandine infiammatorie, come prostaglandina E. RTA 408 può essere
5 usato per favorire la vasodilazione, l'extravasazione plasmatica, il dolore localizzato, la temperatura elevata, e altri sintomi di infiammazione. La forma inducibile dell'enzima COX-2 è associata con la sua produzione, e elevati livelli di COX-2 sono presenti nei tes-
10 suti infiammati. Di conseguenza, l'inibizione di COX-2 può attenuare molti sintomi di infiammazione e numerosi importanti farmaci anti-infiammatori (ad esempio, ibuprofene e celecoxib) agiscono inibendo l'attività COX-2. È stato dimostrato che una classe di prostaglandi-
ne del ciclopentanone (cyPGs) (ad esempio, 15-desossiprostaglandina
15 J2, a.k.a. PGJ2) ha un ruolo nella stimolazione della risoluzione orchestrata dell'infiammazione (ad esempio, Rajakariar *et al.*, 2007). COX-2 è inoltre associato con la produzione di prostaglandine del ciclopentenone. Di conseguenza, l'inibizione di COX-2 può inter-
ferire con la completa risoluzione dell'infiammazione, favorendo po-
20 tenzialmente la persistenza di cellule immuni attivate nei tessuti e portando a un'infiammazione cronica "covante". Questo effetto può essere responsabile dell'incidenza aumentata di malattie cardiovascolari in pazienti usando inibitori selettivi di COX-2 per lunghi periodi di tempo.

25 In un aspetto, RTA 408 può essere usato per controllare la pro-

duzione di citochine pro-infiammatorie nella cellula attivando selettivamente i residui regolatori della cisteina (RCRs) sulle proteine che regolano l'attività dei fattori di trascrizione redox-sensibili. L'attivazione di RCRs mediante cyPGs ha mostrato di iniziare un programma di pro-risoluzione in cui l'attività del fattore di trascrizione antiossidante e citoprotettivo Nrf2 è potenzialmente indotto e le attività dei fattori di trascrizione pro-ossidanti e pro-infiammatori NF- κ B e STATS sono soppressi. In alcune realizzazioni, RTA 408 può essere usato per aumentare la produzione di molecole antiossidanti e riducenti (NQO1, HO-1, SOD1, γ -GCS) e diminuire lo stress ossidativo e la produzione di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie (iNOS, COX-2, TNF- α). In alcune realizzazioni, RTA 408 può essere usato per far sì che le cellule che ospitano l'evento infiammatorio ritornino a uno stato non infiammatorio favorendo la risoluzione dell'infiammazione e limitando eccessivi danni ai tessuti dell'ospite.

A. Cancro

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi della presente descrizione possono essere usati per indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali, per indurre la differenziazione cellulare, per inibire la proliferazione delle cellule del cancro, per inibire una risposta infiammatoria, e/o per funzionare in una capacità chemiopreventiva. Per esempio, sono qui fornite nuove forme polimorfiche che hanno una o più delle seguenti proprietà: (1) una capacità di indurre apoptosi e differenziare le cellule sia maligne

sia non maligne, (2) una capacità a livelli sub-micromolari o nanomolari come inibitore di proliferazione di molte cellule maligne o pre-maligne, (3) una capacità di sopprimere la sintesi *de novo* dell'enzima infiammatorio inducibile dalla sintasi dell'ossido nitrico (iNOS), (4) una capacità di inibire l'attivazione NF- κ B attivazione, e (5) una capacità di indurre l'espressione dell'eme-ossigenasi-1 (HO-1).

I livelli di iNOS e COX-2 sono elevati in alcuni cancro e sono stati implicati nella carcinogenesi e gli inibitori di COX-2 hanno
10 mostrato di ridurre l'incidenza degli adenomi primari del colon nei soggetti umani (Rostom *et al.*, 2007; Brown e DuBois, 2005; Crowel *et al.*, 2003). iNOS è espresso in cellule soppressori mieloide-derivate (MDSCs) (Angulo *et al.*, 2000) e l'attività COX-2 nelle cellule del cancro ha mostrato di portare alla produzione di prostaglandina E2
15 (PGE2), che ha mostrato di indurre l'espressione dell'arginasi in MDSCs (Sinha *et al.*, 2007). L'arginasi e iNOS sono enzimi che utilizzano la L-arginina come substrato e producono L-ornitina e urea, e L-citrullina e NO, rispettivamente. L'esaurimento di arginina dal microambiente tumorale mediante MDSCs, combinato con la produzione
20 di NO e di perossinitrito ha mostrato di inibire la proliferazione e indurre l'apoptosi delle cellule T (Bronte *et al.*, 2003). L'inibizione di COX-2 e di iNOS ha mostrato di ridurre l'accumulo di MDSCs, ristabilire l'attività citotossica delle cellule T associate al tumore e di ritardare la crescita tumorale (Sinha *et al.*, 2007; Mazzone
25 ni *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007).

L'inibizione dei percorsi di segnalazione NF- κ B e JAK/STAT è stata implicata come strategia per inibire la proliferazione delle cellule del cancro epiteliale e indurre la loro apoptosi. L'attivazione di STAT3 e NF- κ B ha mostrato di portare alla soppressione dell'apoptosi nelle cellule del cancro, e di promuovere la proliferazione, l'invasione, e la metastasi. Molti dei geni in bersaglio implicati in questi procedimenti hanno mostrato di essere trascrizionalmente regolati mediante sia NF- κ B sia STAT3 (Yu *et al.*, 2007).

In aggiunta ai loro ruoli diretti nelle cellule epiteliali del, NF- κ B e STAT3 hanno inoltre ruoli importanti in altre cellule presenti nel microambiente tumorale. Esperimenti in modelli animali hanno dimostrato che NF- κ B è richiesto sia nelle cellule del cancro sia nelle cellule ematopoietiche per propagare gli effetti dell'infiammazione sull'inizio e la progressione del cancro (Greten *et al.*, 2004). L'inibizione di NF- κ B nel cancro e nelle cellule mieloidi riduce il numero e la dimensione, rispettivamente, dei tumori risultanti. L'attivazione di STAT3 nelle cellule del cancro porta alla produzione di diverse citochine (IL-6, IL-10) che sopprimono la maturazione delle cellule dendritiche (DC) associate ai tumori. Ulteriormente, STAT3 è attivato mediante queste citochine nelle stesse cellule dendritiche. L'inibizione di STAT3 nei modelli di topo del cancro ristabilisce la maturazione DC, favorisce l'immunità antitumorale e inibisce la crescita tumorale (Kortylewski *et al.*, 2005). In alcune realizzazioni, RTA 408 e le sue forme polimorfiche possono essere usati per trattare il cancro, comprendente, per esempio, il



cancro della prostata. Vedi, ad esempio, l'Esempio H che segue.

B. Sclerosi multipla e Altre Condizioni Neurodegenerative

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con sclerosi multipla (MS) o altre condizioni neurodegenerative come morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, o sclerosi laterale amiotrofica. MS è noto per essere una condizione infiammatoria del sistema nervoso centrale (Williams *et al.*, 1994; Merrill e Benvenist, 1996; Genain e Nauser, 1997). In base a diversi studi, l'evidenza suggerisce che i meccanismi infiammatori, ossidativi, e/o immuni sono implicati nella patogenesi del morbo di Alzheimer (AD), del morbo di Parkinson (PD), della sclerosi laterale amiotrofica (ALS), e MS (Bagasra *et al.*; 1995; McGeer e McGeer, 1995; Simonian e Coyle, 1996; Kaltschmidt *et al.*, 1997). I dati epidemiologici indicano che l'uso cronico di NSAIDs che bloccano la sintesi delle prostaglandine da arachidonato, abbassa notevolmente il rischio di sviluppare AD (McGeer *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1997). Pertanto, gli agenti che bloccano la formazione di NO e le prostaglandine, possono essere usati in approcci per prevenire e trattare le malattie neurodegenerative. Candidati terapeutici di successo per il trattamento di tali malattie tipicamente richiedono la capacità di penetrare nella barriera ematoencefalica. Vedi, per esempio, la pubblicazione del brevetto U.S. 2009/0060873.

C. Neuroinfiammazione

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i me-

todi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con neuroinfiammazione. La neuroinfiammazione incorpora l'idea che le risposte e le azioni dei microglia e degli astrociti nel sistema nervoso centrale hanno un carattere fondamentalmente tipo infiammazione, e che queste risposte sono centrali per la patogenesi e la progressione di un'ampia varietà di disturbi neurologici. Queste idee sono state estese dal morbo di Alzheimer ad altre malattie neurodegenerative (Eikelenboom *et al.*, 2002; Ishizawa e Dickson, 2001), a malattie ischemiche/tossiche (Gehrmann *et al.*, 1995; Touzani *et al.*, 1999), alla biologia tumorale (Graeber *et al.*, 2002) e anche allo sviluppo normale del cervello. La neuroinfiammazione incorpora un ampio spettro di risposte cellulari complesse che comprendono l'attivazione dei microglia e degli astrociti e l'induzione di citochine, chemochine, proteine di complemento, proteine di fase acuta, danni ossidativi e processi molecolari correlati, e gli eventi possono avere effetti dannosi sulle funzioni neuronali, portando a danni neuronali, ulteriormente all'attivazione gliale e infine alla neurodegenerazione.

D. Malattie Renali

In alcune realizzazioni, RTA 408, come pure le sue forme polimorfiche, può essere usato per trattare pazienti con malattie e disturbi renali, comprendenti insufficienza renale e malattie renali croniche (CKD), in base, per esempio, ai metodi descritti da US 8.129.429. L'insufficienza renale, derivante da un'inadeguata clearance di prodotti di scarto metabolici dal sangue e dalle concentra-

zioni anormali degli elettroliti nel sangue, è un problema medico significativo in tutto il mondo, specialmente nei paesi sviluppati. Il diabete e l'ipertensione sono fra le cause più importanti dell'insufficienza renale cronica, anche nota come malattia renale cronica (CKD), ma è anche associata con altre condizioni come il lupus. L'insufficienza renale acuta può derivare dall'esposizione a certi farmaci (ad esempio, acetaminophen) o prodotti chimici tossici, o da danni da ischemia-riperfusione associati con shock o procedimenti chirurgici come il trapianto, e può portare all'insufficienza renale cronica. In molti pazienti, l'insufficienza renale progredisce a uno stadio in cui il paziente richiede una dialisi regolare o il trapianto del rene per continuare a vivere. Entrambi questi procedimenti sono altamente invasivi e associati con effetti collaterali significativi e problemi di qualità della vita. Sebbene ci siano trattamenti efficaci per alcune complicazioni dell'insufficienza renale, come iperparatiroidismo e iperfosfatemia, non c'è un trattamento disponibile per arrestare o invertire la progressione che sta alla base dell'insufficienza renale. Pertanto, agenti che possono migliorare la funzione renale compromessa dovrebbero rappresentare un progresso significativo nel trattamento dell'insufficienza renale.

L'infiammazione contribuisce in modo significativo alla patologia di CKD. C'è inoltre un forte legame meccanicistico fra lo stress ossidativo e la disfunzione renale. Il percorso di segnalazione NF- κ B ha un ruolo importante nella progressione di CKD dal momento che NF- κ B regola la trascrizione di MCP-1, una chemochina che è respon-

sabile del reclutamento dei monociti/macrofagi che porta a una risposta infiammatoria che alla fine danneggia i reni (Wardle, 2001). Il percorso Keap1/Nrf2/ARE controlla la trascrizione di diversi geni che codificano gli enzimi antiossidanti, comprendenti l'eme-
5 ossigenasi-1 (HO-1). L'asportazione del gene Nrf2 nei topi femmina porta allo sviluppo della nefrite glomerulare tipo lupus (Yoh *et al.*, 2001). Ulteriormente, diversi studi hanno dimostrato che l'espressione di HO-1 è indotta in risposta ai danni renali e all'infiammazione e che questo enzima e i suoi prodotti - bilirubina e monossido di carbonio - hanno un ruolo protettivo nei reni (Nath *et al.*, 2006).
10

I danni renali acuti (AKI) possono presentarsi successivamente all'ischemia-riperfusione, al trattamento con alcuni agenti farmacologici, come cisplatino e rapamicina, e iniezioni intravenose di
15 mezzi di radiocontrasto usati nell'imaging medica. Come in CKD, l'infiammazione e lo stress ossidativo contribuiscono alla patologia di AKI. Il meccanismo molecolare alla base della nefropatia indotta da radiocontrasto non è ben compreso; comunque è probabile che una combinazione di eventi comprendenti la vasocostrizione prolungata,
20 l'autoregolazione dei reni danneggiata e la tossicità diretta dei mezzi di contrasto contribuiscano tutti all'insufficienza renale (Tumlin *et al.*, 2006). La vasocostrizione porta a una diminuzione del flusso del sangue renale e provoca ischemia-riperfusione e la produzione di specie ossigeno-reattive. HO-1 è fortemente indotto in
25 queste condizioni ed è stato dimostrato che previene i danni da

ischemia-riperfusione in diversi organi differenti, comprendenti i reni (Nath *et al.*, 2006). Specificatamente, l'induzione di HO-1, in un modello di ratto, ha mostrato di prevenire RCN (Goodman *et al.*, 2007). La riperfusione inoltre induce una risposta infiammatoria, in parte attraverso l'attivazione della segnalazione NF- κ B (Nichols, 2004). NF- κ B in bersaglio è stato proposto come strategia terapeutica per prevenire i danni d'organo (Zingarelli *et al.*, 2003). **E. Malattia cardiovascolare**

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con malattie cardiovascolari. L'eziologia della malattia CV è complessa, ma la maggior parte delle cause sono correlate a un'alimentazione inadeguata o completamente interrotta del sangue a un organo o tessuto critico. Frequentemente tale condizione deriva dalla rottura di una o più placche aterosclerotiche che porta alla formazione del trombo che blocca il flusso del sangue in un vaso critico.

In alcune situazioni, l'aterosclerosi può essere così estesa nei vasi sanguigni critici da sviluppare la stenosi (restringimento delle arterie) e il flusso del sangue agli organi critici (comprendenti il cuore) è cronicamente insufficiente. Tale ischemia cronica può portare a un danno d'organo-terminale di molti tipi, comprendente l'ipertrofia cardiaca associata con l'insufficienza cardiaca congestizia.

L'aterosclerosi, il difetto fondamentale che porta a molte forme di malattie cardiovascolari, si presenta quando un difetto o un dan-

no fisico al rivestimento (endotelio) di un'arteria innesca una risposta infiammatoria che implica la proliferazione delle cellule vascolari dei muscoli lisci e l'infiltrazione dei leucociti nelle aree interessate. Alla fine, può formarsi una lesione complicata, nota
5 come placca aterosclerotica, costituita dalle cellule sopra menzionate combinate con depositi di lipoproteine contenenti colesterolo e altri materiali (ad esempio, Hansson *et al.*, 2006). Nonostante i benefici significativi offerti dai correnti trattamenti terapeutici, la mortalità da malattia cardiovascolare rimane elevata e rimangono
10 necessità significative non soddisfatte nel trattamento della malattia cardiovascolare.

L'induzione di HO-1 ha mostrato di essere utile in svariati modelli di malattie cardiovascolari, e bassi livelli dell'espressione di HO-1 sono stati clinicamente correlati con un elevato rischio di
15 malattia CV. RTA 408, le forme polimorfiche e i metodi qui forniti, pertanto, possono essere usati nel trattamento o nella prevenzione di una varietà di disturbi cardiovascolari comprendenti, ma non limitati a, aterosclerosi, ipertensione, infarto del miocardio, insufficienza cardiaca cronica, ictus, emorragia subaracnoidea, e restenosi.
20 In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche e i metodi qui forniti possono essere usati come terapia in combinazione con altre note terapie cardiovascolari come, ma non limitate a, anticoagulanti, trombolitici, streptochinasi, attivatori dei tessuti del plasminogeno, chirurgia, innesto di bypass nell'arteria corona-
25 rica, angioplastica a palloncino, uso di stent, farmaci che inibi-

scono la proliferazione cellulare, o farmaci che abbassano i livelli del colesterolo.

F. Diabete

In alcune realizzazioni, RTA 408, come pure le sue forme poli-
5 morfiche, possono essere usati per trattare pazienti con diabete, in base, per esempio, ai metodi descritti da US 8.129.429. Il diabete è una malattia complessa caratterizzata dall'insufficienza del corpo a regolare i livelli nella circolazione del glucosio. Questa insufficienza può derivare da una carenza di insulina, un ormone peptidico
10 che regola sia la produzione sia l'assorbimento del glucosio in vari tessuti. La carenza di insulina compromette la capacità dei muscoli, dei grassi o di altri tessuti ad assorbire il glucosio in modo appropriato, portando all'iperglicemia (livelli anormalmente elevati di glucosio nel sangue). Più comunemente, tale carenza di insulina
15 deriva da un'inadeguata produzione nelle cellule dell'isolotto del pancreas. Nella maggior parte dei casi, ciò deriva da una distruzione autoimmune di queste cellule, una condizione nota come diabete di tipo 1 o ad esordio giovanile, ma può inoltre essere dovuta a traumi fisici o alcune altre cause.

20 Il diabete può inoltre insorgere quando i muscoli delle cellule grasse diventano meno responsivi all'insulina e non assorbono il glucosio in modo appropriato, portando all'iperglicemia. Questo fenomeno è noto come resistenza all'insulina, e la condizione risultante è nota come diabete di tipo 2. Il diabete di tipo 2, il tipo
25 più comune, è altamente associato all'obesità e l'ipertensione. L'o-

besità è associata con uno stato infiammatorio del tessuto adiposo che si pensa abbia un ruolo preponderante nello sviluppo della resistenza all'insulina (ad esempio, Hotamisligil, 2006; Guilherme *et al.*, 2008).

5 Il diabete è associato con danni a molti tessuti, largamente a causa dell'iperglicemia (e l'ipoglicemia, che può derivare da dosi di insulina eccessive o mal temporizzate) è una fonte significativa di stress ossidativo. A causa della loro capacità a proteggere contro lo stress ossidativo, particolarmente mediante induzione dell'espressione di HO-1, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui
10 forniti possono essere usati nei trattamenti per molte complicazioni del diabete. Come osservato sopra (Cai *et al.*, 2005), l'infiammazione cronica e lo stress ossidativo nel fegato sono sospettati di essere i fattori contributivi primari nello sviluppo del diabete di
15 tipo 2. Ulteriormente, gli agonisti PPAR γ come tiazolidindioni sono capaci di ridurre la resistenza all'insulina e sono noti per essere un trattamento efficace per il diabete di tipo 2. In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui forniti possono essere usati come terapie di combinazione con agonisti PPAR γ come tiazolidindioni.
20 me tiazolidindioni.

G. Artrite

 In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con una forma di artrite. In alcune realizzazioni, le forme di artrite che
25 possono essere trattate con RTA 408 e le forme polimorfiche qui de-

scritte sono artrite reumatoide (RA), artrite psoriasica (PsA), spondiloartropatie (SpAs) comprendenti spondilite anchilosante (AS), artrite reattiva (ReA), e artrite enteropatica (EA), artrite reumatoide giovanile (JRA), e artrite infiammatoria precoce.

5 Per l'artrite reumatoide, i primi segni tipicamente compaiono nello strato del rivestimento sinoviale, con proliferazione dei fibroblasti sinoviali e il loro attacco alla superficie articolare nel margine delle articolazioni (Lipsky, 1998). Successivamente, i macrofagi, le cellule T e altre cellule infiammatorie sono reclutati
10 nell'articolazione, dove producono numerosi mediatori, comprendenti interleuchina-1 (IL-1) delle citochine, che contribuisce alle sequenze croniche che portano alla distruzione delle ossa e delle cartilagini, e al fattore di necrosi tumorale (TNF- α), che ha un ruolo nell'infiammazione (Dinarello, 1998; Arend e Dayer, 1995; van den
15 Berg, 2001). La concentrazione di IL-1 nel plasma è significativamente più elevata nei pazienti con RA rispetto ai soggetti sani e, in particolare, i livelli plasmatici di IL-1 si correlano con l'attività della malattia RA (Eastgate *et al.*, 1988). Inoltre, i livelli del fluido sinoviale di IL-1 sono correlati con vari aspetti radiografici
20 e istologici di RA (Kahle *et al.*, 1992; Rooney *et al.*, 1990).

Altre forme di artrite comprendono artrite psoriasica (PsA), che è un'artropatia infiammatoria cronica caratterizzata dall'associazione di artrite e psoriasi. Studi hanno rivelato che PsA condivide numerosi aspetti genetici, patogenici e clinici con altre spondiloartropatie (SpAs), un gruppo di malattie che comprende spondilite
25

anchilosante, artrite reattiva e artrite enteropatica (Wright, 1979). La nozione che PsA appartiene al gruppo SpA ha recentemente guadagnato un ulteriore supporto da studi di imaging che dimostrano un'entesite molto estesa in PsA ma non RA (McGonagle *et al.*, 1999; 5 McGonagle *et al.*, 1998). Più specificatamente, è stato postulato che l'entesite è uno degli eventi più precoci che si presentano in SpAs, portando a un rimodellamento delle ossa e all'anchilosi nella colonna vertebrale, come pure alla sinovite articolare quando le entesi infiammate sono prossime alle articolazioni periferiche. Quantità 10 aumentate di TNF- α sono state descritte sia nella pelle psoriasica (Ettehad *et al.*, 1994) sia nei fluidi sinoviali (Partsch *et al.*, 1997). Esperimenti recenti hanno mostrato un beneficio positivo del trattamento anti-TNF sia in PsA (Mease *et al.*, 2000) sia nella spondilite anchilosante (Brandt *et al.*, 2000).

15 L'artrite reumatoide giovanile (JRA), un termine per la forma più prevalente di artrite nei bambini, è applicata a una famiglia di malattie caratterizzate dall'infiammazione cronica e dall'ipertrofia delle membrane sinoviali. Il termine si sovrappone, ma non è completamente sinonimo, con la famiglia di malattie descritte come artrite 20 cronica giovanile e/o artrite idiopatica giovanile in Europa.

JRA poliarticolare è un sottotipo clinico distinto caratterizzato dall'infiammazione e dalla proliferazione sinoviale nelle articolazioni multiple (quattro o più), comprendenti le piccole articolazioni delle mani (Jarvis, 2002). Questo sottotipo di JRA può essere 25 grave, a causa sia del suo coinvolgimento multiplo congiunto, sia

della capacità di progredire rapidamente nel tempo. Sebbene clinicamente distinto, JRA poliarticolare non è omogeneo e i pazienti variano nelle manifestazioni della malattia, nell'età dell'attacco, nella prognosi e nella risposta terapeutica. Queste differenze è molto probabile che riflettano uno spettro di variazione nella natura del'attacco immune e infiammatorio che si può presentare in questa malattia (Jarvis, 1998).

La spondilite anchilosante (AS) è un sottoinsieme di malattie in una classificazione più ampia delle malattie della spondiloartropatia. I pazienti affetti dai vari sottoinsiemi delle spondiloartropatie hanno eziologie della malattia che sono spesso molto diverse, varianti da infezioni batteriche a ereditarietà. Ancora, in tutti i sottogruppi, il risultato finale del processo della malattia è un'artrite assiale.

AS è un disturbo reumatico infiammatorio sistemico cronico dello scheletro assiale con o senza manifestazioni extrascheletriche. Sono principalmente interessati i giunti sacroiliaci e la colonna vertebrale, ma possono inoltre essere implicate le articolazioni di anche e spalle, e meno comunemente, le articolazioni periferiche o alcune strutture extra-articolari, come occhi, vascolatura, sistema nervoso e sistema gastrointestinale. L'eziologia della malattia non è ancora completamente compresa (Wordsworth, 1995; Calin e Taurog, 1998). L'eziologia è fortemente associata con la maggiore istocompatibilità dell'allele HLA-B27 di classe I (MHC I) (Calin e Taurog, 1998). AS colpisce i soggetti all'inizio della loro vita ed è temuta a causa

del suo potenziale di provocare dolore cronico e danni irreversibili a tendini, legamenti, articolazioni e ossa (Brewerton *et al.*, 1973a; Brewerton *et al.*, 1973b; Schlosstein *et al.*, 1973).

H. Colite ulcerativa

5 In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con colite ulcerativa. La colite ulcerativa è una malattia che provoca infiammazione e piaghe, chiamate ulcere, nel rivestimento dell'intestino crasso. L'infiammazione generalmente si presenta nel retto e
10 nella parte inferiore del colon, ma può colpire il colon intero. La colite ulcerativa può inoltre essere chiamata colite o proctite. L'infiammazione rende il colon frequentemente vuoto, provocando diarrea. Le ulcere si formano nei siti dove l'infiammazione ha distrutto i rivestimenti cellulari del colon e le ulcere sanguinano e
15 producono pus.

La colite ulcerativa è una malattia infiammatoria intestinale (IBD), il nome generale per la malattia che provoca l'infiammazione nel'intestino tenue e nel colon. La colite ulcerativa può essere difficile da diagnosticare poiché i suoi sintomi sono similari ad
20 altri disturbi intestinali e a un altro tipo di IBD, il morbo di Crohn. Il morbo di Crohn differisce dalla colite ulcerativa poiché provoca un'infiammazione più profonda nelle pareti intestinali. Inoltre, il morbo di Crohn generalmente si presenta nell'intestino tenue, sebbene la malattia possa presentarsi anche in bocca, esofago, stomaco, duodeno, intestino crasso, appendice, e ano.
25

I. Morbo di Crohn

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti col morbo di Crohn. I sintomi del morbo di Crohn comprendono infiammazione intestinale e lo sviluppo di stenosi e fistole intestinali; la neuropatia spesso accompagna questi sintomi. Farmaci anti-infiammatori, come 5-amminosalicilati (ad esempio, mesalamina) o corticosteroidi, sono tipicamente prescritti, ma non sono sempre efficaci (recensione in Botoman *et al.*, 1998). L'immunosoppressione con ciclosporina è talvolta utile per pazienti resistenti o intolleranti ai corticosteroidi (Brynskov *et al.*, 1989).

Nei casi attivi del morbo di Crohn, elevate concentrazioni di TNF- α e IL-6 sono secrete nella circolazione del sangue, e TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-8 sono prodotti in eccesso localmente dalle cellule della mucosa (*id.*; Funakoshi *et al.*, 1998). Queste citochine possono avere effetti ampiamente varianti sui sistemi fisiologici comprendenti sviluppo delle ossa, ematopoiesi, fegato, tiroide, e funzioni neuropsichiatriche. Inoltre, uno squilibrio del rapporto IL-1 β /IL-1 α , in favore di IL-1 β pro-infiammatorio, è stato osservato in pazienti con morbo di Crohn (Rogler e Andus, 1998; Saiki *et al.*, 1998; Dionne *et al.*, 1998; ma vedi Kuboyama, 1998).

I trattamenti che sono stati proposti per il morbo di Crohn comprendono l'uso di vari antagonisti delle citochine (ad esempio, IL-1 α), inibitori (ad esempio, dell'enzima di conversione IL-1 β e antiossidanti) e anticorpi anti-citochina (Rogler e Andus, 1998; van

Hogezand e Verspaget, 1998; Reimund *et al.*, 1998; Lugerling *et al.*, 1998; McAlindon *et al.*, 1998). In particolare, anticorpi monoclonali contro TNF- α sono stati sperimentati con un certo successo nel trattamento del morbo di Crohn (Targan *et al.*, 1997; Stack *et al.*, 1997; 5 van Dullemen *et al.*, 1995). Questi composti possono essere usati in terapia in combinazione con RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi della presente descrizione.

J. Lupus Sistemico Eritematoso

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche e i me-
10 todi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con SLE. Il lupus sistemico eritematoso (SLE) è una malattia reumatica autoimmune caratterizzata dalla deposizione nei tessuti di autoanti-
corpi e complessi immuni che portano ai danni dei tessuti (Kotzin, 1996). In contrasto con le malattie autoimmuni, come MS e diabete
15 mellito di tipo 1, SLE potenzialmente implica sistemi d'organo multipli direttamente, e le sue manifestazioni cliniche sono diverse e variabili (recensito da Kotzin e O'Dell, 1995). Per esempio, alcuni
pazienti possono dimostrare principalmente rash cutanei e dolori articolari, mostrano remissioni spontanee, e richiedono piccole medi-
20 cazioni. All'altra estremità dello spettro sono pazienti che dimostrano implicazioni renali gravi e progressive che richiedono terapie con dosi elevate di steroidi e farmaci citotossici come ciclofosfamide (Kotzin, 1996).

Uno degli anticorpi prodotti da SLE, IgG anti-dsDNA, ha un ruolo
25 preponderante nello sviluppo del lupus glomerulonefrite (GN) (Hahn e

Tsao, 1993; Ohnishi *et al.*, 1994). La glomerulonefrite è una condizione grave in cui le pareti capillari del sangue dei reni che purifica i glomeruli diventano spessi a causa di accrescimenti sul lato epiteliale delle membrane del basamento glomerulare. La malattia è spesso cronica e progressiva e può portare alla fine a insufficienza renale.

K. Sindrome dell'Intestino irritabile

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con sindrome dell'intestino irritabile (IBS). IBS è un disturbo funzionale caratterizzato da dolore addominale e abitudini intestinali alterate. Questa sindrome può iniziare nei giovani adulti e può essere associata con una disabilità significativa. Questa sindrome non è un disturbo omogeneo. Piuttosto, i sottotipi di IBS sono stati descritti sulla base dei sintomi predominanti - diarrea, costipazione o dolore. In assenza di sintomi di "allarme", come febbre, perdita di peso e emorragia gastrointestinale, è necessaria una limitata efficienza.

In modo crescente, l'evidenza per le origini di IBS suggerisce una correlazione fra l'enterite infettiva e il successivo sviluppo di IBS. Le citochine infiammatorie possono avere un ruolo. In un'indagine di pazienti con una storia di gastroenterite batterica confermata (Neal *et al.*, 1997), il 25% riportava alterazioni persistenti delle abitudini dell'intestino. La persistenza dei sintomi può essere dovuta a uno stress psicologico al momento dell'infezione

acuta (Gwee *et al.*, 1999).

Dati recenti suggeriscono che la sovracrescita batterica nell'intestino tenue può inoltre avere un ruolo nei sintomi IBS. In uno studio (Pimentel *et al.*, 2000), 157 (78%) di 202 pazienti IBS sottoposti a test di respirazione dell'idrogeno avevano risultati del test che erano positivi per la sovracrescita batterica. Dei 47 soggetti che seguivano l'esame, 25 (53%) riportavano miglioramenti nei sintomi (cioè, dolore addominale e diarrea) con trattamento antibiotico.

10 L. Sindrome di Sjögren

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con la sindrome di Sjögren. La sindrome di Sjögren (SS) primaria è una malattia autoimmune sistemica, cronica, lentamente progressiva, che colpisce in modo predominante le donne di media età (rapporto femmina-maschio 9:1), anche se si può riscontrare in tutte le età compresa l'infanzia (Jonsson *et al.*, 2002). La malattia è caratterizzata da infiltrazione linfocitica e distruzione delle ghiandole esocrine, che sono infiltrate da cellule mononucleari comprendenti i linfociti CD4+, CD8+, e le cellule B (Jonsson *et al.*, 2002). In aggiunta, le manifestazioni extraglandolari (sistemiche) sono riscontrate in un terzo dei pazienti (Jonsson *et al.*, 2001).

In altre malattie autoimmuni sistemica, come RA, sono stati identificati fattori critici per i centri germinali ectopici (GCs). I tessuti sinoviali reumatoidi con GCs hanno mostrato di produrre le

chemochine CXCL13, CCL21, e le linfotossine (LT)- β (determinate sui centri follicolari e sulle cellule della zona B del mantello). L'analisi di regressione multivariata di questi analiti identificava CXCL13 e LT- β come le uniche citochine che prevedevano GCs nella sinovite reumatoide (Weyand e Goronzy, 2003). Recentemente CXCL13 e CXCR5 nelle ghiandole salivari hanno mostrato di avere un ruolo essenziale nel processo infiammatorio mediante reclutamento delle cellule B e T, contribuendo così alla neogenesi linfoide e alla formazione di GC ectopico in SS (Salomonsson *et al.*, 2002).

10 M. Psoriasi

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi qui forniti possono essere usati per trattare pazienti con psoriasi. La psoriasi è una malattia cronica della pelle in cui si formano squame e un'inflammazione che colpisce dal 2 al 2,6 per cento della popolazione degli Stati Uniti, o fra 5,8 e 7,5 milioni di persone. La psoriasi compare quando le cellule della pelle salgono velocemente dalla loro origine al di sotto della superficie della pelle e si accumulano sulla superficie prima che abbiano la possibilità di maturare. Generalmente, questo movimento (anche chiamato turnover) impiega circa un mese, ma nella psoriasi il turnover può avvenire in pochi giorni soltanto. Nella sua forma tipica, la psoriasi porta a macchie di pelle densa, rossa (infiammata) coperta con squame argentate. Queste macchie, che sono talvolta descritte come placche, generalmente danno prurito o la percezione di essere irritate. Le placche si presentano molto spesso su gomiti, ginocchia o altre

parti di gambe, cuoio capelluto, fondoschiena, viso, palme e piante dei piedi, ma possono presentarsi sulla pelle in qualsiasi parte del corpo. Questa malattia può inoltre interessare le unghie delle mani, le unghie dei piedi e i tessuti molli dei genitali e dell'interno della bocca.

La psoriasi è un disturbo della pelle attivato dal sistema immunitario, specialmente implicante un tipo di cellule bianche del sangue, chiamate cellule T. Normalmente, le cellule T aiutano a proteggere il corpo contro le infezioni e le malattie. Nel caso della psoriasi, le cellule T entrano in azione per sbaglio e diventano così attive da innescare altre risposte immunitarie, che portano all'infiammazione e a un rapido turnover delle cellule della pelle.

N. Malattie infettive

In alcune realizzazioni, RTA 408, le forme polimorfiche, e i metodi della presente descrizione possono essere utili nel trattamento di malattie infettive, comprendenti infezioni virali e batteriche. Come osservato sopra, tali infezioni possono essere associate con gravi risposte infiammatorie localizzate o sistemiche. Per esempio, l'influenza può provocare una grave infiammazione dei polmoni e l'infezione batterica può provocare una risposta iper-infiammatoria sistemica, comprendente l'eccessiva produzione di multiple citochine infiammatorie, che è il segno caratteristico della sepsi. In aggiunta, qui forniti possono essere utili inibendo direttamente la replicazione dei patogeni virali. Studi precedenti hanno dimostrato che i composti correlati come CDDO possono inibire la replicazione di HIV

nei macrofagi (Vazquez *et al.*, 2005). Altri studi hanno indicato che l'inibizione della segnalazione di NF- κ B può inibire la replicazione del virus dell'influenza, e che le prostaglandine del ciclopentenone possono inibire la replicazione virale (ad esempio, Mazur *et al.*, 2007; Pica *et al.*, 2000).

È qui forniti il trattamento o alla prevenzione di ognuna delle malattie/disturbi/condizioni descritti sopra nella sezione IV usando il composto RTA 408 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, o una forma polimorfica di tale composto (come, ad esempio, una qualsiasi delle forme polimorfiche qui descritte sopra o di seguito), o una composizione farmaceutica comprendente una qualsiasi delle entità sopra menzionate e un veicolo farmaceuticamente accettabile (comprendente, ad esempio, le composizioni farmaceutiche descritte sopra).

V. Formulazioni Farmaceutiche e Vie di Somministrazione

RTA 408 può essere somministrato con una varietà di metodi, ad esempio, per via orale o mediante iniezione (ad esempio, sottocutanea, intravenosa, intraperitoneale, ecc.). A seconda della via di somministrazione, i composti attivi possono essere rivestiti in un materiale per proteggere il composto dall'azione degli acidi e da altre condizioni naturali che possono inattivare il composto. Può inoltre essere somministrato mediante perfusione/infusione continua al sito di una malattia o di una ferita.

Per somministrare RTA 408 all'infuori della somministrazione parenterale, può essere necessario rivestire il composto con, o co-

somministrare il composto con, un materiale per prevenire la sua inattivazione. Per esempio, il composto terapeutico può essere somministrato ad un paziente in un veicolo appropriato, per esempio, liposomi o un diluente. Diluenti farmaceuticamente accettabili comprendono soluzioni saline e di tamponi acquosi. I liposomi comprendono emulsioni di acqua-in-olio-in-acqua CGF come pure convenzionali liposomi (Strejan *et al.*, 1984).

RTA 408 può inoltre essere somministrato per via parenterale, intraperitoneale, intraspinale, o intracerebrale. Le dispersioni possono essere preparate in glicerolo, polietilenglicoli liquidi, e loro miscele e in oli. In ordinarie condizioni di stoccaggio e d'uso, queste preparazioni possono contenere un conservante per prevenire la crescita dei microorganismi.

Le soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate incorporando RTA 408 nella quantità richiesta in un appropriato solvente con uno o una combinazione di componenti elencati sopra, come richiesto, con successiva sterilizzazione filtrante. Generalmente le dispersioni sono preparate incorporando il composto terapeutico in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione basico e i componenti richiesti diversi da quelli elencati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi di preparazione preferiti sono l'essiccamento sotto vuoto e la liofilizzazione, che fornisce una polvere di componente attivo (cioè, il composto terapeutico), più un qualsiasi addizionale componente desiderato da una sua soluzione precedentemente filtrata

sterilmente.

RTA 408 può essere reso completamente amorfo usando un procedimento di essiccamento spray diretto. RTA 408 può essere somministrato per via orale, per esempio, con un diluente inerte o un veicolo commestibile assimilabile. Il composto terapeutico e altri componenti possono inoltre essere compresi in una capsula di gelatina con rivestimento duro o morbido, compresso in compresse o incorporato direttamente nella dieta del paziente. Per la somministrazione orale, il composto terapeutico può essere incorporato, per esempio, con eccipienti e usato sotto forma di compresse ingeribili, compresse orali, pastiglie, capsule, comprendenti una capsula dura o morbida, elisir, emulsioni, dispersioni solida, sospensioni, sciroppi, wafer e simili. La percentuale di composto terapeutico nelle composizioni e nelle preparazioni, naturalmente, può variare. La quantità di composto terapeutico in tali composizioni terapeuticamente utili è tale che sarà ottenuta una forma di dosaggio appropriata.

È specialmente vantaggioso formulare composizioni parenterali in forme di dosaggio unitario per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. Forma di dosaggio unitario, come qui usato, si riferisce a unità fisicamente discrete appropriate come dosaggio unitari per pazienti da trattare, ciascuna unità contenendo una quantità predeterminata di composto terapeutico calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato assieme con il veicolo farmaceutico richiesto. La descrizione delle forme di dosaggio unitario per l'uso secondo l'invenzione è imposta e direttamente dipendente

da (a) le particolari caratteristiche del composto terapeutico e il particolare effetto terapeutico da ottenere, e (b) le limitazioni inerenti nella tecnica della preparazione di tale composto terapeutico per il trattamento di una condizione selezionata in un paziente.

RTA 408 può inoltre essere somministrato per via topica a pelle, occhi, o mucosa. In alcune realizzazioni, il composto può essere preparato in una lozione, una crema, un gel, un olio, un unguento, un linimento, una soluzione, una sospensione, o un'emulsione. Alternativamente, se è desiderato il rilascio locale nei polmoni, il composto terapeutico può essere somministrato mediante inalazione in una formulazione in polvere anidra o di aerosol.

RTA 408 sarà tipicamente somministrato a un dosaggio terapeuticamente efficace sufficiente per trattare una condizione associata con un dato paziente. Per esempio, l'efficacia di un composto può essere valutata in un sistema di un modello animale che può prevedere l'efficacia nel trattamento della malattia nei soggetti umani, come i sistemi di modello evidenziati negli esempi e nei disegni.

La reale quantità del dosaggio di RTA 408 o di una composizione comprendente RTA 408 somministrata a un paziente può essere determinata mediante fattori fisici e fisiologici, come età, sesso, peso corporeo, gravità della condizione, tipo di malattia da trattare, interventi terapeutici precedenti o contemporanei, idiopatia del paziente e via di somministrazione. Questi fattori possono essere determinati da un tecnico esperto. Il medico responsabile della sommi-

nistrazione determinerà tipicamente la concentrazione del componente(i) attivo in una composizione e la dose(i) appropriata per il singolo paziente. Il dosaggio può essere regolato dal singolo medico nel caso di qualsiasi complicazione.

5 Una quantità efficace tipicamente varierà da circa 0,001 mg/kg a circa 1000 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 750 mg/kg, da circa 100 mg/kg a circa 500 mg/kg, da circa 1,0 mg/kg a circa 250 mg/kg, da circa 10,0 mg/kg a circa 150 mg/kg in una o più somministrazioni di dosi giornaliere, per uno o diversi giorni (a seconda del corso
10 della modalità di somministrazione e dei fattori discussi sopra) Altri intervalli di dosaggio appropriati comprendono da 1 mg a 10000 mg al giorno, da 100 mg a 10000 mg al giorno, da 500 mg a 10000 mg al giorno, e da 500 mg a 1000 mg al giorno. In alcune particolari realizzazioni, la quantità è minore di 10.000 mg al giorno con un
15 intervallo da 750 mg a 9000 mg al giorno.

La quantità efficace può essere meno di 1 mg/kg/ giorno, meno di 500 mg/kg/giorno, meno di 250 mg/kg/ giorno, meno di 100 mg/kg/giorno, meno di 50 mg/kg/ giorno, meno di 25 mg/kg/giorno, o meno di 10 mg/kg/ giorno. Alternativamente, può essere nell'inter-
20 vallo da 1 mg/kg/giorno a 200 mg/kg/giorno. In alcune realizzazioni, la quantità può essere di 10, 30, 100, o 150 mg/kg formulati come sospensione in olio di sesamo come descritto di seguito nell'Esempio C1. In alcune realizzazioni, la quantità può essere di 3, 10, 30 o 100 mg/kg somministrati giornalmente mediante somministrazione orale
25 con sonda gastrica come descritto di seguito negli Esempi C2 e C3.

In alcune realizzazioni, la quantità può essere di 10, 30, o 100 mg/kg somministrati per via orale come descritto di seguito nell'Esempio C6. Per esempio, con riferimento al trattamento di pazienti diabetici, il dosaggio unitario può essere una quantità che riduce il glucosio nel sangue di almeno il 40% in confronto a un paziente non trattato. In un'altra realizzazione, il dosaggio unitario è una quantità che riduce il glucosio nel sangue a un livello che è $\pm 10\%$ del livello di glucosio nel sangue di un paziente non diabetico.

In altri esempi non limitativi, una dose può inoltre comprendere da circa 1 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 5 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 10 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 50 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 100 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 200 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 350 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 500 $\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, circa 1 mg/kg di peso corporeo, circa 5 mg/kg di peso corporeo, circa 10 mg/kg di peso corporeo, circa 50 mg/kg di peso corporeo, circa 100 mg/kg di peso corporeo, circa 200 mg/kg di peso corporeo, circa 350 mg/kg di peso corporeo, circa 500 mg/kg di peso corporeo, a circa 1000 mg/kg di peso corporeo o più per somministrazione, e qualsiasi intervallo qui derivabile. In esempi non limitativi di un intervallo derivabile dai numeri elencati sopra, un intervallo da circa 5 mg/kg di peso corporeo a circa 100 mg/kg di peso corporeo, da circa 5 mg/kg di peso corporeo a circa 500 mg/kg di peso corporeo, ecc., può essere somministrato, in base ai numeri descritti sopra.

In alcune realizzazioni, una composizione farmaceutica della presente descrizione può comprendere, per esempio, almeno circa lo

0,01% di RTA 408. In altre realizzazioni, RTA 408 può comprendere fra circa lo 0,01% e circa il 75% del peso dell'unità, o fra circa lo 0,01% e circa il 5%, per esempio, e qualsiasi intervallo qui derivabile. In alcune realizzazioni, RTA 408 può essere usato in una
5 formulazione come una sospensione in olio di sesamo dello 0,01%, 0,1%, o 1% come descritto di seguito negli Esempi F e G. In alcune realizzazioni, RTA 408 può essere formulato per somministrazione topica alla pelle o agli occhi, usando un veicolo farmaceuticamente accettabile o come sospensione, emulsione, o soluzione in concentra-
10 zioni varianti da circa lo 0,01% al 10%. In alcune realizzazioni la concentrazione varia da circa lo 0,1% a circa il 5%. La concentrazione ottimale può variare a seconda dell'organo in bersaglio, della specifica preparazione e della condizione da trattare.

Dosi singole o multiple dell'agente comprendente RTA 408 sono
15 contemplate. Intervalli di tempo desiderati per il rilascio di dosi multiple possono essere determinati da una persona di normale capacità nella tecnica impiegando non più della sperimentazione routinaria. Come esempio, ai pazienti possono essere somministrate due dosi giornalmente ad intervalli di approssimativamente 12 ore. In alcune
20 realizzazioni, l'agente è somministrato una volta al giorno. L'agente(i) può essere somministrato su un programma routinario. Come qui usato, un programma routinario si riferisce a un predeterminato periodo di tempo designato. Il programma routinario può comprendere periodi di tempo che sono identici o che differiscono nella lunghezza,
25 purché il programma sia predeterminato. Per esempio, il program-

ma routinario può implicare la somministrazione due volte al giorno, ogni giorno, ogni due giorni, ogni tre giorni, ogni quattro giorni, ogni cinque giorni, ogni sei giorni, su base settimanale, su base mensile, o un qualsiasi numero di giorni o settimane di intervallo.

5 Alternativamente, il programma routinario predeterminato può implicare la somministrazione su base di due volte al giorno per la prima settimana, seguito da una base giornaliera per diversi mesi, ecc. In altre realizzazioni, l'agente(i) può essere somministrato per via orale e che la durata sia o non sia dipendente dall'assorbimento di
10 alimenti. Pertanto, per esempio, l'agente può essere assunto ogni mattina e/o ogni sera, indipendentemente dal momento in cui il paziente ha mangiato o mangerà.

VI. Terapia in combinazione

Oltre ad essere usati come monoterapia, RTA 408 e le forme polimorfiche qui descritte possono inoltre essere usate in terapie di
15 combinazione. Una terapia efficace di combinazione può essere ottenuta con una singola composizione o formulazione farmacologica che comprende entrambi gli agenti, o con due distinte composizioni o formulazioni, somministrate contemporaneamente, dove una composizione
20 ne comprende RTA 408 o le sue forme polimorfiche, e l'altra comprende il secondo agente(i). L'altra modalità terapeutica può essere somministrata prima, contemporaneamente con, o successivamente alla somministrazione di RTA 408 o delle sue forme polimorfiche. La terapia usando RTA 408 o le sue forme polimorfiche può precedere o se-
25 guire la somministrazione dell'altro agente(i) con intervalli va-

rianti da minuti a settimane. In realizzazioni dove l'altro agente e RTA 408 o le sue forme polimorfiche sono somministrati separatamente, ci si dovrebbe generalmente assicurare che un periodo di tempo significativo non termini fra il tempo di ciascun rilascio, cosicché

5 ciascun agente dovrà essere ancora in grado di esercitare un effetto vantaggiosamente combinato. In tali situazioni, è contemplato che si dovrebbero tipicamente somministrare RTA 408 o le forme polimorfiche e l'altro agente terapeutico in circa 12-24 ore l'uno dall'altro e, più preferibilmente, in circa 6-12 ore l'uno dall'altro, essendo

10 massimamente preferito un tempo protratto soltanto di circa 12 ore. In alcune situazioni, può essere desiderabile prolungare il periodo di tempo per il trattamento in modo significativo, comunque, un periodo da diversi giorni (2, 3, 4, 5, 6 o 7) fino a diverse settimane (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) tra le rispettive amministrazioni.

15 È inoltre concepibile che si desideri più di una somministrazione di RTA 408 o delle sue forme polimorfiche, o dell'altro agente. Sotto questo aspetto, possono essere impiegate varie combinazioni. A titolo illustrativo, dove RTA 408 o le sue forme polimorfiche è "A" e l'altro agente è "B", le seguenti variazioni basate su 3 e 4 som-

20 ministrazioni totali sono tipiche:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B
 AB/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/AB B/B/B/A A/A/AB B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A
 A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Altre combinazioni sono ugualmente contemplate. Esempi non limi-

25 tativi di agenti farmacologici che possono essere usati comprendono

un qualsiasi agente farmacologico noto per essere utile nel trattamento di un cancro. In alcune realizzazioni, sono contemplate le combinazioni di RTA 408 o delle sue forme polimorfiche con un'immunoterapia mirata per il cancro, terapia genica, radioterapia, agente chemioterapico, o chirurgia. È inoltre contemplata una combinazione di RTA 408 o delle sue forme polimorfiche con più di uno dei summenzionati metodi comprendenti più di uno tipo di una specifica terapia. In alcune realizzazioni, l'immunoterapia può essere diversa dagli anticorpi mirati per il cancro come, ma non limitati a, trastuzumab (Herceptin®), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Eribitux®), e panitumumab (Vectibix®) o anticorpi coniugati come ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), brentuximab vedotin (Adcetris®), ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla™), o denileukin dititox (Ontak®). Ulteriormente, in alcune realizzazioni, RTA 408 o le sue forme polimorfiche sono previste per essere usati in terapie di combinazione con immunoterapie a base di cellule dendritiche come Sipuleucel-T (Provenge®) o le immunoterapie delle cellule adottive T.

Ulteriormente, è contemplato che RTA 408 o le sue forme polimorfiche siano usati in combinazione con un agente chemioterapico come, ma non limitato a, antracicline, tassani, methotrexate, mitoxantro-ne, estramustina, doxorubicina, etoposide, vinblastina, carboplatino, vinorelbina, 5-fluorouracile, cisplatino, topotecan, ifosfamide, ciclofosfamide, epirubicina, gemcitabina, vinorelbina, irinotecan, etoposide, vinblastina, pemetrexed, melphalan, capecitabina, e ossa-

liplatino. In alcune realizzazioni, RTA 408 o le sue forme polimorfiche sono usati in combinazione con radioterapia comprendente, ma non limitata a, l'uso di radiazioni ionizzanti. In alcune realizzazioni, gli effetti dell'agente terapeutico per il cancro sono aumentati in modo sinergico mediante la somministrazione con RTA 408 e le sue forme polimorfiche. In alcune realizzazioni, terapie di combinazione che comprendono RTA 408 sono usate per trattare il cancro, comprendente, per esempio, il cancro della prostata. Vedi, ad esempio, l'Esempio H che segue.

10 Inalcune realizzazioni, i metodi possono ulteriormente comprendere (1) il contatto di una cellula tumorale con il composto prima del contatto della cellula tumorale con il secondo agente chemioterapico, (2) il contatto di una cellula tumorale con il secondo agente chemioterapico prima del contatto della cellula tumorale con il
15 composto, o (3) il contatto di una cellula tumorale con il composto e il secondo agente chemioterapico contemporaneamente. Il secondo agente chemioterapico, in alcune realizzazioni, può essere un antibiotico, un anti-infiammatorio, un anti-neoplastico, un anti-proliferativo, un anti-virale, un immunomodulatore, o un immunosop-
20 pressore. In altre realizzazioni, il secondo agente chemioterapico può essere un agente alchilante, un modulatore del recettore degli androgeni, un disgregante citoscheletrico, un modulatore del recettore degli estrogeni, un inibitore della istone-deacetilasi, un inibitore della HMG-CoA riduttasi, un inibitore della prenil-proteina
25 trasferasi, un modulatore del recettore retinoide, un inibitore del-

la topoisomerasi, o un inibitore della tirosinchinasi. In alcune realizzazioni, il secondo agente chemioterapico è 5-azacitidina, 5-fluorouracile, acido 9-cis-retinoico, actinomicina D, alitretinoina, tutti gli acidi trans-retinoici, annamicina, axitinib, belinostat, bevacizumab, bexarotene, bosutinib, busulfan, capecitabina, carboplatino, carmustina, CD437, cediranib, cetuximab, chlorambucil, cisplatino, ciclofosfamide, citarabina, dacarbazina, dasatinib, daunorubicina, decitabina, docetaxel, dolastatin-10, doxifluridina, doxorubicina, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etoposide, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicin, esametilmelamina, idarubicina, ifosfamide, imatinib, irinotecan, isotretinoina, ixabepilone, lapatinib, LBH589, lomustina, mecloretamina, melphalan, mercaptopurina, methotrexate, mitomicina, mitoxantrone, MS-275, neratinib, nilotinib, nitrosourea, ossaliplatino, paclitaxel, plicamicina, procarbazina, semaxanib, semustina, sodio butirrato, sodio fenilacetato, streptozotocina, suberoilanolide, acido idrossammico, sunitinib, tamoxifen, teniposide, tiotepa, tioguanina, topotecan, TRAIL, trastuzumab, tretinoina, tricostatina A, acido valproico, valrubicina, vandetanib, vinblastina, vincristina, vindesina, o vinorelbina.

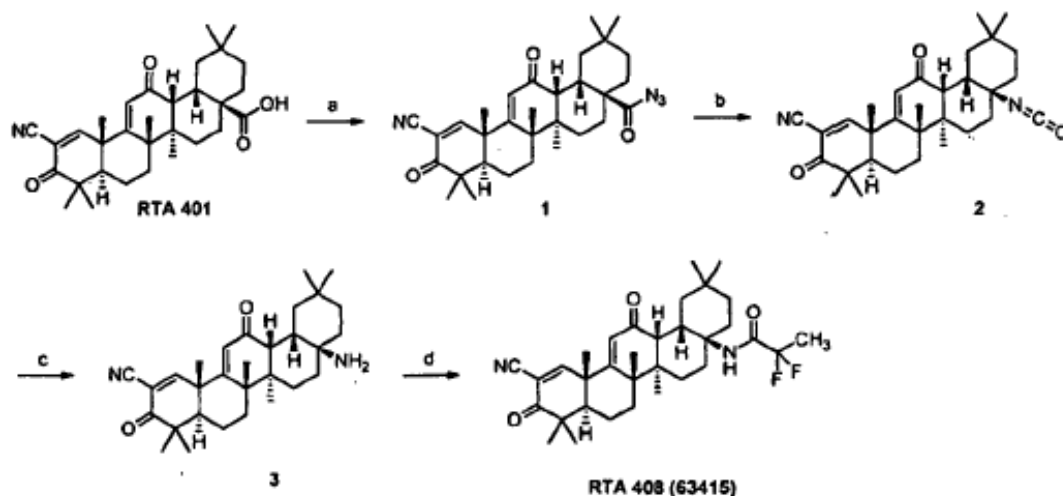
20 Addizionalmente, terapie di combinazione per il trattamento di malattie cardiovascolari utilizzanti RTA 408, le forme polimorfiche, e le composizioni farmaceutiche della presente descrizione sono contemplate. Per esempio, tali metodi possono ulteriormente comprendere la somministrazione di una quantità farmaceuticamente efficace di
25 uno o più farmaci cardiovascolari in aggiunta a RTA 408, alle forme

polimorfiche, e alle composizioni farmaceutiche della presente descrizione. Il farmaco cardiovascolare può essere, ma non limitato a, per esempio, un farmaco che abbassa il colesterolo, un anti-iperlipidemico, un bloccante i canali del calcio, un anti-
5 ipertensivo, o un inibitore della HMG-CoA riduttasi. In alcune realizzazioni, esempi non limitativi di farmaci cardiovascolari comprendono amlodipina, aspirina, ezetimibe, felodipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina o nitrendipina. In altre realizzazioni, altri esempi non limitativi di
10 farmaci cardiovascolari comprendono atenololo, bucindololo, carvedilolo, clonidina, doxazosina, indoramina, labetalolo, metildopa, metoprololo, nadololo, oxprenololo, fenossibenzamina, fentolamina, pindololo, prazosin, propranololo, terazosina, timololo o tolazolina. In altre realizzazioni, il farmaco cardiovascolare può essere,
15 per esempio, una statina, come atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina o simvastatina.

VII. Esempi

I seguenti esempi sono inclusi per illustrare le realizzazioni
20 preferite dell'invenzione. Sarebbe da comprendere dagli esperti nella tecnica che le tecniche descritte negli esempi che seguono rappresentano tecniche scoperte dall'inventore per un miglior funzionamento della pratica dell'invenzione e, pertanto, possono essere considerate modalità preferite per la sua esecuzione.

25 A. Sintesi di RTA 408 (63415)



Reagenti e condizioni: (a) $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$ (DPPA), Et_3N , toluene, 0°C per 5 min, poi t.a. durante la notte, ~94%; (b) benzene, 80°C per 2 h; (c) HCl , CH_3CN , t.a. per 1 h; (d) $\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CO}_2\text{H}$, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , t.a. durante la notte, 73% da **RTA 401** (4 stadi).

Composto 1: A una soluzione di toluene (400 ml), **RTA 401** (che può essere preparato secondo i metodi descritti, per esempio, da Honda, *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 2000b; Honda *et al.*, 2002; Yates *et al.*, 2007; e i brevetti U.S. 6.326.507 e 6.974.801 (20,0 g, 40,6 mmoli) e Et_3N (17,0 ml, 122,0 mmoli) furono aggiunti in un reattore e raffreddati a 0°C con agitazione. Difenilfosforilazide (DPPA) (13,2 ml, 61,0 mmoli) fu aggiunta con agitazione a 0°C in 5 min e la miscela fu agitata in continuo a temperatura ambiente durante la notte (Il controllo HPLC-MS non mostra alcun **RTA 401**). La miscela di reazione fu caricata direttamente su una colonna di gel di silice e purificata mediante cromatografia in colonna (gel di silice, da 0% a 5% EtOAc in CH_2Cl_2) per fornire il composto **1** (19,7 g, ~94%, parzialmen-

polypo Montel

te trasformato nel composto 2) come schiuma bianca.

Composto 2: Il composto 1 (19,7 g, ~38,1 mmoli) e benzene (250 ml) furono aggiunti in un reattore e riscaldati a 80°C con agitazione per 2 h (Il controllo HPLC-MS non mostra alcun composto 1). La miscela di reazione fu concentrata a pressione ridotta per fornire composto grezzo 2 come residuo solido, che fu usato per lo stadio successivo senza purificazione.

Composto 3: Il composto grezzo 2 ($\leq 38,1$ mmoli) e CH_3CN (200 ml) furono aggiunti in un reattore e raffreddati a 0°C con agitazione. HCl (12 N, 90 ml) fu aggiunta a 0°C in 1 min e la miscela fu agitata in continuo a temperatura ambiente per 1 h (Il controllo HPLC-MS non mostra alcun composto 2). La miscela di reazione fu raffreddata a 0°C e 10% di NaOH (~500 ml) fu aggiunto con agitazione. Poi, NaHCO_3 saturo (1 L) fu aggiunto con agitazione. La fase acquosa fu estratta mediante EtOAc (2x500 ml). Le fasi organiche riunite furono lavate con H_2O (200 ml), NaCl saturo (200 ml), essiccate su Na_2SO_4 , e concentrate per fornire il composto grezzo 3 (16,62 g) come schiuma gialla chiara, che fu usata per lo stadio successivo senza purificazione.

RTA 408: Ammina grezza 3 (16,62 g, 35,9 mmoli), $\text{CH}_3\text{CF}_2\text{CO}_2\text{H}$ (4,7388 g, 43,1 mmoli), e CH_2Cl_2 (360 ml) furono aggiunti in un reattore con agitazione a temperatura ambiente. Poi, dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (11,129 g, 53,9 mmoli) e 4-(dimetilammino)-piridina (DMAP) (1,65 g, 13,64 mmoli) furono aggiunti e la miscela fu agitata in continuo a temperatura ambiente durante la notte (Il controllo



HPLC-MS non mostra alcun composto 3). La miscela di reazione fu filtrata per rimuovere i sottoprodotti solidi e il filtrato fu caricato direttamente su una colonna di gel di silice e purificato mediante cromatografia in colonna (gel di silice, da 0% a 20% di EtOAc in Esani) due volte per fornire il composto **RTA 408** (16,347 g, 73% da **RTA 401** in 4 stadi) come schiuma bianca: ^1H NMR (400 MHz, CD_3Cl) δ 8,04 (s, 1H), 6,00 (s, 1H), 5,94 (s, br, 1H), 3,01 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz), 2,75-2,82 (m, 1H), 1,92-2,18 (m, 4H), 1,69-1,85 (m, 7H), 1,53-1,64 (m, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,42 (s, 3H), 1,11-1,38 (m, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,18 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 0,92 (s, 3H); m/z 555 ($M+1$).

B. Farmacodinamiche

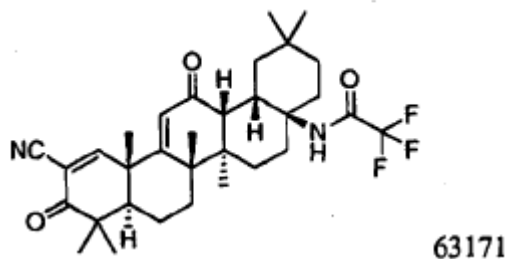
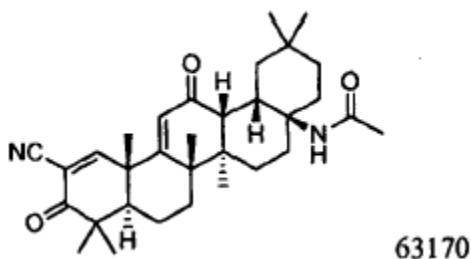
Un sommario degli studi *in vitro* e *in vivo* per valutare gli effetti farmacodinamici primari di RTA 408 è fornito di seguito.

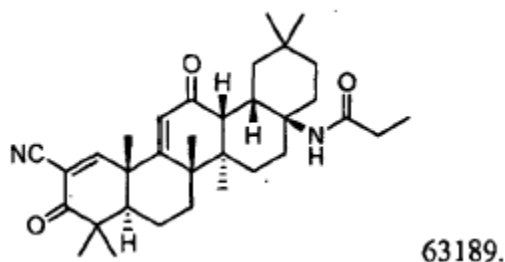
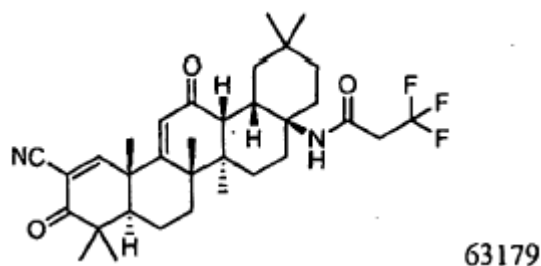
15 1. Effetti di RTA 408 su Keap1-Nrf2 e NF- κ B *in Vitro*

L'inibizione della produzione di NO $\text{IFN}\gamma$ -indotta mediante AIMS è Nrf2-dipendente (Dinkova-Kostova, 2005). Macrofagi di topo RAW264.7 furono depositi in piastre a 96 pozzetti a 30.000 cellule/pozzetto in triplo in RPMI 1640 arricchito con lo 0,5% di FBS e incubato a 37°C col 5% di CO_2 . al giorno successivo, le cellule furono pre-trattate con DMSO (veicolo) o RTA 408 per 2 h, con successivo trattamento con 20 ng/ml di $\text{IFN}\gamma$ di topo per 24 h. I livelli di nitrito (NO_2^-) nei terreni furono misurati come surrogato per l'ossido nitrico usando il sistema reagente di Griess (cat # G2930, Promega), secondo istruzioni del produttore, dal momento che il nitrito è un prodotto sta-

Philippe Monteb

bile di scissione primario di NO. La vitalità cellulare fu valutata usando il reagente di proliferazione cellulare WST-1 (cat # 11644807001, Roche Applied Science) secondo le istruzioni del produttore. I valori di IC_{50} furono determinati in base alla soppressione della produzione di ossido nitrico $IFN\gamma$ -indotta normalizzata per la vitalità cellulare. Il trattamento con RTA 408 portava a una soppressione dose-dipendente della produzione di NO $IFN\gamma$ -indotta, con un valore medio di IC_{50} di $3,8 \pm 1,2$ nM. I risultati da un esperimento rappresentativo sono mostrati in FIG. 1. Il valore IC_{50} per RTA 408 è stato trovato essere del 45%-65% inferiore rispetto ai valori di IC_{50} per i composti 63170 (8 ± 3 nM), 63171 ($6,9 \pm 0,6$ nM), 63179 (11 ± 2 nm), e 63189 (7 ± 2 nM). 63170, 63171, 63179, e 63189 sono composti delle formule:





2. Effetto di RTA 408 sui Geni in bersaglio Nrf2

RTA 408 fu esaminato in due differenti saggi reporter di lucife-
 5 rasi per valutare l'attivazione di ARE. Il primo reporter di lucife-
 rasi esaminato era sotto il controllo di un singolo ARE derivato dal
 promotore del gene NQO1 umano, che consente una valutazione quanti-
 tativa dell'attività endogena del fattore di trascrizione Nrf2 in
 cellule coltivate di mammifero. L'espressione della luciferasi *Fire-*
 10 *fly* dal reporter NQO1-ARE del plasmide di luciferasi è controllata
 mediante il legame di Nrf2 a una specifica sequenza enhancer corri-
 spondente all'elemento della risposta antiossidante (ARE) che fu
 identificato nella regione del promotore del gene della ossidoridut-
 tasi 1 (NQO1) umana NADPH:chinone (Xie *et al.*, 1995). Il plasmide
 15 NQO1-ARE-reporter di luciferasi fu costruito inserendo NQO1-ARE
 umano (5'-CAGTCACAGTGACTCAGCAGAATCTG-3') nel vettore pLuc-MCS
 usando i siti di clonazione HindIII/XhoI (GenScript Corp., Piscata-
 way, NJ). La linea cellulare di epatoma umano HuH-7, mantenuta in

Philippe Montiel

DMEM (Invitrogen) arricchito col 10% di FBS e 100 U/ml (ciascuna) di penicillina e streptomicina, fu trasfettata transitoriamente usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con the Plasmide del reporter di luciferasi NQ01-ARE e il plasmide pRL-TK, che esprime in modo costitutivo la luciferasi *Renilla* ed è usato come controllo interno per la normalizzazione ei livelli di trasfezione. Trenta ore dopo la trasfezione, le cellule furono trattate con RTA 408 per 18 h. L'attività di luciferasi *Firefly* e *Renilla* fu saggiata mediante il saggio di luciferasi Dual-Glo (cat # E2920, Promega), e il segnale di luminescenza fu misurato su un luminometro L-Max II (Molecular Devices). L'attività di luciferasi *Firefly* fu normalizzata per l'attività *Renilla*, e fu calcolato il fattore moltiplicativo di induzione in un veicolo di controllo (DMSO) dell'attività normalizzata *Firefly*. FIG. 2a mostra un'induzione dose-dipendente dell'attività di luciferasi mediante RTA 408 in questa linea cellulare. I valori rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti. Il venti per cento meno di RTA 408 (12 nM) rispetto a 63189 (14,9 nM) fu richiesto per aumentare la trascrizione da NQ01 ARE nelle cellule HuH-7 di 2-volte. Ugualmente, 2,1-2,4 volte meno di RTA 408 rispetto a 63170 (25,2 nM) e 63179 (29,1 nM), rispettivamente, fu richiesto per aumentare la trascrizione da NQ01 ARE in cellule HuH-7 di 2-volte.

L'effetto di RTA 408 sull'attivazione del reporter di luciferasi fu inoltre valutato nella linea cellulare del reporter AREc32. Questa linea cellulare è derivata da cellule MCF-7 del carcinoma della mammella umano ed è stabilmente trasfettata con un gene del reporter

di luciferasi *Firefly* nel controllo trascrizionale delle otto copie della sequenza GSTA2 ARE di ratto (Wang, *et al.*, 2006). Successivamente al trattamento con RTA 408 per 18 h, l'attività di luciferasi *Firefly* fu misurata usando il sistema del saggio di luciferasi ONE-Glo (Promega, Catalogo #E6110) secondo le istruzioni del produttore.

5 Una risposta dose-dipendente fu osservata nella linea cellulare del reporter AREc32 (FIG. 2b). Un'induzione di 2-volte dell'attività di luciferasi fu evidenziata successivamente al trattamento con 15,6 nM di RTA 408 in entrambi i sistemi di saggio NQ01-ARE e GSTA2-ARE.

10 osservando i risultati dallo studio di attività di luciferasi GSTA2-ARE (AREc32), gli effetti dell'induzione di 63415 (RTA 408) su GSTA2-ARE possono essere direttamente confrontati con quelli di RTA 402, 63170, 63171, 63179, e 63189 assieme con gli studi di vitalità WST1 (FIGG. 3a-f). In confronto ai valori di RTA 402, 63415 mostrava

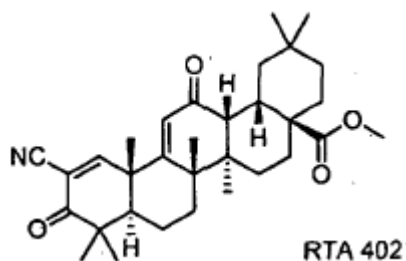
15 l'induzione più veloce della trascrizione GSTA2-ARE-mediata dei cinque composti di confronto con una concentrazione di 93 nM necessaria per raggiungere l'induzione di 4-volte nel saggio del reporter di luciferasi. Tutti gli altri composti mostravano un'induzione simile soltanto con concentrazioni molto più elevate con 63170 che richiedeva una concentrazione di 171 nM, 63171 che richiedeva una con-

20 centrazione di 133 nM, 63179 che richiedeva una concentrazione di 303 nM e 63189 che richiedeva una concentrazione di 174 nM per ottenere un'induzione di 4-volte dell'attività di luciferasi. Questi valori corrispondono a un aumento di 1,86 (63415), 3,40 (63170), 2,65

25 (63171), 6,05 (63179) e 3,47 (63189) volte nella quantità del compo-



sto attivo necessario in confronto a RTA 402 per portare alla stessa quantità di attività.



RTA 408 inoltre mostrava un aumento nei livelli di trascrizione
5 dei noti geni in bersaglio Nrf2 nei fibroblasti di polmone fetale umano HFL1 e nelle linee cellulari epiteliali bronchiali umane BEAS-2B. Le cellule HFL1 furono coltivate in terreni F-12K arricchiti con 10% di siero fetale bovino e 1% di penicillina-streptomina. Le cellule BEAS-2B furono coltivate in terreni DMEM/F-12 arricchiti con
10 10% di siero fetale bovino e 1% di penicillina-streptomina. Le cellule furono deposte in piastre a 6-pozzetti a una densità di $2,5 \times 10^5$ cellule/pozzetto. Il giorno successivo, le cellule furono trattate con DMSO (veicolo) o RTA 408 (7,8, 15,6, 31,3, 62,5, o 125 nM) per 18 h. Ciascun pozzetto riceveva la stessa quantità di veicolo.
15 Successivamente al trattamento, i terreni furono rimossi e le cellule furono raccolte usando il tampone RLT (Qiagen). I lisati furono omogeneizzati usando colonne QIAshredder (Qiagen, Catalogo #79654) e RNA fu isolato usando il minikit RNeasy (Qiagen, Catalogo #74104). Per la trascrizione inversa, RNA (1 μ g) fu combinato con il primer
20 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ e H₂O in un volume finale di 23,25 μ l. La miscela fu riscaldata a 70°C per 10 min e poi collocata su ghiaccio. Una misce-

la principale contenente 8 μ l 5X del primo tampone strand, 2 μ l di 1 mg/ml BSA, 2 μ l di 20 mM DTT, 4 μ l di miscela 5 mM dNTP, 0,25 μ l di RNaseOUT™ e 0,5 μ l di trascrittasi inversa Superscript® II furono aggiunti alla miscela RNA e incubati a 42°C per 1 h. La reazione fu
5 inattivata mediante riscaldamento a 70°C per 10 min. La miscela di reazione fu diluita 1:3 con H₂O prima dell'uso in qPCR. 2,5 μ l della reazione di trascrizione inversa diluiti furono combinati con una serie di primer PCR (0,36 μ M di concentrazione finale), 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Catalogo #170-8885) e H₂O a un volume finale
10 di 20 μ l. Le sequenze per i primer PCR sono come di seguito: *Ligasi glutammato-cisteina, subunità del modificatore (GCLM)*, primer in avanti 5'-GCTGTGGCTACTGCGGTATT-3' (SEQ ID NO: 1) primer inverso 5'-ATCTGCCTCAATGACACCAT-3' (SEQ ID NO: 2); *Eme-ossigenasi-1 (HMOX1)* primer in avanti 5'-TCCGATGGGTCCTTACACTC- 3' (SEQ ID NO: 3), primer
15 inverso 5'-TAGGCTCCTTCCTCCTTTCC-3' (SEQ ID NO: 4); *NAD(P)H deidrogenasi, chinone 1 (NQO1)* primer in avanti 5'-AAAACACTGCCCTCTTGTGG-3' (SEQ ID NO: 5), primer inverso 5'-GTGCCAGTCAGCATCTGGTA-3' (SEQ ID NO: 6); *Proteina ribosomale S9 (RPS9)* primer in avanti 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGTCTG-3' (SEQ ID NO: 7), primer inverso 5'-
20 GAGACAATCCAGCAGCCCAGGAGGG-3' (SEQ ID NO: 8); *Tioredoxina-riduttasi 1 (TXNRD1)* primer in avanti 5'- ATTGCCACTGGTGAAAGACC-3' (SEQ ID NO: 9), primer inverso 5'- ACCAATTTTGTGGCCATGT-3' (SEQ ID NO: 10). Tutti i primer erano stati precedentemente validati per la specificità e l'efficienza dell'amplificazione. cDNA fu amplificato usando le
25 seguenti condizioni di ciclo: (95°C per 3 min, 44 cicli di 95°C per



30 sec, 60°C per 15 sec, 72°C per 15 sec, seguiti da una curva di fusione di 55°C a 95°C in incrementi di 0,5°C). L'abbondanza relativa di ciascun Gene in bersaglio Nrf2 fu determinata usando il metodo comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$). Le reazioni PCR furono eseguite in pozzetti in triplo per ciascun campione. Due esperimenti indipendenti furono eseguiti usando le condizioni descritte sopra. Il trattamento di fibroblasti di polmone HFL1 con RTA 408 per 18 h portava a un'espressione aumentata di diversi geni in bersaglio Nrf2, comprendenti NQO1, HMOX1, GCLM, e TXNRD1, misurata mediante PCR quantitativa (FIGG. 4a-d). Per tutti i geni esaminati, l'induzione mediante RTA 408 era dose-dipendente ed evidente a concentrazioni minori di 15,6 nM. Il trattamento delle cellule epiteliali bronchiali BEAS-2B con RTA 408 per 18 h portava a un aumento simile dose-dipendente di tutti i geni in bersaglio Nrf2 valutati (FIGG. 5a-d). RTA 408 inoltre aumentava l'espressione dei geni in bersaglio Nrf2 nelle cellule mesangiali umane normali (nHMC), della linea cellulare microgliale BV2 di topo e della linea cellulare del neuroblastoma umano SH-SY5Y a concentrazioni similari.

Livelli di proteine dei bersagli Nrf2 NQO1 e HMOX1 furono misurati nelle cellule SH-SY5Y e BV-2 mediante Western blot successivamente al trattamento con RTA 408. Le cellule SH-SY5Y furono deposte in piastre a 6-pozzetti a una densità di 4×10^5 cellule per pozzetto. Le cellule BV-2 furono deposte in piastre a 6-pozzetti a una densità di $2,5 \times 10^4$ cellule per pozzetto. Ventiquattro ore (BV-2) o 48 (SH-SY5Y) dopo la deposizione, le cellule furono trattate con RTA

408 per 24 ore. Successivamente al trattamento, le cellule furono lavate due volte con PBS freddo e raccolte in tampone di lisi. Le cellule furono trattate con ultrasuoni e i frammenti fu chiarificati mediante centrifugazione (10 min @ 18.000 rcf, Beckman Coulter, microfuge 18 centrifuga). La proteina totale nel surnatante fu quantificata usando il reagente per proteine Bio-Rad con BSA come standard. Quantità uguali delle proteine cellulari totali furono separate su SDS-PAGE, e le proteine furono trasferite in una membrana di nitrocellulosa. Le membrane furono bloccate per 1 h in TBST (1 x TBS con 0,1% di Tween-20) contenente il 5% di latte, lavate 3 volte con TBST, e incubate con anticorpi primari durante la notte a 4°C. L'anticorpo NQ01 era della Abcam (#AB2346); HMOX1 (HO-1) l'anticorpo era della Santa Cruz (#sc-10789); l'anticorpo actina era della Millipore (#MAB 1501). Dopo lavaggio con TBST, gli anticorpi secondari furono aggiunti in TBST + 5% di latte per 1 h a temperatura ambiente. Gli anticorpi secondari IgG AffiniPure di capra anti-coniglio o anti-topo erano della Jackson ImmunoResearch (catalogo #111-035-144 e #115-035-146, rispettivamente). Le membrane furono lavate in TBST, sviluppate usando ECL, ed esposte a una pellicola a raggi X. Il trattamento con RTA 408 inoltre aumentava i livelli di proteina NQ01 nelle cellule SH-SY5Y in modo dose-dipendente (FIG. 6a). La proteina HMOX1 non fu determinata nel non-trattato o nelle cellule SH-SY5Y RTA 408-trattate. Nelle cellule BV2, il trattamento con RTA 408 aumentava i livelli delle proteine NQ01 e HMOX1 a concentrazioni fino a 125 nM (FIG. 6b). Il valore EC_{50} per l'induzione dell'espressione

delle proteine Nrf2 in cellule SK-N-SH mediante RTA 408 (56,4 nM) era del 45%-65% inferiore rispetto ai valori EC_{50} per 63171 (122 nM), 63189 (102 nM), e 63179 (126 nM). La stessa quantità di 63170 (54,6 nM) fu richiesta.

5 La EC_{50} fu misurata usando un saggio western NQO1 in-cellula dove le cellule furono incubate con il composto in valutazione per tre giorni. Dopo incubazione con il composto di interesse, le cellule furono fatte reagire con l'anticorpo NQO1 di topo e il giorno successivo le cellule furono fatte reagire con l'anticorpo IgG IRDye-
10 800CW-anti-topo. I segnali in bersaglio furono visualizzati e poi analizzati.

Consistente con l'induzione dei geni in bersaglio Nrf2 e i corrispondenti prodotti delle proteine, il trattamento delle cellule di macrofago di topo RAW264.7 per 24 h aumentava l'attività enzimatica
15 di NQO1 in modo dose-dipendente, con aumenti evidenti a 7,8 nM (FIG. 7). L'attività enzimatica NQO1 fu misurata mediante un saggio modificato Prochaska (Prochaska and Santamaria, Anal Biochem. 169:328-336, 1988).

Presi assieme, questi dati le linee cellulari multiple dimostrano che il trattamento con RTA 408 aumenta l'attività trascrizionale
20 controllata mediante elementi di risposta antiossidanti, aumenta l'espressione dei geni in bersaglio Nrf2, e aumenta l'attività di NQO1, un prodotto del gene in bersaglio Nrf2.

3. Effetto di RTA 408 sui Marcatori della Capacità Redox Cellulare

25 Il glutathione e NADPH sono fattori critici richiesti per la con-

servazione della capacità redox cellulare. Diversi geni implicati nella sintesi del glutathione (ad esempio, GCLC e GLCM) e NADPH [ad esempio, esoso-6-fosfato deidrogenasi (H6PD) e l'enzima malico 1 (ME1)] hanno dimostrato di essere regolati da Nrf2 (Wu, 2011). L'effetto del trattamento con RTA 408 sui livelli totali di glutathione fu valutato nelle linee cellulari di epatocita di topo AML-12 usando il kit di saggio del glutathione GSH-Glo™ (Promega, Catalogo #V6912) secondo le istruzioni del produttore. Il trattamento delle cellule AML-12 per 24 h con RTA 408 aumentava i livelli cellulari totali del glutathione in modo dose-dipendente (FIG. 8). I dati mostrati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. Un aumento >2-volte nel glutathione totale fu osservato a concentrazioni di RTA 408 minori di 15,6 nM. Il valore EC₅₀ valore usando un modello di topo RAW264.7 per l'induzione dei livelli di glutathione mediante RTA 408 (9,9 nM) era del 22%-57% inferiore rispetto ai valori EC₅₀ per 63170 (12,1 nM), 63171 (23,2 nM), e 63189 (16 nM).

L'effetto del trattamento con RTA 408 sui livelli di NADPH, misurato mediante l'assorbanza di un colorante redox-sensibile, WST-1 (Roche Applied Science, Catalogo #11644807001), fu valutato nelle cellule HCT-116. L'assorbanza WST-1 è comunemente usata per valutare la vitalità cellulare misurando la produzione glicolitica di NAD(P)H mediante le cellule vitali. Pertanto, in situazioni dove la produzione di NADPH aumenta in assenza di qualsiasi effetto sulla vitalità cellulare, anche l'assorbanza WST-1 aumenta (Berridge *et al.*, 1996). Diversi geni chiave implicati nella produzione di NADPH hanno

inoltre mostrato di essere regolati da Nrf2 (Thimmulappa *et al.*, 2002; Wu, *et al.*, 2011). Il trattamento con RTA 408 per 24 h aumentava l'assorbanza WST-1 in modo dose-dipendente (FIG. 9), suggerendo che i livelli di NADPH erano aumentati.

5 L'effetto di RTA 408 sull'espressione dei geni implicati nel percorso di sintesi di NADPH fu inoltre valutato in questo studio. Cellule HCT-116 furono trattate con RTA 408 per 24 h, e i livelli di mRNA di H6PD, fosfogluconato deidrogenasi (PGD), transchetolasi (TKT), e ME1 furono misurati usando PCR quantitativa. Le cellule
10 HCT-116 furono deposte in piastre a 6-pozzetti a una densità di 3×10^5 cellule/pozzetto. Il giorno successivo, le cellule furono trattate con DMSO (veicolo), 10 nM RTA 408, o 50 nM RTA 408 per 24 h. Ciascun pozzetto riceveva la stessa quantità di veicolo. Successivamente al trattamento, i terreni furono rimossi e le cellule furono raccolte usando il tampone RLT (Qiagen). I lisati furono omogeneizzati
15 usando le colonne QIAshredder (Qiagen, Catalogo #79654) e RNA fu isolato usando i minikit RNeasy (Qiagen, Catalogo #74104). Per la trascrizione inversa, RNA (1 μ g) fu combinato col primer Oligo(dT)12-18 e H₂O in un volume finale di 23,25 μ l. La miscela fu riscaldata a 70°C per 10 min e poi collocata su ghiaccio. Una miscela
20 principale contenente 8 μ l del primo tampone strand 5X, 2 μ l di 1 μ g/ml BSA, 2 μ l di 20 mM DTT, 4 μ l di 5 mM di miscela dNTP, 0,25 μ l RNaseOUT™ e 0,5 μ l di trascrittasi inversa Superscript® II furono aggiunti alla miscela di RNA e incubati a 42°C per 1 h. La reazione
25 fu inattivata mediante riscaldamento a 70°C per 10 min. La miscela

di reazione fu diluita 1:3 con H₂O prima dell'uso in qPCR. 2,5 µl della reazione della trascrizione inversa diluita furono combinati con una serie di primer PCR (0,36 µM di concentrazione finale), 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Catalogo #170-8885) e H₂O a un volume finale di 20 µl. Le sequenze per i primer PCR sono come di seguito: *Proteina ribosomale S9 (RPS9)* primer in avanti 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGTCTG-3' (SEQ ID NO: 7), primer inverso 5'-GAGACAATCCAGCAGCCCAGGAGGG-3' (SEQ ID NO: 8); *Esoso-6-fosfato deidrogenasi (H6PD)* primer in avanti 5'-GAGGCCGTGTACACCAAGAT-3' (SEQ ID NO: 11), primer inverso 5'-AGCAGTGGGGTGAAAATACG-3' (SEQ ID NO: 12), *Fosfogluconato deidrogenasi (PGD)* primer in avanti 5'-AAGGCACTCTACGCTTCCAA-3' (SEQ ID NO: 13), primer inverso 5'-AGGAGTCCTGGCAGTTTTCA-3' (SEQ ID NO: 14), *Transchetolasi (TKT)* primer in avanti 5'-CATCTCCGAGAGCAACATCA-3' (SEQ ID NO: 15), primer inverso 5'-TTGTATTGGCGGCTAGTTCC-3' (SEQ ID NO: 16); *Enzima malico 1 (ME1)* primer in avanti 5'-TATATCCTGGCCAAGGCAAC-3' (SEQ ID NO: 17) primer inverso 5'-GGATAAAGCCGACCCTCTTC-3' (SEQ ID NO: 18). Tutti i primer erano stati precedentemente validati per la specificità e l'efficienza di amplificazione. I cDNA furono amplificati usando le seguenti condizioni di ciclo: (95°C per 3 min, 44 cicli di 95°C per 30 sec, 60°C per 15 sec, 72°C per 15 sec, seguiti da una curva di fusione da 55°C a 95°C in incrementi di 0,5°C). L'abbondanza relativa di ciascun gene in bersaglio fu determinata usando il metodo comparativo CT ($\Delta\Delta CT$). Le reazioni PCR furono eseguite in pozzetti in triplo per ciascun campione. Furono eseguiti due esperimenti indi-

pendenti usando le condizioni descritte sopra. Il trattamento con RTA 408 portava a un aumento dose-dipendente nell'espressione dei geni implicati nella sintesi di NADPH (FIGG. 10a-d).

In sintesi, il trattamento con RTA 408 aumentava i livelli totali di glutathione negli epatociti AML-12 e aumentava l'assorbanza WST-1, un marcatore della produzione NADPH, nelle cellule HCT-116. Questa osservazione è correlata con un aumento nell'espressione di diversi enzimi codificanti i geni fondamentali implicati nella sintesi di NADPH.

10 4. Effetto di RTA 408 sulla segnalazione di NF- κ B TNF α -indotta

NF- κ B è un fattore di trascrizione che ha un ruolo centrale nella regolazione di molte risposte immuni e infiammatorie. RTA 402 e altri AIMS hanno mostrato di inibire la segnalazione di NF- κ B pro-infiammatorio in una varietà di linee cellulari (Shishodia, 2006; Ahmad, 2006; Yore, 2006). Usando la linea cellulare NIH3T3/NF- κ B-luc (Panomics) di topo, furono esplorati gli effetti di RTA 408 e dei composti 63171, 63179, 63170, e 63189 sul reporter NF- κ B-Luc. La linea cellulare NIH3T3/NF- κ B-luc mantiene un'integrazione cromosomica del costrutto del reporter di luciferasi *Firefly* regolato mediante otto copie dell'elemento di risposta NF- κ B. Gli effetti di questi composti possono essere quantificati misurando il valore della IC₅₀ di NF- κ B. RTA 408 mostrava una IC₅₀ di 1,2 μ M, che quando normalizzato per la vitalità mostrava una IC₅₀ di 1,4 μ M. Gli altri quattro composti mostravano valori di IC₅₀ di NIH3T3/NF- κ B di 1,7, 0,2, 1,1, e 1,1 μ M, che quando normalizzati per la vitalità mostravano valori

di IC_{50} di 1,8, 0,6, 1,1, e 1,0 mM, rispettivamente. RTA 408 e i suoi effetti su NF- κ B sono riportati in un diagramma in funzione del dosaggio e del cambiamento relativo come pure WST1 e WST1/2 sono mostrati nelle FIGG. 11a & b. L'effetto di RTA 408 sulla segnalazione NF- κ B TNF α -indotta fu valutato nelle cellule HeLa/NF- κ B-Luc, una linea cellulare di adenocarcinoma cervicale umano stabilmente trasfettata con un costrutto del reporter di luciferasi sotto il controllo di elementi di risposta trascrizionale multipli NF- κ B. Le cellule HeLa/NF- κ B-Luc furono pretrattate per 1 h con RTA 408, con successivo trattamento con TNF- α (10 ng/ml) per altre 5 h. Dopo il trattamento, la luminescenza fu misurata, e l'effetto del pretrattamento di RTA 408 sull'attività di luciferasi TNF- α -indotta fu determinato. I risultati medi e le deviazioni standard da tre esperimenti indipendenti sono mostrati in FIG. 12. RTA 408 inibiva in modo dose-dipendente l'attivazione NF- κ B TNF- α -indotta con un valore IC_{50} di 517 ± 83 nM. Risultati similari furono osservati in un'altra linea cellulare del reporter NF- κ B (A549/NF- κ B-Luc) dove RTA 408 inibiva l'attivazione di NF- κ B TNF- α -indotta con un valore IC_{50} di 627 nM (intervallo 614-649 nM). RTA 408 era 1,6-1,8 volte più efficiente all'espressione riducente dal reporter promotore NF- κ B nelle cellule HeLa/NF- κ B-Luc rispetto a 63189 (854 nM) e 63170 (953 nM), rispettivamente. Ulteriore sperimentazione con la linea cellulare A549 umana mostrava una IC_{50} per RTA 408 come 1,7 μ M e un valore che è stato normalizzato per la vitalità di 1,7 μ M. La IC_{50} di RTA 408 mostrava attività simile a 63189, 63179, 63171, e 63170 che mostrava valori

di IC_{50} di 1,1, 1,4, 2,0, e 1,0, rispettivamente. Quando questi valori furono normalizzati per la vitalità, il saggio mostrava IC_{50} di 1,2, 1,5, 2,1 e 1,1 μM , rispettivamente. Il cambiamento per NF- κB in funzione della concentrazione di RTA 408 assieme con le curve WST1 e WST1/2 fu riportato in un diagramma ed è mostrato nelle FIGG. 13a & b.

L'effetto di RTA 408 sulla fosforilazione TNF- α -indotta di $I\kappa B\alpha$, uno stadio fondamentale nell'attivazione del percorso NF- κB , fu inoltre valutato nelle cellule HeLa. Le cellule HeLa furono pretrattate con RTA 408 per 6 h, con successivo trattamento con TNF- α (20 ng/ml) per 5 min. I livelli totali e fosforilati di $I\kappa B\alpha$ furono valutati mediante Western blot. Gli anticorpi primari $I\kappa B\alpha$ erano della Santa-Cruz (sc-371), l'anticorpo p $I\kappa B\alpha$ erano della Cell Signaling (9246), l'anticorpo actina era della Millipore (MAB 1501). Gli anticorpi secondari di capra anti-coniglio puro per affinità perossidasi-coniugato (IgG) e di capra anti-topo puro per affinità perossidasi-coniugato erano acquistati dalla Jackson ImmunoResearch. Le macchie delle proteine furono sviluppate usando ECL, ed esposte a una pellicola per raggi X. Consistente con il risultato dal saggio del reporter di luciferasi, RTA 408 inibiva la fosforilazione TNF- α -indotta di $I\kappa B\alpha$ in un modo dose-dipendente (FIG. 14).

RTA 408 ha inoltre dimostrato di inibire altri percorsi di segnalazione pro-infiammatori, come il trasduttore del segnale IL-6-indotto e la fosforilazione dell'attivatore di trascrizione 3 (STAT3) fosforilazione e l'attivatore dell'osteoclastogenesi del re-

ettore del legante NF- κ B (RANKL)-indotto. Nelle cellule HeLa, il pretrattamento con 1 μ M RTA 408 per 6 h inibiva la fosforilazione di STAT3 indotta da IL-6. Gli anticorpi monoclonali STAT3 (124H6) e fosfo-STAT3 (Tyr705) erano della Cell Signaling Technology. IgG di capra anti-coniglio puro per affinità perossidasi-coniugato e IgG di capra anti-topo puro per affinità perossidasi-coniugato erano della Jackson ImmunoResearch. L'osteoclastogenesi è un procedimento di differenziazione multi-stadio che deriva dal legame di RANKL al suo recettore, RANK, su cellule di origine ematopoietica. Ciò porta all'attivazione di NF- κ B e MAPK, che a loro volta aumentano la trascrizione dei geni in bersaglio osteoclasti-specifici, comprendenti la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP). L'effetto di RTA 408 sull'osteoclastogenesi RANKL-indotta fu valutato nella linea cellulare di macrofago di topo RAW264.7. Le cellule RAW 264.7 furono deposte in piastre a 24-pozzetti a una densità di 5.000 cellule/pozzetto. Il giorno successivo, le cellule furono trattate con RTA 408 per 2 h e poi trattate con 50 ng/ml RANKL di topo ricombinante (R&D Systems). Le cellule trattate furono incubate per quattro giorni per consentire la differenziazione negli osteoclasti. La differenziazione negli osteoclasti fu valutata misurando l'attività TRAP. In breve, 90 μ l di terreni di coltura cellulare condizionati furono rimossi da ciascun pozzetto del test e suddivisi in aliquote in pozzetti in triplo (30 μ l/pozzetto) di una piastra a 96-pozzetti. 170 μ l di tampone del saggio TRAP (Kamiya Biomedical) furono poi aggiunti a ciascun pozzetto e la piastra fu incubata a 37°C per 3 ore.

Successivamente all'incubazione, l'assorbanza un 540 nm fu determinata usando uno spettrofotometro per la lettura delle piastre Spectramax M2. RTA 408 inibiva in modo dose-dipendente l'attività TRAP RANKL-indotta e la formazione di osteoclasti, con una IC_{50} di ~5-10 nM.

5. Effetto di RTA 408 sull'Espressione dei Geni Codificanti gli Enzimi di Transaminasi

Gli aumenti delle transaminasi furono osservati in studi di tossicità al giorno 28 con RTA 408 nei ratti e, in una misura molto inferiore, nelle scimmie. Risultati similari sono stati osservati successivamente alla somministrazione orale di un AIM correlato (bardoxolone metile) nei soggetti umani (Pergola, 2011). Un'ipotesi per questo effetto è che AIMS aumentano direttamente o indirettamente l'espressione del gene della transaminasi in assenza di tossicità cellulare. Per valutare se il trattamento con RTA 408 influisce sui livelli di mRNA delle transaminasi, epatociti AML-12 di topo furono trattati con RTA 408 per 18 h, e i livelli di mRNA dei geni codificanti le transaminasi furono misurati usando PCR quantitativa. Cellule AML-12 furono deposte in piastre da coltura a 6-pozzetti a 3×10^5 cellule per pozzetto usando 2 ml di terreno per pozzetto. Il giorno successivo le cellule furono trattate con DMSO (veicolo) o 250 nM e 500 nM di RTA 408 per 18 h a 37°C. Ciascun pozzetto riceveva lo 0,1% di DMSO. furono eseguiti tre esperimenti indipendenti ripetuti. Successivamente al trattamento, i terreni furono rimossi e le cellule furono raccolte usando il tampone RLT (Qiagen). I lisati

furono omogeneizzati usando colonne QIAshredder (Qiagen, Catalogo #79654) e l'RNA fu isolato usando i minikit RNeasy (Qiagen, Catalogo #74104). Per la trascrizione inversa, RNA (1 µg) fu combinato col primer Oligo(dT)12-18 e H₂O in un volume finale di 23,25 µl. La miscela fu riscaldata a 70°C per 10 min e poi collocata su ghiaccio. Una miscela principale contenente 8 µl del primo tampone strand 5X, 2 µl di 1 mg/ml BSA, 2 µl 20 di mM DTT, 4 µl di miscela 5 mM dNTP, 0,25 µl di RNaseOUT™ e 0,5 µl di trascrittasi inversa Superscript® II furono aggiunti alla miscela di RNA e incubati a 42°C per 1 h. La reazione fu inattivata mediante riscaldamento a 70°C per 10 min. La miscela di reazione fu diluita 1:3 con H₂O prima dell'uso in qPCR. 2,5 µl della reazione della trascrizione inversa diluita furono combinati con una serie di primer PCR (0,36 µM di concentrazione finale), 2X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Catalogo #170-8885) e H₂O a un volume finale di 20 µl. Le sequenze per i primer PCR sono come di seguito: *Proteina ribosomale L19 (Rp119)* primer in avanti 5'-TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC-3' (SEQ ID NO: 19), primer inverso 5'-ACAGTCACAGGCTTGCGGATG-3' (SEQ ID NO: 20); *NAD(P)H deidrogenasi, chionone 1 (Nqo1)* primer in avanti 5'-TCGGGCTAGTCCCAGTTAGA-3' (SEQ ID NO: 21), primer inverso 5'-AAAGAGCTGGAGAGCCAACC-3' (SEQ ID NO: 22); *Transaminasi piruvica glutammica 1 (Gpt1 o Alt1)* primer in avanti 5'-CACGGAGCAGGTCTTCAACG-3' (SEQ ID NO: 23), primer inverso 5'-AGAATGGTCATCCGGAAATG-3' (SEQ ID NO: 24); *Transaminasi piruvica glutammica 2 (Gpt2 o Alt2)* primer in avanti 5'-CGCGGTGCAGGTCAACTACT-3' (SEQ ID NO: 25), primer inverso 5'-CCTCATCAGCCAGGAGAAAA-3' (SEQ ID



NO: 26); *Transaminasi di Glutammato oxaloacetato 1* (*Got1* o *Ast1*)
 primer in avanti 5'-GGCTATTCGCTATTTTGTGT-3' (SEQ ID NO: 27), primer
 inverso 5'-GACCAGGTGATTCGTACAAT-3' (SEQ ID NO: 28); *Transaminasi di*
Glutammato oxaloacetato 2 (*Got2* o *Ast2*) primer in avanti 5'-
 5 AGAGTCCTCTTCAGTCATTG-3' (SEQ ID NO: 29), primer inverso 5'-
 ATGATTAGAGCAGATGGTGG-3' (SEQ ID NO: 30). Tutti i primer erano stati
 precedentemente validati per la specificità e l'efficienza di ampli-
 ficazione. I cDNA furono amplificati usando le seguenti condizioni
 di ciclo: (95°C per 3 min, 44 cicli di 95°C per 30 sec, 60°C per 15
 10 sec, 72°C per 15 sec, seguiti da una curva di fusione da 55°C a 95°C
 in incrementi di 0,5°C). L'abbondanza relativa di ciascun gene in
 bersaglio fu determinata usando il metodo comparativo CT ($\Delta\Delta CT$). Le
 reazioni PCR furono eseguite in pozzetti in triplo per ciascun cam-
 pione. Il trattamento con RTA 408 aumentava i livelli di mRNA di
 15 alanina transaminasi 1 (*Alt1* o *Gpt1*) e aspartato transaminasi 1
 (*Ast1* o *Got1*) (FIGG. 15a,c). RTA 408 non aveva effetti sui livelli
 di mRNA della alanina transaminasi 2 (*Alt2* o *Gpt2*) e riduceva i li-
 velli di mRNA di aspartato transaminasi 2 (*Ast2* o *Got2*) (FIGG.
 15b,d). Questi risultati dimostrano che RTA 408, alle concentrazioni
 20 esaminate (250 nM o 500 nM), ha effetto sull'espressione del gene
 della transaminasi *in vitro*.

6. Effetto di RTA 408 sui Livelli degli Intermedi Glicolitici

Studi in topi diabetici hanno dimostrato che bardoxolone metile
 aumenta l'assorbimento muscolo-specifico di glucosio insulina-
 25 stimolato (Saha, 2010). Nei soggetti umani, una percentuale più ele-

vata di pazienti riceventi bardoxolone metile riportava l'esperienza di crampi muscolari in confronto con pazienti che ricevevano placebo (Pergola, 2011). Spasmi muscolari sono stati inoltre riportati da pazienti diabetici a seguito della somministrazione di insulina, ipotizzando una possibile associazione col metabolismo muscolare del glucosio. L'effetto di RTA 408 sul metabolismo glicolitico fu valutato mediante la valutazione dei livelli di lattato e piruvato in cellule di muscolo coltivate di roditore C2C12. Per misurare i livelli di lattato, miotubi differenziati C2C12 furono trattati con 1 μ M o 2 μ M di RTA 408 o insulina per 3 h a 37°C. Il tampone fu rimosso e fu rimosso e risparmiato per la misurazione dei livelli di lattato extracellulare. I frammenti cellulari furono pellettizzati mediante centrifugazione (10 min a 14.000 rpm) prima della misurazione del lattato. Per misurare il lattato intracellulare, le cellule furono sospese in 0,1% Triton X-100 in PBS e lisate mediante taglio con un ago di misura 25. I lisati cellulari furono centrifugati (10 min a 14.000 rpm, 4°C) e il lattato fu misurato nel surnatante. Il lattato intracellulare ed extracellulare fu misurato usando il Lactate Assay Kit (BioVision, Catalogo # K607-100). Similare al trattamento con insulina, il trattamento di miotubi differenziati di C2C12 con 1 μ M o 2 μ M di RTA 408 per 3 h aumentava in modo significativo i livelli di lattato intracellulare ed extracellulare in modo dose-dipendente.

Per misurare i livelli di piruvato, i miotubi differenziati C2C12 furono trattati con 250 o 500 nM di RTA 408 o 100 nM di insu-

lina per 18 h. Successivamente al trattamento col farmaco, i terreni furono rimossi e le cellule furono lavate con PBS. Le cellule furono lisate in Pyruvate Assay Buffer (Pyruvate Assay Kit, BioVision, Catalogo # K609-100). I lisati cellulari furono centrifugati (10 min
5 un 14.000 rpm, 4°C) e i livelli di piruvato furono misurati nel surnatante. Il trattamento di Miotubi differenziati C2C12 con 250 nM o 500 nM di RTA 408 per 18 h inoltre aumentava in modo significativo ($P < 0,0001$, contrassegnato da asterischi) i livelli di piruvato intracellulare in modo dose-dipendente (FIG. 16). Assieme, questi ri-
10 sultati dimostrano che RTA 408, alle concentrazioni esaminate, può influire sugli intermedi glicolitici muscolari *in vitro*; comunque, non è chiaro come i risultati da questo sistema *in vitro* alle concentrazioni esaminate di RTA 408 siano correlati ai potenziali effetti sul metabolismo del glucosio a livelli di dose clinicamente
15 rilevanti nei soggetti umani.

7. Valutazione *In Vitro* dell'Efflusso di RTA 408 mediante MRP-1

Una delle caratteristiche dei candidati del farmaco è il rapporto di efflusso dei composti. Il rapporto di efflusso misura quanto facilmente il composto sia trasportato attraverso una membrana. La
20 proteina MRP-1, o la proteina 1 di resistenza-assistenza multifarmaco, è una delle famiglie di proteine che aiuta a facilitare il trasporto degli anioni organici e di altre piccole molecole attraverso le membrane cellulari. Un rapporto di efflusso più ampio tipicamente significa che il farmaco candidato è più facilmente trasportato fuo-
25 ri dalla membrana ed è meno disponibile a modulare i processi intra-

cellulari. Proteine simili inoltre regolano il trasporto dei composti attraverso la barriera ematoencefalica. Il rapporto di efflusso di MRP-1 per RTA 408 (1,3) fu determinato sperimentalmente per essere approssimativamente di dieci volte minore di 63170 (10) e 63171 (11,2) e più di 40 volte minore di 63179 (56,5) e 63189 (57,1). Senza voler essere legati dalla teoria, RTA 408 può non essere un buon substrato per MRP-1 e/o un candidato per l'efflusso mediato dalla p-glicoproteina alla barriera ematoencefalica. In alcune realizzazioni, RTA 408 può essere usato per il trattamento di disturbi del sistema nervoso centrale (CNS).

C. Effetti Protettivi di RTA 408 in Modelli Animali di Malattia Polmonare

RTA 408 fu esaminato in diversi modelli animali di malattie polmonari per valutare la sua potenziale efficacia nei polmoni. Per tutti gli studi, RTA 408 fu somministrato giornalmente per via orale in olio di sesamo a livelli di dose nell'intervallo da 3 a 150 mg/kg. Nella maggior parte dei casi, RTA 408 fu somministrato iniziando diversi giorni prima dell'induzione della risposta dei danni polmonari.

1. Infiammazione polmonare LPS-indotta nei topi

RTA 408 fu esaminato in due studi di infiammazione polmonare LPS-indotta nei topi. Nel primo studio, con la finalità di essere un traguardo preliminare dose-intervallo, RTA 408 (30, 100, o 150 mg/kg) fu somministrato per via orale una volta al giorno per tre giorni, seguito dalla somministrazione di LPS 1 h dopo la dose fina-

le. Il fluido di lavaggio broncoalveolare (BALF) fu raccolto 20 h dopo la somministrazione di LPS (21 h dopo la dose finale di RTA 408) e valutato per i livelli dei marcatori pro-infiammatori (cioè, IL-6, IL-12p40, TNF- α , e RANTES) usando la tecnologia Luminex™. Il trattamento con RTA 408 portava a una riduzione significativa di IL-12p40 a tutte le dosi e in TNF- α a dosi di 100 e 150 mg/kg (FIG. 17). Nel secondo studio, RTA 408 (10, 30, o 100 mg/kg) fu somministrato giornalmente per sei giorni, seguito dalla somministrazione di LPS 1 h dopo la dose finale. In questo studio, fu osservata una diminuzione significativa nel peso corporeo a un livello di dose di 100 mg/kg iniziando al giorno 3. Riduzioni significative in TNF- α fu osservata a una dose di 10 mg/kg, e riduzioni significative in IL-12p40, TNF- α , e RANTES furono osservate a una dose di 30 mg/kg (FIG. 18a). L'ulteriore valutazione dei polmoni di topi in questo studio rivelava un impegno significativo di geni Nrf2 pertinenti in bersaglio, comprendente l'induzione significativa dell'attività dell'enzima NQO1 (mediante misurazione della velocità di riduzione di 2,6-diclorofenolo-indofenolo) e aumenti nel GSH totale (GSH-Glo™, Promega, Madison, WI) a 10 e 30 mg/kg (FIG. 18b).

2. Fibrosi polmonare bleomicina-indotta

L'effetto di RTA 408 fu inoltre valutato in modelli di fibrosi polmonare bleomicina-indotta nei topi e nei ratti. Nel primo studio preliminare, RTA 408 (10, 30, o 100 mg/kg) fu somministrato a topi giornalmente mediante somministrazione orale con sonda gastrica per 39 giorni, con una somministrazione di bleomicina (intranasale) al

giorno 10. All'ultimo giorno di dosaggio, il tessuto di polmone fu raccolto e fu eseguita l'istologia per valutare la misura dell'infiammazione e della fibrosi interstiziale. In questo modello, non furono osservati effetti statisticamente significativi alle dosi di RTA 408 esaminate (FIGG. 19a & b). Una valutazione addizionale fu eseguita usando un modello di ratto di fibrosi polmonare che era stato caratterizzato a fondo al Lovelace Respiratory Research Institute. In questo studio, ai ratti fu somministrata bleomicina o soluzione salina mediante somministrazione intratracheale al giorno 0. Successivamente alla somministrazione, gli animali ricevevano RTA 408 (3, 10, o 30 mg/kg) giornalmente mediante somministrazione orale con sonda gastrica per 28 giorni. La somministrazione di una dose di 30 mg/kg fu arrestata al giorno 14 a causa dell'eccessiva disidratazione e diarrea negli animali. Per gli animali rimanenti, il fluido di lavaggio broncoalveolare fu raccolto al giorno 28 per la valutazione degli infiltrati pro-infiammatori mediante citometria di flusso e il tessuto di polmone fu analizzato per i livelli di idrossiprolina mediante LC-MS e istopatologia. La somministrazione con bleomicina solfato induceva un sostanziale rilascio di neutrofili e un aumento nel collagene solubile in BALF, come pure un aumento dell'idrossiprolina nel polmone. Il trattamento con 3 e 10 mg/kg di RTA 408 sopprimeva in modo significativo l'infiltrazione cellulare polimorfonucleare (PMN) nei polmoni e inoltre produceva una riduzione significativa (~10%-20%) nella deposizione di idrossiprolina (FIGG. 20a & b).

In modo importante, la valutazione istopatologica rivelava una riduzione significativa nella deposizione di collagene, valutata mediante colorazione tricromica, nei ratti trattati con RTA 408. Mentre gli animali di controllo con bleomicina mostravano principalmente una colorazione moderata, gli animali trattati con 10 mg/kg di RTA 408 avevano prevalentemente una colorazione da minima a blanda (Tabella 2).

Tabella 2: Effetto di RTA 408 sulla deposizione di collagene in polmone di ratto come valutato dall'intensità della colorazione tricromica

Intensità della colorazione ^a	Controllo con bleomicina	RTA 408 (3 mg/kg)	RTA 408 (10 mg/kg)
Minima	0	0	3
Blanda	1	0	4
Moderata	7	7	1
^a I valori rappresentano l'intensità della colorazione negli animali con colorazione tricromica interstiziale nelle aree delle alterazioni polmonari bleomicina-indotte			

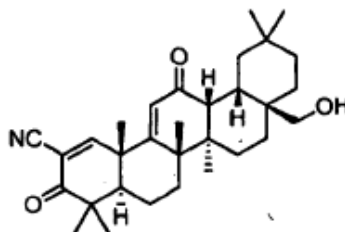
Un'ulteriore valutazione dei polmoni dai ratti in questo studio inoltre rivelava un impegno significativo dei geni in bersaglio Nrf2 pertinenti come valutato mediante il saggio Quantigene Plex 2.0 Multiplex (Affymetrix, Santa Clara, CA) (FIG. 21). RTA 408 aumentava in modo significativo e dose-dipendente l'attività enzimatica di NQO1, Txnrd, Gsr, e Gst nei polmoni dei ratti esposti a bleomicina, dimostrando l'attivazione di Nrf2 mediante RTA 408 in questa impostazio-

Elly Montel

ne della malattia. L'attività dell'enzima NQO1 fu valutata misurando la velocità di riduzione di DCPIP. Le attività enzimatiche di Txnrd, Gst, e Gst furono misurate usando kit commercialmente disponibili dalla Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

5 3. COPD indotto da fumo di sigaretta nei topi

RTA 408 fu inoltre esaminato in un modello di topo di COPD indotto da fumo di sigaretta. I topi ricevevano RTA 408 (3, 10, o 30 mg/kg) giornalmente mediante somministrazione orale con sonda gastrica per due settimane e furono esposti a fumo di sigaretta cinque
10 giorni alla settimana durante il periodo di dosaggio di RTA 408. Alla fine dello studio, il tessuto di polmone e BALF furono raccolti per l'analisi degli infiltrati infiammatorio e delle citochine. In questo esperimento, la somministrazione di dosi multiple di RTA 408 a dosi minori di 3 mg/kg di RTA 408 portava a una soppressione si-
15 gnificativa delle citochine pro-infiammatorie, comprendenti KC (omologo funzionale di topo di IL-8 umana) e TNF- α come misurato usando la tecnologia Luminex™. Un sommario dei risultati da questo studio è presentato nelle FIGG. 22a-e. Un analogo di AIM (63355) fu esaminato nello stesso studio per confronto. 63355 è un composto di formula:



20 L'ulteriore valutazione dei polmoni da topi in questo studio inoltre rivelava un impegno significativo dei geni in bersaglio Nrf2

Philip Monteleone

pertinenti (FIG. 23). L'attività dell'enzima NQO1 nel polmone, misurata a una velocità di riduzione di DCPIP, era significativamente diminuita dall'esposizione al fumo di sigaretta; la somministrazione di RTA 408 recuperava questa perdita. L'attività enzimatica di Txnrd fu inoltre indotta da una dose di 30 mg/kg di RTA 408. In generale l'attività enzimatica di Gsr non fu alterata, e l'attività enzimatica di Gst fu diminuita con il trattamento - entrambi i quali erano probabilmente la conseguenza di una risposta temporale per questi enzimi. Le attività enzimatiche di Txnrd, Gst, e Gsr furono misurate usando kit commercialmente disponibili dalla Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

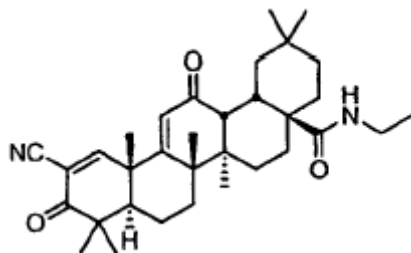
4. Asma Ovalbumina-indotta nei topi

L'attività potenziale di RTA 408 fu inoltre valutata in uno studio pilota in un modello di topo di asma ovalbumina-indotta. I topi furono sensibilizzati con una iniezione IP di ovalbumina e alluminio idrossido al giorno 0 e al giorno 14 e ad essi fu somministrata per via intranasale ovalbumina in soluzione salina ai giorni 14, 25, 26, e 27. I topi ricevevano RTA 408 (3, 10, o 30 mg/kg) giornalmente mediante somministrazione orale con sonda gastrica ai giorni 1-13 e 15-27. Successivamente alla sensibilizzazione e alla somministrazione di ovalbumina, topi trattati col veicolo avevano un aumento significativo nel numero totale dei leucociti in confronto con i topi trattati col controllo positivo (desametasone). Un aumento nel numero di T cellule e cellule B fu inoltre osservato nei topi trattati col veicolo. Il trattamento con RTA 408 a 30 mg/kg riduceva in modo

significativo il numero e la percentuale di cellule B nelle vie aeree. RTA 408 (3 e 30 mg/kg) inoltre riduceva in modo significativo il numero di macrofagi, ma non la percentuale media di macrofagi, determinati nelle vie aeree. Queste osservazioni sono indicative della potenziale efficacia in questo modello.

5. Effetti di RTA 408 sulla Sepsis LPS-indotta nei topi

La sepsi fu indotta al giorno 0 con una iniezione IP di LPS (21 mg/kg), e la sopravvivenza fu seguita fino al giorno 4. RTA 408 (10, 30, o 100 mg/kg) fu somministrato giornalmente mediante somministrazione orale con sonda gastrica dal giorno -2 al giorno 2. Nel gruppo di controllo del veicolo, 60% degli animali sopravviveva fino al giorno 4 (velocità di sopravvivenza maggiore di ~40% prevista in questo modello). Nei gruppi di trattamento con RTA 408, l'80% degli animali nel gruppo di dosaggio di 10 mg/kg e il 90% degli animali nel gruppo di dosaggio di 30 mg/kg sopravvivevano fino al giorno 4 (FIGG. 24c & d). Per il gruppo di dosaggio di 100 mg/kg, il 90% degli animali sopravviveva fino al giorno 4, con soltanto un singolo decesso che avveniva al giorno 4. Anche se questi effetti indotti da RTA 408 sono indicativi della profonda efficacia in questo modello, la percentuale di sopravvivenza relativamente elevata nel gruppo del veicolo di controllo precludeva una differenza statisticamente significativa fra i gruppi di controllo e RTA 408-trattato. Sono inoltre presentati i risultati ottenuti usando il composto RTA 405 (FIGG. 24a & b). RTA 405 è un composto di formula:



6. Effetti di RTA 408 contro la Mucosite Orale Indotta da Radiazioni

L'esposizione a radiazioni acute dirette alla sacca boccale della guancia di criceti produce effetti similari a quelli osservati nella mucosite ulcerativa orale di soggetti umani. Questi effetti comprendono mucositi da moderate a gravi caratterizzate da gravi eritema e vasodilatazione, erosione della mucosa superficiale e formazione di ulcere. Un singolo studio fu eseguito per valutare gli effetti di RTA 408 in questo modello. Al giorno 0, a ciascun criceto fu somministrata una dose acuta di radiazione di 40 Gy diretta alla sacca boccale della guancia sinistra. RTA 408 (10, 30, o 100 mg/kg) fu somministrato per via orale due volte giorno dal giorno -5 al giorno -1, e dal giorno 1 al giorno 15. Iniziando al giorno 6 e continuando fino al giorno 28 a giorni alterni, la mucosite orale fu valutata usando una scala di punteggio standard 6-punti. Dosi sia di 30 sia di 100 mg/kg di RTA 408 provocavano una riduzione significativa nella durata della mucosite ulcerativa (FIG. 25). Ulteriormente, fu inoltre osservata una diminuzione dose-dipendente nella percentuale degli animali con mucosite con punteggio ≥ 3 . Comunque, la somministrazione di RTA 408 a 30 o 100 mg/kg provocava riduzioni significative dose-dipendente nell'aumento di peso nei criceti irradiati.

A causa della perdita di peso di oltre il 20%, due degli otto criceti nel gruppo di dosaggio di 100 mg/kg furono eutanizzati al giorno 2.

7. Effetto di RTA 408 sull'Induzione dei Biomarcatori Nrf2 *in Vivo*

5 Come descritto sopra, un bersaglio molecolare fondamentale di RTA 408 è Nrf2, un regolatore trascrizionale centrale della protezione cellulare antiossidativa. L'attivazione di Nrf2 induce la sovraregolazione di una batteria di geni citoprotettivi, comprendenti NQO1, enzimi implicati nella sintesi di GSH [cioè, ligasi catalitica
10 glutammato-cisteina e subunità modificatrici (Gclc e Gclm)], enzimi implicati nella detossificazione (cioè, glutathione S-transferasi [Gsts]), e i transporter di efflusso [cioè, proteine resistenza alla resistenza multi-farmaco (Mrps)]. L'induzione di questi geni porta a uno sforzo cellulare coordinato per proteggere contro i danni ossi-
15 dativi, evidenziati dalla capacità antiossidativa aumentata, dall'induzione della sintesi del glutathione e dalla coniugazione ed esportazione di molecole potenzialmente dannose dalle cellule. In aggiunta ai punti finali di efficacia e all'espressione del gene in bersaglio Nrf2 valutati nei vari modelli animali descritti sopra, la
20 capacità di RTA 408 a indurre l'espressione dei geni in bersaglio Nrf2 fu inoltre valutata usando i tessuti raccolti da topi, ratti e scimmie sani trattati con RTA 408.

 Come parte degli studi di tossicità di 14 giorni non-GLP di RTA 408 nei topi, ratti e scimmie, i tessuti furono raccolti allo scopo
25 di misurare mRNA e i livelli di attività enzimatica di geni in ber-

saggio Nrf2 selezionati. Per i topi e i ratti, campioni di fegato furono raccolti 4 h dopo la dose finale al giorno 14. Per le scimmie, sangue (per l'isolamento di PBMC), tessuti di fegato, polmone e cervello furono raccolti 24 h dopo la dose finale al giorno 14.

5 L'attività enzimatica per NQO1, Gst, e glutathione riduttasi (Gsr), come descritto sopra, fu misurata negli omogenati di tessuto. I livelli di mRNA furono determinati usando la tecnologia Quantigene Plex 2.0 secondo il protocollo del produttore, che implica un saggio basato sull'ibridizzazione usando perle magnetiche xMAP® Luminex®
10 per la quantificazione diretta dei bersagli di mRNA. In aggiunta, le concentrazioni di RTA 408 furono misurate nel plasma e nei tessuti mediante i metodi LC/MS/MS su uno spettrometro di massa TQD (Waters, Milford, MA).

RTA 408 generalmente aumentava l'espressione di vari geni in
15 bersaglio Nrf2 in modo dose-dipendente a dosi di 10, 30, e 100 mg/kg (FIG. 26, FIG. 27a, FIGG. 28a & b). La sovraregolazione trascrizionale dei geni in bersaglio Nrf2 mediante RTA 408 inoltre portava a un aumento funzionale nella risposta antiossidante, come manifestato dagli aumenti dose-dipendenti nell'attività enzimatica di NQO1, Gst,
20 e Gsr nel fegato di roditore, come pure nel fegato e nel polmone di scimmia (FIGG. 29a & b, FIGG. 30a & b, FIGG. 31a & b). Ulteriormente, nei roditori, l'esposizione del fegato a RTA 408 era correlata con i livelli dell'attività enzimatica di NQO1, il gene in bersaglio prototipico per Nrf2 (FIG. 32b, FIG. 33b). Nelle scimmie, il livello
25 dell'espressione di mRNA in PBMCs sia di NQO1 sia di sulfiredoxin 1

(SRXN1) è correlato con l'esposizione plasmatica a RTA 408 (FIGG. 37a & b). Complessivamente, RTA 408 aumentava i livelli di mRNA e l'attività dei bersagli di Nrf2, e tali aumenti generalmente erano correlati con l'esposizione di tessuto e plasma, suggerendo che i bersagli di Nrf2 possono servire come possibili biomarcatori per l'attivazione di Nrf2 (FIGG. 34a & b) e possono essere utili per valutare l'attività farmacologica di RTA 408 in soggetti umani sani.

D. Farmacologia di Sicurezza

Un programma di farmacologia di sicurezza conforme a GLP fu completato usando RTA 408. Questo includeva studi *in vitro* e *in vivo* (scimmia) sul sistema cardiovascolare, come pure studi sul sistema respiratorio e sul sistema nervoso centrale nei ratti.

1. Valutazione degli Effetti di RTA 408 sui Canali Clonati hERG Espressi in cellule HEK293

Questo studio fu eseguito per valutare gli effetti di RTA 408 sulla corrente rettificante di potassio rapidamente attivata verso l'interno (IKr) condotto dai canali hERG (gene umano correlato a etere-a-go-go-) stabilmente espressi nella linea cellulare di reni embrionici umani (HEK293). Gli effetti di RTA 408 sulla corrente del potassio hERG-correlata furono valutati usando metodi di elettrofisiologia prefissati usando cellule intere. RTA 408 fu determinato per avere un valore IC_{50} di 12,4 μM in un saggio hERG QPatch_Kv11.1. Questo valore era di 2,5-3 volte più elevato dei valori per 63170 (4,9 μM) e 63189 (3,8 μM), rispettivamente. Il valore IC_{50} di RTA 408 era simile al valore di 63171 (15,7 μM).



2. Valutazione Cardiovascolare di RTA 408 in Scimmie Cynomolgus

Un singolo studio fu eseguito per valutare il potenziale effetti cardiovascolari di RTA 408 in scimmie cynomolgus cosce in libero movimento. Alle stesse scimmie cynomolgus, quattro maschi e quattro
5 femmine, furono somministrati il veicolo (olio di sesamo) e RTA 408 a livelli di dose di 10, 30, e 100 mg/kg secondo un disegno dei quadrati latini, con un animale/sesso/ trattamento dosato ogni settimana successivamente per 14 giorni senza un periodo di interruzione fra le somministrazioni, fino a che ogni animale riceveva tutti i
10 trattamenti. Il veicolo e RTA 408 furono somministrati a tutti gli animali mediante somministrazione orale con sonda gastrica a un volume di dosaggio di 5 ml/kg.

Gli animali furono instrumentati con trasmettitori telemetrici per la misurazione della temperatura corporea, la pressione sanguigna, la frequenza cardiaca e la valutazione con elettrocardiogramma
15 (ECG). La temperatura corporea, la pressione del sangue sistolica, diastolica e arteriosa media, la frequenza cardiaca e i parametri ECG (durata di QRS e intervalli RR, PR, e QT) furono controllati continuamente da almeno 2 h pre-dose fino ad almeno 24 h post-dose.
20 I tracciati ECG furono stampati a punti di tempo designati dal controllo cardiovascolare e furono valutati qualitativamente da un cardiologo veterinario certificato da un comitato. Prima della prima somministrazione in studio, gli animali non trattati furono controllati continuamente per i punti finali cardiovascolari per almeno 24
25 h, e questi dati furono usati nel calcolo dell'intervallo QT corret-



to per tutto lo studio.

Le osservazioni per la morbidità, la mortalità, i danni e la disponibilità di cibo e acqua furono eseguiti almeno due volte al giorno per tutti gli animali. Le osservazioni cliniche furono eseguite pre-dose, approssimativamente 4 h post-dose, e successivamente al completamento del periodo di monitoraggio cardiovascolare. I pesi corporei furono misurati e registrati il giorno prima a ciascuna somministrazione di trattamento.

RTA 408 a livelli di dose di 10, 30, e 100 mg/kg non produceva mortalità, segni clinici avversi, o portava a variazioni significative nel peso corporeo, nella temperatura corporea, nella pressione sanguigna, o nei parametri ECG qualitativi o quantitativi (intervalli PR, RR, QRS, QT) (FIG. 35; Tabella 45). Nel gruppo di dosaggio di 100 mg/kg, fu osservato un piccolo (1,6% in media) ma statisticamente significativo aumento nell'intervallo QT corretto; comunque, i dati dei singoli animali non mostravano aumenti consistenti in QTc che dovrebbero indicare un effetto correlato all'articolo del test. Di conseguenza, a causa della piccola grandezza della variazione e della mancanza di una risposta consistente nei singoli animali, questi piccoli aumenti in QTc non furono considerati per essere correlati al trattamento con RTA 408. Pertanto, la somministrazione orale di RTA 408 non produceva effetti sulla funzione cardiovascolare nelle scimmie cynomolgus a dosi fino a e comprendenti 100 mg/kg.

3. Valutazione neurocomportamentale di RTA 408 nei Ratti

La potenziale tossicità neurocomportamentale acuta di RTA 408 fu

valutata nei ratti. Tre gruppi di trattamento di 10 ratti maschio e 10 ratti femmina CD® [Cr1:CD® (SD)] ricevevano RTA 408 a livelli di dosaggio di 3, 10, o 30 mg/kg. Un gruppo addizionale di 10 animali/sex serviva come controllo e riceveva il veicolo (olio di sesamo). Il veicolo o RTA 408 fu somministrato a tutti i gruppi mediante somministrazione orale con sonda gastrica una volta al giorno 1 a un volume di dose di 10 ml/kg.

Le osservazioni per morbidità, mortalità, danni e disponibilità di cibo e acqua furono eseguite due volte al giorno per tutti gli animali. Le osservazioni per i segni clinici furono eseguite prima del dosaggio al giorno 1 e seguendo la valutazione di ogni batteria osservazionale funzionale (FOB). Le valutazioni FOB furono eseguite pre-dose (Giorno -1) e ad approssimativamente 4 e 24 h post-dose. I pesi corporei furono misurati e registrati pre-dose al giorno 1.

RTA 408 a dosi di 3, 10, e 30 mg/kg non produceva mortalità, osservazioni cliniche negative o effetti su una qualsiasi delle misure neurocomportamentali esaminate. Leggere diminuzioni nel peso corporeo furono osservate approssimativamente 24 h dopo il dosaggio nel gruppo di 30 mg/kg che può essere potenzialmente correlato all'articolo del test. Rispetto ai punti finali neurocomportamentali di base valutati in questo studio, RTA 408 non produce effetti negativi nei ratti a dosi fino a e comprendenti 30 mg/kg.

4. Valutazione polmonare di RTA 408 nei Ratti

Il potenziale effetto di RTA 408 sulla funzione polmonare fu valutato nei ratti. Tre gruppi di trattamento di otto ratti maschio e

otto ratti femmina CD® [Crl:CD® (SD)] ricevevano RTA 408 a livelli di dose di 3, 10, o 30 mg/kg. Un gruppo addizionale di 8 animali/sex serviva come controllo e riceveva il veicolo (olio di sesamo). Il veicolo o RTA 408 fu somministrato a tutti i gruppi mediante somministrazione orale con sonda gastrica una volta al giorno 1 a un volume di dosaggio di 10 ml/kg.

Le osservazioni per mortalità, morbidità, danni e disponibilità di cibo e acqua furono eseguite due volte giornalmente per tutti gli animali. Le osservazioni cliniche furono eseguite prima del dosaggio, approssimativamente 4 h post-dose, e successivamente al completamento del periodo di controllo polmonare di 8 h. I pesi corporei furono misurati e registrati al giorno della somministrazione di RTA 408. La funzione polmonare (velocità respiratoria, volume tidale e volume minuto) fu controllata per almeno 1 h prima del dosaggio per stabilire una linea di base e per almeno 8 h post-dose.

RTA 408 a dosi di 3, 10, e 30 mg/kg non produceva mortalità, osservazioni cliniche negative o effetti su uno qualsiasi dei parametri polmonari valutati. Pertanto, rispetto ai punti finali polmonari di base valutati in questo studio, RTA 408 non produceva un qualsiasi effetto negativo nei ratti a dosi fino a e comprendenti 30 mg/kg.

E. Panoramica Non-clinica

1. Farmacocinetiche

RTA 408 è stato studiato sia *in vitro* sia *in vivo* per valutare la sua PK e le proprietà metaboliche. Gli studi *in vitro* sono stati eseguiti per determinare il legame della proteina plasmatica di RTA

408 e la ripartizione sangue/plasma, l'inibizione e l'induzione del citocromo P450 (CYP450) e per identificare i metaboliti formati dai microsomi epatici di topi, ratti, scimmie e soggetti umani. I dati pertinenti all'assorbimento e alla distribuzione *in vivo* successivamente alla somministrazione ripetuta di RTA 408 sono stati ottenuti principalmente attraverso il controllo dei livelli di farmaco nel plasma e nei tessuti selezionati da studi tossicologici. Metodi bioanalitici sensibili e selettivi basati sulla cromatografia liquida-spettrometria di massa sono stati usati per misurare le concentrazioni di RTA 408 in plasma, sangue, e tessuti con appropriate accuratezza e precisione. Le misurazioni furono eseguite su spettrometri di massa TQD e QToF (Waters).

a. Assorbimento

L'assorbimento e il comportamento farmacocinetico sistemico di RTA 408 furono studiati in topi, ratti e scimmie successivamente alla somministrazione orale singola e ripetuta (giornaliera). Successivamente alla somministrazione orale di una formulazione in sospensione a dosi da 10 a 100 mg/kg, le concentrazioni massime furono osservate in da 1 a 2 h nei topi, e in da 1 a 24 h nei ratti e nelle scimmie. L'esposizione sistemica a RTA 408 tendeva ad essere più elevata nei ratti, con livelli inferiori osservati nei topi e nelle scimmie. Le stime dell'emivita terminale apparente di RTA 408 osservata dopo la somministrazione orale erano generalmente nell'intervallo da 6- a 26-h, anche se una fase di assorbimento apparente prolungata in alcuni casi precludeva il calcolo di una stima definitiva

dell'emivita.

L'esposizione sistemica a RTA 408 era generalmente simile in maschi e femmine. L'esposizione a RTA 408 successivamente alla somministrazione orale giornaliera ripetuta tendeva ad essere leggermente più elevata (≤ 2 -volte) dell'esposizione osservata dopo una
5 singola dose. La somministrazione di RTA 408 in un intervallo di dosaggio da 3 a 100 mg/kg in una formulazione in sospensione generalmente portava ad aumenti proporzionali della dose nell'esposizione sistemica. Comunque, la somministrazione di dosi più elevate (da 100
10 a 800 mg/kg nelle scimmie; da 500 a 2000 mg/kg nei ratti) non portava ad aumenti simili nell'esposizione, suggerendo la saturazione dell'assorbimento a dosi al di sopra di 100 mg/kg. Successivamente alla somministrazione orale di una formulazione in capsule non ottimizzata (sciolta-riempita) di RTA 408 (3 mg/kg) alle scimmie, l'e-
15 sposizione sistemica dose-normalizzata tendeva ad essere alquanto inferiore rispetto a quella osservata con la formulazione in sospensione.

L'assorbimento e il comportamento farmacocinetico sistemico di RTA 408 furono studiati nei ratti usando una somministrazione topica
20 singola e ripetuta. La somministrazione di RTA 408 in un intervallo dallo 0,01% al 3% mostrava concentrazioni plasmatiche inferiori rispetto a dosaggi orali simili. L'esposizione sistemica a RTA 408 generalmente aumentava in modo dose-dipendente. La somministrazione topica fu formulata come sospensione in olio di sesamo.

25 Usando conigli, l'assorbimento oculare e il comportamento farma-



cocinetico sistemico di RTA 408 fu valutato. RTA 408 fu somministrato per via topica nell'occhio una volta al giorno per cinque giorni. La somministrazione oculare mostrata una concentrazione plasmatica inferiore di RTA 408 rispetto a quando RTA 408 è somministrato per via orale (FIG. 36). La quantità di RTA 408 nel plasma anche dopo cinque giorni consecutivi mostrava soltanto una piccola variazione in confronto alla concentrazione dopo la prima dose rispetto a quando RTA 408 era somministrato per via orale, dove le concentrazioni plasmatiche erano quasi 100 volte più elevate (FIG. 36).

10 **b. Distribuzione**

Le proteine plasmatiche di legame di RTA 408 furono valutate nel plasma di topo, ratto, coniglio, cane, maialino nano, scimmia e umano di RTA 408 a concentrazioni di 10-2000 ng/ml usando la metodologia dell'ultracentrifugazione. RTA 408 fu legato saldamente alle proteine plasmatiche. Le proteine plasmatiche che si legano a specie non cliniche variavano dal 93% (topo) a >99% (maialino nano), con legame del 95% nelle specie tossicologiche (ratto e scimmia) e 97% nei soggetti umani. Non c'era evidenza di un legame delle proteine dipendente dalla concentrazione in qualsiasi specie esaminata. I risultati dagli esperimenti di ripartizione sangue-a-plasma indicano che RTA 408 tendeva a distribuirsi principalmente nella frazione plasmatica del sangue in modo lineare, con rapporti sangue:plasma <1,0 per tutte le specie e a tutte le concentrazioni esaminate.

La distribuzione di RTA 408 nei tessuti è stata studiata dopo somministrazione orale a topi, ratti e scimmie. Negli studi di tos-



sicità non-GLP di 14 giorni, i tessuti selezionati (fegato, polmone, e cervello) furono raccolti a un singolo punto temporale (4 h per ratto e topo; 24 h per la scimmia) dopo che la dose finale dello studio fu somministrata e furono analizzati per il contenuto di RTA 408 usando LC/MS/MS. RTA 408 si distribuisce facilmente in polmone, fegato, e cervello. Nel polmone, le concentrazioni di RTA 408 a 4 h nei topi e nei ratti erano simili a o leggermente più elevate (<2-volte) rispetto alle concentrazioni nel plasma, mentre a 24 h nelle scimmie, le concentrazioni di RTA 408 nel polmone erano da 6- a 16-volte più elevate rispetto alle concentrazioni plasmatiche. Un modello simile fu osservato per il cervello. Al contrario, le concentrazioni di RTA 408 nel fegato erano da 5- a 17-volte più elevate che nel plasma per i topi e i ratti a 4 h, e da 2- a 5-volte più elevate che nel plasma a 24 h nelle scimmie.

Gli effetti farmacologici di RTA 408 nei tessuti furono valutati in topi, ratti e scimmie, controllando l'induzione dei geni in bersaglio di Nrf2 negli stessi tessuti raccolti per l'esposizione al farmaco dallo studio di tossicità di 14 giorni. L'induzione dei geni in bersaglio di Nrf2 mediante RTA 408 portava a un aumento nella risposta antiossidante come manifestato dall'aumento dose-dipendente in NQO1, glutatione S-transferasi (Gst), e nell'attività enzimatica glutatione riduttasi (Gsr) nei tessuti esaminati. Le attività enzimatiche furono misurate come descritte sopra. Ulteriormente, nei roditori, il contenuto nel fegato di RTA 408 è correlato con il livello dell'attività enzimatica per NQO1, il gene in bersaglio prototi-

pico per Nrf2. Nelle scimmie, il livello dell'espressione di mRNA nelle cellule mononucleari di sangue periferico (PBMCs) sia per NQO1 sia per sulfiredoxin 1 (SRXN1) è correlato con l'esposizione plasmatica di RTA 408 (FIGG. 37a & b). Complessivamente, RTA 408 induceva i biomarcatori di Nrf2 in roditori e scimmie, e tali induzioni generalmente sono ben correlate con l'esposizione dei tessuti e del plasma a RTA 408.

Quando RTA 408 fu somministrato a conigli mediante somministrazione topica oculare, le concentrazioni più elevate del composto si trovavano nella cornea, nella retina, o nell'iride, mentre l'umore vitreo, l'umore acqueo e il plasma mostravano concentrazioni significativamente inferiori di RTA 408 (FIG. 38).

c. Metabolismo

Il metabolismo di RTA 408 è stato studiato dopo incubazione *in vitro* di RTA 408 per 60 min con microsomi di fegato da topi, ratti, scimmie e soggetti umani in presenza di un sistema nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH)-rigenerante e di una miscela di reazione di uridina difosfato glucuronosiltransferasi (UGT). Il turnover estensivo di RTA 408 fu osservato con microsomi di primati, con <10% di molecole progenitrici che rimanevano alla fine dei 60 min di incubazione nei microsomi sia di scimmia sia umani. Al contrario, il grado del metabolismo era inferiore nei microsomi di roditore, con >65% della molecola progenitrice che rimaneva alla fine dell'incubazione. La mancanza di standard autentici disponibili per i vari metaboliti potenziali di RTA 408 precludeva la valutazione



quantitativa dei metaboliti osservati. Da una prospettiva qualitativa, un modello simile di metaboliti di RTA 408 fu osservato attraverso le specie, e includevano picchi con masse consistenti con la riduzione e l'idrossilazione di RTA 408 come pure la glucuronidazione di RTA 408 o dei suoi metaboliti di riduzione/idrossilazione. Non furono osservati singoli metaboliti umani, con tutti i picchi nelle incubazioni di microsomi umani che erano anche osservati in una o più delle specie precliniche. In particolare, in base ai dati dei microsomi *in vitro*, tutti i metaboliti umani erano presenti nelle specie di tossicità di ratto o scimmia, del roditore e non-roditore selezionato.

d. Interazioni Farmacocinetiche del Farmaco

Il potenziale di RTA 408 a inibire il metabolismo citocromo P450 (CYP450)-mediato fu valutato usando microsomi di fegato umano raccolti e substrati standard per gli enzimi CYP450 specifici. RTA 408 inibiva direttamente CYP2C8 e CYP3A4/5 con valori K_i di approssimativamente 0,5 μM per ciascun enzima. Non fu osservata alcuna inibizione significativa per gli altri enzimi esaminati (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, o CYP2D6), con un'inibizione <50% alla concentrazione più elevata esaminata (3 μM). In aggiunta, c'era una piccola o nessuna evidenza di inibizione metabolismo-dipendente di uno qualsiasi degli enzimi esaminati. Studi futuri di ricerca del potenziale per le interazioni farmaco-farmaco CYP3A4/5-mediate possono essere garantiti sulla base di questi dati, e delle concentrazioni potenzialmente elevate che possono essere ottenute localmente nel tratto



gastrointestinale (GI) dopo somministrazione orale.

Il potenziale di RTA 408 a indurre l'espressione dell'enzima CYP450 fu valutato usando epatociti umani coltivati. Nelle condizioni dove gli induttori prototipici provocavano gli aumenti previsti nell'attività di CYP, RTA 408 (fino a 3 μ M non era un induttore dell'attività enzimatica di CYP1A2, CYP2B6, o CYP3A4 negli epatociti umani coltivati). L'attività enzimatica fu misurata controllando la conversione del substrato di fenacetina, bupropione e testosterone per CYP1A2, CYP2B6, e CYP3A4, rispettivamente, nei microsomi isolati.

F. Effetti di RTA 408 sulla Dermatite da Radiazione Acuta

Sono stati esaminati gli effetti di RTA 408 come misura preventiva topica o orale per la dermatite da radiazione acuta. Usando topi maschi BALB/c, una dose di 30 Gy di radiazione fu somministrata al giorno 0 (Tabella 3). Il veicolo olio di sesamo o RTA 408 fu somministrato ai ratti ai giorni da -5 a -1 e ai giorni da 1 a 30. RTA 408 fu somministrato sia per via orale in 3, 10, e 30 mg/kg in olio di sesamo sia per via topica in una composizione percentuale di 0,01%, 0,1%, e 1% in olio di sesamo. La dermatite fu valutata alla cieca ogni due giorni dal giorno 4 al giorno 30. Al giorno 12, fu osservato il picco tipico della dermatite e 4 topi furono sacrificati 4 ore dopo la somministrazione della dose. I topi rimanenti furono sacrificati al giorno 30 a 4 h post-dose. Il plasma fu raccolto ai giorni 12 e 30 come pure campioni di pelle irradiata per mRNA e l'esame istologico.



**Tabella 3: Disegno dello Studio per il Modello della Dermatite da
Radiazione Acuta**

Gruppo	Numero di animali	Radiazione (Giorno 0)	Trattamento	Programma di trattamento
1	9 maschi	---	Non trattato	---
2	10 maschi	30 Gy	Non trattato	---
3	14 maschi	30 Gy	Veicolo di controllo (olio di sesamo)	Giorno da -5 a -1 & Giorno da 1 a 30
4	14 maschi	30 Gy	RTA 408-0,01% o 3 mg/kg	Giorno da -5 a -1 & Giorno da 1 a 30
5	14 maschi	30 Gy	RTA 408-0,1% o 10 mg/kg	Giorno da -5 a -1 & Giorno da 1 a 30
6	14 maschi	30 Gy	RTA 408-1% o 30 mg/kg	Giorno da -5 a -1 & Giorno da 1 a 30

Nei gruppi in esame dove i topi furono trattati con RTA 408, l'incidenza della dermatite appariva leggermente diminuita nella gravità quando RTA 408 fu somministrato per somministrazione orale o topica (FIGG. 39-42). Ulteriormente, le curve che tracciano i punteggi clinici medi della dermatite per i gruppi del test in funzione del tempo mostrano alcune variazioni con la somministrazione di RTA 408 in forma sia orale sia topica dai gruppi del test non trattati (FIGG. 43-45) particolarmente nel caso dove RTA 408 fu somministrato

attraverso somministrazione orale. Inoltre, come si può vedere nelle
Tabelle 4 e 5 che seguono, la percentuale di topi affetti da derma-
tite con un punteggio clinico al di sopra di 3 era significativamen-
te inferiore per i topi trattati con RTA 408 attraverso una sommini-
5 strazione orale, mentre la percentuale di topi affetti da dermatite
con un punteggio clinico al di sopra di 2 era leggermente inferiore
per i gruppi del test a cui fu somministrata una somministrazione
topica di RTA 408.

Tabella 4: Percentuale di topi per gruppo di test che hanno un punteggio superiore a 2 nel loro esame clinico della dermatite e a cui è fornito un trattamento topico contenente RTA 408

	Giorno 12	Giorno 14	Giorno 16	Giorno 18	Giorno 20	Giorno 22	Giorno 24	Giorno 26	Giorno 28	Giorno 30	% di animali- giorni >=2	% di animali- giorni >=3
1 nessuna radia- zione, non trat- tato	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 irradiato, non trattato	0,0	50,0	83,3	83,3	83,3	100,0	66,7	50,0	50,0	50,0	35,6	0,0
3 irradiato, olio di sesamo	21,4	45,0	60,0	50,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,6	0,0
4 irradiato, RTA 408-0,01%	0,0	0,0	20,0	50,0	10,0	40,0	40,0	40,0	20,0	10,0	14,4	0,0
5 irradiato, RTA 408-0,1%	7,1	10,0	20,0	80,0	60,0	40,0	30,0	10,0	0,0	0,0	16,3	0,0
6 irradiato, RTA 408-RTA-1,0%	10,7	20,0	10,0	70,0	30,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,7	0,0

Philippe Montel

Tabella 5: percentuale di topi per gruppo di test che hanno un punteggio superiore a 3 nel loro esame clinico della dermatite e a cui è fornito un trattamento orale contenente RTA 408

		Giorno 16	Giorno 18	Giorno 20	Giorno 22	Giorno 24	Giorno 26	Giorno 28	% di animali- giorni >=2	% di animali- giorni >=3
1	nessuna radiazione, non trattato	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
2	irradiato, non trat- tato	20	40	20	20	20	20	20	39,0	8,8
3	irradiato, olio di sesamo	35	50	40	30	20	0	0	45,6	10,9
4	irradiato, RTA 408-3 mg/kg	10	10	0	0	0	0	0	32,5	1,3
5	irradiato, RTA 408- 10 mg/kg	10	25	30	0	0	0	0	33,8	4,1
6	irradiato, RTA 408- 30 mg/kg	10	20	10	0	0	0	0	28,8	2,5

Dr. M. Montebelli

G. Effetti di RTA 408 sulla Dermatite da Radiazione Frazionata

Utilizzando RTA 408 attraverso somministrazione topica, furono misurati gli effetti di RTA 408 verso il miglioramento degli effetti della dermatite da radiazione frazionata. Usando topi Balb/c, RTA 408 in una preparazione topica fu somministrato ai topi giornalmente dal giorno -5 al giorno 30 in tre dosi varianti dallo 0,01% all'1%. I topi furono irradiati ai giorni 0-2 e 5-7 con sei dosi di 10-Gy al giorno. I punteggi clinici della dermatite per i topi furono valutati alla cieca ogni due giorni dal giorno 4 fino alla fine dello studio. In FIG. 46, il grafico mostra la variazione nel punteggio clinico medio per ciascun gruppo ed era riportato in diagramma in funzione del tempo. Il grafico mostra un miglioramento statisticamente significativo nei punteggi per i topi trattati dallo 0,1% all'1,0% di formulazione topica di RTA 408. Studi e parametri di trattamento si possono trovare nella Tabella 6.

Tabella 6: Condizioni di Studio per la Dermatite Indotta da Radiazione Frazionata

Gruppo	Numero di Animali	Radiazione (Giorni 0-2, 5-7)	Trattamento	Programma di Trattamento
1	9 maschi	---	Non trattato	---
2	14 maschi	6x 10 Gy	Non trattato	---
3	18 maschi	6x 10 Gy	Veicolo di controllo (olio di sesamo)	QD Giorni da -5 a 30

4	18 maschi	6x 10 Gy	RTA 408-0,01%	QD Giorni da - 5 a 30
5	18 maschi	6x 10 Gy	RTA 408-0,1 %	QD Giorni da - 5 a 30
6	18 maschi	6x 10 Gy	RTA 408-1%	QD Giorni da - 5 a 30

Analizzando i punteggi clinici medi che sono mostrati nella FIG. 46, fu eseguita un'analisi dell'area sotto la curva (AUC), che forniva la gravità della dermatite rispetto alla durata della dermatite. Questa analisi AUC mostrava il confronto diretto fra i gruppi differenti di topi e l'effetto delle differenti composizioni percentuali RTA 408 (FIG. 47 e Tabella 7). La somministrazione delle formulazioni topiche di RTA 408 riducevano le lesioni di Grado 2 e di Grado 3 da 60% e del 33% quando i topi furono esposti soltanto al veicolo al 21% e al 6% con RTA 408 a una concentrazione dell'1%, rispettivamente. L'altra composizione di RTA mostrava una certa attività ma non era significativa come quella mostrata dalla formulazione all'1%.

Tabella 7: Percentuale del Punteggio della Dermatite per Ciascun

Gruppo di Trattamento

Gruppo	% Giorni ≥ 2	% Giorni ≥ 3
No radiazione, No Tx	0 %	0 %
Radiazione, No Tx	66%	31%
Radiazione, Olio di sesamo	60%	33%

Radiazione, RTA 408 (0,01%)	54%	29%
Radiazione, RTA 408 (0,1%)	40%	13%
Radiazione, RTA 408(1%)	21%	6%

H. Effetti Sinergici di RTA 408 e di Agenti Terapeutici del Cancro sulla Crescita Tumorale

Uno studio degli effetti di RTA 408 usato in combinazione con agente chemioterapici tradizionali fu eseguito per determinare l'efficacia del potenziale trattamento. Studi *in vitro* furono eseguiti per determinare gli effetti di RTA 408 su due differenti linee cellulari del cancro della prostata, LNCaP e DU-145. Come si può vedere nella FIG. 48a, il trattamento delle linee cellulari di cancro della prostata (LNCaP) *in vitro* con 5-fluorouracile mostra un aumento statisticamente significativo nella citotossicità quando combinato con RTA 408 a dosi da varianti da 0,125 a 0,5 μM . Usando la linea cellulare di prostata DU-145 e docetaxel, RTA 408 amplificava la citotossicità dell'agente chemioterapico in modo statisticamente significativo per il dosaggio di RTA 408 da 0,125 a 0,75 μM come mostrato nella FIG. 48b. Questa evidenza supporta il concetto che RTA 408 può agire sinergisticamente con gli agenti terapeutici del cancro e può essere usato in alcune realizzazioni per fornire una maggiore efficacia di trattamento di pazienti con cancro.

Dopo i risultati di successo del saggio *in vitro*, fu eseguito un saggio pilota *in vivo* usando LNCaP/C4-2B e DU145 di cancro umano

della prostata preparati per esprimere la luciferasi di lucciola (successivamente descritti come C4-2B-Luc e DU145- Luc, rispettivamente). È da osservare che entrambe queste linee cellulari si sviluppano in modo androgeno-indipendente. Le cellule furono coltivate in RPMI 1640 arricchito col 10% di FBS. Le cellule furono raccolte usando TrypLE Express (Invitrogen) e lavate in PBS e conteggiate. Le cellule furono ricostituite in PBS per arrivare a una concentrazione finale di 3×10^6 cellule per 30 μ l (se non stabilito in modo diverso) e suddivise in aliquote in provette separate. Il fattore di crescita ridotto Matrigel (BD Bioscience) fu scongelato durante la notte a +4°C e trasferito in provette in aliquote di 30 μ l. Le soluzioni cellula/Matrigel furono trasferite nel vivaio e miscelate appena prima dell'iniezione in un rapporto 1:1. Ciascun topo (n = 1 per gruppo per un totale di tre animali) riceveva una singola iniezione sottocutanea di cellule tumorali. I tumori furono pre-stabiliti per 4 settimane. Poi, un animale fu trattato con RTA 408 (17,5 mg/kg, i.p.) una volta al giorno per 3 giorni (Giorni da -3 a -1). Il giorno successivo(giorno 0), gli animali trattati con RTA 408 e un altro animale furono trattati con una singola dose di 18 Gy IR, localizzata nella regione pelvica dove i tumori furono impiantati. Il topo che fu pre-trattato con RTA 408 riceveva tre dosi aggiuntive di RTA 408 (17,5 mg/kg, i.p.), ogni due giorni, nella settimana successiva. Il terzo animale non riceveva trattamento e serviva come controllo positivo. La progressione tumorale fu controllata settimanalmente mediante imaging dal vivo. Per determinare le cellule tumorali



esprimenti la luciferasi, i topi furono iniettati IP con D-Luciferina 5 min prima dell'imaging secondo il protocollo del produttore (Caliper LifeScience). Prima dell'imaging i topi furono anestetizzati mediante inalazione di isoflurano inalazione e visualizzati sul sistema IVIS Lumina XR system (Caliper LifeScience). Per la standardizzazione, fu determinato il tempo di esposizione minimo necessario per visualizzare il tumore di controllo e tutti gli animali furono visualizzati in queste condizioni. Al giorno 7, nessuna riduzione apparente nella dimensione del tumore era visibile negli animali trattati IR in confronto al controllo, mentre gli animali che ricevevano sia RTA 408 sia IR mostravano un'immagine del tumore più piccola. Al giorno 14 e al giorno 21, gli animali di controllo mostravano uno sviluppo e una crescita tumorali continuati, mentre gli animali trattati con radiazioni ionizzanti mostravano alcuni miglioramenti, in particolare al giorno 21. D'altro lato, gli animali trattati con RTA 408 e radiazioni ionizzanti non mostravano progressione dal giorno 7 al giorno 14 e non avevano un tumore visibile al giorno 21. La progressione del tumore per settimana si può vedere in FIG. 49 I dati sia in vitro sia in vivo mostrano che RTA 408 appare come complemento all'attività di differenti agenti terapeutici del cancro aumentando così l'efficacia dell'agente.

I. Effetti di RTA 408 su un Modello di Infiammazione Oculare

Uno studio degli effetti di RTA 408 sull'infiammazione oculare fu eseguito usando conigli New Zealand del ceppo albino. I conigli furono suddivisi in 5 gruppi di 12 conigli a cui furono somministra-

te tre differenti concentrazioni di RTA 408 (0,01%, 0,1%, e 1%), collirio Voltarene® allo 0,1% e il veicolo (olio di sesamo). A ciascun coniglio furono somministrate tre instillazioni entro 60 min prima dell'induzione della paracentesi e due instillazioni entro 30 min dopo l'induzione della paracentesi. Ogni instillazione era di 50 µl e fu somministrata in entrambi gli occhi. L'umore acqueo per 6 animali per punto temporale fu raccolto 30 min e nuovamente 2 h dopo l'induzione della paracentesi. La quantità di infiammazione fu determinata mediante concentrazione nelle proteine nell'umore acqueo.

10 Come rappresentato nella FIG. 50, RTA 408 mostrava una riduzione nella proteina dell'umore acqueo simile a quella della concentrazione più elevata di uno qualsiasi degli altri composti di riferimento (MaxiDex o mapracorat) a soltanto lo 0,01% di RTA 408 nella formulazione. Gli effetti di aumento della concentrazione di RTA 408

15 sembravano trascurabili dal momento che tutte le concentrazioni di RTA 408 sembravano mostrare effetti relativamente simili nell'errore nella riduzione della concentrazione delle proteine nell'umore acqueo.

J. Schermo polimorfico

20 Fu eseguito uno studio di preformulazione e di polimorfismo per il composto 63415. Come parte di questo studio, fu eseguito un programma di polimorfismo preliminare allo scopo di identificare le forme anidre massimamente stabili a temperatura ambiente e gli eventuali idrati con una probabilità ragionevolmente elevata. Fu eseguito

25 to un totale di 30 esperimenti di cristallizzazione, comprendenti



gli equilibri della fase, esperimenti di essiccamento e altre tecniche. Tutti i solidi ottenuti furono caratterizzati mediante spettroscopia da FT-Raman. Tutte le nuove forme furono caratterizzate mediante PXRD e TG-FTIR, e facoltativamente mediante DSC e DVS.

5 In aggiunta, fu preparata e caratterizzata la forma amorfa. Diversi esperimenti usando differenti tecniche e approcci furono eseguiti per preparare la forma amorfa. La forma amorfa fu caratterizzata mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, DSC, DVS, e titolazione Karl-Fischer. La stabilità della forma amorfa fu esaminata
10 in condizioni di umidità e temperatura elevate nel corso di quattro settimane.

1. Materiale di Partenza e Nomenclatura

Due lotti di 63415 furono usati come materiali di partenza (Tabella 8). 63415 è inoltre descritto come PP415 in questa descrizione. Tutti i campioni ricevuti o generati durante questo studio riceveva un particolare codice di identificazione della forma PP415-Px, dove Px si riferisce al numero di campione/esperimento (x = 1, 2, ..., n).

Tabella 8: Materiali di partenza

20

Campione	Materiale	Quantità	Ricevuto
PP415-PI	63415, lotto #: 014,1-66-1; MW = 554,7 g/mole, $C_{33}H_{44}F_2N_2O_3$	5,0 g	25 marzo 2011
PP415-P40	63415, lotto #: 2083-69-DC; MW = 554,7 g/mole, $C_{33}H_{44}F_2N_2O_3$	5,0 g	27 maggio 2011

2. Composto 63415, lotto # 0414-66-1 (PP415-P1): Forma Amorfa



Il materiale di partenza 63415; lotto # 0414-66-1, fu caratterizzato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, TGFTIR, titolazione Karl-Fisher, ^1H -NMR, DSC, DVS, e misurazioni approssimate della solubilità. I risultati sono compendati nella Tabella 9.

5 **Tabella 9: Caratterizzazione del materiale di partenza 63415 (PP415-P1)**

Metodo	Risultati
FT-Raman	sarà usato come riferimento
PXRD	nessun modello di picco distinto, il materiale è amorfo
TG-FTIR	$\sim 0,9\%$ in peso ($\sim 0,1$ eq.) EtOH con tracce di H_2O da 25°C a 200°C , decomposizione a $T > 290^\circ\text{C}$
Karl-Fischer	$0,5\%$ in peso di H_2O
^1H -NMR	in accordo con la struttura, $\sim 0,08$ eq. EtOH
DSC	prima scansione di riscaldamento: transizione vetrosa $T_g = 152,7^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,72 \text{ J/g}^\circ\text{C}$); seconda scansione di riscaldamento: transizione vetrosa $T_g = 149,7^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,45 \text{ J/g}^\circ\text{C}$)
DVS	leggermente igroscopico; $\Delta m = +0,4\%$ (50% – 85% r.h.); FT-Raman e PXRD invariati

Lo spettro FT-Raman (FIG. 58) sarà usato come spettro di riferimento per il materiale di partenza. PXRD (FIG. 59) non mostra un modello di picco distinto. L'ampio alone a ~ 10 - $20^\circ 2\theta$ è caratteristico per i materiali amorfi.

Il termogramma TG-FTIR (FIG. 60) mostra la perdita graduale di $\sim 0,9\%$ in peso di EtOH (cioè, $\sim 0,1$ eq.) con tracce di H_2O fra 25 e

200°C. La decomposizione inizia a $T > 290^\circ\text{C}$.

Un contenuto di acqua dello 0,5% in peso fu determinato mediante titolazione Karl-Fisher.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (FIG. 61) è in accordo con la struttura e mostra ~0.08 eq. di EtOH, in accordo col termogramma TG-FTIR.

Il termogramma DSC (FIG. 62) mostra in una prima scansione di riscaldamento una transizione vetrosa del materiale amorfo a $T_g = 152,7^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,72 \text{ J/g}^\circ\text{C}$). In una seconda scansione dopo raffreddamento con decomposizione, la transizione vetrosa si presenta a $T_g = 149,7^\circ\text{C}$ ($\Delta C_p = 0,45 \text{ J/g}^\circ\text{C}$).

L'isoterma DVS (FIG. 63) mostra che si può verificare una perdita graduale della massa dell'1,0% in peso abbassando l'umidità relativa da 50% r.h. a 0% r.h.; l'equilibrio fu raggiunto a 0% r.h. Aumentando l'umidità relativa a 95% r.h. si verifica un aumento graduale della massa del 2,1% in peso (rispetto alla massa a 0% r.h.); l'equilibrio fu raggiunto a 95% r.h. Abbassando l'umidità relativa da 95% r.h. a 50% r.h. la massa finale era dello 0,2% in peso al di sotto del materiale di partenza. L'aumento della massa dello 0,4% in peso a 85% r.h. (rispetto alla massa di partenza) classifica il campione come leggermente igroscopico.

Lo spettro FT-Raman (FIG. 64) e il modello PXRD (FIG. 65) del campione dopo la misurazione DVS sono invariati in confronto allo spettro e al modello del campione prima della misurazione.

La solubilità approssimata del materiale di partenza PP415-P1 fu misurata in dodici solventi e in quattro miscele di solvente a t.a.

Miljo Montel

mediante diluizione manuale combinata con osservazione visiva (Tabella 10). A causa dell'errore sperimentale inerente in questo metodo, i valori di solubilità vanno intesi come stime grezze e devono essere usati unicamente per la progettazione degli esperimenti di cristallizzazione. Tutte le miscele di solventi sono elencate come rapporti in volume (v/v).

Tabella 10: Solubilità approssimata del materiale di partenza PP415-P1 (amorfo)

Solvente	Solubilità S [mg/ml]
toluene	S > 200
DCM	S > 200
EtOAc	S > 210
acetone	S > 230
MeCN	S > 230
DMF	S > 210
MeOH	S < 210
EtOH ^a	105 < S < 210
2PrOH	16 < S < 19
DEE	S ≥ 1 ^d
eptano	S < 1
H ₂ O	S < 1
2PrOH / H ₂ O (9:1) ^b	7,9 < S < 8,5
MeCN / H ₂ O (2:3) ^c	S < 1
EtOAc / eptano (1:1) ^a	100 < S < 200
toluene / DEE (1:1) ^a	S > 220

^a precipitazione osservata dopo ~1 giorno;
^b attività dell'acqua $a(\text{H}_2\text{O}) \sim 0,7$ a 25°C ;
^c attività dell'acqua $a(\text{H}_3\text{O}) > 0,9$ a 50°C ;
^d dissoluzione incompleta all'inizio ($S < 1$), ma il residuo solido si discioglieva completamente durante la notte ($S > 1$).

3. Composto 63415, lotto # 2083-69-DC (PP415-P40): Classe 2

63415, lotto # 2083-69-DC, è un solvato di eptano. Questo materiale (PP415-P40) fu caratterizzato mediante PXRD e fu trovato che corrispondeva alla classe 2 (FIG. 66).

5 La classe 2 probabilmente corrisponde a solvati isostrutturali, non stechiometrici ($< 0,5$ eq.) (di eptano, cicloesano, isopropil eteri, 1-butanol, trietilammina, ed eventualmente altri solventi, come esano e altri eteri) col solvente legato saldamente.

10 I piccoli picchi visibili nel modello di PP415-P40 a $7,9^\circ 2\theta$ e $13,8^\circ 2\theta$ non corrispondono ai picchi delle classi 3, 4, o 5. La loro origine non è chiara a questo punto.

4. Stabilità Chimica della Forma Amorfa

La stabilità chimica della forma amorfa fu studiata in differenti solventi nel corso di sette giorni.

15 Soluzioni/sospensioni con una concentrazione di 1 mg/ml furono preparate in quattro solventi organici (acetone, MeOH, MeCN, EtOAc) e tre mezzi di tensioattivi acquosi (SDS acq. all'1%, Tween 80 acq. all'1%, CTAB acq. all'1%).

Furono preparate quattro soluzioni/sospensioni separate per cia-

Philippe Montcler

scun solvente, equilibrate per 6 h, 24 h, 2 giorni, e 7 giorni e successivamente analizzate mediante HPLC.

L'area relativa-% ottenuta dai cromatogrammi HPLC è fornita nella Tabella 11. Il composto sembra essere alquanto instabile nel diluente (0,1% acido formico in MeCN); nel corso della sequenza (cioè, in ~24 ore) l'area-% del campione di riferimento (PP415-P1, funziona all'inizio e alla fine della sequenza) diminuiva dal 99,9% al 99,3% a 254 nm e dal 99,9% al 99,5% a 242 nm. A causa di questo effetto, i campioni misurati verso la fine della sequenza (sistemati nel seguente ordine: 7 giorni, 2 giorni, 24 h, 6 h), possono essere interessati e l'area-% ottenuta può essere sottostimata.

Tabella 11: Esperimenti di stabilità chimica con la forma amorfa di 63415 (PP415-P1)^a

Solvente	a 254 nm				a 242 nm			
	7 g	2 g	24 h	6 h	7 g	2 g	24 g	6 h
acetone	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,7%	99,7%	99,6%	99,6%
EtOAc	99,8%	99,8%	99,8%	99,7%	99,8%	99,9%	99,8%	99,7%
MeOH	99,8%	99,8%	99,7%	99,8%	99,8%	99,9%	99,7%	99,8%
MeCN	97,7%	99,5%	99,3%	99,4%	97,4%	99,5%	99,3%	99,3%
Tween 1% ^b	97,7%	97,1%	95,1%	97,6%	98,7%	98,7%	96,2%	99,1%
SDS 1% ^c	99,7%	99,6%	99,7%	99,7%	99,8%	99,7%	99,7%	99,7%
CTAB 1%	99,3%	99,4%	99,4%	99,6%	99,3%	99,4%	99,4%	99,7%
^a alla terza lunghezza d'onda (210 nm), l'intensità del segnale era debole e il rapporto segnale-rumore ampio, pertanto non fu eseguita l'integrazione ^b sospensioni, non tutto il materiale si discioglieva a questo punto								

Philippe Montebell

c sospensioni, non tutto i solidi si discioglievano per punti temporali di 24 h e 6 h

Una decomposizione $\geq 1\%$ fu osservata per le soluzioni in MeCN dopo sette giorni e per le sospensioni nel mezzo acquoso Tween 80 all'1% (a tutti i punti temporali a 254 nm e dopo 24 h, 2 g, e 7 g a 242 nm).

5 5. Stabilità allo Stoccaggio della Forma Amorfa

Come si può meglio vedere circa le proprietà fondamentali e la stabilità fisica, la forma amorfa di 63415 fu sollecitata mediante stoccaggio a temperature e umidità relative elevate.

I campioni della forma amorfa (materiale di partenza PP415-P1) furono stoccati all'aperto a 25°C/~62% r.h. (in una soluzione acquosa satura di NH_4NO_3) e 40°C/~75% r.h. (in una soluzione acquosa sovrassatura di NaCl) e chiusi a 60°C e 80°C (Tabella 12). Ai punti temporali 0 settimane (w), 1 w, 2 w, e 4 w i campioni furono esaminati mediante PXRD e confrontati col materiale di partenza, PP415-P1.

Tabella 12: Esperimenti di stabilità allo stoccaggio con la forma amorfa di 63415 (PP415-P1)

Campione	Condizioni	Punti temporali	Risultato PXRD
PP415-P2a	aperto, 25°C / ~62% r.h.	1 w	amorfo
PP415-P2b	aperto, 25°C / ~62% r.h.	2 w	amorfo
PP415-P2c	aperto, 25°C / ~62% r.h.	4 w	amorfo

PP415-P3a	aperto, 40°C / ~75% r.h.	1 w	amorfo
PP415-P3b	aperto, 40°C / ~75% r.h.	2 w	amorfo
PP415-P3c	aperto, 40°C / ~75% r.h.	4 w	amorfo
PP415-P4a	chiuso, 60°C	1 w	amorfo
PP415-P4b	chiuso, 60°C	2 w	amorfo
PP415-P4c	chiuso, 60°C	4 w	amorfo
PP415-P5a	chiuso, 80°C	1 w	amorfo
PP415-P5b	chiuso, 80°C	4 w	amorfo
PP415-P5c	chiuso, 80°C	4 w	amorfo

Dopo una settimana (punto temporale 1 w, FIG. 67), due settimane (punto temporale 2 w, FIG. 68), e quattro settimane (punto temporale 4 w, FIG. 69) tutti i quattro campioni erano ancora amorfi, dal momento che i diffrattogrammi della polvere ai raggi X non mostrano differenze in confronto al materiale di partenza al punto temporale 0 w.

6. Esperimenti di cristallizzazione ed essiccamento

a. Esperimenti di Cristallizzazione

Le equilibrazioni della fase, le cristallizzazioni da soluzioni calde e gli esperimenti di evaporazione furono eseguiti partendo dalla forma amorfa in modo da identificare con una probabilità ragionevolmente elevata la forma anidra più stabile a t.a. ed eventuali idrati. Tutti i materiali ottenuti furono caratterizzati mediante spettroscopia FT-Raman; i campioni selezionati furono inoltre caratterizzati mediante PXRD.

Gli spettri FT-Raman furono raggruppati in classi secondo la similarità delle posizioni dei loro picchi. Il campione originale

(PP415-P1, vedi Tabella 8) fu classificato assieme con i prodotti di cristallizzazione. Gli spettri in una classe, comunque, non sono strettamente identici, ma simili. Possono esistere piccole differenze e spostamenti di picco. Considerando i soli spettri FT-Raman, è difficile determinare se lo spettro di una classe appartiene alla stessa forma polimorfica.

I picchi nei modelli PXRD furono determinati e i modelli poi classificati in gruppi usando il software *PANalytical X'Pert (High-score Plus)*. Questi gruppi identificano i modelli di elevata similarità. Comunque, piccole, ma significative, differenze esistono in un gruppo. Pertanto, i modelli in un gruppo non corrispondono necessariamente agli stessi Polimorfi, ma rappresentano forme differenti con strutture molecolari molto simili. Le classi FT-Raman corrispondono in tutti i casi ai gruppi PXRD.

b. Esperimenti di Equilibratura della Sospensione

Esperimenti di equilibratura della sospensione furono eseguiti in un solvente e in undici miscele solvente (Tabella 13). Le sospensioni di ~100 mg di PP415-P1 in 0,2-2,0 ml dei solventi selezionati furono preparate e agitate per 4-15 giorni a 22-24.°C. I solidi furono recuperati e caratterizzati mediante spettroscopia FT-Raman; la maggior parte furono caratterizzati inoltre mediante PXRD.

Tabella 13. Esperimenti di equilibratura della sospensione partendo dalla forma amorfa (PP415-P1)

Campione	Solvente/Miscela	Classe FT-Raman	Gruppo PXRD

PP415-P6	2PrOH	3	3
PP415-P7	1:2 EtOAc/eptano	2	2
PP415-P8	1:2 acetone/esano	2	2
PP415-P9	1:3 toluene/DEE	2 ^d	--
PP415-P10	1:3 MeOH/TBME	2	2
PP415-P11	1:2 MEK/cicloesano	2 ^d	--
PP415-P12	9:1 EtOH/H ₂ O ^a	3	3
PP415-P13	7:3 MeCN/H ₂ O ^b	4 ^d	4
PP415-P14	~1:1 THF/H ₂ O ^c	5 ^d	5
PP415-P29	1:2 EtOAc/TEA	2	2
PP415-P31	9:1 PEG/H ₂ O	1	1
PP415-P35	7:3 MeCN/H ₂ O ^b	4 ^d	4
attività dell'acqua: ^a (H ₂ O) ~0,5 a 50°C; ^a (H ₂ O) ~ 0,85 a 50°C; ^c a(H ₂ O) >0,99 a 64°C; ^d lo spettro contiene segnali del solvente			

c. Cristallizzazioni da Soluzioni Calde

Soluzioni calde di PP415-P1 furono preparate in un solvente e quattro miscele di solvente (Tabella 14). Dopo lento raffreddamento a 5°C a una velocità di ~0,2 K/min, fu osservata precipitazione in tre casi (-P20, -P21, -P24). In due casi (-P22, -P23) nessun solido precipitava, anche dopo stoccaggio un 4-5°C per due giorni. Qui, il solvente fu evaporato sotto un flusso di N₂ a t.a. I solidi furono recuperati e caratterizzati mediante spettroscopia FT-Raman e per quelli con spettri differenti dal materiale amorfo di partenza, FT-Raman classe 1, anche mediante PXRD.

Tabella 14: Esperimenti di lento raffreddamento partendo dalla forma amorfa (PP415-P1)

Campione	Solvente/Miscela	Condizioni	Classe FT-Raman	Gruppo PXRD
PP415-P20	~2:1 acetone/H ₂ O	55°C → 5°C	3 ^b	3
PP415-P21	~1:5 EtOH/cicloesano	75°C → 5°C	2	2
PP415-P22	~1:3 MeCN/toluene	75°C → 5°C ^a	1 ^b	-
PP415-P23	1:3 EtOAc/diossano	75°C → 5°C ^a	1 ^b	-
PP415-P24	1BuOH	75°C → 5°C	2 ^b	2
^a nessuna precipitazione dopo il lento raffreddamento e agitazione a 5°C per 2 giorni; solvente evaporato sotto un flusso di N ₂ a t.a. ^b lo spettro contiene segnali di solvente				

d. Esperimenti di Evaporazione/Precipitazione

Soluzioni limpide di PP415-P1 furono preparate in tre miscele solvente (Tabella 15). I solventi furono poi lentamente evaporati a t.a. in condizioni ambiente. Comunque, in due dei tre esperimenti (-P15 e -P17) un solido bianco precipitava prima dell'inizio dell'evaporazione. I solidi ottenuti furono esaminati mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD.

Tabella 15: Esperimenti di lenta evaporazione con la forma amorfa (PP415-P1)

Campione	Solvente/Miscela	Classe FT-Raman	Gruppo PXRD
PP415-P15	1:2 DCM/IPE	2 ^a	2
PP415-P16	1:2 MeOH/toluene	1 ^a	--
PP415-P17	1:3 EtOAc/eptano	2 ^a	2
^a lo spettro contiene segnali del solvente.			

e. Esperimenti di essiccamento.

Almeno un campione di ciascuna classe fu essiccato sotto vuoto allo scopo di allontanare i solventi e ottenere forme cristalline non solvate di 63415 (Tabella 16). I materiali essiccati furono
5 ulteriormente caratterizzati mediante FT-Raman, PXRD e TG-FTIR.

Tabella 16: Esperimenti di essiccamento eseguiti su campioni ottenuti dagli esperimenti di cristallizzazione

Campione	Materiale di partenza (Classe)	Condizioni	Risultato
PP415-P18	PP415-P15 (2)	t.a., 2-10 mbar, ~2 h	2
PP415-P19	PP415-P17 (2)	t.a., 2-10 mbar, ~2 h	2
PP415-P25	PP415-P6 (3)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	3
PP415-P26	PP415-P13 (4)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	4
PP415-P27	PP415-P14 (5)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	1 ^a
PP415-P28	PP415-P21 (2)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	2 ^b
PP415-P30	PP415-P7 (2)	50-70°C, 1-10 mbar, 3 giorni	2

Campione	Materiale di partenza (Classe)	Condizioni	Risultato
PP415-P32	PP415-P19 (2)	80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 giorni	2 ^b
PP415-P33	PP415-P25 (3)	80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 giorni	3
PP415-P34	PP415-P28 (2)	80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 giorni	2 ^b
PP415-P36	PP415-P35 (4)	80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 giorni	4 ^c
PP415-P37	PP415-P35 (4)	80°C, flusso di N ₂ , 3 giorni	4 ^c
PP415-P44a	PP415-P41 (5)	80°C, 100 mbar, 2 giorni	1 ^a
PP415-P46a	PP415-P45 (6)	80°C, 100 mbar, 4 giorni	1 ^a
^a desolvatazione con successo, riduzione significativa del contenuto di solvente, campione per lo più amorfo, solamente alcuni ampi picchi in PXRD ^b campione meno cristallino, come indicato dai picchi più ampi in PXRD ^c desolvatazione con successo, riduzione significativa del contenuto di solvente, campione ancora cristallino; nessuna variazione nella struttura			

7. Caratterizzazione di Nuove Forme (Classi)

a. Sommario delle Nuove Classi

In aggiunta alla forma amorfa di 63415, quattro nuove forme cristalline furono ottenute in questo studio (Tabella 17).

5

Tabella 17: Sommario delle classi ottenute

Classe	Caratteristiche	Risultato degli Esperimenti di Essiccamento



Classe 1	forma amorfa	--
Classe 2	solvati isostrutturali (ad es., eptano)	essiccamento non riuscito
Classe 3	solvati isostrutturali (ad es., etanolo)	essiccamento non riuscito
Classe 4	solvato MeCN & solvato desolvato	essiccamento con successo, struttura invariata
Classe 5	solvato di THF	l'essiccamento portò a una forma amorfa

Classe 2: La maggior parte degli esperimenti di cristallizzazione portava a un materiale solido di classe 2. Questi campioni probabilmente corrispondono a solvati isostrutturali, non stechiometrici ($<0,5$ eq.) (di eptano, cicloesano, isopropil etero, 1-butanolo, trietilammina, ed eventualmente esano e altri eteri, ecc.) con molecole di solvente saldamente legate. Gli spettri Raman e i modelli PXRD in questa classe sono molto simili fra di loro, pertanto le strutture possono essere essenzialmente identiche con soltanto piccole differenze dovute ai differenti solventi che furono incorporati.

Esperimenti di essiccamento sui campioni della classe 2 non hanno portato a una forma cristallina, non solvatata. Anche temperature elevate (80°C) e un vuoto elevato ($<1 \times 10^{-3}$ mbar) non poterono rimuovere completamente le molecole di solvente saldamente legate; un contenuto di solvente $>2\%$ in peso rimaneva sempre. La cristallinità di questi campioni è ridotta, ma nessuna trasformazione in una differente struttura né una sostanziale amorfizzazione fu osservata.

Classe 3: Il materiale solido della classe 3 fu ottenuto da di-

versi esperimenti di cristallizzazione. I campioni della classe 3 sono probabilmente solvati isostrutturali di 2PrOH, EtOH, e probabilmente acetone con molecole di solvente saldamente legate. Possono corrispondere sia a emisolvati stechiometrici, sia a solvati non
5 stechiometrici con un contenuto di solvente di $\sim 0,5$ eq. Come con la classe 2, gli spettri Raman e i modelli PXRD in questa classe sono molto simili fra di loro, indicando strutture simili che incorporano differenti solventi.

In modo simile alla classe 2, furono inoltre eseguiti senza
10 successo esperimenti di essiccamento. Le molecole di solvente legate molto saldamente potevano essere rimosse soltanto parzialmente (da $\sim 5,4\%$ in peso a $\sim 4,8\%$ in peso, fino a 3 giorni a 1×10^{-3} mbar e 80°C). I modelli PXRD rimanevano invariati.

Classe 4: Il materiale della classe 4 era ottenuto soltanto da
15 un sistema solvente 7:3 di MeCN/H₂O. Più probabilmente corrisponde a un emisolvato cristallino di acetonitrile.

Mediante essiccamento (sotto vuoto o in flusso di N₂ a elevate temperature) la maggior parte del solvente poté essere rimossa senza modificare o distruggere la struttura cristallina (PXRD rimaneva in-
20 variato). Pertanto, fu ottenuta una forma cristallina, non solvatata (o piuttosto un solvato desolvato). È leggermente igroscopia (aumento della massa di $\sim 0,7\%$ in peso da 50% r.h. a 85% r.h.) ed ha un eventuale punto di fusione a $196,1^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 29,31$ J/g).

Classe 5: La classe 5 fu inoltre ottenuta soltanto da un sistema
25 solvente: ($\sim 1:1$ THF/H₂O) e contiene THF legato (e può essere H₂O).

Dal momento che il contenuto dei due componenti non può essere quantificato separatamente, la natura esatta di questo solvato cristallino non poté essere determinata.

L'essiccamento della classe 5 portava a una completa desolvatazione e trasformazione nella forma amorfa (classe 1). Un possibile processo per preparare la forma amorfa dal materiale della classe 2 è una trasformazione della classe 2 nella classe 5, seguita da essiccamento e amorfizzazione.

b. Classe 1- Forma amorfa

10 Classe 1, la forma amorfa di 63415, fu ottenuta da alcuni esperimenti di cristallizzazione (Tabella 18). La maggior parte degli esperimenti di cristallizzazione portava al materiale cristallino delle classi 2, 3, 4, o 5.

15 Il materiale di partenza, PP415-P1, è amorfo e appartiene alla classe 1. Furono eseguiti ulteriori esperimenti, esclusivamente allo scopo di preparare la forma amorfa (classe 1).

Tabella 18. Esperimenti di cristallizzazione che portavano al materiale solido della classe 1

Campione	Metodo	Solvente	Caratterizzazione	Essiccamento
PP415-P31	equilibratura della sospensione	9:1 PEG/H ₂ O	Raman, PXRD	--
PP415-P22	lento raffreddamento ^a	~1:3 MeCN/toluene	osserv. visiva, Raman	--
PP415-P23	lento raffredd-	1:3	osserv. visiva,	--

Allyo Monteb

	damento	EtOAc/diossano	Raman	
PP415-P16	evap./precip.	1:2 MeOH/toluene	osserv. visiva, Raman	--
a nessuna precipitazione dopo lento raffreddamento e agitazione a 5°C per 2 giorni; solvente evaporato sotto flusso di N ₂ a t.a.				

c. Classe 2 - Solvati Isostrutturali (ad esempio, Eptano)

La maggior parte degli esperimenti di cristallizzazione portava al materiale solido della classe 2 (Tabella 19). In aggiunta, uno lotto di un solvato di eptano della classe 2, PP415-P40, fu usato
5 come materiale di partenza (vedi Tabella 8).

Gli spettri FT-Raman della classe 2 sono chiaramente simili fra di loro (FIG. 70) ma mostrano piccole differenze. Differiscono in modo significativo dagli spettri del materiale di partenza amorfo, classe 1 (FIG. 71) e dagli spettri delle classi 3, 4, e 5 (FIG.
10 72).

I modelli PXRD della classe 2 (FIG. 73) confermano la cristallinità dei materiali. I modelli dei campioni sono molto simili fra di loro ma mostrano piccole differenze (FIG. 74). I modelli della classe 2 differiscono chiaramente dai modelli delle classi 3, 4, e 5
15 (FIG. 75).

Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P7 (FIG. 76) mostra la perdita di ~7,5% in peso di EtOAc ed eptano in due stadi da ~100°C a 290°C e la decomposizione a temperature $T > 290^\circ\text{C}$. Prima degli esperimenti TG-FTIR, i campioni furono essiccati brevemente (per ~5 min)
20 sotto vuoto (10-20 mbar) per rimuovere l'eccesso di solvente non le-

gato. La perdita sia di EtOAc sia di eptano avveniva assieme nello stesso intervallo di temperature; ma i solventi sembravano saldamente legati nella struttura. Il contenuto teorico di EtOAc (p.eb. = 76°C) di un emisolvato è del 7,4% in peso, il contenuto teorico di eptano (p.eb. = 98°C) di un emisolvato è dell'8,3% in peso. Sfortunatamente, il contenuto dei due componenti non può essere quantificato separatamente.

Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P21 (FIG. 77) mostra la perdita di ~5,8% in peso di cicloesano, in due stadi da ~140°C a ~250°C e la decomposizione a temperature $T > 250^\circ\text{C}$. Con il punto di ebollizione del cicloesano a 81°C, il solvente sembra saldamente legato nella struttura. Il contenuto teorico di cicloesano di un emisolvato è del 7,1% in peso. Pertanto, il campione PP415-P18 eventualmente corrisponde a un solvato non stechiometrico di cicloesano (con un contenuto di solvente $< 0,5$ eq.).

Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P24 (FIG. 78) mostra la perdita di ~16,6% in peso di 1BuOH in uno stadio da ~50°C a ~160°C., l'ulteriore perdita di 1BuOH (6,6% in peso) in un secondo stadio da 160°C a 230°C e la decomposizione a temperature $T > 230^\circ\text{C}$. Con il punto di ebollizione di 1BuOH a 117°C, il solvente di almeno il secondo stadio sembra saldamente legato nella struttura. Il contenuto teorico di 1BuOH dell'emisolvato è del 6,3% in peso.

Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P29 (FIG. 79) mostra la perdita di ~5,1% in peso di EtOAc e TEA a ~50 o a ~220°C, la maggior parte in uno stadio da 180°C a 210°C. La decomposizione avviene

a temperature $T > 220^{\circ}\text{C}$. La perdita sia di EtOAc sia di TEA avviene assieme nello stesso intervallo di temperature; entrambi i solventi sembrano saldamente legati nella struttura (con il punto di ebollizione di EtOAc a 77°C e di TEA a 89°C).

5 Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P47 (FIG. 80) mostra la tipica perdita di massa in due stati per la classe 2 (totale di $\sim 7,9\%$ in peso EtOAc) a temperature fino a 240°C , indicando molecole di solvente legate molto saldamente.

10 Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P48 (FIG. 81) mostra la perdita della massa del $\sim 3,5\%$ in peso di etile formiato e acqua, dapprima gradualmente e poi in uno stadio evidente fra 180°C e 200°C . Ci può essere un'ulteriore perdita di etile formiato concomitante con la decomposizione a $T > 240^{\circ}\text{C}$.

15 Pertanto, i campioni della classe 2 possono tutti corrispondere a solvati isostrutturali non stechiometrici ($< 0,5$ eq.), con molecole di solvente saldamente legate. Dal momento che gli spettri Raman, e i modelli PXRD in questa classe sono molto simili fra di loro, le strutture possono essere essenzialmente identiche fra di loro con soltanto piccole distorsioni delle dimensioni della cella unitaria o
20 piccole variazioni delle posizioni atomiche nella cella unitaria, a causa delle differenti dimensioni e forme delle molecole di solvente incorporate.

Tabella 19: Esperimenti di cristallizzazione che portano al materiale solido della classe 2

25



Campione	Metodo	Solvente	Caratterizzazione	Essiccamento
PP415-P7	equilibratura della sospen- sione	1:2 EtOAc/eptano	Raman, PXRD, TG- FTIR	x
PP415-P8	equilibratura della sospen- sione	1:2 acetone/esano	Raman, PXRD	--
PP415-P9	equilibratura della sospen- sione	1:3 toluene/DEE	Raman, PXRD,	--
PP415-P10	equilibratura della sospen- sione	1:3 MeOH/TBME	Raman, PXRD	--
PP415-P11	equilibratura della sospen- sione	1:2 MEK/cicloesano	Raman	--
PP415-P29	equilibratura della sospen- sione	EtOAc/TEA	Raman, PXRD, TG- FTIR	--
PP415-P15	evap./precip.	1:2 DCM/IPE	Raman, PXRD	x
PP415-P17	evap./precip.	1:3 EtOAc/eptano	Raman, PXRD	x
PP415-P21	lento raf- freddamento	~1:5 EtOH/cicloesano	Raman PXRD, TG- FTIR	x
PP415-P24	evap./precip.	1BuOH	Raman, PXRD,	--
PP415-P43a	evaporazione	(8:2) THF/esano	PXRD	--
PP415-P47a	evaporazione	EtOAc	PXRD, TG-FTIR	--
PP415-P48a	evaporazione	etile formiato	PXRD, TG-FTIR	--
a materiale di partenza: PP415-P40, classe 2; in tutti gli altri esperimenti				

Campione	Metodo	Solvente	Caratterizzazione	Essiccamento
PP415-P1, classe 1, fu usato come materiale di partenza.				

d. Esperimenti di essiccamento su Campioni della Classe 2

Diversi campioni della classe 2 furono essiccati sotto vuoto (e alcuni a elevate temperature) e in un tentativo di desolvatarli allo scopo di ottenere una forma anidra di 63415. Particolari e caratterizzazioni dei campioni essiccati sono forniti di seguito nella Tabella 20.

Comunque, anche essiccando per tre giorni a 80°C e a un vuoto $<1 \times 10^{-3}$ mbar le molecole di solvente saldamente legate non poterono essere completamente rimosse; un contenuto di solvente $>2\%$ in peso rimaneva (vedi campioni -P32 e -P34). I modelli PXRD mostrano una cristallinità ridotta di questi campioni, ma non fu osservata alcuna trasformazione in una struttura differente.

Tabella 20: Esperimenti di essiccamento su campioni della classe 2

Materiale di partenza		Essiccamento	Materiale essiccato		
Campione	Contenuto di solvente	Condizioni	Campione	Contenuto di solvente	Classe
PP415-P7	EtOAc/eptano (~7,5%)	50-70°C, 1-10 mbar, 3 giorni	PP415-P30	eptano (~2,5%)	2
PP415-P15	IPE (sconosciuto)	t.a., 2-10 mbar, ~2 h	PP415-P18	IPE (~7,0%)	2
PP415-P17	EtOAc(?)/eptano (sconosciuto)	t.a., 2-10 mbar, ~2 h	PP415-P19	eptano (~7,6%)	2
PP415-P19	eptano (~7,6%)	80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3	PP415-	eptano	2a

Philippe Montcler

		giorni	P32	(~2,2%)	
PP415-P21	cicloesano (~5,8%)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	PP415- P28	cicloesano (~3,0%)	2a
PP415- P28a	cicloesano (~3,0%)	80°C, <1x10 ⁻³ mbar, 3 giorni	PP415- P34	cicloesano (~2,3%)	2a
^a secondo PXRD alquanto meno cristallino					

Pertanto, i solvati della classe 2 sembrano avere molecole di solvente legate molto saldamente. Sono difficili da desolvatare o da trasformare/renderli amorfi.

e. PP415-P7 → PP415-P30

5 Il materiale solido del campione PP415-P7, classe 2, ottenuto da un esperimento di equilibrizzazione della sospensione in 1:2 EtOAc/eptano fu essiccato (come PP415-P30) sotto vuoto per diversi giorni (1-10 mbar, 50-70°C).

10 Lo spettro FT-Raman del materiale essiccato della classe 2 (PP415-P30) mostra piccole differenze dallo spettro originale (campione PP415-P7, FIG. 82) ma corrisponde ancora alla classe 2.

Il modello PXRD del materiale essiccato della classe 2 (PP415-P30) mostra picchi meno intensi, leggermente più ampi (FIG. 83) ma ancora corrisponde alla classe 2.

15 Il termogramma TG-FTIR del campione essiccato di PP415-P30 (FIG. 84) mostra la perdita di ~2,5% in peso eptano (e di una certa quantità di EtOAc) in due stadi da ~50°C a ~250°C e la decomposizione a temperature $T > 250^\circ\text{C}$. In confronto alla TG-FTIR del campione PP415-

P7 (FIG. 76), i due stadi della perdita di solvente sono conservati, ma la quantità totale di solvente nel campione è diminuita da ~7.5% in peso in PP415-P7 a ~2,5% in peso in PP415-P30.

Pertanto, il tentativo di desolvatare questo solvato a elevate temperature (50-70°C) e un vuoto di 1-10 mbar) ha causato soltanto una perdita parziale di solvente.

f. PP415-P15 → PP415-P18

Il materiale solido del campione PP415-P 15, classe 2, ottenuto da un esperimento di precipitazione in 1:2 DCM/IPE fu essiccato (come PP415-P18) sotto vuoto (~2-20 mbar) un t.a. per ~2 h.

Lo spettro FT-Raman di PP415-P18 è identico allo spettro del campione PP415-P15 (FIG. 85), entrambi corrispondono alla classe 2.

Il modello PXRD di PP415-P18 mostra piccole differenze nel modello di PP415-P15 (FIG. 86). PP415-P18 corrisponde ancora alla classe 2.

Il termogramma TG-FTIR (FIG. 87) mostra la perdita di ~7,0% in peso di IPE in due stadi da ~140°C a ~250°C e una decomposizione a temperature $T > 250^\circ\text{C}$. Col punto di ebollizione di IPE che è di 67°C, il solvente sembra saldamente legato nella struttura. Il contenuto teorico di IPE di un emisolvato è dell'8,4% in peso.

Sfortunatamente, nessun TG-FTIR fu registrato del material prima dello stadio di essiccamento. Comunque, dal momento che il solvente sembra saldamente legato nella struttura e nessuna (o soltanto una piccola) variazione è osservata negli spettri FT-Raman e nei modelli PXRD, si è ipotizzato che l'essiccamento non ha alcun effetto signi-

ficativo sulla struttura o sul contenuto del solvente.

g. PP415-P17 → PP415-P19 → PP415-P32

Il materiale solido del campione PP415-P17, classe 2, ottenuto da un esperimento di precipitazione in 1:3 EtOAc/eptano fu essiccato
5 (come PP415-P19) sotto vuoto (~2-20 mbar) un t.a. per ~2 h.

Lo spettro FT-Raman di PP415-P19 è identico allo spettro del campione PP415-P 17 (FIG. 88); nessuna variazione può essere osservata, ed entrambi corrispondono alla classe 2.

[0289] Il modello PXRD di PP415-P19 differisce leggermente dal modello di PP415-P17 (FIG. 89) ma ancora corrisponde alla classe 2.
10

Il termogramma TG-FTIR (FIG. 90) mostra la perdita di ~7,6% in peso di eptano in due stadi da ~140°C a ~270°C e la decomposizione a temperature $T > 270^\circ\text{C}$. col punto di ebollizione dell'eptano che è di 98°C, il solvente sembra saldamente legato nella struttura. Il contenuto teorico di eptano di un emisolvato è dell'8,3% in peso.
15

Un ulteriore esperimento di essiccamento (80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 giorni) fu eseguito sullo stesso campione come PP415-P32.

Lo spettro FT-Raman rimaneva invariato (FIG. 88). Il modello PXRD corrispondeva ancora alla classe 2 (FIG. 89), ma il campione
20 era meno cristallino (dal momento che i picchi erano più ampi e avevano un rapporto S/N inferiore).

Il termogramma TG-FTIR (FIG. 90) mostra la perdita di ~2,2% in peso di eptano, la maggior parte di esso in uno stadio da 170°C a 200°C e la decomposizione a temperature $T > 250^\circ\text{C}$.

25 Pertanto, il contenuto di eptano era ridotto soltanto dal 7,6%

in peso al 2,2% in peso, confermando lo stretto legame delle molecole del solvente.

h. PP415-P21 → PP415-P28 → PP415-P34

Il materiale solido del campione PP415-P21, classe 2, ottenuto da un esperimento di lento raffreddamento in ~1:5 EtOH/cicloesano fu essiccato (come PP415-P28) sotto vuoto per diversi giorni (2-20 mbar, t.a. a 60°C).

Lo spettro FT-Raman del materiale essiccato della classe 2 (PP415-P28) mostra piccole differenze nello spettro della classe 2 (campione PP415-P21, FIG. 92), ma ancora corrisponde alla classe 2.

Il modello PXRD del materiale essiccato della classe 2 (PP415-P28) mostra picchi più ampi, meno intensi, in confronto al modello di PP415-P21 (FIG: 93), indicando che il campione essiccato è meno cristallino. Comunque, il modello corrisponde ancora alla classe 2.

Il termogramma TG-FTIR del campione essiccato PP415-P28 (FIG. 94) mostra la perdita di ~3,0% in peso di cicloesano in due stadi da ~140°C a ~250°C e la decomposizione a temperatura $T > 250^\circ\text{C}$. In confronto alla TG-FTIR del campione PP415-P21 (FIG. 77), i due stadi della perdita del solvente sono conservati, ma la quantità totale di solvente nel campione è diminuita da ~5,8% in peso in PP415-P21 a ~3,0% in peso in PP415-P28.

Pertanto, la desolvatazione di questo solvato sembra che abbia causato soltanto una perdita parziale di solvente, parallela a una perdita parziale della cristallinità.

L'ulteriore essiccamento di questo campione (a 80°C, $<1 \times 10^{-3}$



mbar, 3 giorni) fu eseguito come PP415-P34.

Lo spettro FT-Raman rimaneva invariato (FIG. 92). Il modello PXRD corrispondeva ancora alla classe 2 (FIG. 93), ma il campione era meno cristallino (dal momento che i picchi erano più ampi e avevano un rapporto S/N inferiore).

Il termogramma TG-FTIR (FIG. 95) mostra la perdita di ~2,3% in peso di cicloesano, in due stadi da 25°C a 270°C e la decomposizione a temperatura $T > 270^\circ\text{C}$.

Pertanto, il contenuto di cicloesano fu ridotto soltanto dal 3,0% in peso al 2,3% in peso confermando lo stretto legame delle molecole del solvente.

1. Classe 3 - Solvati Isostrutturali (ad esempio, Etanolo)

Diversi esperimenti di cristallizzazione portavano al materiale solido della classe 3 e furono caratterizzati dalla spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TG-FTIR (Tabella 21).

Gli spettri FT-Raman della classe 3 sono chiaramente simili fra di loro (FIG. 96) ma mostrano piccole differenze (FIG. 97). Gli spettri della classe 3 differiscono significativamente dallo spettro del materiale amorfo di partenza, classe 1 (FIG. 98), e dagli spettri delle classi 2, 4, e 5 (FIG. 72).

I modelli PXRD della classe 3 (FIG. 99) confermano la cristallinità dei materiali. I modelli dei tre campioni sono simili fra di loro ma mostrano piccole ma significative differenze (FIG. 100). I modelli della classe 3 differiscono chiaramente dai modelli cristallini delle classi 2, 4, e 5 (FIG. 75).

Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P6 (FIG. 100) mostra la perdita di ~5,4% in peso di 2PrOH da 25°C a 250°C, la maggior parte di esso in uno stadio da ~170°C a 190°C. La decomposizione inizia a temperature $T > 250^\circ\text{C}$. Prima degli esperimenti TGFTIR, i
5 campioni furono essiccati brevemente (per ~5 min) sotto vuoto (10-20 mbar) per rimuovere l'eccesso di solvente non legato. Il contenuto teorico di 2PrOH (p.eb. = 82°C) di un emisolvato è del 5,1% in peso.

Il termogramma TG-FTIR del campione PP415-P12 (FIG. 101) mostra la perdita di ~4,9% in peso EtOH (con tracce di acqua) da 25°C a
10 250°C, la maggior parte di esso in uno stadio da ~160°C a 190°C. La decomposizione inizia a temperatura $T > 250^\circ\text{C}$. Il contenuto teorico di EtOH (p.eb. = 78°C) di un emisolvato è del 4,0% in peso.

Pertanto, i campioni della classe 3 sembrano essere solvati iso-strutturali di 2PrOH, EtOH, e probabilmente acetone con un contenuto
15 di solvente saldamente legato. Possono corrispondere a emisolvati stechiometrici. Comunque, non si può escludere che queste forme siano solvati non stechiometrici.

Dal momento che gli spettri Raman e i modelli PXRD in questa classe sono molto simili fra di loro, le strutture possono essere
20 essenzialmente identiche con soltanto piccole distorsioni delle dimensioni delle celle unitarie o piccole variazioni di posizioni atomiche delle celle unitarie dovute all'incorporazione di differenti molecole di solvente.

**Tabella 21. Esperimenti di cristallizzazione che portano a un mate-
25 riale solido della classe 3**



Campione	Metodo	Solvente/Miscela	Caratterizzazione	Essiccamento
PP415-P6	equilibratura della sospensione	2PrOH	Raman, PXRD, TG- FTIR	X
PP415-P12	equilibratura della sospensione	9:1 EtOH/H ₂ O	Raman, PXRD, TG- FTIR	--
PP415-P20	lento raffredda- mento	~2:1 acetone/H ₂ O	Raman, PXRD	--

j. Esperimenti di essiccamento su Campioni della Classe 3

Uno dei campioni della classe 3 (PP415-P6), ottenuto da un esperimento di equilibratura della sospensione in 2PrOH, fu essiccato (come PP415-P25) sotto vuoto per diversi giorni (2-20 mbar, t.a. a 60°C, Tabella 22).

Il termogramma TG-FTIR di questo materiale essiccato della classe 3, campione PP415-P25 (FIG. 102), mostra la perdita di ~5,4% in peso di 2PrOH da 50°C a 250°C, la maggior parte di esso in uno stadio da 170°C a 190°C, un'altra perdita di ~1,0% in peso di 2PrOH da 290°C a 320°C, e la decomposizione a temperature $T > 320^\circ\text{C}$. In confronto al TG-FTIR della classe originale 3 del campione PP415-P6 (FIG. 103), con un contenuto di solvente di ~5,4% in peso 2PrOH, il contenuto di solvente non sembra essere diminuito in modo significativo.

Questo materiale fu ulteriormente essiccato (come PP415-P33, Tabella 22) per tre giorni sotto alto vuoto e a elevate temperature ($<1 \times 10^{-3}$ mbar, 80°C) allo scopo di desolvatare il solvato e di ottenere una forma anidra, non solvatata di 63415.

Il termogramma TG-FTIR di questo ulteriore materiale essiccato della classe 3, campione PP415-P33 (FIG. 103) mostra la perdita di ~4,2% in peso di 2PrOH da 50°C a 210°C, la maggior parte di esso in uno stadio da 160°C a 190°C, un'altra perdita di ~0,5% in peso di 2PrOH da 210°C a 290°C, e la decomposizione a temperature $T > 290^\circ\text{C}$.

In confronto al contenuto di solvente dei campioni PP415-P6 e PP415-P25, il contenuto di solvente fu diminuito soltanto da ~5,4% in peso a ~4,8% in peso.

Tabella 22. Esperimenti di essiccamento sui campioni della classe 3

Materiale di partenza		Essiccamento	Materiale essiccato		
Campione	Contenuto di solvente	Condizioni	Campione	Contenuto di solvente	Classe
PP415-P6	2PrOH (~5,4%)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	PP415-P25	2PrOH (~5,4%)	3
PP415-P25	2PrOH (~5,4%)	80°C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 giorni	PP415-P33	2PrOH (~4,8%)	3

Gli spettri FT-Raman della classe 3 (campione PP415-P6), del materiale essiccato della classe 3 (campione PP415-P25), e dell'ulteriore materiale essiccato della classe 3 (campione PP415-P33) sono identici e non mostrano variazioni (FIG. 104).

I modelli PXRD della classe 3 (campione PP415-P6) e dell'ulteriore materiale essiccato della classe 3 (campione PP415-P33) non

mostrano alcuna differenza significativa, mentre ci sono alcuni piccoli spostamenti e differenze dal modello del materiale inizialmente essiccato della classe 3 (campione PP415-P25, FIG. 105). Tutti i modelli corrispondono alla classe 3.

5 Dal momento che l'essiccamento non ha un effetto preponderante sul contenuto del solvente, non è sorprendente che gli spettri FT-Raman e i modelli PXRD dei materiali essiccati non mostrino differenze in confronto al materiale non essiccato.

Pertanto, la classe 3 è una classe di solvati isostrutturali
10 (2PrOH, EtOH, e probabilmente acetone) con molecole di solvente molto saldamente legate che possono essere rimosse soltanto parzialmente (~5,4% in peso a ~4,8% in peso) mediante le condizioni di essiccamento qui applicate (fino a 3 giorni a 1×10^{-3} mbar e 80°C).

k. Classe 4 - Solvato di acetonitrile

15 La classe 4 fu ottenuta soltanto da una miscela solvente 7:3 MeCN/H₂O (Tabella 23). L'esperimento risultante nella classe 4 (PP415-P13) fu ripetuto come PP415-P35 per preparare dell'altro materiale per ulteriori studi di essiccamento.

Lo spettro FT-Raman (FIG. 72) e il modello PXRD (FIG. 75) della
20 classe 4 (campione PP415-P13) differiscono significativamente dagli spettri e dai modelli delle classi 2, 3, e 5.

Il termogramma TG-FTIR della classe 4 (campione PP415-P13, FIG. 106) mostra la perdita di ~3,4% in peso di MeCN (con tracce di acqua) da 25°C a 270°C, la maggior parte di esso in uno stadio da
25 ~180°C a 210°C. La decomposizione inizia a temperatura $T > 270^\circ\text{C}$. Pri-



ma degli esperimenti TG-FTIR, i campioni furono essiccati brevemente (per ~5 min) sotto vuoto (10-20 mbar) per rimuovere il solvente in eccesso, non legato. Il contenuto teorico di MeCN (p.eb. = 81°C) di un emisolvato è del 3,6% in peso.

5 **Tabella 23. Esperimenti di cristallizzazione che portavano al materiale solido della classe 4**

Campione	Metodo	Solvente	Caratterizzazione	Essiccamento
PP415-P13	equilibratura della sospensione	7:3 MeCN/H ₂ O	Raman, PXRD, TG-FTIR	X
PP415-P35	equilibratura della sospensione	7:3 MeCN/H ₂ O	Raman, PXRD, TG-FTIR	X

1. Esperimenti di essiccamento sulla Classe 4

I campioni della classe 4 ottenuti da esperimenti di equilibratura della sospensione in ~7:3 MeCN/H₂O furono essiccati sotto vuoto per diversi giorni o sotto un flusso di N₂ (Tabella 24).

Tabella 24. Esperimenti di essiccamento sui campioni della classe 4

Materiale di partenza		Essiccamento	Materiale essiccato		
Campione	Contenuto di solvente	Condizioni	Campione	Contenuto di solvente	Classe
PP415-P13	MeCN (~3,4%)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	PP415-P26	MeCN (~2,8%)	4

PP415-P35	MeCN (~2,9%)	80 °C, $<1 \times 10^{-3}$ mbar, 3 giorni	PP415-P36	MeCN/H ₂ O ^a (~0,6%)	4
PP415-P35	MeCN (~2,9%)	80 °C, flusso di N ₂ , 3 giorni	PP415-P37	MeCN/H ₂ O ^a (~0,9%)	4
^a contenuto di solvente possibile MeCN e H ₂ O, ma difficile da determinare dal momento che le quantità sono piccole					

Lo spettro FT-Raman del materiale essiccato della classe 4 (PP415-P26) è identico allo spettro della classe 4 (PP415-P13, FIG. 107).

Il modello PXRD del materiale essiccato della classe 4 (PP415-P26) mostra soltanto differenze molto piccole dal modello della classe 4, campione PP415-P13 (FIG. 108). Alcuni picchi sembrano meglio risolti, e le intensità dei picchi sono spostate. Non è osservata amorfizzazione. Il modello di PP415-P26 corrisponde alla classe 4.

Il termogramma TG-FTIR del materiale essiccato della classe 4, campione PP415-P26 (FIG. 109) mostra la perdita di ~2,8% in peso MeCN da 170 °C a 250 °C e la decomposizione a temperature $T > 300$ °C. In confronto al TG-FTIR del campione PP415-P13 (FIG. 106), il contenuto di solvente del campione è diminuita dal 3,4% in peso al 2,8% in peso.

Pertanto, il campione sembra essere un solvato parzialmente desolvatato. Dal momento che non rimaneva materiale sufficiente per un secondo esperimento di essiccamento con successiva caratterizzazione, l'esperimento PP415-P13 fu ripetuto (come PP415-P35). Una quan-

tità maggiore di materiale della classe 4 fu preparata e furono eseguiti due esperimenti di essiccamento con questo materiale preparato di fresco:

- PP415-P36: essiccamento sotto vuoto ($<1 \times 10^{-3}$ mbar) a 80°C per tre giorni
- PP415-P37: essiccamento sotto flusso di N₂ a 80°C per tre giorni.

Gli spettri FT-Raman di questi campioni essiccati della classe 4 (PP415-P36 e -P37) corrispondono allo spettro della classe 4 (cioè, PP415-P35, FIG. 110).

I modelli PXRD (FIG. 111) del materiale della classe 4 (campione PP415-P35) e i campioni essiccati della classe 4 (campioni PP415-P36 e PP415-P37) sono identici. I campioni essiccati sono cristallini.

I termogrammi TG-FTIR di questi campioni essiccati della classe 4 (FIG. 112 per PP415-P36 e FIG. 113 per PP415-P37) mostrano soltanto un piccolo contenuto di solvente (MeCN e/o H₂O) di ~0,6% in peso e ~0,9% in peso per PP415-P36 e PP415-P37, rispettivamente, in due stadi da 25°C a 280°C. Il contenuto di solvente è eventualmente MeCN e H₂O, ma è da determinare in quanto le quantità sono piccole. La decomposizione inizia a temperature $T > 280^\circ\text{C}$.

Pertanto, la maggior parte del solvente di questo solvato poté essere rimossa senza distruggere la struttura cristallina. Fu ottenuta una forma cristallina, non solvatata (o piuttosto un solvato desolvato).

m. Ulteriore Caratterizzazione della Classe 4 Essiccata e Desolvata-

ta

L'essiccamento della classe 4 (solvato MeCN) portava a un solvato desolvatato con un contenuto di solvente ridotto a <1% in peso (TG-FTIR).

5 Nessuna variazione nella struttura si presentava per desolvatazione(FT-Raman e PXRD). Nessuna perdita significativa della cristallinità fu osservata.

Pertanto, fu ottenuta una forma cristallina, non solvatata, di 63415, l'unica nota finora.

10 Questo materiale desolvatato della classe 4 fu ulteriormente caratterizzato mediante DVS e DSC.

L'isoterma DVS (FIG. 114) mostra che durante il tempo di equilibr
brazione iniziale a 50% r.h. la massa guadagna ~0,4% in peso. Duran
te la misurazione, si verifica una perdita graduale, reversibile
15 della massa di ~1.3% in peso abbassando l'umidità relativa da 50%
r.h. a 0% r.h. Fu raggiunto l'equilibrio. Dopo aumento dell'umidità
relativa a 95% r.h., un graduale aumento della massa di ~0.8% in pe
so fu osservato (rispetto al equilibr
20 50% r.h., la massa finale rimaneva dello 0,1% in peso al di sotto
della massa iniziale equilibrata. L'aumento della massa di ~0.7% in
peso dopo aumento dell'umidità relativa da 50% r.h. a 85% r.h. clas
sificava il campione come leggermente igroscopico.

Il modello PXRD del campione dopo la misurazione è invariato in
25 confronto al modello prima della misurazione (FIG. 115).

Philippe Montebelli

Il termogramma DSC di un campione di materiale desolvatato della classe 4 (FIG. 116) non mostra transizione vetrosa attribuibile alla forma amorfa, che dovrebbe essere prevista a $\sim 150^{\circ}\text{C}$, ma invece un picco endotermico distinto con un massimo a $T = 196,1^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 29,31$ J/g), probabilmente corrispondente alla fusione, e all'assenza di decomposizione fino a 270°C .

In aggiunta, un esperimento DSC fu eseguito con una miscela $\sim 1:1$ del materiale amorfo, classe 1, con il materiale desolvatato della classe 4 per studiare se il materiale amorfo fosse trasformato e cristallizzato nella classe 4 desolvatata, un evento che si prevedeva avvenisse (se del tutto) al di sopra della temperatura di transizione vetrosa della forma amorfa ($T_g \approx 150^{\circ}\text{C}$) e al di sotto della fusione della classe 4 desolvatata ($T_m \approx 196^{\circ}\text{C}$).

Il termogramma DSC della miscela (FIG. 117) mostra un evento endotermico con un picco $T = 156,7^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 1,47$ J/g) e un secondo evento endotermico con un picco a $197,0^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 14,1$ J/g). Il primo evento può essere attribuibile al materiale amorfo (transizione vetrosa a una $T_g \approx 150^{\circ}\text{C}$). Il secondo evento può corrispondere alla fusione della classe 4 desolvatata a $T_m \approx 196^{\circ}\text{C}$. Il calore di fusione ($\Delta H = 14,1$ J/g) della miscela ben si correla alla metà del calore di fusione ($\Delta H = 29,3$ J/g) della classe 4 desolvatata pura.

Nessun evento esotermico nella variazione di temperatura fra la transizione vetrosa e la fusione corrispondente a un'eventuale cristallizzazione del materiale amorfo può essere osservato. Pertanto, nessuna trasformazione della forma amorfa nella forma della classe 4



desolvatata sembra che si verifichi su questa scala cronologica.

In ancora un altro esperimento DSC con una miscela ~1:1 del materiale amorfo, classe 1, con il materiale desolvatato della classe 4, il riscaldamento fu arrestato a 173°C (fra la transizione vetrosa e la fusione) per dar tempo a un'eventuale cristallizzazione.

Il termogramma DSC della miscela (FIG. 118) mostra un evento endotermico con un picco a $T = 161.4^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 0,31 \text{ J/g}$) e un secondo evento endotermico con un picco a $201,4^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 11,4 \text{ J/g}$). Come nel primo esperimento, il calore di fusione del secondo picco non aumentava; nessuna indicazione per la trasformazione della forma amorfa nella forma desolvatata della classe 4 era visibile.

La linea di base curvata (da -50°C a 150°C) è più probabilmente un artefatto (dovuto a un coperchio del portacampione piegato).

n. Classe 5 - Solvato di THF

La classe 5 fu ottenuta soltanto da una miscela solvente 1:1 THF/H₂O (Tabella 25). Lo spettro FT-Raman (FIG. 71) e il modello PXRD (FIG. 75) della classe 5 differiscono significativamente dagli spettri e dai modelli delle classi 2, 3, e 4.

Il termogramma TG-FTIR della classe 5 (campione PP415=P14, FIG. 119) mostra la perdita di ~36,1% in peso di THF e H₂O da 25 a 200°C, la maggior parte di esso in uno stadio da ~100°C a 130°C. Prima degli esperimenti TG-FTIR, i campioni furono essiccati brevemente (for ~5 min) sotto vuoto (10-20 mbar) per rimuovere il solvente in eccesso, non legato. La perdita sia di THF sia di H₂O si presentava assieme nello stesso intervallo di temperature. La decomposizione inizia



a una temperatura $T > 300^{\circ}\text{C}$. Il contenuto teorico di THF (p.eb. = 66°C) di un trisolvato è del 28,1% in peso. Sfortunatamente, dal momento che il contenuto dei due componenti non può essere quantificato separatamente, l'esatto stato di solvatazione non può essere determinato.

Sono forniti particolari sugli esperimenti e sulle caratterizzazioni dei campioni PP415-P41 e PP415-P45.

Tabella 25. Esperimenti di cristallizzazione che portano al materiale solido della classe 5

Campione	Metodo	Solvente	Caratterizzazione	Essiccamento
PP415-P14	equilibratura della sospensione	1:1 THF/H ₂ O	Raman, PXRD, TG-FTIR	X
PP415-P41 ^b	equilibratura della sospensione	1:1 THF/H ₂ O	PXRD	X
PP415-P45 ^{b, c}	equilibratura della sospensione	1:1 THF/H ₂ O	PXRD	X
^b materiale di partenza: PP415-P40, classe 2; in tutti gli altri esperimenti in questa tabella PP415-P1, classe 1, fu usato come materiale di partenza ^c esperimenti su scala di 3-g invece di una scala di 100-mg				

o. Esperimenti di essiccamento su Campioni della classe 5

Il campione della classe 5 (PP415-P14), ottenuto da un esperimento di equilibratura della sospensione in ~1:1 THF/H₂O, fu essiccato (come PP415-P27) sotto vuoto per diversi giorni (2-20 mbar, t.a. a 60°C , Tabella 26).

Tabella 26. Esperimenti di essiccamento dei campioni della classe 5

Allyo Monteb

Materiale di partenza		Essiccamento	Materiale essiccato		
Campione	Contenuto di solvente	Condizioni	Campione	Contenuto di solvente	Classe
PP415-P14	THF & H ₂ O (~36% in peso)	t.a., ~3 mbar, ~5 giorni; 60°C, 5-10 mbar, 2x1 h; 40-50°C, 5-20 mbar, ~1 giorno	PP415-P27	-- (~0,3% in peso)	1 (+5) ^a
^a principalmente amorfo, solamente alcuni ampi picchi con un basso rapporto S/N					

Lo spettro FT-Raman del materiale essiccato (PP415-P27) è differente dallo spettro della classe 5 (PP415- P14, FIG. 120) e, con i suoi picchi allargati, assomiglia più allo spettro della classe 1, il materiale amorfo di partenza, PP415-P1.

5 Il modello PXRD del materiale essiccato della classe 5 (PP415-P27) mostra soltanto alcuni picchi ampi, a bassa intensità con un basso rapporto S/N, indicando la scarsa cristallinità del campione (FIG. 121). Alcuni dei picchi possono corrispondere alla classe 5, mentre altri, cioè a $7,35^\circ 2\theta$, sono nuovi o spostati.

10 Il termogramma TG-FTIR del materiale essiccato della classe 5 (FIG. 122) mostra una perdita della massa di ~0,3% in peso da 25°C a 290°C e la decomposizione a temperature $T > 290^\circ\text{C}$. Il campione è anidro.

Pertanto, mediante essiccamento sotto vuoto, il materiale ha perso il solvente contenuto e inoltre molto della sua cristallinità.

8. Esperimenti per Preparare la Forma Amorfa

Esperimenti allo scopo di preparare la forma amorfa, classe 1, furono eseguiti usando il materiale classe 2 (PP415-P40, Tabella 8) come materiale di partenza. Sono stati tentati diverse strategie e metodi:

- 5 • Trasformazione della classe 2 nella classe 5, seguita dall'essiccamento della classe 5 per ottenere la forma amorfa, classe 1.
- Preparazione della forma amorfa, classe 1, direttamente dalla classe 2, se possibile usando i solventi ICH della classe 3.

10 Principalmente il materiale amorfo fu preparato partendo dal materiale della classe 2 in un procedimento a due stadi attraverso la classe 5 su scala di 100-mg e 3-g.

Ulteriori esperimenti furono eseguiti allo scopo di semplificare il procedimento a un procedimento a stadio singolo, per evitare il
 15 solvente THF ICH della classe 2 e per ottenere un materiale completamente amorfo. Il metodo più promettente è stato trovato essere la precipitazione da una soluzione di acetone in un bagno di acqua fredda. Questo metodo diretto fornisce risultati molto migliori del metodo in due stadi attraverso la classe 5.

20 **a. Preparazione della forma amorfa attraverso la Classe 5**

Esperimenti di cristallizzazione usando la classe 2, PP415-P40, come materiale di partenza furono eseguiti allo scopo di trasformare questo solvato di eptano nella classe 5 (probabilmente solvato di THF), seguito dall'essiccamento della classe 5 per ottenere un mate-
 25 riale amorfo (Tabella 27).

Philip Montel

Si pensa che la classe 5 sia un buon stadio intermedio, dal momento che è più facile da desolvatare e amorfizzare rispetto alle classi 2 o 3.

**Tabella 27. Sommario degli esperimenti allo scopo di preparare il
5 materiale della forma amorfa, classe 1, attraverso la classe 5**

Stadio	Campione	Metodo	Condizioni	Risultati
1	PP415-P41	equilibratura della sospensione	1:1 THF/H ₂ O, 24 °C, 3 giorni	classe 5
"	PP415-P45	equilibratura della sospensione	1:1 THF/H ₂ O, t.a. 1 giorno	classe 5
2	PP415-P44a	essiccamento	100 mbar, 80°C, 2 giorni	classe 1 ^a ; 0,9% in peso di THF
"	PP415-P46a	essiccamento	100 mbar, 80°C, 4 giorni	classe 1 ^a ; 0,4% in peso di H ₂ O
a principalmente amorfo, solamente alcuni ampi picchi con un basso rapporto S/N				

b. Stadio 1: Trasformazione della classe 2 nella Classe 5

La trasformazione del solvato di eptano, classe 2, nel solvato di THF, classe 5, fu eseguita con successo sospendendo il materiale
10 PP415-P40 (solvato di eptano) in una miscela (1:1) THF/H₂O ed equilibrando la sospensione a t.a. (PP415-P41, scala 100 mg). Il materiale solido risultante corrisponde al solvato di THF, classe 5 (FIG. 123).

Un primo esperimento di aumento proporzionale dalla scala in mg
15 alla scala in g (x 30, cioè, scala di 3-g) fu eseguito analogamente

Philippe Monteb

a PP415-P41: il materiale di partenza del solvato di eptano classe 2 (PP415-P40) fu equilibrato in THF/H₂O (1:1) per un giorno e trasformato con successo nella classe 5, solvato di THF (PP415-P45, FIG. 124).

5 ***c. Stadio 2: Amorfizzazione del materiale della classe 5 mediante Essiccamento***

Il materiale della classe 5 (solvato di THF) fu essiccato a elevata temperatura (80°C) sotto vuoto (~100 mbar) prendendo in considerazione le condizioni che possono essere usate al sito API MFG.

10 Dopo essiccamento, il materiale dell'esperimento su scala di 100-mg, PP415-P41, per un giorno a 80°C e a 100 mbar è trasformato principalmente nel materiale amorfo (PP415-P44, FIG. 125). Il modello PXRD mostra soltanto alcuni ampi picchi con bassa intensità. Dopo
15 essiccamento addizionale (80°C, 100 mbar) durante la notte, l'intensità di questi ampi picchi è ulteriormente ridotta (PP415-P44a). TG-FTIR di questo materiale mostra la perdita di ~0,9% in peso THF (con tracce di acqua) gradualmente da 25°C a 280°C e decomposizione a temperature $T > 300^{\circ}\text{C}$ (FIG. 126).

Il materiale dell'esperimento su scala 3-g, PP415-P45, fu inol-
20 tre essiccato a 80°C e 100 mbar (come PP415-P46). Fu trasformato durante la notte principalmente nel materiale amorfo con soltanto alcuni ampi picchi di bassa intensità (FIG. 127). Dopo un totale di quattro giorni di essiccamento (80°C, 100 mbar), questi ampi picchi sono ancora presenti (-P46a, FIG. 128). TG-FTIR di questo materiale
25 non mostra alcun contenuto di THF, ma la perdita di ~0,4% in peso di

acqua gradualmente da 25°C a 250°C e la decomposizione a temperature $T > 250^\circ\text{C}$ (FIG. 129).

d. Ottenimento della Forma Amorfa Direttamente

La preparazione della forma amorfa partendo dal materiale della classe 2 nel procedimento a due stadi attraverso la classe 5 ebbe ampiamente, ma non completamente, successo. Pertanto, furono eseguiti ulteriori esperimenti allo scopo di semplificare il procedimento a un processo a singolo stadio, per evitare l'uso di solvente THF ICH classe 2, e per ottenere un materiale completamente amorfo (Tabella 28).

La forma amorfa, classe 1, fu preparata direttamente dal materiale della classe 2 in un esperimento di evaporazione della soluzione della classe 2 soluzione in THF sotto un flusso di N_2 (PP415-P42, FIG. 129).

Nel tentativo di simulare un solvato di eptano/esano non completamente essiccato con una quantità significativa di solvente rimanente, fu eseguita l'evaporazione di una soluzione della classe 2 in una soluzione 8:2 THF/esano (esano fu usato al posto di eptano in modo da avere punti di ebollizione simili della miscela solvente). Comunque, il solido risultante corrisponde alla classe 2, la classe dei solvati isostrutturali, non alla classe 5 (PP415-P43, FIG. 130).

Per evitare il solvente THF ICH della classe 2, gli esperimenti di evaporazione furono eseguiti in solventi ICH classe 3.

L'evaporazione della soluzione della classe 2 in EtOAc sotto un flusso di N_2 portò a un materiale cristallino con un modello PXRD



corrispondente alla classe 2 (PP415-P47, FIG. 130). TG-FTIR (FIG. 80) mostra la tipica perdita della massa in due stadi della classe 2 (totale di ~7,9% in peso di EtOAc) a temperature fino a 240°C, indicando molecole di solvente legate molto saldamente.

5 L'evaporazione in etile formiato inoltre forniva il materiale cristallino della classe 2 e non la forma amorfa (PP415-P48, FIG. 131). TG-FTIR (FIG. 78) mostra la perdita della massa di ~3,5% in peso etile formiato, dapprima gradualmente e poi in uno stadio evidente fra 180°C e 200°C. Ci possono essere ulteriori perdite di etile
10 le formiato concomitanti con la decomposizione a $T > 240^{\circ}\text{C}$.

Comunque, il materiale della classe 2 fu trasformato con successo nella forma amorfa, classe 1, aggiungendo una soluzione di acetone a un bagno di acqua fredda (5°C) (PP415-P49, FIG. 132).

Questo metodo diretto per la preparazione della forma amorfa
15 fornisce risultati migliori ed è la via più promettente rispetto al procedimento in due stadi.

Tabella 28. Sommario degli esperimenti allo scopo di ottenere la forma amorfa direttamente dal materiale di partenza della classe 2

Campione	Metodo	Solvente	Condizione	Risultato
PP415-P42	evaporazione	THF	flusso di N ₂ , 1 giorno	classe 1
PP415-P43	evaporazione	8:2 THF/esano	flusso di N ₂ , 1 giorno	classe 2
PP415-P47	evaporazione	EtOAc	flusso di N ₂ , 1 giorno	classe 2

PP415-P48	evaporazione	etile formiato	flusso di N ₂ , 1 giorno	classe 2
PP415-P49	precipitazione	acetone	bagno di H ₂ O a 5°C	classe 1

9. Strumentale - Condizioni di Misurazione Tipiche

Spettroscopia FT-Raman: *Bruker RFS100* col software OPUS 6.5; eccitazione Nd:YAG 1064-nm, detector Ge, intervallo 3500-100 cm⁻¹; condizioni di misurazione tipiche: energia laser nominale 100-300 mW, 5 64-128 scansioni, risoluzione 2 cm⁻¹.

PXRD: *Stoe Stadi P*; *Detector* Mythen1K; radiazione Cu-K α ; condizioni di misurazione standard: trasmissione; energia della tubazione 40 kV e 40 mA; monocromatore Ge curvo; dimensione dello stadio 0,02 °2 θ , tempo dello stadio 12 s o 60 s, intervallo di scansione 1,5- 10 50,5 °2 θ o 1,0-55 °2 θ ; modalità del detector: scansione dello stadio; stadio del detector 1 °2 θ o 6 °; preparazione del campione standard: da 10 a 20 mg di campione furono collocati tra due fogli di acetato; porta-campione: porta-campione di trasmissione Stoe; il campione fu fatto ruotare durante la misurazione.

15 **TG-FTIR:** *Netzsch Thermo-Microbalance TG 209* con *Bruker FT-IR Spectrometer Vector 22*; crogiolo di alluminio (con microfori), atmosfera N₂, velocità di riscaldamento 10 K/min, intervallo 25-250°C o 25-350°C.

20 **DSC:** *Perkin Elmer DSC 7*; crogiolo d'oro (chiuso o con microfori), campione riempito in ambiente di N₂, velocità di riscaldamento 10 K/min, intervallo da -50 a 250°C o 350°C, a tempi di decomposi-

zione con raffreddamento (a -200 K/min) a -50°C fra le scansioni.

DVS: *Projekt Messtechnik Sorptions Prüfsystem SPS 11 - 100n o Sistemi di Misurazione della Superficie DYS-1.* Il campione fu collocato su un contenitore di alluminio o di platino sulla parte superiore di una microbilancia e lasciato equilibrare per 2 h a 50% r.h. prima dell'inizio del programma di umidità pre-definito:

(1) $50 \rightarrow 0\%$ r.h. ($5\%/h$); 5 h un 0% r.h.

(2) $0 \rightarrow 95\%$ r.h. ($5\%/h$); 5 h a 95% r.h.

(3) $95 \rightarrow 50\%$ r.h. ($5\%/h$); 2 h a 50% r.h.

10 L'igroscopicità fu classificata in base all'aumento della massa a 85% r.h. rispetto alla massa iniziale come segue: deliquescente (sufficiente acqua assorbita per formare un liquido), molto igroscopico (aumento della massa $\geq 15\%$), igroscopico (aumento della massa $< 15\%$ ma $\geq 2\%$), leggermente igroscopico (aumento della massa $< 2\%$ ma $\geq 0,2\%$), o non-igroscopico (aumento della massa $< 0,2\%$).

Solventi: per tutti gli esperimenti, furono usati solventi di grado analitico Fluka, Merck, o ABCR.

Determinazione della Solubilità Approssimata: Le solubilità approssimate furono determinate mediante una diluizione graduale di una sospensione di circa 10 mg di sostanza in 0,05 ml di solvente. Se la sostanza non era disciolta mediante addizione di un totale di $> 10\text{ ml}$ di solvente, la solubilità è indicata come $< 1\text{ mg/ml}$. A causa dell'errore sperimentale inerente in questo metodo, i valori di solubilità sono intesi per essere considerati come valori stimati grezzi e devono essere usati soltanto per il disegno degli esperi-

menti di cristallizzazione.

Determinazione della Stabilità Chimica: Furono preparati quattro campioni di 1,0 mg del materiale PP415-P1 in 1,0 ml del rispettivo solvente. Le risultanti sospensioni/soluzioni furono equilibrate in uno scuotitore *Eppendorf Thermomixer Comfort* a temperatura controllata per 7 giorni, 2 giorni, 24 h, e 6 h a 25°C a una velocità di agitazione di 500 rpm. Se necessario, la fase solida fu separata mediante un filtro da centrifugazione (membrana PVDF 0,5- μ m). I fil-
trati furono diluiti nel diluente (0,1% di acido formico in MeCN) a concentrazioni $\leq 0,2$ mg/ml (sconosciuta e probabilmente inferiore per le sospensioni) ed esaminati usando il metodo HPLC fornito nella Tabella 29. Come riferimento, il materiale PP415-P1 fu diluito nel diluente a una concentrazione di 0,25 mg/ml e aggiunto all'inizio e alla fine della sequenza HPLC.

15 Risultati HPLC

Tabella 29. Metodo HPLC usato per le determinazioni della stabilità chimica

Colonna	Zorbax Eclipse XDB-C18, 3 X 150 mm, 5 μ m (CC19)		
Eluente A	H ₂ O + 0,1% acido formico		
Eluente B	MeCN + 0,1% acido formico		
Gradiente	0 min	50% A	50% B
	10,0 min	10% A	90% B
	15,0 min	0% A	100% B
	15,1 min	50% A	50% B

Allyo Monteb

	20,0 min	50% A	50% B
Flusso	0,75 ml/min		
Volume di iniezione	10 µl		
Lunghezza d'onda	254 nm, 242 nm, 210 nm		
Tempo di acquisizione	20 min		
Tempo di esecuzione	20 min		
Temperatura della colonna	25°C		
Tempo di ritenzione	8,9-9,0 min		

10. Abbreviazioni

Metodi:

AUC analisi dell'area sotto la curva

DSC calorimetria a scansione differenziale

5 DVS assorbimento dinamico del vapore

FT Raman spettroscopia Raman a trasformata di Fourier

¹H-NMR spettroscopia di risonanza magnetica nucleare protonica

HPLC cromatografia liquida a elevata prestazione

PXRD diffrazione della polvere ai raggi X

10 TG-FTIR termogravimetria accoppiata alla spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier

Prodotti chimici:

- 1BuOH 1-butanol
CTABcetiltrimetilammonio bromuro
DCM diclorometano
5 DEE dietilere
DMF *N,N*-dimetilformamide
EtOAc etile acetato
EtOHetanolo
IPE isopropilere
10 MeCNacetonitrile
MEK metiletilchetone
MeOHmetanolo
PEG propilenglicole
PTFEpolitetrafluoroetilene, Teflon
15 2PrOH 2-propanolo, isopropanolo
SDS sodio dodecilsolfato
TBME *terz*-butilmetilere
TEA trietilamina
THF tetraidrofurano
20 Tween 80 poliossietilene (80) sorbitanmonooleato o polisorbato 80

Geni, Proteine, e Parametri biologici:

- AIM antiossidante modulatore dell'inflammazione
Akr1cl aldo-cheto riduttasi famiglia 1, membro cl
ALP fosfatasi alcalina
25 ALT alanina transaminasi

ARE elemento di risposta antiossidante

AST aspartato transaminasi

AUC area sotto la curva

BAL lavaggio broncoalveolare

5 BALF fluido di lavaggio broncoalveolare

Bil bilirubina

BUN azoto ureico del sangue

COPD malattia polmonare ostruttiva cronica

COX-2 cicloossigenasi-2

10 Cr creatina

CYP450 citocromo P450

Eh-1 epossido idrolasi 1

G6PD glucosio-6 fosfato deidrogenasi

Gclc glutammato-cisteina ligasi, subunità catalitica

15 Gclm glutammato-cisteina ligasi, subunità modificatrice

Ggt1 gamma-glutamyltransferasi

Glr x glutaredoxina-1

Glu glucosio

GOT transaminasi glutammica-oxaloacetica

20 GPT1 transaminasi glutammica-piruvato

Gpx3 glutathione perossidasi 3

GSH glutathione

GSR glutathione riduttasi

GSs glutathione sintetasi

25 GST glutathione S-transferasi

- GSTa1 glutatione S-transferasi alfa 1
GSTp1 glutatione S-transferasi pi 1
Gy Gray
H6PD esoso-6-fosfato deidrogenasi
- 5 hERG gene umano di etere a-go-go-correlato
HMOX1 eme-ossigenasi (decycling) 1
HO-1 eme-ossigenasi
IFN γ interferone-gamma
IL interleuchina
- 10 iNOS sintasi inducibile dell'ossido nitrico
I κ B α fattore nucleare dell'attivatore del gene kappa del polipeptide
leggero inibitore nelle cellule B, alfa
KC proteina correlata a IL-8 di topo
Keap 1 proteina 1 associata a ECH tipo Kelch
- 15 LPS lipopolisaccaride
ME1 enzima malico 1
MPCE eritrociti policromatici micronucleari
Mrp proteina correlata a metG
Mrps proteina correlata alla resistenza multifarmaco
- 20 NADPH nicotinammide adenina dinucleotide fosfato, ridotta
NF κ B fattore nucleare dell'attivatore della catena leggera kappa delle
cellule B attivate
NO ossido nitrico
NQO1 NAD(P)H chinone ossidoriduttasi 1
- 25 Nrf2 fattore nucleare (eritroide-derivato)-tipo 2

p-I κ B α I κ B α fosforilato

PBMC cellule mononucleari di sangue periferico

PCE eritrociti policromatici

PGD fosfogluconato deidrogenasi

5 PMN polimorfonucleare

RANTES cellula T regolata e normale espressa e secreta

SODI superossido dismutasi 1

SRXN1 sulfiredoxina-1

TG gliceridi totali

10 TKT transchetolasi

TNF α fattore alfa di necrosi tumorale

Txn tioredoxina

TXNRD1 tioredoxina-riduttasi 1

xCT veicolo del soluto famiglia 7, membro 11

15 **Misc:**

API componente farmaceuticamente attivo

aq. acquoso

p.eb. punto di ebollizione

crist. cristallino

20 decomp. decomposizione

d giorno(i)

eq. equivalente

equil. equilibrizzazione

evap. evaporazione

25 h ora(e)

PRL078ESM

mat.materiale

min minuto(i)

m.p.punto di fusione

MS setacci molecolari

5 part. parzialmente

precip. precipitazione

r.h.umidità relativa

rpm giri per minuto

t.a.temperatura ambiente (~25°C)

10 S/N segnale-rumore (rapporto)

solv. solvente

susp. sospensione

T temperatura

T_g temperatura di transizione vetrosa

15 theo. teorico

vis. obs. osservazione visiva

w settimana(e)

% in peso percento in peso

K. Tabelle Ulteriori

20 **Tabella 30: Lista dei campioni ed esperimenti effettuati**

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
PP415-P1	ricevuti ~5g di 63415, lotto # 0141-66-1, il 25 marzo 2011; MW = 554,7 g/mole, C ₃₃ H ₄₄ F ₂ N ₂ O ₃	FT-Raman: PP415P1.0 PP415P1.1	FT-Raman: usato come ri- ferimento per P1 PXRD: amorfo, nessun mo- dello di picco cristal-

Giuseppe Monteleone

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
		PXRD: 117a TG-FTIR: a4285 1H-NMR: Mar30-2011- ktr/30 DSC: d_9840 DVS: #0305_02 post-DVS Ra- man: PP415P1_aDVS post-DVS PXRD: 179a	lino TG-FTIR: perdita di ~0,9% in peso (~0,1 eq.) EtOH con tracce di H ₂ O da 25°C a 200°C, decom- posizione a T > 290°C 1H-NMR: in accordo con la struttura, ~0,08 eq. di EtOH DSC: prima scansione: Tg = 152,7°C (ΔC_p = 0,72 J/g°C); seconda scansio- ne: Tg = 149,7°C (ΔC_p = 0,45 J/g°C) DVS: leggermente igro- scopica; Δm = +0,4% (50%→85% r.h.); aumento totale della massa di 2,1% in peso da 0% r.h. a 95% r.h. Raman post-DVS e PXRD: invariati
PP415-P2	materiale stoccato di PP415-P1 a 25°C aperto su una soluzione satura di NH ₄ NO ₃ (cioè, a ~62% r.h.); campioni esaminati dopo 1 w (PP415-P2a), 2w (PP415- P2b), e 4 w (PP415-P2c).	PXRD: 132a (-P2a) 191a (-P2b) 262a (-P2c)	PXRD: tutto amorfo, cor- risponde a P1
PP415-P3	materiale stoccato di PP415-P1 a 40°C aperto su una soluzione satura di NaCl (cioè, a ~75% r.h.); campioni esaminati dopo 1 w (PP415-P3a), 2 w (PP415- P3b), e 4 w (PP415-P3c).	PXRD: 133a (-P3a) 192a (-P3b) 263a (-P3c)	PXRD: tutto amorfo, cor- risponde a P1
PP415-P4	materiale stoccato di	PXRD: 134a (-	PXRD: tutto amorfo, cor-

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	PP415-P1 a 60°C in un contenitore chiuso; campioni esaminati dopo 1 w (PP415-P4a); 2 w (PP415-P4b), e 4 w (PP415-P4c).	P4a) 193a (- P4b) 264a (- P4c)	risponde a P1
PP415-P5	materiale stoccato di PP415-P1 a 80°C in un contenitore chiuso; campioni esaminati dopo 1 w (PP415-P5a), 2 w (PP415-P5b), e 4 w (PP415-P5c).	PXRD: 135a (- P5a) 194a (- P5b) 265a (- P5c)	PXRD: tutto amorfo, corrisponde a P1
PP415-P6	97,7 mg sospesi di PP415-P1 in 0,4 ml di 2PrOH; ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; aggiunto gradualmente un totale di 0,5 ml di solvente nei successivi due giorni; dopo 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione (membrana PTFE da 0,20 μ m); materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P6.0 PXRD: 225a TG-FTIR: a4323	Raman: corrisponde alla classe 3 PXRD: corrisponde alla classe 3 TG-FTIR: perdita di ~5,4% in peso di 2PrOH da 25°C a 250°C, la maggior parte di esso in uno stadio da ~170°C a 190°C; la decomposizione inizia a T>250°C
PP415-P7	104,3 mg di PP415-P1 sospesi in 0,6 ml di 1:2 EtOAc/eptano; ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a 22°C con agitazione a 400	FT-Raman: PP415P7.0 PXRD: 227a TG-FTIR: a4338	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: perdita di ~7,5% in peso di EtOAc e

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	rpm; aggiunto gradualmente un totale di 0,2 ml di miscela solvente nei successivi due giorni; dopo 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.		eptano in due stadi da ~100°C a 290°C; la decomposizione inizia a T > 290°C
PP415-P8	102,0 mg di PP415-P1 sospesi in 0,4 ml di 1:2 acetone/esano; ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; aggiunto gradualmente un totale di 0,2 ml di miscela solvente nei successivi due giorni; dopo 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante Spettroscopia FT-Raman e PXRD.	FT-Raman: PP415P8.0 PXRD: 228a	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2
PP415-P9	102,6 mg di PP415-P1 sospesi in 0,4 ml di 1:3 toluene/dietilene; ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a	FT-Raman: PP415P9.0	Raman: corrisponde alla classe 2, contiene segnali di solvente

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	22°C con agitazione a 400 rpm; aggiunto gradualmente un totale di 0,2 ml di miscela solvente nei successivi due giorni; dopo 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante Spettroscopia FT-Raman.		
PP415-P10	102,5 mg di PP415-P1 sospesi in 0,2 ml di 1:3 MeOH/TBME; ottenuta una soluzione limpida; soluzione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; dopo 1 giorno osservata una sospensione densa; aggiunti 0,2 ml di miscela solvente; continuava l'equilibratura della sospensione a 22°C con agitazione a 400 rpm; dopo un totale di 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante Spettroscopia FT-Raman e PXRD.	FT-Raman: PP415P10.0 PXRD: 229a	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2
PP415-P11	97,1 mg di PP415-P1 sospeso in 0,4 ml di 1:2 MEK/cicloesano; ottenuta una sospensione bianca;	FT-Raman: PP415P11.0	Raman: corrisponde alla classe 2, contiene segnali di solvente



Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	sospensione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; dopo 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante Spettroscopia FT-Raman.		
PP415-P12	98,6 mg di PP415-P1 sospesi in 0,2 ml di 9:1 EtOH/H ₂ O; ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; aggiunto gradualmente un totale di 0,2 ml di miscela solvente nei successivi due giorni; dopo 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante Spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P12.0 PXRD: 230a TG-FTIR: a4324	Raman: corrisponde alla classe 3 PXRD: corrisponde alla classe 3 TG-FTIR: perdita di ~4,9% in peso di EtOH (con tracce di acqua) da 25°C a 250°C, la maggior parte di esso in uno stadio da ~160°C a 190°C; la decomposizione inizia a T>250°C
PP415-P13	95,9 mg di PP415-P1 sospesi in 0,2 ml di 7:3 MeCN/H ₂ O; ottenute due fasi limpide, separate; soluzione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; dopo 1 giorno osservata	FT-Raman: PP415P13.0 PXRD: 231a TG-FTIR: a4321	Raman: corrisponde alla classe 4, contiene segnali di solvente PXRD: corrisponde alla classe 4 TG-FTIR: perdita di ~3,4% in peso MeCN (con

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	una sospensione densa; aggiunti 0,2 ml di miscela solvente; continuava l'equilibrazione della sospensione a 22°C con agitazione a 400 rpm; dopo un totale di 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante Spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.		tracce di acqua) da 25°C a 270°C, la maggior parte di esso in uno stadio da ~180°C a 210°C; la decomposizione inizia a T>270°C
PP415-P14	95,8 mg di PP415-P1 sospesi in 0,2 ml di 9:1 THF/H ₂ O; ottenute due fasi limpide, separate; soluzione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; dopo 1 giorno osservata una fase limpida; aggiunti 0,2 ml di H ₂ O; osservato un precipitato bianco; sospensione equilibrata a 22°C con agitazione a 400 rpm; dopo un totale di 15 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione (membrana PTFE da 0,20 μm); materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale	FT-Raman: PP415P14.0 PXRD: 232a TG-FTIR: a4322	Raman: corrisponde alla classe 5, contiene segnali di solvente PXRD: corrisponde alla classe 5 TG-FTIR: perdita di ~36,1% in peso THF e H ₂ O da 25°C a 200°C, la maggior parte di esso in uno stadio da ~100°C a 130°C; la decomposizione inizia a T > 300°C



Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.		
PP415-P15	100,6 mg di PP415-P1 disciolti in 0,2 ml di 1:2 DCM/IPE; ottenuta una soluzione limpida; osservata precipitazione di un solido bianco in <1 min; aggiunti 0,2 ml di miscela solvente; fiala coperta con tessuto a singolo strato e il solvente è lasciato evaporare in condizioni ambiente; ottenuto materiale solido bianco, umido dopo diverse ore; solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD.	FT-Raman: PP415P15.0 PXRD: 137a	Raman: corrisponde alla classe 2, contiene segnali di solvente PXRD: corrisponde alla classe 2
PP415-P16	100,3 mg di PP415-P1 disciolti in 0,2 ml di 1:2 MeOH/toluene; ottenuta una soluzione limpida; fiala coperta con tessuto a singolo strato e il solvente è lasciato evaporare in condizioni ambiente; ottenuto materiale vetroso dopo diversi giorni; materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman.	FT-Raman: PP415P16.0	FT-Raman: corrisponde alla classe 1, contiene picchi di solvente toluene
PP415-P17	101,0 mg di PP415-P1 disciolti in 0,3 ml di 1:3 EtOAc/eptano; ottenuta una soluzione limpida; osse-	FT-Raman: PP415P17.0 PXRD: 138a	Raman: corrisponde alla classe 2, contiene segnali di solvente PXRD: corrisponde alla classe

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	vata precipitazione di un solido bianco in <1 min; aggiunti 0,2 ml di miscela solvente; fiala coperta con tessuto a singolo strato e il solvente è lasciato evaporare in condizioni ambiente; ottenuto materiale solido bianco, umido dopo diverse ore; solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD.		2
PP415-P18	materiale di PP415-P15 essiccato sotto vuoto (2-20 mbar) un t.a. per ~2 h; solido bianco, essiccato, esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P18.0 PXRD: 149a TG-FTIR: a4301	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: perdita di ~7,0% in peso di IPE in due stadi da ~140°C a ~250°C; decomposizione a T > 250°C
PP415-P19	materiale di PP415-P17 essiccato sotto vuoto (2-20 mbar) un t.a. per ~2 h; solido bianco, essiccato, esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P19.0 PXRD: 150a TG-FTIR: a4302	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: perdita di ~7,6% in peso di eptano in due stadi da ~140°C a ~270°C; decomposizione a T > 270°C
PP415-P20	98,8 mg di PP415-P1 sospesi in 2,0 ml di H ₂ O; sospensione riscaldata a 50°C; aggiunti lentamente e gradualmente 4,0 ml di	FT-Raman: PP415P20.0 PXRD: 226a	Raman: corrisponde alla classe 3, contiene segnali di solvente PXRD: corrisponde alla classe 3

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	acetone; ottenuta una soluzione limpida; soluzione riscaldata a 55°C e mantenuta a 55°C per 30 min; raffreddata lentamente in 4 h e 10 min a 5°C (a ~0,2 K/min); recuperato solido mediante filtrazione sotto vuoto (dimensione dei pori P4); solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD.		
PP415-P21	100,9 mg di PP415-P1 sospesi in 2,0 ml di cicloesano; sospensione riscaldata a 70°C; aggiunti lentamente e gradualmente 0,5 ml di cicloesano e 0,5 ml di EtOH; la sospensione sottile diviene più spessa a causa della precipitazione addizionale nel corso dell'aggiunta del solvente; sospensione riscaldata a 75°C e mantenuta a 75°C per 30 min; raffreddata lentamente in 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); recuperato un solido mediante filtrazione sotto vuoto (dimensione dei pori P4); solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P21.0 PXRD: 218a TG-FTIR: a4326	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: perdita di ~5,8% in peso di cicloesano in due stadi da ~140°C a ~250°C; decomposizione a T > 250°C



Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
PP415-P22	151,1 mg di PP415-P1 sospesi in 1,5 ml di toluene; sospensione riscaldata a 70°C; ottenuta una soluzione limpida; aggiunti 0,5 ml di MeCN; soluzione riscaldata a 75°C e mantenuta a 75°C per 30 min; raffreddata lentamente in 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); osservata una soluzione limpida e nessuna precipitazione; soluzione limpida agitata a 5°C per 2 giorni; nessuna precipitazione osservata; solvente evaporato in corrente di N ₂ a t.a.; ottenuta una sostanza vetrosa; esaminata mediante spettroscopia FT-Raman.	FT-Raman: PP415P22.0	Raman: corrisponde alla classe 1, contiene segnali di solvente
PP415-P23	150,6 mg di PP415-P1 sospesi in 1,5 ml di diossano; sospensione riscaldata a 70°C; ottenuta una soluzione limpida; aggiunti 0,5 ml di EtOAc; soluzione riscaldata a 75°C e mantenuta a 75°C per 30 min; raffreddata lentamente in 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); osservata una soluzione limpida e nessuna precipitazione; soluzione limpida agitata a 5°C per 2 giorni; nessuna precipitazione osservata; solvente evapo-	FT-Raman: PP415P23.0	Raman: corrisponde alla classe 1, contiene segnali di solvente



Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	rato in corrente di N ₂ a t.a.; ottenuta una sostanza vetrosa; esaminata mediante spettroscopia FT-Raman.		
PP415-P24	99,4 mg di PP415-P1 sospesi in 0,3 ml di 1BuOH; sospensione riscaldata a 70°C; ottenuta una soluzione limpida; subito dopo osservata precipitazione di un solido bianco; aggiunti 0,5 ml di 1BuOH; ancora sospensione; sospensione riscaldata a 75°C e mantenuta a 75°C per 30 min; raffreddata lentamente in 5 h a 5°C (a ~0,23 K/min); recuperato un solido mediante filtrazione sotto vuoto (dimensione dei pori P4); solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P24.0 PXRD: 219a TG-FTIR: a4325	Raman: corrisponde alla classe 2, contiene segnali di solvente PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: perdita di ~16,6% in peso di 1BuOH in uno stadio da ~50°C a ~160°C, ulteriore perdita di 1BuOH (6,6% in peso) in un secondo stadio da 160°C a 230°C; decomposizione a T > 230°C
PP415-P25	materiale di PP415-P25 essiccato sotto vuoto: a 60°C e ~5 mbar per ~1 h; un t.a. e ~3 mbar per 4,5 giorni; a 60°C. e ~10 mbar per 1 h; a 40-50°C e 5-20 mbar per -20 h, solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD,	FT-Raman: PP415P25.0 PXRD: 258a TG-FTIR: a4337	Raman: corrisponde alla classe 3 PXRD: corrisponde alla classe 3 TG-FTIR: perdita di ~5,4% in peso di 2PrOH da 50°C a 250°C, la maggior parte di esso in uno stadio da 170°C a

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	e TG-FTIR.		190°C, un'altra perdita di ~1,0% in peso di 2PrOH da 290°C a 320°C; decomposizione a T > 320°C
PP415-P26	materiale di PP415-P13 essiccato sotto vuoto: a 60°C e ~5 mbar per ~1 h; a t.a. e ~3 mbar per 4,5 giorni; a 60°C e ~10 mbar per 1 h; a 40-50°C e 5-20 mbar per ~20 h, solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P26.0 PXRD: 259a TG-FTIR: a4335	Raman: corrisponde alla classe 4 PXRD: corrisponde alla classe 4 TG-FTIR: perdita di ~2,8% in peso di MeCN da 170°C a 250°C; decomposizione a T > 300°C
PP415-P27	materiale di PP415-P14 essiccato sotto vuoto: a 60°C e ~5 mbar per ~1 h; a t.a. e ~3 mbar per 4,5 giorni; a 60°C e ~10 mbar per 1 h; a 40-50°C e 5-20 mbar per ~20 h, solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P27.0 PXRD: 260a TG-FTIR: a4336	Raman: sembra corrispondere a una miscela della classe 1 e della classe 5 PXRD: il campione è soltanto parzialmente cristallino; alcuni picchi ampi corrispondono alla classe 5; pertanto corrisponde a una miscela della classe 1 e classe 5 amorfe TG-FTIR: perdita di ~0,3% in peso da 25°C a 290°C; decomposizione a T > 290°C
PP415-P28	materiale di PP415-P21 essiccato sotto vuoto: a 60°C e ~5 mbar per ~1 h; a t.a. e ~3 mbar per 4,5 giorni; a 60°C e ~10 mbar	FT-Raman: PP415P28.0 PXRD: 261a TG-FTIR: a4334	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2, campione meno cristallino, come indi-

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	per 1 h; a 40-50°C e 5-20 mbar per ~20 h, solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TG-FTIR.		cato dai picchi più ampi TG-FTIR: perdita di ~3,0% in peso di cicloesano in due stadi da ~140°C a ~250°C; decomposizione a T > 250°C
PP415-P29	132,2 mg di PP415-P1 sospesi in 0,8 ml di 1:2 EtOAc/TEA; osservata variazione nell'aspetto della fase solida; agitata e trattata con ultrasuoni; sospensione equilibrata a 24°C con agitazione a 500 rpm; dopo 4 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione (membrana PTFE da 0,20 µm); materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD; materiale essiccato per 5 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P29.0 PXRD: 282a TG-FTIR: a4346	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: perdita di ~5,1% in peso EtOAc e TEA da ~50°C a ~220°C, la maggior parte di esso in uno stadio da 180°C a 210°C; decomposizione a T > 220°C
PP415-P30	materiale di PP415-P7 essiccato sotto vuoto a 50-70°C e 1-10 mbar per 3 giorni; solido esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, e TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P30.0 PXRD: 290a TG-FTIR: a4347	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: perdita di ~2,1% in peso di eptano (e di una certa quantità di EtOAc) in due stadi da ~50°C a ~250°C; decomposizione a T > 250°C
PP415-P31	137,6 mg di PP415-P1 sospesi in 2 ml di 9:1	FT-Raman:	Raman: corrisponde alla classe 1

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	H ₂ O/PEG 400; ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a 24°C con agitazione a 400 rpm; dopo 5 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione sotto vuoto; solido lavato tre volte con piccole quantità di H ₂ O; materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman e PXRD.	PP415P31.0 PXRD: 320a	PXRD: amorfo, corrisponde alla classe 1
PP415-P32	materiale di PP415-P19 essiccato sotto vuoto a 80°C e $<1 \times 10^{-3}$ mbar; dopo 1 giorno materiale esaminato mediante TG-FTIR (a4362); essiccamento continuato; dopo un totale di 3 giorni materiale esaminato mediante TG-FTIR (a4365), spettroscopia FT-Raman, e PXRD come P32A.	FT-Raman: PP415P32.0 PXRD: 331a (P32A) TG-FTIR: a4362(P32) a4365 (P32A)	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2, meno cristallino TG-FTIR P32: perdita di 2,8% in peso di eptano (25-250°C), la maggior parte di esso in uno stadio da 170°C a 200°C; decomposizione a T > 250°C TG-FTIR P32A: perdita di 2,2% in peso di eptano (25-250°C), la maggior parte di esso in uno stadio da 170°C a 200°C; decomposizione a T > 250°C
PP415-P33	materiale di PP415-P19 essiccato sotto vuoto a 80°C e $<1 \times 10^{-3}$ mbar; dopo 3 giorni materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD e TG-FTIR	FT-Raman: PP415P33.0 PXRD: 332a TG-FTIR:	Raman: corrisponde alla classe 3 PXRD: corrisponde alla classe 3 TG-FTIR: perdita di ~4,2% in peso di 2PrOH

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
		a4366	(50-210°C), la maggior parte di esso in uno stadio da 160°C a 190°C, un'altra perdita di ~0,5% in peso di 2PrOH (210°C a 290°C); decomposizione a T > 290°C
PP415-P34	materiale di PP415-P 19 essiccato sotto vuoto un 80°C e <1x10 ⁻³ mbar; dopo 3 giorni materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD e TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P34.0 PXRD: 333a TG-FTIR: a4367	Raman: corrisponde alla classe 2 PXRD: corrisponde alla classe 2, meno cristallino TG-FTIR: perdita di ~2,3% in peso di cicloesano in due stadi da 25°C a 270°C; decomposizione a T > 270°C
PP415-P35	158,4 mg di PP415-P1 sospesi in 0,2 ml di MeCN/H ₂ O ottenute due fasi limpide, separate; soluzione equilibrata a 24°C con agitazione a 400 rpm; dopo 3 giorni osservata una sospensione densa; aggiunti 0,1 ml di miscela solvente; continuata l'equilibratura della sospensione a 24°C con agitazione a 400 rpm; dopo un totale di 5 giorni recuperato materiale solido mediante filtrazione per centrifugazione(membrana PTFE da 0,20 µm); materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman;	FT-Raman: PP415P35.0 PXRD: 326a TG-FTIR: a4363	Raman: corrisponde alla classe 4, contiene segnali di solvente PXRD: corrisponde alla classe 4 TG-FTIR: perdita di 2,9% in peso di MeCN da 25°C a 250°C; decomposizione a T > 250°C

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	materiale essiccato per 10 min sotto vuoto (10-20 mbar); materiale esaminato mediante PXRD e TG-FTIR.		
PP415-P36	materiale di PP415-P35 essiccato sotto vuoto a 80°C e $<1 \times 10^{-3}$ mbar; dopo 3 giorni materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD e TG-FTIR.	FT-Raman: PP415P36.0 PXRD: 339a TG-FTIR: a4369	Raman: corrisponde alla classe 4 PXRD: corrisponde alla classe 4 TG-FTIR: perdita di ~0,6% in peso (probabilmente H ₂ O e/o MeCN) in due stadi da 25°C a 280°C; decomposizione a T > 280°C
PP415-P37	materiale di PP415-P35 essiccato sotto un flusso di N ₂ a 80°C; dopo 3 giorni materiale esaminato mediante spettroscopia FT-Raman, PXRD, TG-FTIR, DSC, e DVS.	FT-Raman: PP415P37.0 PXRD: 340a TG-FTIR: a4370 DSC: d_9907 DVS: dvs1176 post-DVS PXRD: 363a	Raman: corrisponde alla classe 4 PXRD: corrisponde alla classe 4 TG-FTIR: perdita di ~0,9% in peso (probabilmente H ₂ O e/o MeCN) in due stadi da 25°C a 280°C; decomposizione a T > 280°C DSC: picco endotermico distinto a T = 196,1°C ($\Delta H = 29,31$ J/g); nessuna decomposizione fino a 270°C DVS: leggermente igroscopico; $\Delta m = +0,7\%$ (50%–85% r.h.); aumento totale della massa di 2,1% in peso da 0% r.h. a 95% r.h. post-DVS PXRD: corrisponde alla classe 4



Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
PP415-P38	Esperimento DSC: combinati 1,275 mg di PP415-P1 e 1,344 mg di PP415-P36; equilibrati per 3 min sotto N ₂ ; campione riscaldato da -50°C a 270°C a 10 K/min.	DSC: d_9917	DSC
PP415-P39	Esperimento DSC: combinati 2,17 mg di PP415-P1 e 2,20 mg di PP415-P36; solidi miscelati usando una spatola; equilibrati per 3 min sotto N ₂ ; campione riscaldato da -50°C a 173°C a 10K/min; mantenuto a 173°C per 30 min; riscaldato da 173°C a 270°C a 10 K/min.	DSC: d_9923	DSC
PP415-P40	ricevuti ~5 g di 63415, lotto #: 2083-69-DC il 27 maggio 2011; MW = 554,7 g/mole, C ₃₃ H ₄₄ F ₂ N ₂ O ₃	PXRD: 390a	PXRD: corrisponde alla classe 2
PP415-P41	101,3 mg di PP415-P40 sospesi in 0,20 ml di THF/H ₂ O (1:1); ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a 24°C; dopo 3 giorni recuperato un solido mediante filtrazione per centrifugazione (membrana PTFE 0,2 µm); materiale solido essiccato sotto vuoto per 5 min; solido esaminato mediante PXRD.	PXRD: 400a	PXRD: corrisponde alla classe 5



Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
PP415-P42	104,6 mg di PP415-P40 disciolti in 0,20 ml di THF; ottenuta una soluzione limpida; solvente evaporato sotto un flusso di N ₂ durante la notte; ottenuto un solido bianco; solido esaminato mediante PXRD.	PXRD: 405a	PXRD: amorfo (classe 1)
PP415-P43	101,8 mg di PP415-P40 disciolti in 0,20 ml di THF/esano (8:2); ottenuta una soluzione limpida; solvente evaporato sotto un flusso di N ₂ durante la notte; ottenuto un solido bianco; solido esaminato mediante PXRD.	PXRD: 429a	PXRD: corrisponde alla classe 2
PP415-P44	materiale di PP415-P41 essiccato sotto vuoto (~100 mbar) a 80°C; solido esaminato dopo 1 giorno mediante PXRD (474a); essiccamento continuato durante la notte; solido esaminato nuovamente mediante PXRD (482a) e TG-FTIR.	PXRD: 474a, 482a TG-FTIR: a4401	PXRD: entrambi principalmente amorfi (classe 1), alcuni ampi picchi con bassa intensità TG-FTIR: ~0,9% in peso di THF 25-280°C, decomposizione a T > 300°C
PP415-P45	3,03 g di PP415-P40 sospesi in 6,0 ml di THF/H ₂ O (1:1); ottenuta una sospensione bianca; sospensione equilibrata a t.a.; dopo 1 giorno recuperata una piccola aliquota mediante filtrazione per centrifugazione ed esaminata mediante PXRD; solido recuperato dell'intero	PXRD: 471a	PXRD: corrisponde alla classe 5



Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	campione mediante filtrazione sotto vuoto; campione essiccato per 10 min sotto vuoto (~10 mbar).		
PP415-P46	materiale di PP415-P45 essiccato sotto vuoto (~100 mbar) a 80°C; solido esaminato dopo essiccamento durante la notte mediante PXRD (481 a); essiccamento continuato; dopo 4 giorni solido esaminato come PP415-P46a mediante PXRD (496a) e TG-FTIR.	PXRD: 481a, 496a TG-FTIR: a4410	PXRD: entrambi principalmente amorfi (classe 1), alcuni ampi picchi con bassa intensità TG-FTIR: ~0,4% in peso di H ₂ O 25-250°C, decomposizione a T > 250°C
PP415-P47	101,8 mg di PP415-P40 disciolti in 0,4 ml di EtOAc; ottenuta una soluzione limpida; solvente evaporato sotto un flusso di N ₂ durante la notte; ottenuto un solido bianco; solido esaminato mediante PXRD e TG-FTIR.	PXRD: 492a TG-FTIR: a4412	PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: ~6,2% in peso di EtOAc 25-170°C, 1,7% in peso di EtOAc 170-240°C, decomposizione a T > 240°C
PP415-P48	101,1 mg di PP415-P40 disciolti in 0,4 ml di etile formiato; ottenuta una soluzione limpida; solvente evaporato sotto un flusso di N ₂ durante la notte; ottenuto un solido bianco; solido esaminato mediante PXRD e TG-FTIR.	PXRD: 493a TG-FTIR: a4413	PXRD: corrisponde alla classe 2 TG-FTIR: ~3,5% in peso di etile formiato 25-200°C, decomposizione a T > 200°C
PP415-P49	205,3 mg di PP415-P40 disciolti in 0,3 ml di acetone; ottenuta una soluzione limpida; aggiunti gradualmente a 30,0 ml di	PXRD: 593a	PXRD: amorfo (classe 1)

Campione	Descrizione sperimentale	Metodi di test	Risultati/Osservazioni
	H ₂ O (pre-raffreddati a 5°C); ottenuta una sospensione bianca sottile; sospensione sottile agitata a 5°C durante la notte; ottenuta una sospensione bianca più spessa; recuperato un solido mediante filtrazione sotto vuoto (dimensione dei pori P4); ottenuti 188,3 mg di un solido bianco; solido esaminato mediante PXRD.		

Tabella 31. Parametri di FIG. 51

Composto	Livelli NOx (% vs Controlli LPS)		
	13 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
RTA 405 *	44%	26%	18%
63415	30%	18%	16%

Tabella 32. 63415: Saggi e Punti finali ADMET primario in vivo - ADMET primario chiave

5

Saggio	Punti finali chiave
tossicità 14-giorno nel topo	Tollerabilità, peso corporeo, chimica clinica Distribuzione nei tessuti Espressione dell'mRNA del gene in bersaglio Nrf2 & attivazione enzimatica nel fegato
tossicità 14-giorno nel ratto	Tollerabilità, peso corporeo, chimica clinica, & istopatologia limitata



	Distribuzione tissutale e plasma TK Espressione dell'mRNA del gene in bersaglio Nrf2 & attivazione enzimatica nel fegato
tossicità 14- giorno nella scimmia	Tollerabilità, peso corporeo, chimica cli- nica, & istopatologia limitata Distribuzione tissutale e plasma TK Espressione dell'mRNA del gene in bersaglio Nrf2 e attivazione enzimatica in tessuti multipli & PBMCs

Tabella 33. Parametri di Fig. 54

	Veicolo	63415		
Dose (mg/kg)	0	10	30	100
ALT (U/L)	100	39	63	91
AST (U/L)	156	98	147	167
ALP (U/L)	120	131	110	98
Bil totale (mg/dl)	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
BUN (mg/dl)	17	15	15	15
Cr (mg/dl)	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Glu (mg/dl)	288	307	285	273

**Tabella 34. 63415 è negativo per la genotossicità nello studio mi-
cronucleare in vivo**

5

Trattamento (n=5/gruppo)	PCE/Eritrociti totali (Media +/- SD)	Variazione del control- lo (%)	Numero di MPCE/1000 PCE (Media +/-SD)	Numero del punteggio di MPCE/PCE
punto temporale 24-h				
Olio di se-	0,588 ± 0,04	-	0,2 ± 0,27	2/10000



PRL078ESM

samo				
125 mg/kg	0,543 ± 0,03	-8	0,3 ± 0,27	3/10000
250 mg/kg	0,520 ± 0,06	-12	0,3 ± 0,27	3/10000
500 mg/kg	0,426 ± 0,07	-28	0,0 ± 0,00	0/10000
1000 mg/kg	0,498 ± 0,05	-15	0,2 ± 0,27	2/10000
1500 mg/kg	0,499 ± 0,06	-15	0,4 ± 0,22	4/10000
2000 mg/kg	0,531 ± 0,05	-10	0,2 ± 0,27	2/10000
punto temporale 48-h				
Olio di se- samo	0,526 ± 0,05	-	0,3 ± 0,27	3/10000
125 mg/kg	0,453 ± 0,03	-14	0,2 ± 0,27	2/10000
250 mg/kg	0,391 ± 0,02	-26	0,2 ± 0,27	2/10000
500 mg/kg	0,339 ± 0,05	-36	0,3 ± 0,45	3/10000
1000 mg/kg	0,344 ± 0,04	-35	0,1 ± 0,22	1/10000
1500 mg/kg	0,376 ± 0,05	-39	0,4 ± 0,42	4/10000
2000 mg/kg	0,360 ± 0,03	-32	0,1 6 0,22	1/10000

Tabella 35. Parametri di FIG. 35

Trattamento	Giorno	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Bil tot (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Prot tot (g/dL)	Albumina (g/dL)	Glucosio (mg/dL)	Coolest (mg/dL)	TG (mg/dL)
Veicolo	BL	30	29	320	0,15	23	0,63	7,2	4,1	87	124	52
	giorno 14	37	37	345	0,23	18	0,63	6,9	4,1	63	130	64
10 mg/kg	BL	46	32	351	0,18	35	0,78	7,4	4	74	146	51
	giorno 14	46	38	382	0,23	27	0,68	7,2	4	39	144	82
30 mg/kg	BL	32	32	409	0,18	23	0,7	7,3	4,2	85	125	47
	giorno 14	47	43	416	0,2	20	0,58	7,2	4	53	122	64
100 mg/kg	BL	32	35	381	0,15	24	0,7	6,9	4	96	137	37
	giorno 14	43	37	390	0,18	24	0,55	6	3,2	32	93	61

Spilys Montebell

Tabella 36. Attività in vitro di 63415 e 63355

	63415	63355
NO IC ₅₀ (nM), RAW264.7	4,0 ± 1	0,63 ± 0,06
WST-1 IC ₅₀ (nM), RAW64.7	125	150
NQ01-ARE (volte a 62,5 nM in HuH7)	5,3 ± 1,0	6,5 ± 0,9

Tabella 37. Parametri di FIG. 52

Composto	Plasma	Sangue intero	Cervello	Fegato	Polmone	Reni
RTA 405 (nM)	130	1165	93	1143	1631	2357
63415 (nM)	51	679	1081	985	533	1604

5

Tabella 38. Parametri di FIG. 53

Composto	Fegato	Polmone	Reni
RTA 405	1,93	1,48	8,25
63415	10,9	1,75	10,9

RIFERIMENTI

I seguenti riferimenti possono fornire esemplari procedurali o altri dettagli supplementari a quelli qui descritti.

- 10 Brevetto U.S. 6.326.507
 Brevetto U.S. 6.974.402
 Brevetto U.S. 7.943.778
 Brevetto U.S. 8.124.799



Brevetto U.S. 8.129.429

Pubblicazione del brevetto U.S. 2009/0060873

Abraham and Kappas, Free Radical Biol. Med., 39:1-25, 2005.

Aghajan et al., J Gastroenterol Hepatol., Suppl 2:10-14, 2012.

5 Ahmad et. al., Cancer Res., 68:2920-2926, 2008.

Ahmad et. al., J. Biol. Chem., 281:35764-9, 2006.

Angulo et al., Eur. J. Immunol., 30:1263-1271, 2000.

Araujo et. al., J. Immunol., 171(3):1572-1580, 2003.

Arend and Dayer, Arthritis Rheum., 38:151-160, 1995.

10 Bach, Hum. Immunol., 67(6):430-432, 2006.

Bagasra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:12041-12045, 1995.

Blake et. al. Am JRespir Cell Mol Biol, 42:524-36, 2010.

Berridge et al., Biochemica, 4: 14-19, 1996.

Botoman et al., Am. Fam. Physician, 57(1):57-68, 1998.

15 Brandt et al., Arthritis Rheum., 43:1346-1352, 2000.

Brewerton et al., Lancet., 1:904-907, 1973a.

Brewerton et al., Lancet., 1:956-957, 1973b.

Bronte et al., Trends Immunol., 24:302-306, 2003.

Brown and DuBois J. Clin. Oncol., 23:2840-2855, 2005.

20 Brynskov et al., N. Engl. J. Med., 321(13):845-850, 1989.

Cantin et. al., J Clin Invest, 79:1665-73, 1987.

Cai et al., Nat. Med., 11(2):183-190, 2005.

Calin and Taurog, In: The Spondylarthritides, Calin et. al. (Eds.),
Oxford, UK. Oxford University Press, 179, 1998.

25 Car et. al., Am J Respir Crit Care Med, 149:655-9, 1994.

- Cemuda-Morollon et. al., J Biol Chem, 276:35530-6, 2001.
- Chan and Kan, Proc Natl Acad Sci. USA, 96:12731-6,1999.
- Chauhan and Chauhan, Pathophysiology, 13(3): 171-181. 2006.
- Chen and Kunsch, Curr Pharm Des, 10:879-91, 2004.
- 5 Cho et. al., Am J Respir Cell Mol Biol, 26:175-82, 2002.
- Crowell et al., Mol. Cancer Ther., 2:815-823, 2003.
- Cuzzocrea et. al., Mol Pharmacol, 61:997-1007, 2002.
- Dickerson et. al., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, March 6, 2007.
- 10 Dinarello, Int. Rev. Immunol., 16:457-499, 1998.
- Dinkova-Kostova et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(12):4584-4589, 2005.
- Dionne et al., Clin. Exp. Immunol., 112(3):435-442, 1998.
- Douglas et. al., Am J Respir Crit Care Med, 158:220-5, 1998.
- 15 Dudhgaonkar et. al., Eur. J. Pain, 10(7):573-9, 2006.
- Eastgate et al., Lancet, 2(8613):706-9, 1988.
- Eikelenboom et al., Glia, 40(2):232-239,2002.
- Ettehadi et al., Clin. Exp. Immunol., 96(1):146-151, 1994.
- Fischer et. al.,. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 6:413-21, 2011.
- 20 Forstermann, Biol. Chem., 387:1521, 2006.
- Funakoshi et al., Digestion, 59(1):73-78, 1998.
- Gebel et. al., Toxicol Sci, 115:238-52, 2010.
- Gehrmann et al., Glia, 15(2):141-151, 1995.
- Genain and Nauser, J. Mol. Med., 75:187-197, 1997.
- 25 Goodman et al., Kidney Int., 72(8):945-953, 2007.

- Graeber et al., *Glia*, 40(2):252-259, 2002.
- Greten et al., *Cell*, 118:285-296, 2004.
- Grivennikov and Karin, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(1):11-19, 2010.
- 5 Guilherme et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(5):367-77, 2008.
- Gwee et al., *Gut*, 44(3):400-406., 1999.
- Hallgren et. al., *Am Rev Respir Dis*, 139:373-7, 1989.
- Hahn and Tsao, In: *Dubois' Lupus Erythematosus*, 4th Ed, Wallace and Hahn (Eds.), Lea and Febiger, Philadelphia, 195-201, 1993.
- 10 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use, Stahl and Wermuth Eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- Hanson et. al., *BMC Medical Genetics*, 6(7), 2005.
- Hansson et al., *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1:297-329, 2006.
- Hayden and Ghosh, *Cell*, 132:344-62, 2008.
- 15 He and Karin, *Cell Res.*, 21(1):159-168, 2011.
- Honda et. al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:1027-1030, 2002.
- Honda et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(24):6306-6309, 2006.
- Honda et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:1623-1628, 1997.
- Honda et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8(19):2711-2714, 1998.
- 20 Honda et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9(24):3429-3434, 1999.
- Honda et. al., *J. Med. Chem.*, 43:4233-4246, 2000a.
- Honda et. al., *J. Med. Chem.*, 43:1866-1877, 2000b.
- Hotamisligil, *Nature*, 444(7121):860-7, 2006.
- Iizuka et. al., *Genes Cells*, 10:1113-25, 2005.
- 25 Ikezaki et. al., *Food Chem Toxicol*, 34:327-35, 1996.

- Ishii et. al., J Immunol, 175:6968-75, 2005.
- Ishikawa et. al., Circulation, 104(15):1831-1836, 2001.
- Ishizawa and Dickson, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 60(6):647-657, 2001.
- 5 Jarvis, Curr. Opin. Rheumatol., 10(5):459-467, 1998.
- Jarvis, Pediatr. Ann., 31(7):437-446, 2002.
- Jonsson et al., Oral Dis., 8(3):130-140, 2002.
- Jonsson et al., Trends Immunol., 22(12):653-654, 2001.
- Kahle et al., Ann. Rheum. Dis., 51:731-734, 1992.
- 10 Kaltschmidt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:2642-2647, 1997.
- Karin, Nature, 441(7092):431-436, 2006.
- Kawakami et. al., Brain Dev., 28(4):243-246, 2006.
- Kawamoto et. al., J Biol Chem, 275:11291-9, 2000.
- Kendall-Tackett, Trauma Violence Abuse, 8(2):117-126, 2007.
- 15 Kensler et. al., Annu Rev Pharmacol Toxicol, 47:89-116, 2007.
- Kikuchi et. al., Respir Res, 11:31, 2010.
- Kim et. al., Mutat Res, 690:12-23, 2010.
- King et. al., Am J Respir Crit Care Med, 184:92-99, 2011.
- Kinnula et. al., Am J Respir Crit Care Med, 172:417-22, 2005.
- 20 Klingsberg et. al., Respiriology, 15:19-31, 2010.
- Kortylewski et al., Nat. Med., 11:1314-1321, 2005.
- Kotzin and O'Dell, In: Samler's Immunologic Diseases, 5th Ed., Frank et al. (Eds.), Little Brown & Co., Boston, 667-697, 1995.
- Kotzin, Cell, 85:303-306, 1996.
- 25 Kruger et. al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 319(3):1144-1152, 2006.

- Kuboyama, Kurume Med. J., 45(1):33-37, 1998.
- Lee et. al., Mol Cell, 36:131-40, 2009.
- Lee et. al., Glia., 55(7):712-22, 2007.
- Lencz et. al., Mol. Psychiatry, 12(6):572-80, 2007.
- 5 Levonen et. al., Biochem J, 378:373-82, 2004.
- Li and Kong, Mol Carcinog, 48:91-104, 2009.
- Liby et. al., Cancer Res., 65(11):4789-4798, 2005.
- Liby et. al., Mol. Cancer Ther., 6(7):2113-9, 2007b.
- Liby et. al., Nat. Rev. Cancer, 7(5):357-356, 2007a.
- 10 Lipsky, In: Harrison's principles of internal medicine, Fauci et al.(Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880-1888, 1998.
- Liu et. al., FASEB J., 20(2):207-216, 2006.
- Lu et. al., J. Clin. Invest., 121(10):4015-29, 2011.
- Lugering et al., Ital. J. Gastroenterol. Hepatol., 30(3):338-344, 15 1998.
- Malhotra et. al., Am J Respir Crit Care Med, 178:592-604, 2008.
- March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms; and structure, 2007.
- Mazur et al., Cell Microbiol., 9(7):1683-94, 2007.
- 20 Mazzoni et al., J. Immunol., 168:689-695, 2002.
- McAlindon et al., Gut, 42(2):214-219, 1998.
- McGeer and McGeer, Brain Res. Brain Res. Rev., 21:195-218, 1995.
- McGeer et al., Neurology, 19:331-338, 1996.
- McGonagle et al., Arthritis Rheum., 41:694-700, 1998.
- 25 McGonagle et al., Curr. Opin. Rheumatol., 11:244-250, 1999.

- McIver et. al., Pain, 120(1-2):161-9, 2005.
- Mease et al., Lancet, 356:385-390, 2000.
- Merrill and Benvenist, Trends Neurosci., 19:331-338, 1996.
- Mochizuki et. al., Am J Respir Crit Care Med, 171:1260-6, 2005.
- 5 Morbidity & Mortality: 2009 Chart Book on Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases. National Heart, Lung, and Blood Institute, 2009.
- Morris et. al., J. Mol. Med., 80(2):96-104, 2002.
- Morse and Choi, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 172(6):660-670, 2005.
- 10 Morse and Choi, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 27(1):8-16, 2002.
- Nath et al., Neurology, 66(1):149-150, 2006.
- Neal et al., BMJ., 314(7083):779-782, 1997.
- Nichols, Drug News Perspect., 17(2):99-104, 2004.
- Ohnishi et al., Int. Immunol., 6:817-830, 1994.
- 15 Ogushi et. al., J Med Invest, 44:53-8, 1997.
- Pall, Med. Hypoth., 69:821-825, 2007.
- Parambil et. al., Chest, 128:3310-5, 2005.
- Partsch et al., Br. J. Rheumatol., 24:518-523, 1997.
- Pergola et. al., N Engl J Med, 365:327-336, 2011.
- 20 Pica et al., Antimicrob Agents Chemother., 44(1):200-4, 2000.
- Pimentel et al., Am. J. Gastroenterol., 95(12):3503-3506, 2000.
- Place et. al., Clin. CancerRes., 9(7):2798-806, 2003.
- Prochaska and Santamaria, Anal Biochem., 169:328-336, 1988.
- Rajakariar et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(52):20979-84, 25 2007.

- Rangasamy et. al., J Clin Invest, 114:1248-59, 2004.
- Rangasamy et. al., J Exp Med, 202:47-59, 2005.
- Reimund et al, Eur. J. Clin. Invest., 28(2):145-150, 1998.
- Renauld, J Clin Pathol, 54:577-89, 2001.
- 5 Rogler and Andus, World J. Surg., 22(4):382-389, 1998.
- Rooney et al., Rheumatol. Int., 10:217-219, 1990.
- Ross et. al, Am. J. Clin. Pathol., 120(Suppl):S53-71, 2003.
- Ross et. al., Expert Rev. Mol. Diagn., 3(5):573-585, 2003.
- Rossi et. al., Nature, 403:103-8, 2000.
- 10 Rostom et al., Ann. Intern. Med., 146, 376-389, 2007.
- Ruster et. al., Scand. J. Rheumatol., 34(6):460-3, 2005.
- Sacerdoti et. al., Curr Neurovasc Res., 2(2):103-111, 2005.
- Saha et. al., J Biol Chem, 285:40581-92, 2010.
- Saiki et al., Scand. J. Gastroenterol., 33(6):616-622, 1998.
- 15 Salomonsson et al., Scand. J. Immunol., 55(4):336-342, 2002.
- Salvemini et. al., J. Clin. Invest., 93(5):1940-1947, 1994.
- Sarchielli et. al., Cephalalgia, 26(9):1071-1079, 2006.
- Satoh et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(3):768-773, 2006.
- Schlosstein et al., NE J. Medicine, 288:704-706, 1973.
- 20 Schulz et. al., Antioxid. Redox. Sig., 10:115, 2008.
- Selman et. al., Ann Intern Med, 134:136-51, 2001.
- Sheppard, J Clin Invest, 107:1501-2, 2001.
- Shishodia et. al., Clin Cancer Res, 12:1828-38, 2006.
- Simonian and Coyle, Annu. Rev Pharmacol. Toxicol., 36:83-106, 1996.
- 25 Singh et. al., Free Rad Biol Med, 46:376-386, 2009.

- Sinha et al., Cancer Res., 67:4507-4513, 2007.
- Sporn et. al., J Nat Prod, 74:537-45, 2011.
- Sriram et. al., Pulm Pharmacol Ther, 22:221-36, 2009.
- Stack et. al., Lancet, 349(9051):521-524, 1997.
- 5 Standiford et. al., Chest, 103:121S, 1993.
- Standiford et. al., J Immunol, 151:2852-63, 1993.
- Stewart et al., Neurology, 48:626-632, 1997.
- Straus et. al., Proc Natl Acad Sci USA, 97:4844-9, 2000.
- Strejan et. al., J. Neuroimmunol., 7:27, 1984.
- 10 Strieter, Am J Respir Crit Care Med, 165:1206-7, 2002.
- Suh et. al., Cancer Res., 58:717-723, 1998.
- Suh et. al., Cancer Res., 59(2):336-341, 1999.
- Sussan et al., Proc Natl Acad Sci USA, 106:250-5, 2009.
- Szabo et. al., Nature Rev. Drug Disc., 6:662-680, 2007.
- 15 Takafiashi et. al., Cancer Res., 57:1233-1237, 1997.
- Tamir and Tannebaum, Biochim. Biophys. Acta, 1288:F31-F36, 1996.
- Taniguchi et. al., Eur Respir J, 35:821-9, 2010.
- Targan et al., N. Engl. J. Med., 337(15):1029-1035, 1997.
- Thimmulappa et al., Cancer Research, 62: 5196-5203, 2002.
- 20 Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III, or ATP III), National Institutes of Health, 2001, NIH Publication No. 01-3670.
- Touzani et al., J. Neuroimmunol., 100(1-2):203-215, 1999.
- 25 Tumlin et al., Am. J. Cardiol., 98(6A): 14K-20K, 2006.

- van den Berg, Semin. Arthritis Rheum., 30(5S-2):7-16, 2001.
- van Dullemen et al., Gastroenterol., 109(1):129-135, 1995.
- van Hogezaand and Verspaget, Drugs, 56(3):299-305, 1998.
- Vazquez et al., J. Virol., 79(7):4479-91, 2005.
- 5 Wakabayashi, et. al., Antioxid Redox Signal, 13:1649-63, 2010.
- Wang et al., Cancer Res., 66:10983-10994, 2006.
- Wardle, Nephrol. Dial. Transplant., 16(9): 1764-8, 2001.
- Weyand and Goronzy, Ann. NYAcad. Sci., 987:140-149, 2003.
- Williams et al., Clin. Neurosci., 2(3-4):229-245, 1994.
- 10 Wordsworth, In: Genes and Arthritis, Brit. Medical Bulletin, 51:249-266, 1995.
- Wright, Clin. Orthop. Related Res., 143:8-14, 1979.
- Wu et. al., Toxicol Sci, 123:590-600, 2011.
- Xie et. al., J. Biol. Chem., 270(12):6894-6900, 1995.
- 15 Yates et al., Mol. Cancer Ther, 6(1):154-162, 2007.
- Yore et. al., Mol Cancer Ther, 5:3232-9, 2006.
- Yoh et al., Kidney Int., 60(4):1343-1353, 2001.
- Yu et al., Nat. Rev. Immunol., 7:41-51, 2007.
- Zhou et al., Am. J. Pathol., 166(1):27-37, 2005.
- 20 Zhou et al., Cancer Sci., 98:882-889, 2007.
- Zingarelli et al., J. Immunol, 171(12):6827-6837, 2003.

LISTA DI SEQUENZE

<110> Reata Pharmaceuticals, Inc.

5 <120> DERIVATI DI 2,2-DIFLUOROPROPIONAMMIDE DI BARDOXOLONE METILE,
FORME POLIMORFICHE E LORO METODI D'USO

<130> X3329 EP/1

10 <150> 61/780,444

<151> 2013-03-13

<150> 61/775,288

<151> 2013-03-08

15

<150> 61/687,669

<151> 2012-04-27

<160> 30

20

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Primer di sintesi

30

<400> 1

gctgtggcta ctgcggtatt

20

<210> 2

35

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

40

<223> Primer di sintesi

<400> 2

atctgcctca atgacacat

20

Mylo Montel

PRL078ESM

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 5 <213> Sequenza artificiale

 <220>
 <223> Primer di sintesi

 10 <400> 3
 tccgatgggt ccttacactc 20

 <210> 4
 <211> 20
 15 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale

 <220>
 <223> Primer di sintesi
 20
 <400> 4
 taggctcctt cctcctttcc 20

 <210> 5
 25 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale

 <220>
 30 <223> Primer di sintesi

 <400> 5
 aaaacactgc cctcttgtgg 20

 35 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequenza artificiale

 40 <220>
 <223> Primer di sintesi

 <400> 6

polyo Monteb

PRL078ESM

	gtgccagtca gcatctggta	20
	<210> 7	
	<211> 25	
5	<212> CDNA.	
	<213> Sequenza artificiale	
	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
10	<400> 7	
	gatgagaagg accccacggc gtctg	25
	<210> 8	
15	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
	<220>	
20	<223> Primer di sintesi	
	<400> 8	
	gagacaatcc agcagcccag gaggg	25
25	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
30	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
	<400> 9	
35	attgccactg gtgaaagacc	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
40	<220>	
	<223> Primer di sintesi	

PRL078ESM

	<400> 10	
	accaattttg ttggccatgt	20
5	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
10	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
	<400> 11	
	gaggccgtgt acaccaagat	20
15	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
20	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
	<400> 12	
25	agcagtgggg tgaaaatacg	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
30	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
	<400> 13	
35	aaggcactct acgcttcaa	20
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Sequenza artificiale	
	<220>	
	<223> Primer di sintesi	

PRL078ESM

	<400> 14	
	aggagtcctg gcagttttca	20
5	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
10	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
	<400> 15	
	catctccgag agcaacatca	20
15	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
20	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
	<400> 16	
25	ttgtattggc ggctagttcc	20
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
30	<213> Sequenza artificiale	
	<220>	
	<223> Primer di sintesi	
35	<400> 17	
	tatatcctgg ccaaggcaac	20
	<210> 18	
	<211> 20	
40	<212> DNA	
	<213> Sequenza artificiale	
	<220>	

PRL078ESM

<223> Primer di sintesi

<400> 18

ggataaagcc gaccctcttc

20

5

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

10

<220>

<223> Primer di sintesi

<400> 19

15 tcaggctaca gaagaggctt gc

22

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

20 <213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Primer di sintesi

25 <400> 20

acagtcacag gcttgcgat g

21

<210> 21

<211> 20

30 <212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Primer di sintesi

35

<400> 21

tcgggctagt cccagttaga

20

<210> 22

40 <211> 20

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

Primo Montchi

PRL078ESM

<220>

<223> Primer di sintesi

<400> 22

5 aaagagctgg agagccaacc 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Primer di sintesi

15 <400> 23

cacggagcag gtcttcaacg 20

<210> 24

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Primer di sintesi

25 <400> 24

agaatggtca tccggaaatg 20

<210> 25

30 <211> 20

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

35 <223> Primer di sintesi

<400> 25

cgcggtgcag gtcaactact 20

40 <210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

PRL078ESM

<220>

<223> Primer di sintesi

5 <400> 26
cctcatcagc caggagaaaa 20

<210> 27

<211> 20

10 <212> DNA
<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Primer di sintesi

15 <400> 27
ggctattcgc tatttttgtgt 20

<210> 28

20 <211> 20

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

25 <223> Primer di sintesi

<400> 28

gaccaggtga ttcgtacaat 20

30 <210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

35 <220>

<223> Primer di sintesi

<400> 29

agagtcctct tcagtcattg 20

40

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

Philippe Montch

PRL078ESM

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Primer di sintesi

5

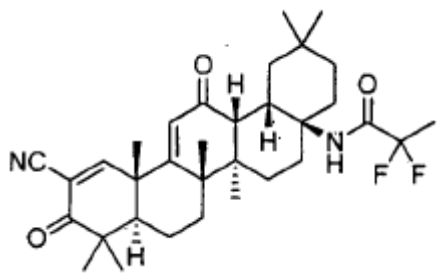
<400> 30

atgattagag cagatggtgg

20

RIVENDICAZIONI

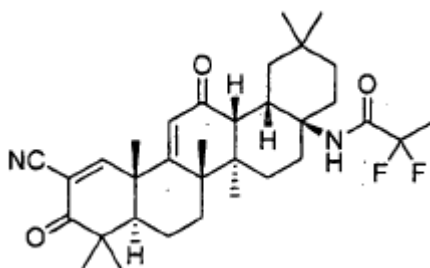
1. Composto di formula:



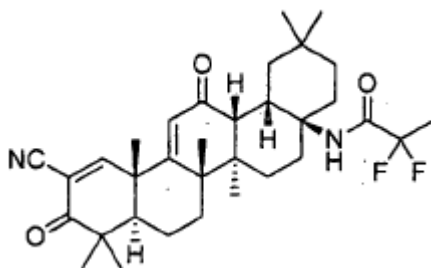
o un suo sale farmaceuticamente accettabile,

5 per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del cancro, in cui il composto è da somministrare in combinazione con una immunoterapia.

2. Composto per l'uso secondo la Rivendicazione 1, che è un composto di formula:



10 3. Forma polimorfica del composto avente la formula:



per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del cancro, in cui la forma polimorfica è da somministrare in combinazione con una immuno-

terapia; e

dove la forma polimorfica ha un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente un picco a circa 14 °2 θ ; o

5 la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 5,6, 7,0, 10,6, 12,7, e 14,6 °2 θ ; o

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,0,
10 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (doppio picco), 14,2, e 16,0 °2 θ ; o

dove la forma polimorfica è un emisolvato di acetonitrile avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,5, 11,4, 15,6, e 16,6 °2 θ ; o

dove la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffra-
15 zione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, e 15,6 °2 θ .

4. Composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del cancro, la composizione farmaceutica comprendendo:

un componente attivo costituito da un composto come definito nelle

20 Rivendicazioni 1 o 2 o una forma polimorfica secondo la Rivendicazione 3, e

un veicolo farmaceuticamente accettabile.

5. Composto per l'uso secondo le Rivendicazioni 1 o 2 o la forma polimorfica per l'uso secondo la Rivendicazione 3 o la composizione
25 farmaceutica per l'uso secondo la Rivendicazione 4, in cui

l'immunoterapia è una immunoterapia mirata per il cancro, una immunoterapia a base di cellule dendritiche, o una immunoterapia delle cellule adottive T.

5 **6.** Composto per l'uso secondo le Rivendicazioni 1 o 2, o la forma polimorfica per l'uso secondo la Rivendicazione 3, o la composizione farmaceutica per l'uso secondo la Rivendicazione 4, in cui l'immunoterapia è un anticorpo mirato per il cancro che è scelto tra trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, ibritumomab tiuxetan, tositumomab, brentuximab vedotin, adotrastuzumab
10 emtansine, e denileukin dititox.

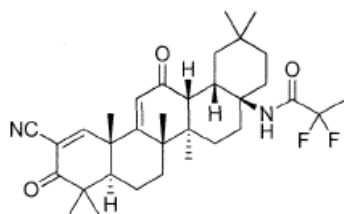
7. Composto per l'uso secondo la Rivendicazione 6, o la forma polimorfica per l'uso secondo la Rivendicazione 6, o la composizione farmaceutica per l'uso secondo la Rivendicazione 6, in cui il cancro è un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, melanoma, mesotelioma,
15 mieloma multiplo o seminoma.

8. Composizione per l'uso secondo la Rivendicazione 7 o la forma polimorfica per l'uso secondo la Rivendicazione 7 o la composizione farmaceutica per l'uso secondo la Rivendicazione 7, in cui il cancro è un melanoma.

20 **9.** Il composto per l'uso secondo la Rivendicazione 6, o la forma polimorfica per l'uso secondo la Rivendicazione 6, o la composizione farmaceutica per l'uso secondo la Rivendicazione 6, in cui il cancro è della vescica, del sangue, delle ossa, del cervello, della mammella, del sistema nervoso centrale, della cervice, del colon, dell'endometrio, esofago, cistifellea, genitali, tratto genitourinario, te-
25

sta, reni, laringe, fegato, polmone, tessuto muscolare, collo, mucosa orale o nasale, ovaio, pancreas, prostata, pelle, milza, intestino tenue, intestino crasso, stomaco, testicolo, o tiroide.

10. Composto della formula

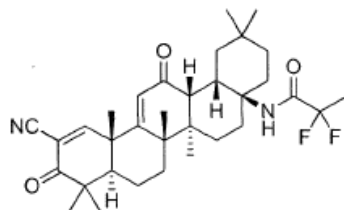


5

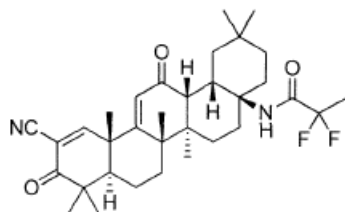
o un suo sale farmaceuticamente accettabile,
per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione associata con stress ossidativo causato da disfunzione mitocondriale.

11. Composto per l'uso secondo la Rivendicazione 10, che è un composto della formula:

10



12. Forma polimorfica di un composto avente la formula:



per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione associata con stress ossidativo causato da disfunzione mitocondriale;
in cui la forma polimorfica ha un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente un picco a circa 14 °2 θ , oppure

15

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 5,6, 7,0, 10,6, 12,7, e 14,6 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,0, 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (doppio picco), 14,2, e 16,0 °2 θ , oppure

la forma polimorfica è un emisolvato di acetonitrile avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 7,5, 11,4, 15,6, e 16,6 °2 θ , oppure

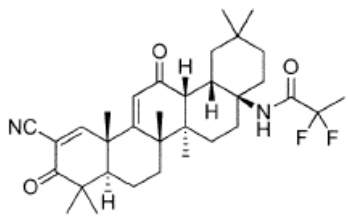
la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuK α) comprendente picchi a circa 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, e 15,6 °2 θ .

13. Composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una condizione associata con stress ossidativo causato da disfunzione mitocondriale, la composizione farmaceutica comprendendo:

un componente attivo costituito da un composto come definito nelle Rivendicazioni 10 o 11 o una forma polimorfica come definita nella Rivendicazione 12; e

un veicolo farmaceuticamente accettabile.

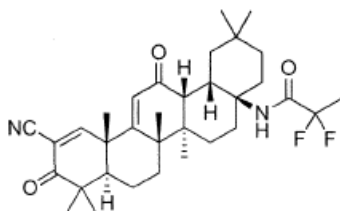
14. Composto della formula



o un suo sale farmaceuticamente accettabile,

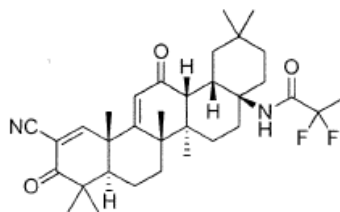
per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di un disturbo convulsivo.

15. Composto per l'uso secondo la Rivendicazione 14, che è un composto della formula:



5

16. Forma polimorfica di un composto avente la formula:



per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di un disturbo convulsivo;

10 in cui la forma polimorfica ha un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuKα) comprendente un picco a circa $14^\circ 2\theta$, oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuKα) comprendente picchi a circa 5,6,

15 7,0, 10,6, 12,7, e $14,6^\circ 2\theta$, oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuKα) comprendente picchi a circa 7,0, 7,8, 8,6, 11,9, 13,9 (doppio picco), 14,2, e $16,0^\circ 2\theta$, oppure

la forma polimorfica è un emisolvato di acetonitrile avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuKα) comprendente

picchi a circa 7,5, 11,4, 15,6, e 16,6 °2θ, oppure

la forma polimorfica è un solvato avente un modello di diffrazione della polvere ai raggi X (CuKα) comprendente picchi a circa 6,8, 9,3, 9,5, 10,5, 13,6, e 15,6 °2θ.

- 5 **17.** Composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di un disturbo convulsivo, la composizione farmaceutica comprendendo:

un componente attivo costituito da un composto come definito nella rivendicazione 14 o 15 o una forma polimorfica come definita nella

10 rivendicazione 16; e

un veicolo farmaceuticamente accettabile.

- 18.** Composto per l'uso secondo la rivendicazione 14 o 15, o la forma polimorfica per l'uso secondo la rivendicazione 16, o la composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 17, in cui il
15 disturbo convulsivo è epilessia.

Si dichiara che la presente è una traduzione fedele della descrizione del brevetto europeo No. 3 444 261.

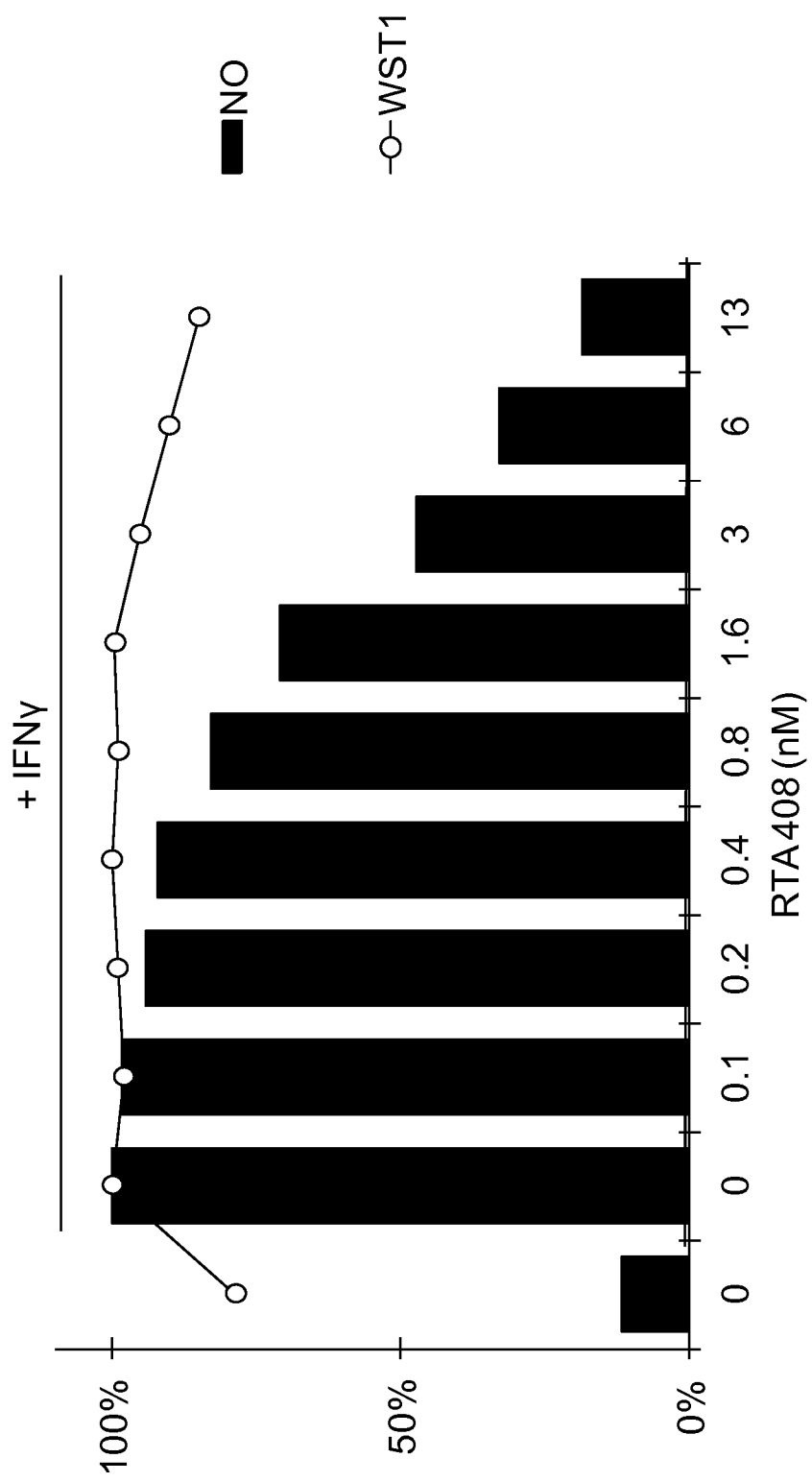
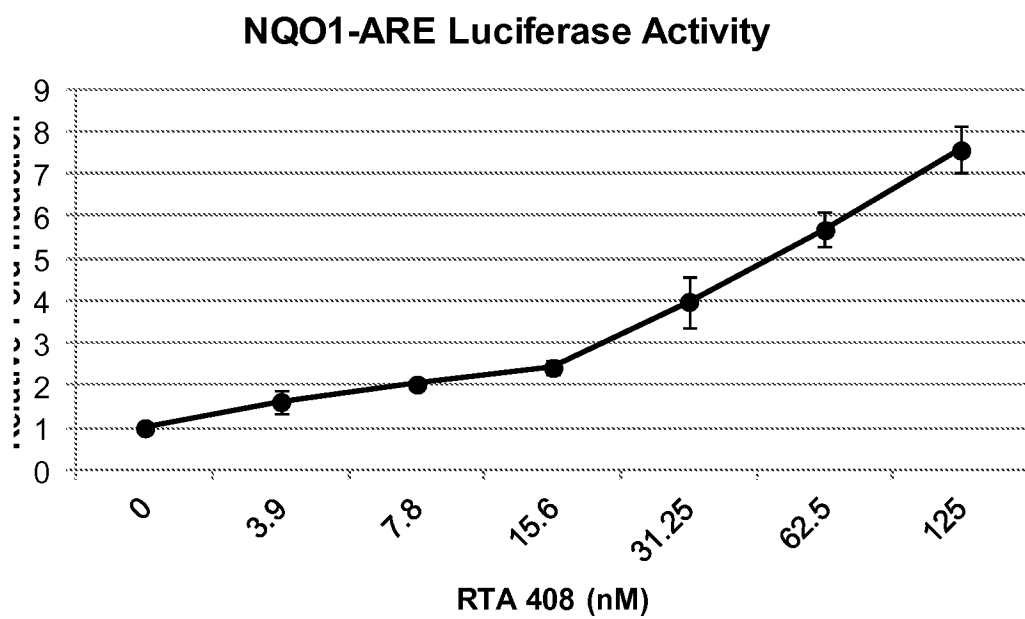
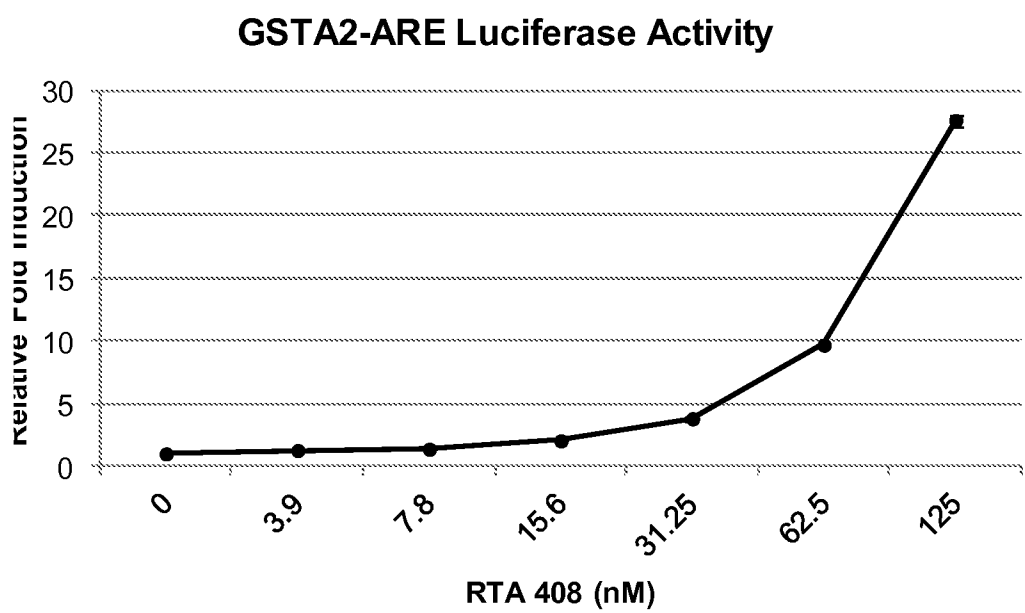


FIG. 1

polyo Monteb



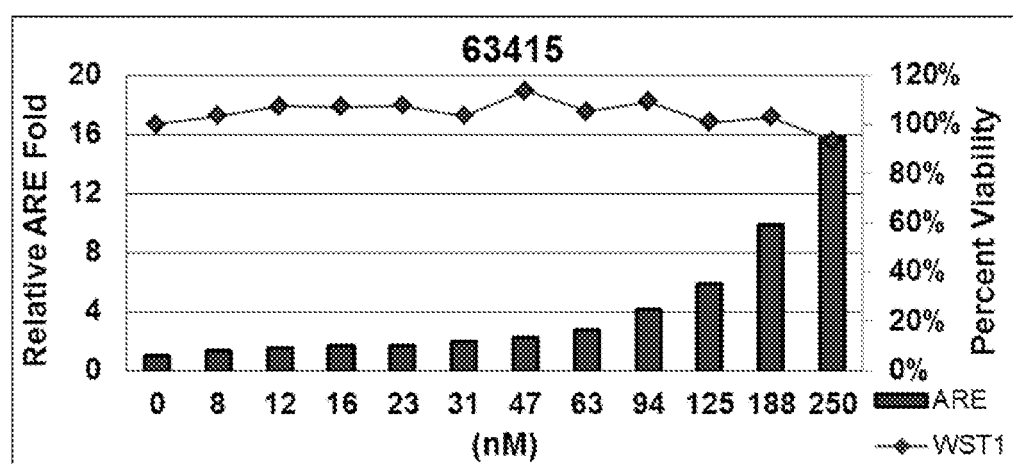
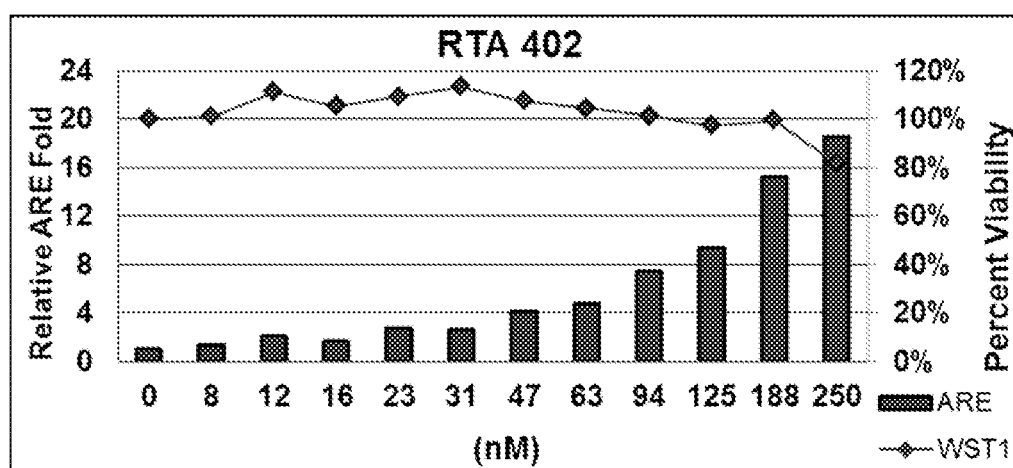
(a)



(b)

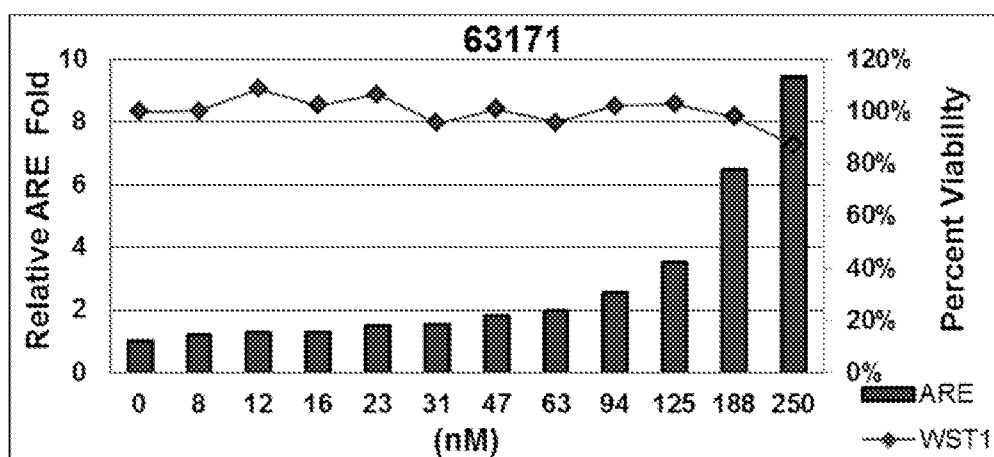
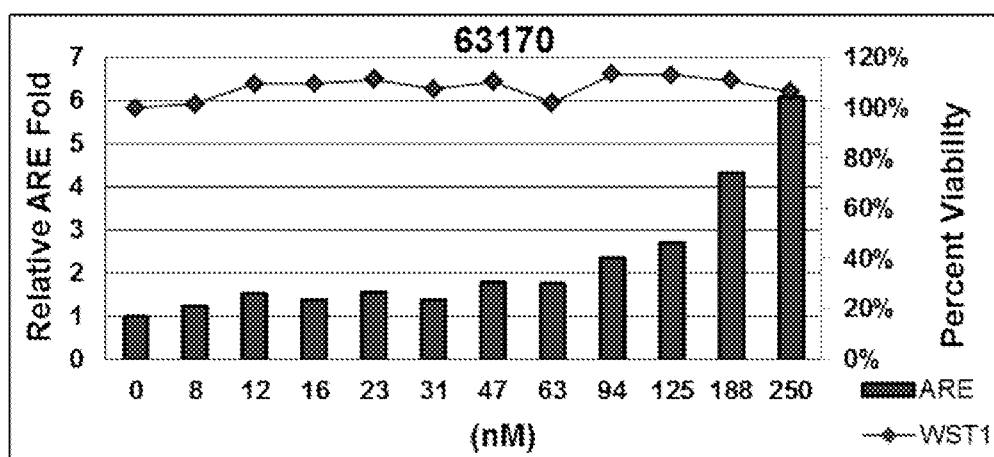
FIGS. 2a & b

Pilyp Montel



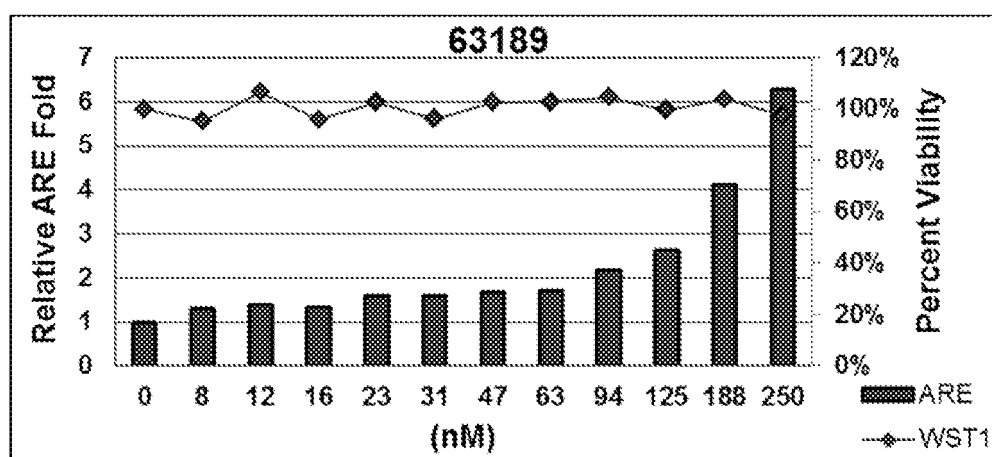
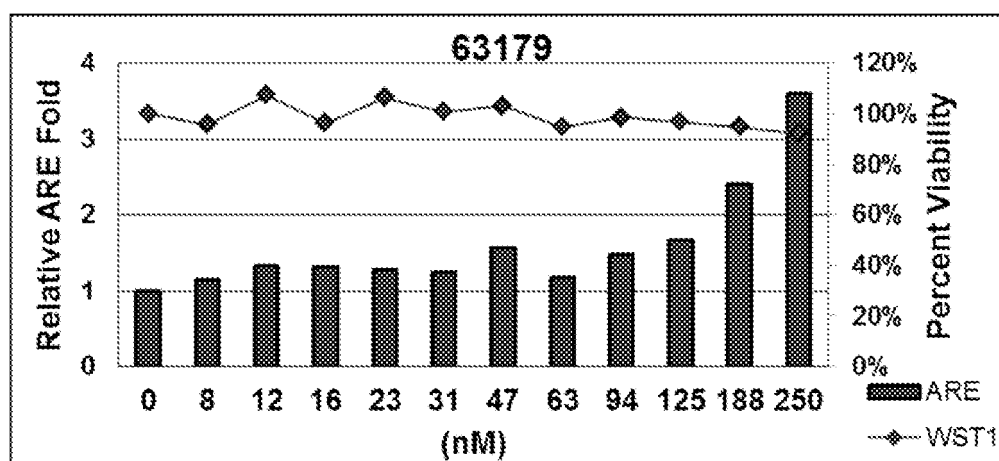
FIGS. 3a & b

polyo Montch



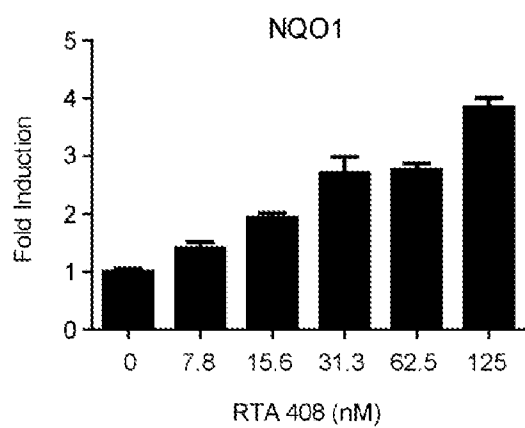
FIGS. 3c & d

Polya Montel

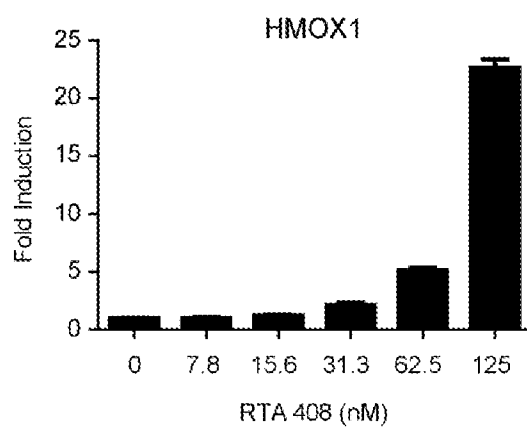


FIGS. 3e & f

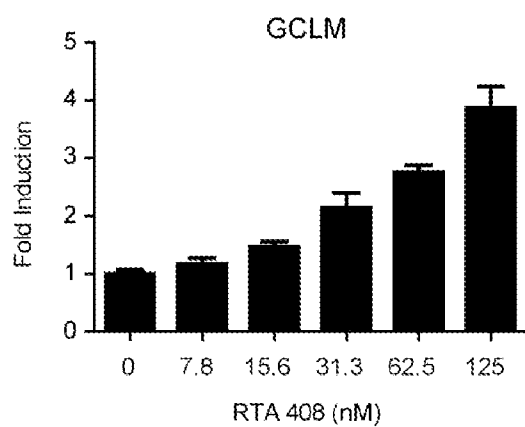
polyo Montel



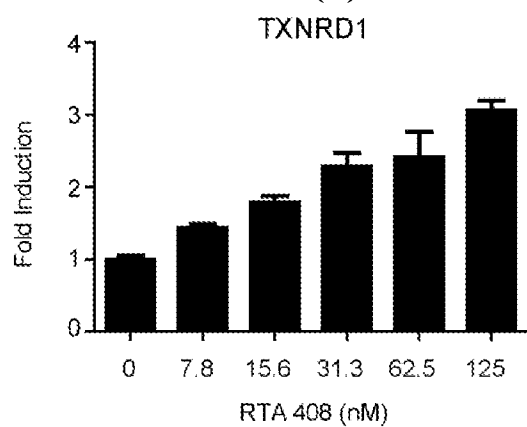
(a)



(b)



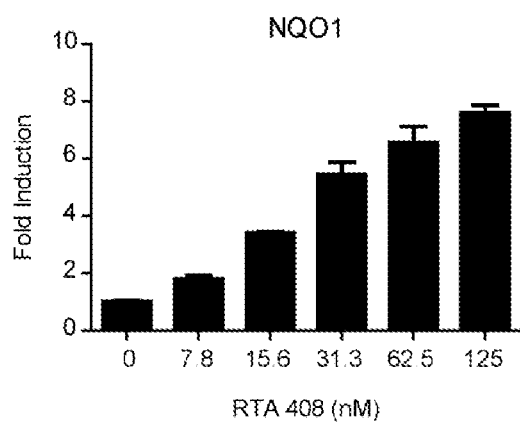
(c)



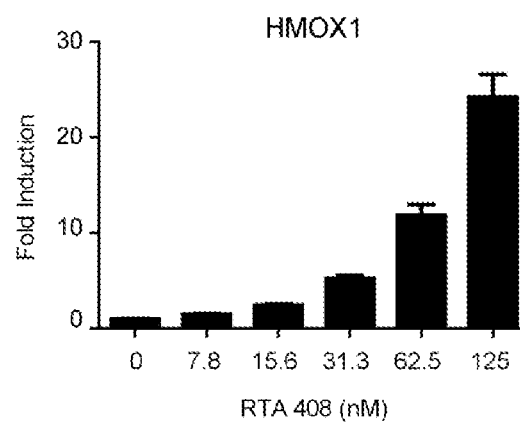
(d)

FIGS. 4a – d

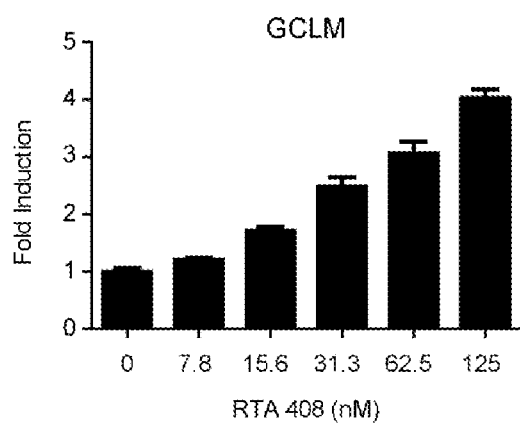
polyo Monteb



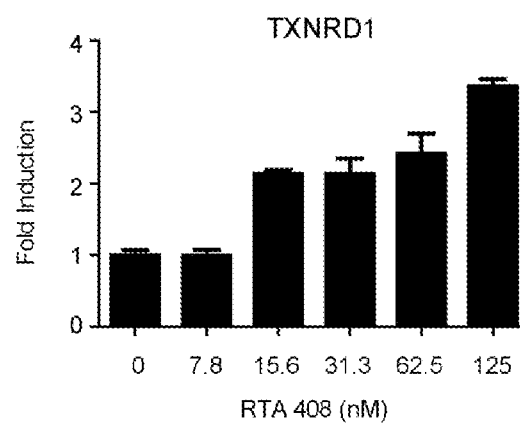
(a)



(b)



(c)

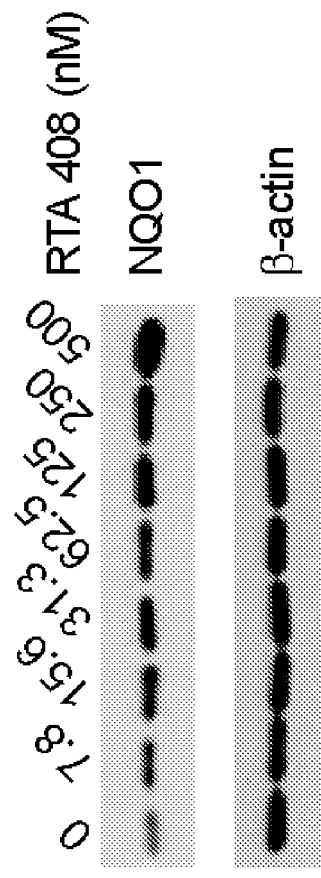


(d)

FIGS. 5a – d

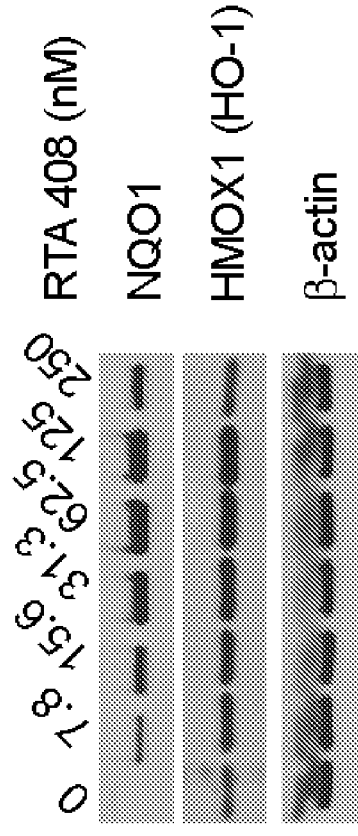
polyo Montel

SH-SY5Y Cells



(a)

BV2 Cells



(b)

FIGS. 6a & b

Polypo Montchi

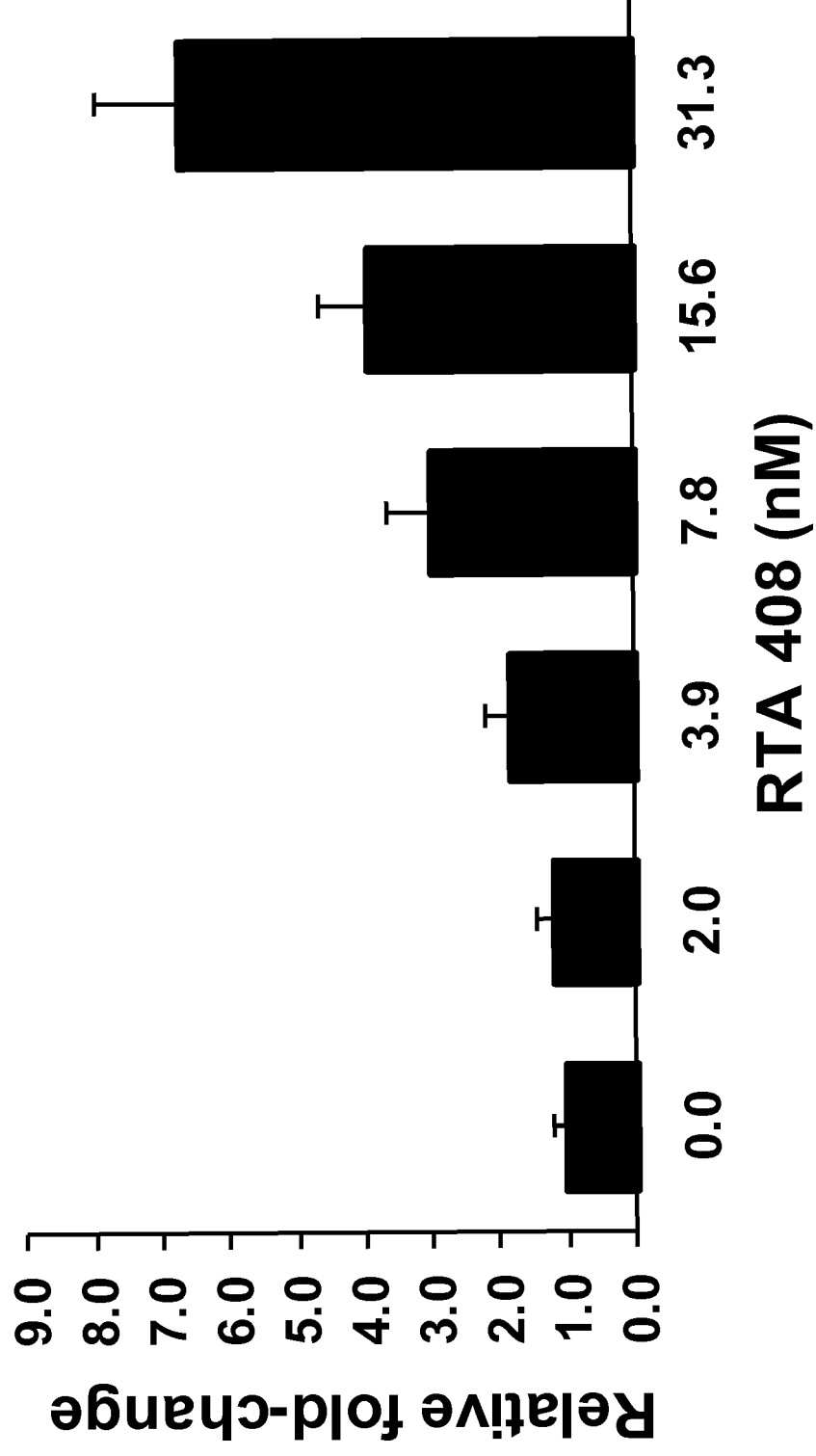


FIG. 7

Allyso Monteb

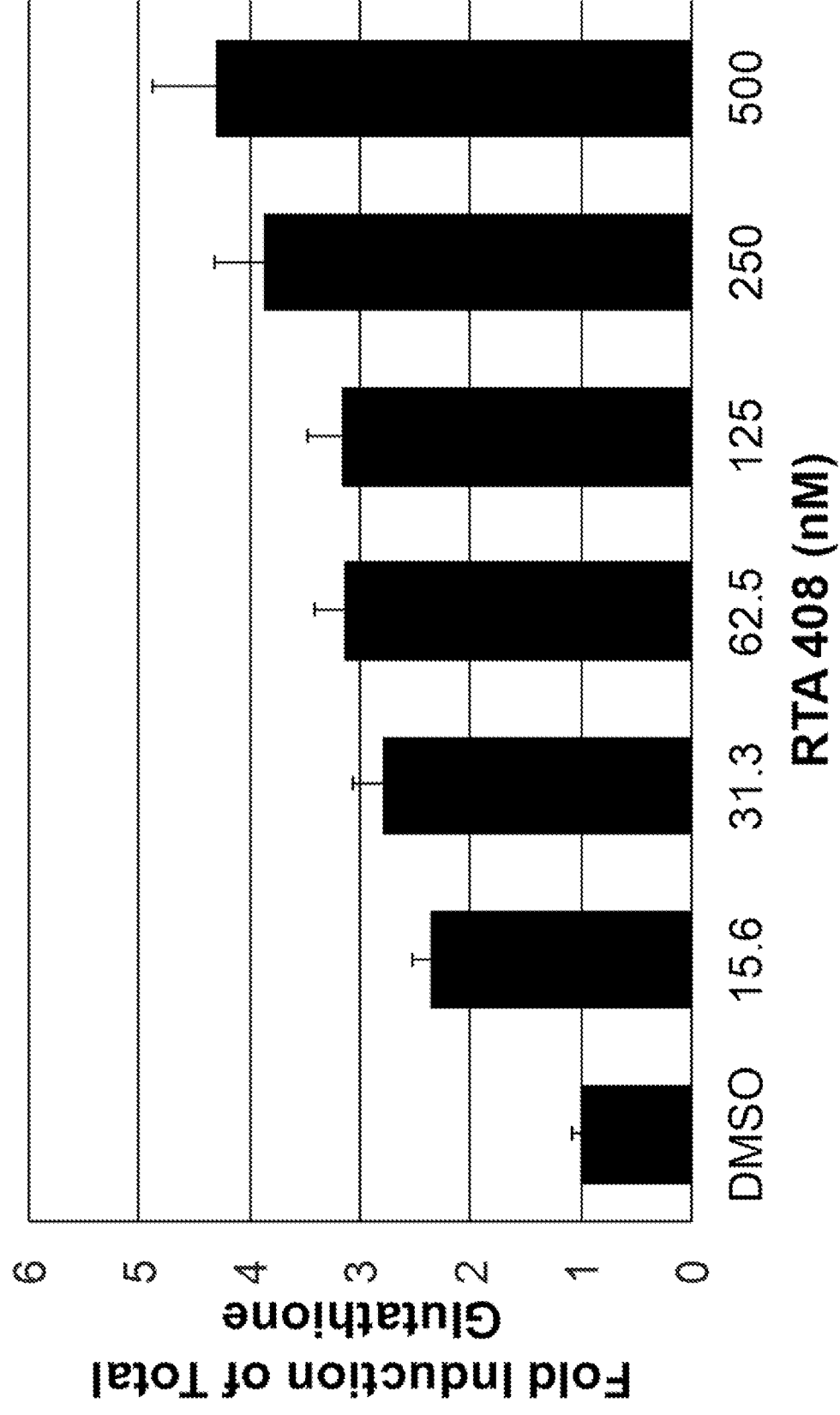


FIG. 8

Mya Montel

WST1

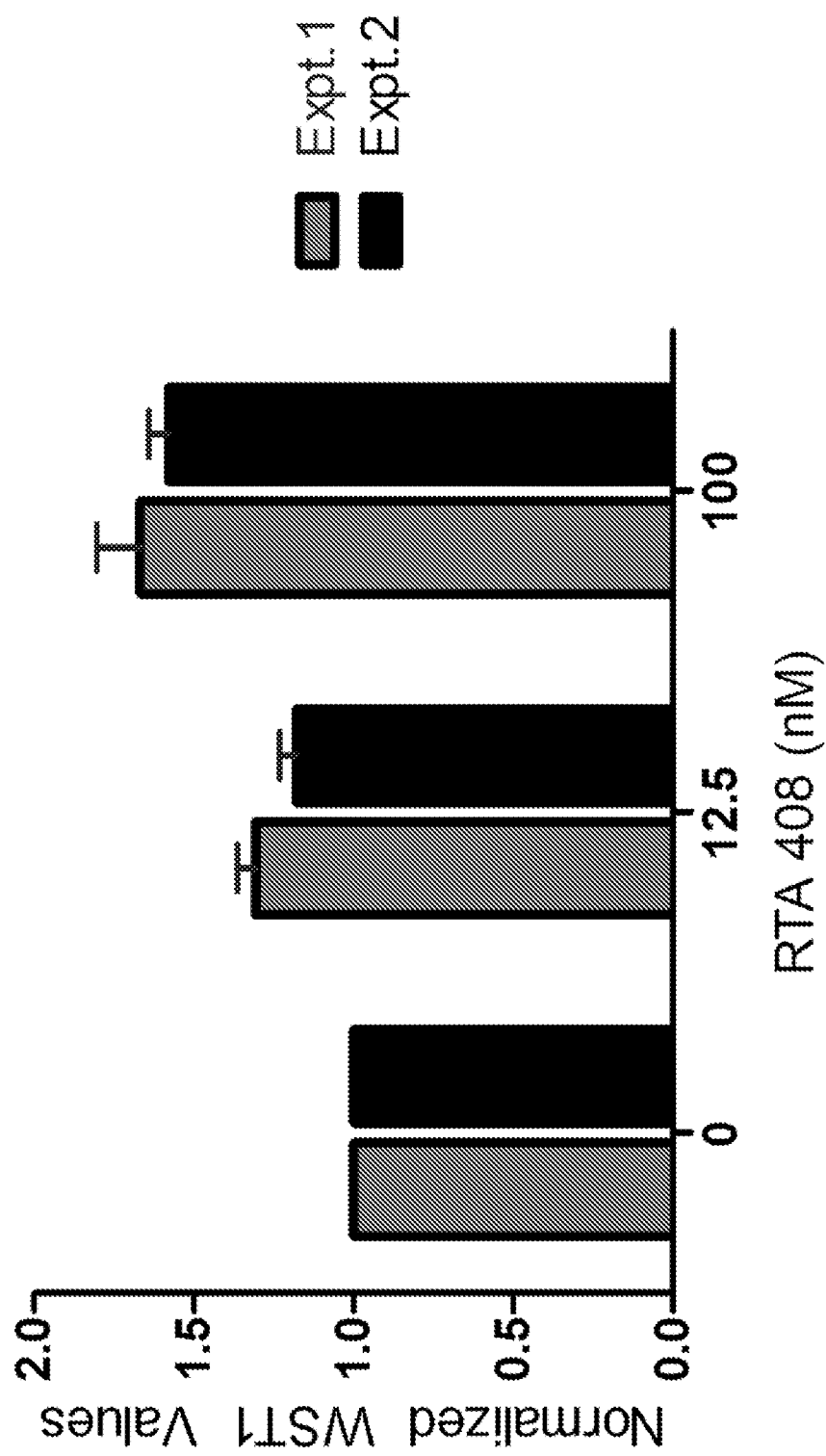
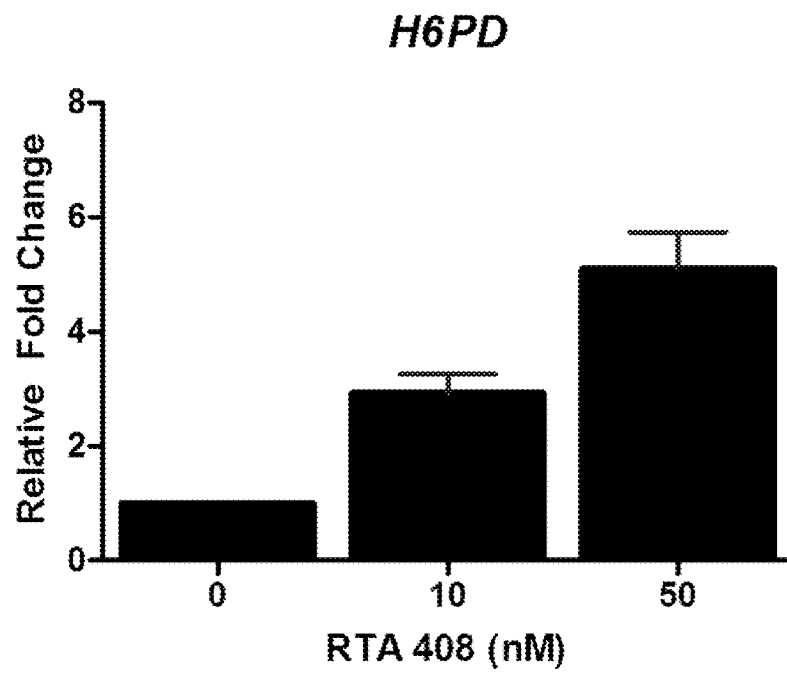
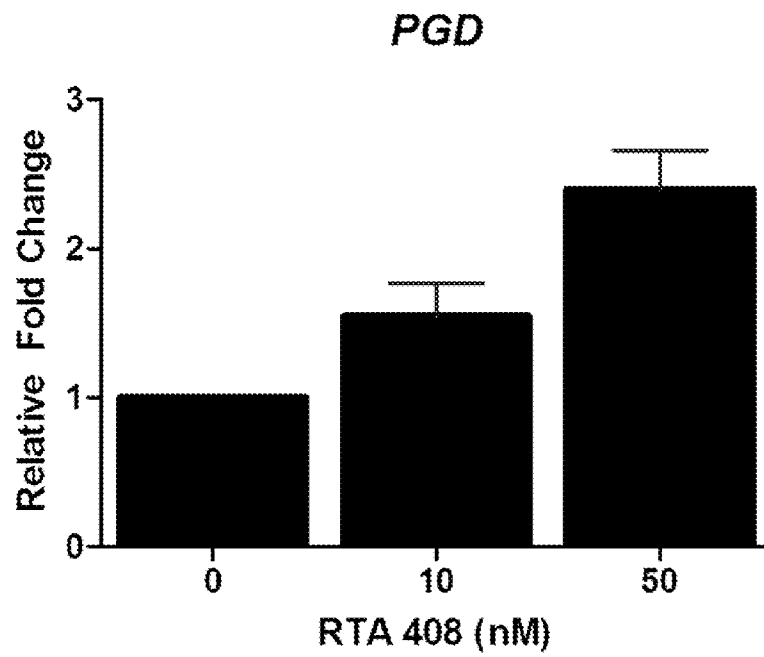


FIG. 9

Philip Monteleone



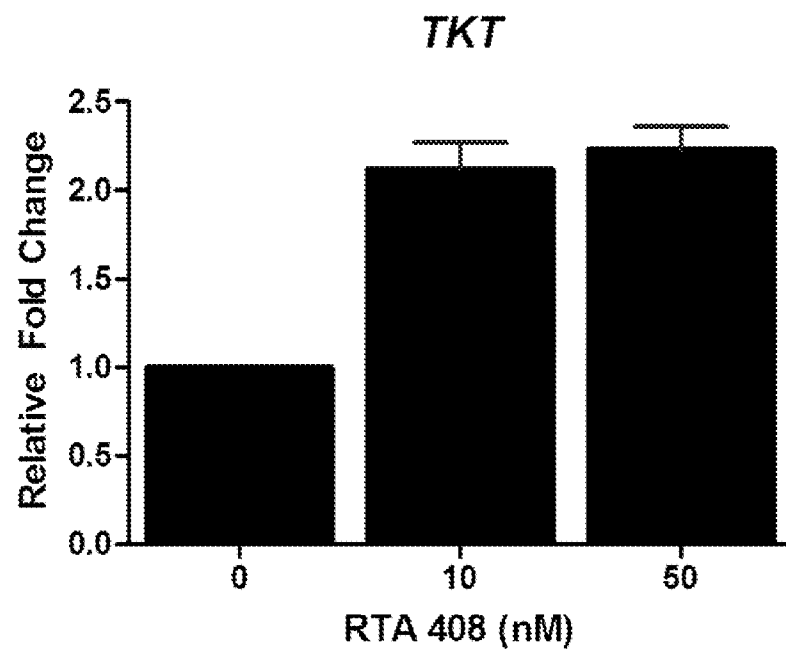
(a)



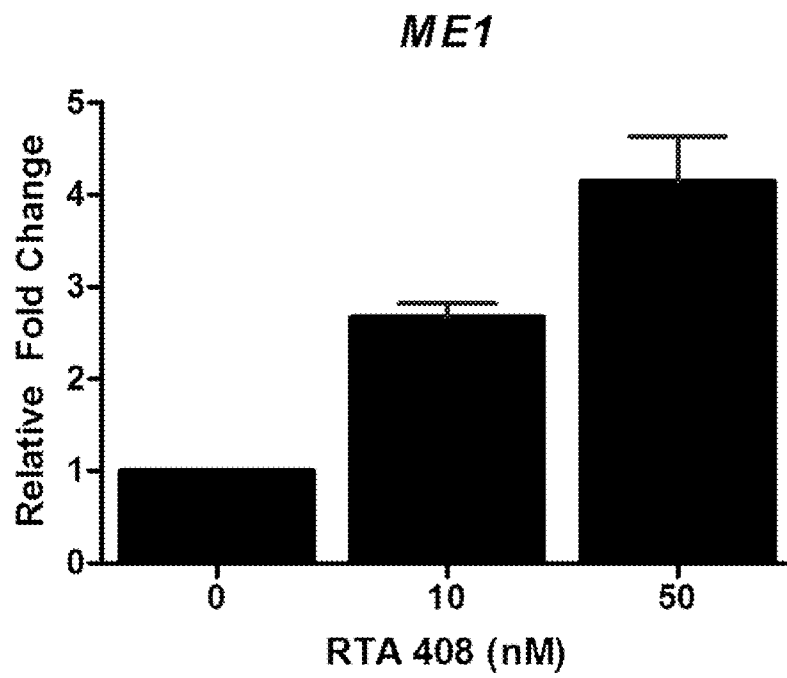
(b)

FIGS. 10a & b

Polys Montel



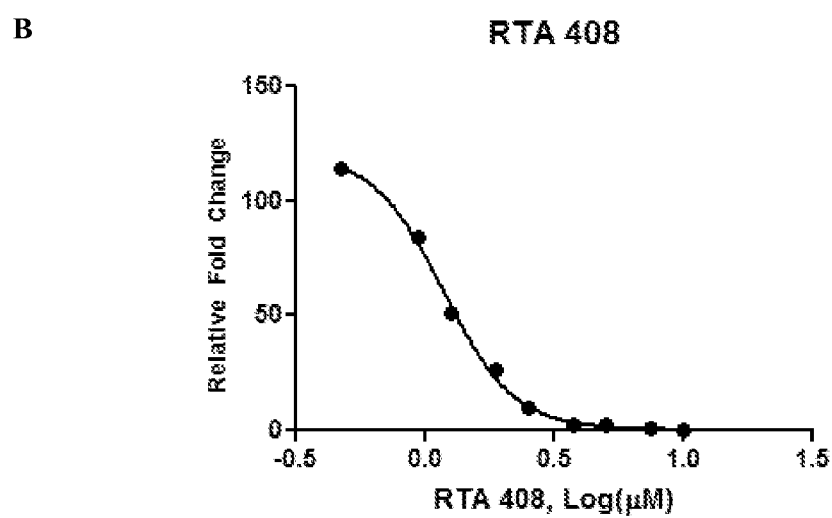
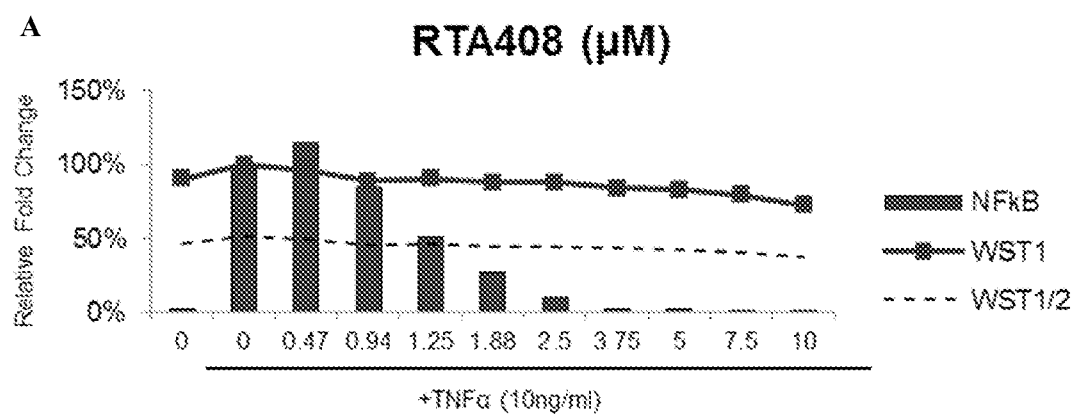
(c)



(d)

FIGS. 10c & d

Mylo Montel



FIGS. 11a & b

Myo Montel

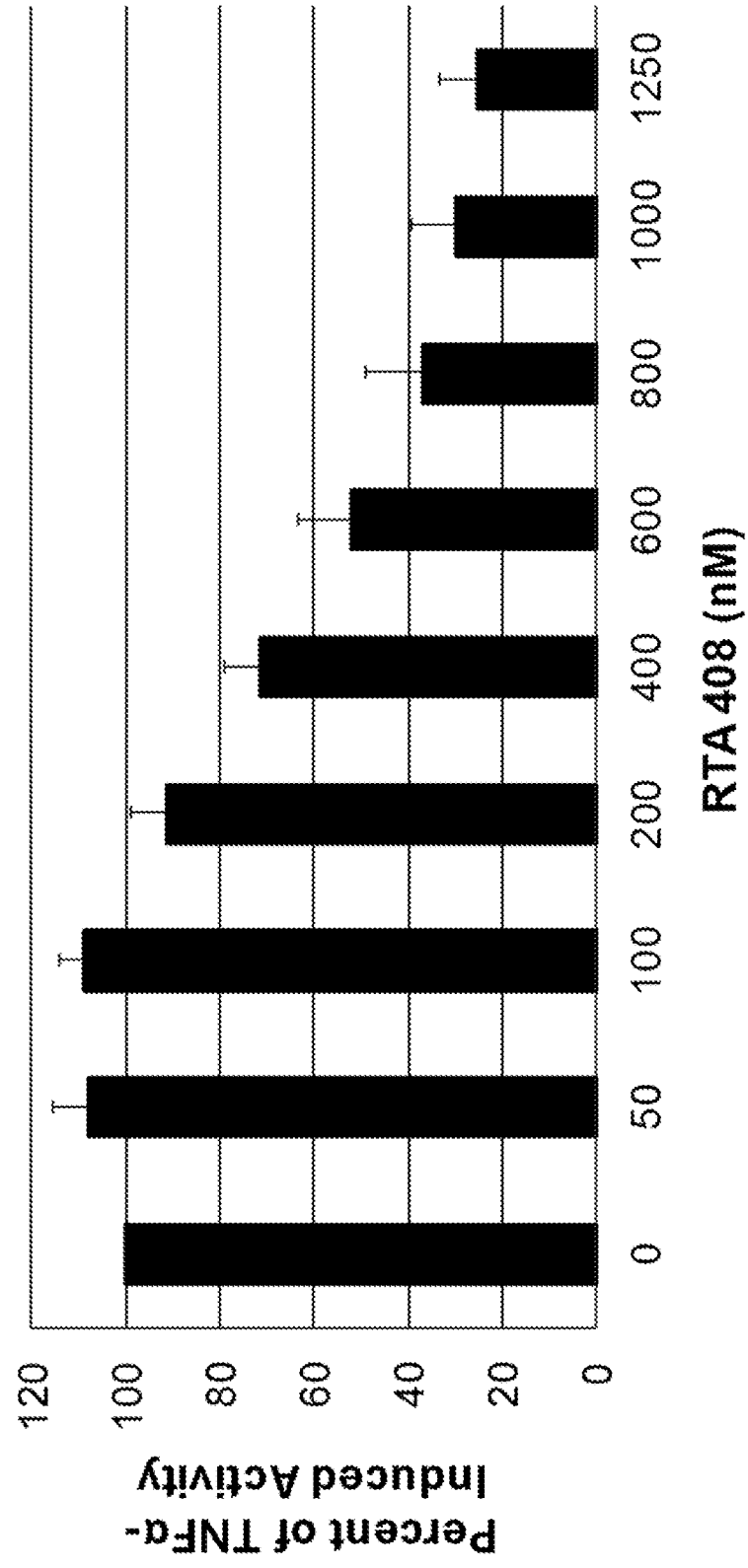
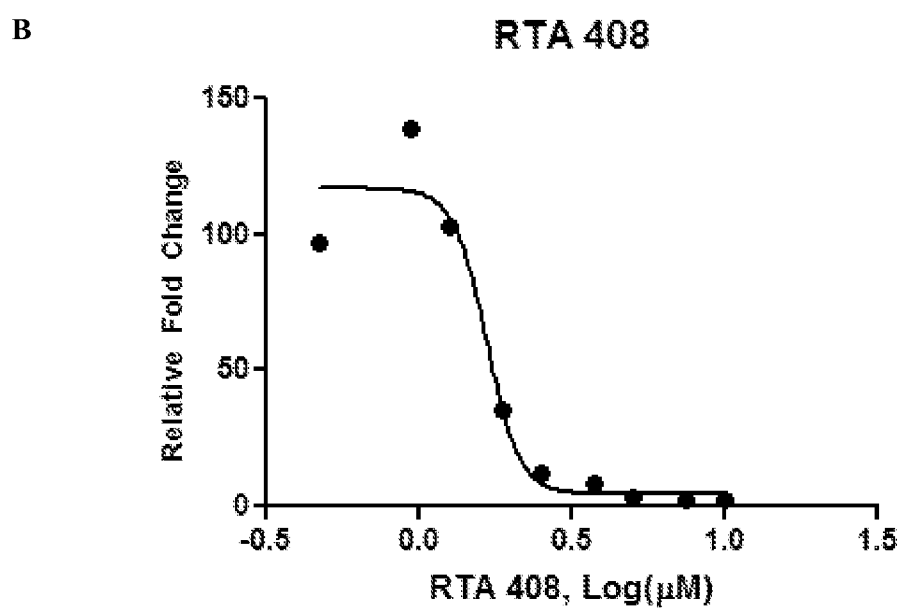
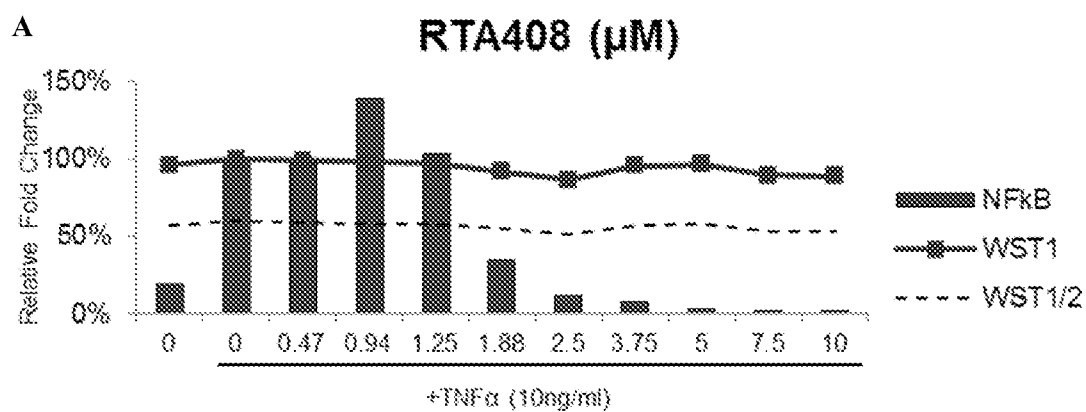


FIG. 12

Philip Monteleone



FIGS. 13a & b

Polys Montel

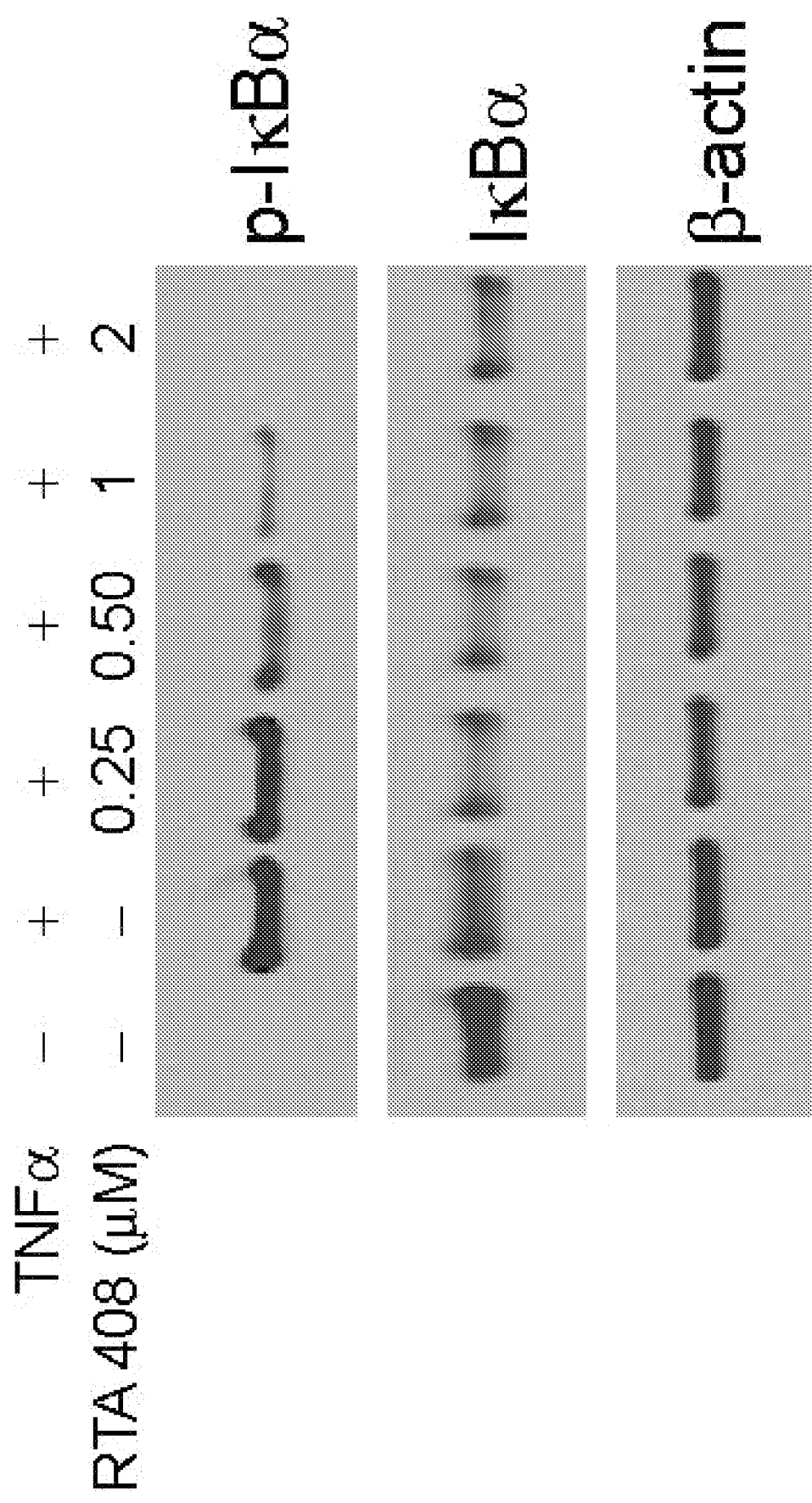
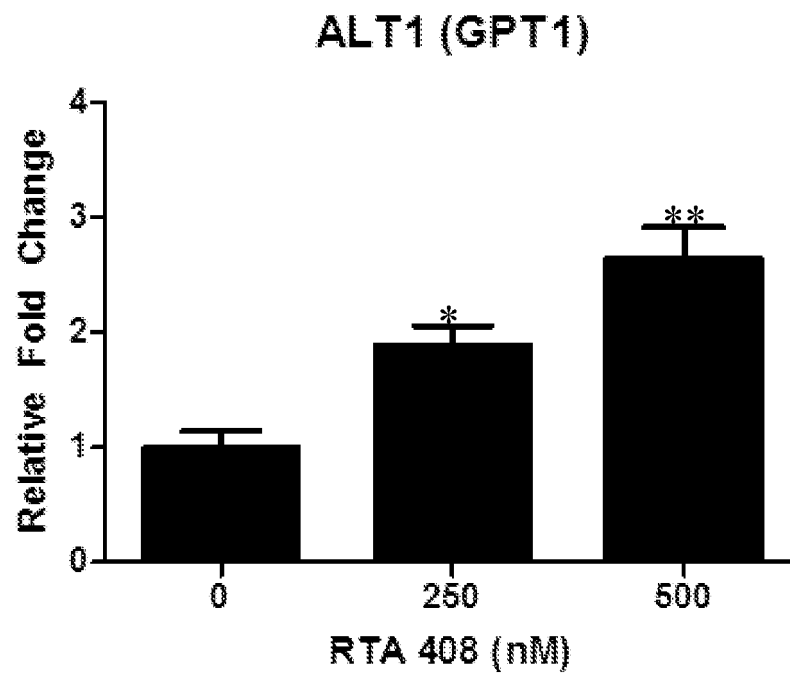
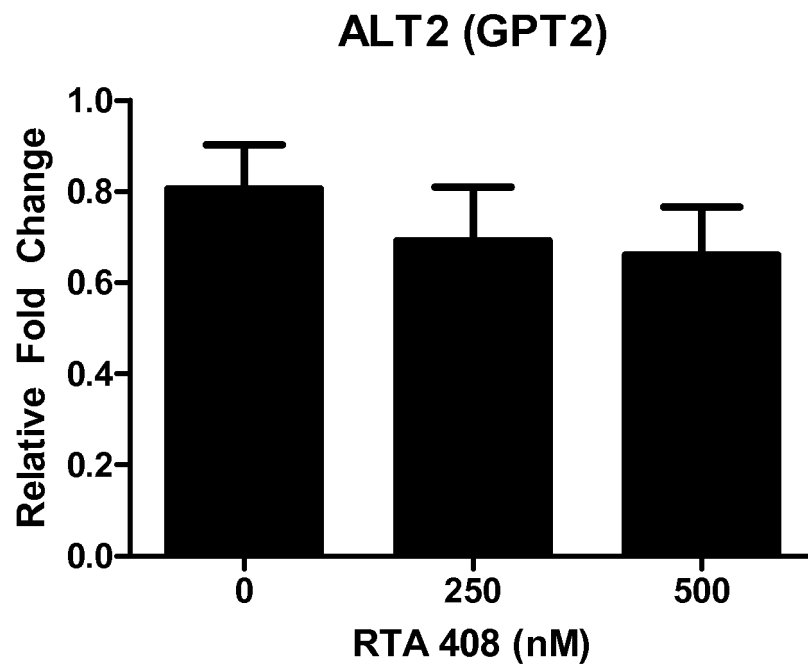


FIG. 14

Polyo Montchi



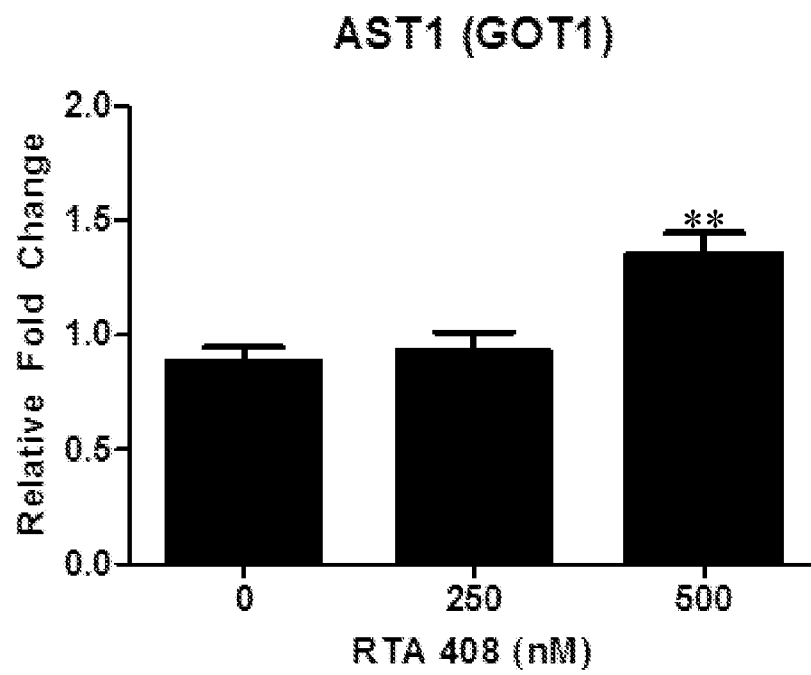
(a)



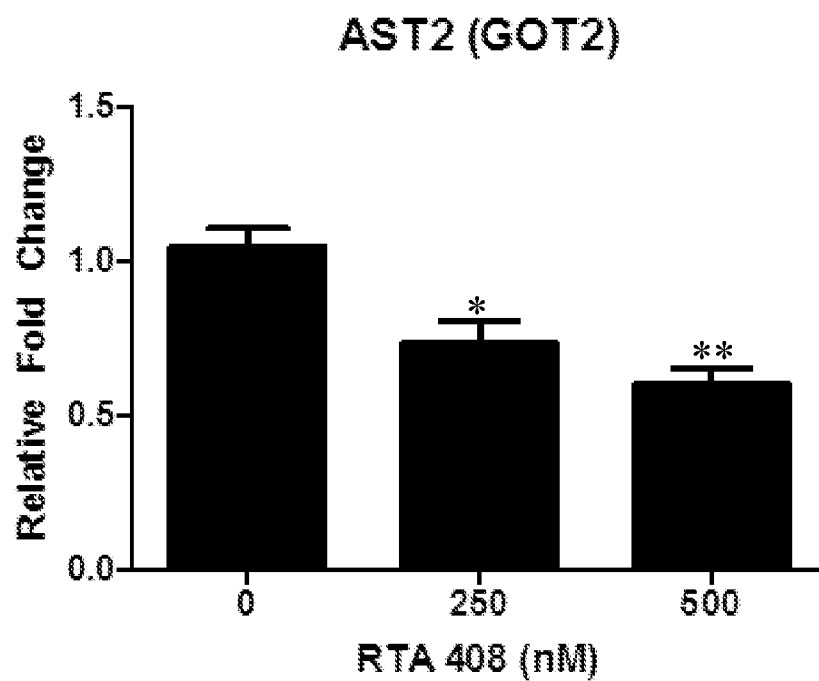
(b)

FIGS. 15a & b

Prilys Montel



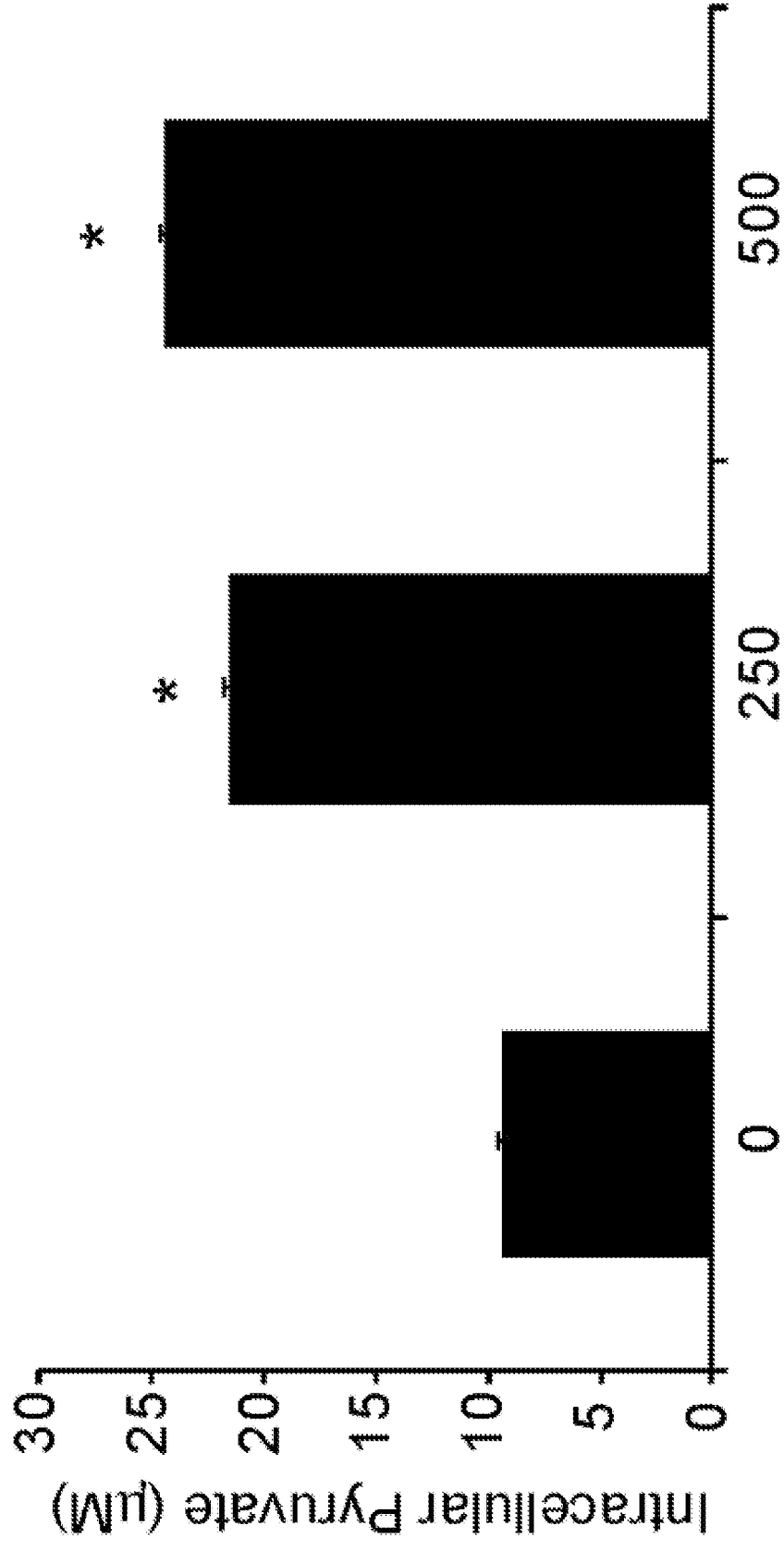
(c)



(d)

FIGS. 15c & d

Pylyp Montel



RTA 408 (nM)

FIG. 16

Pritypa Monteb

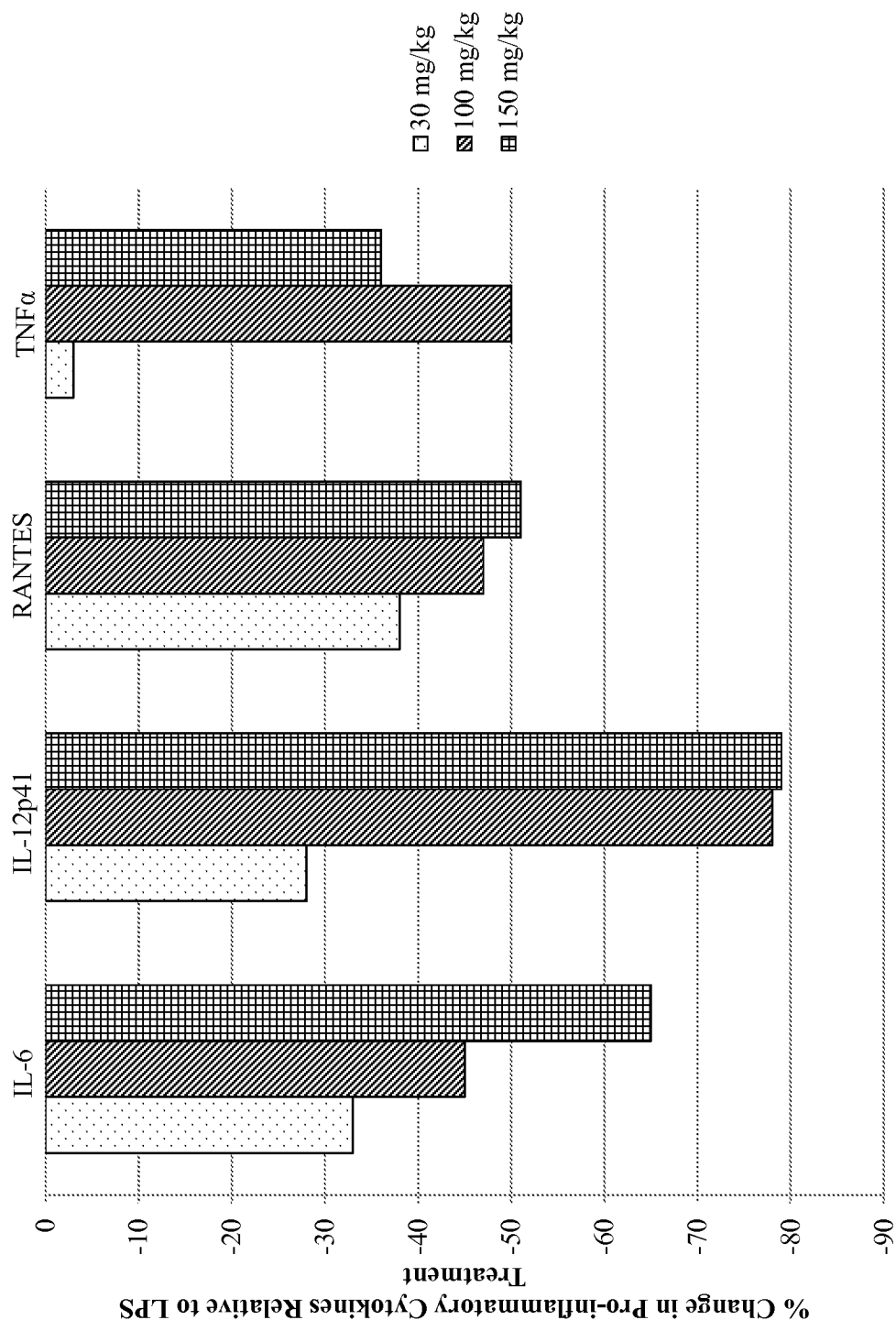
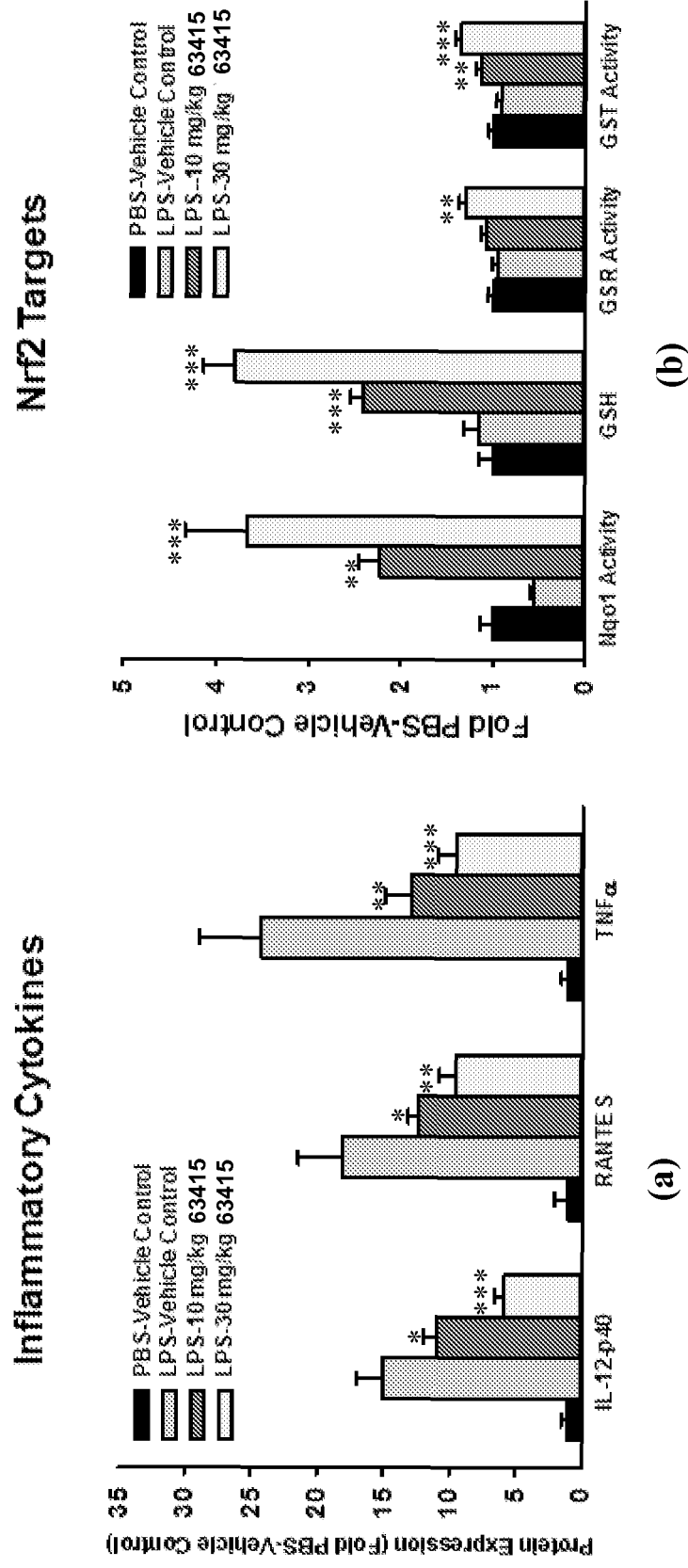


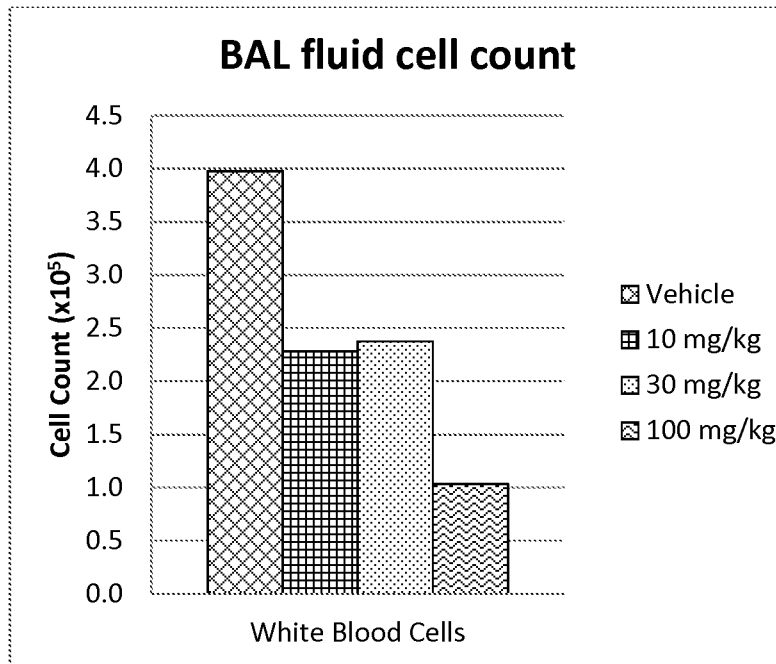
FIG. 17

Philip Monteleone

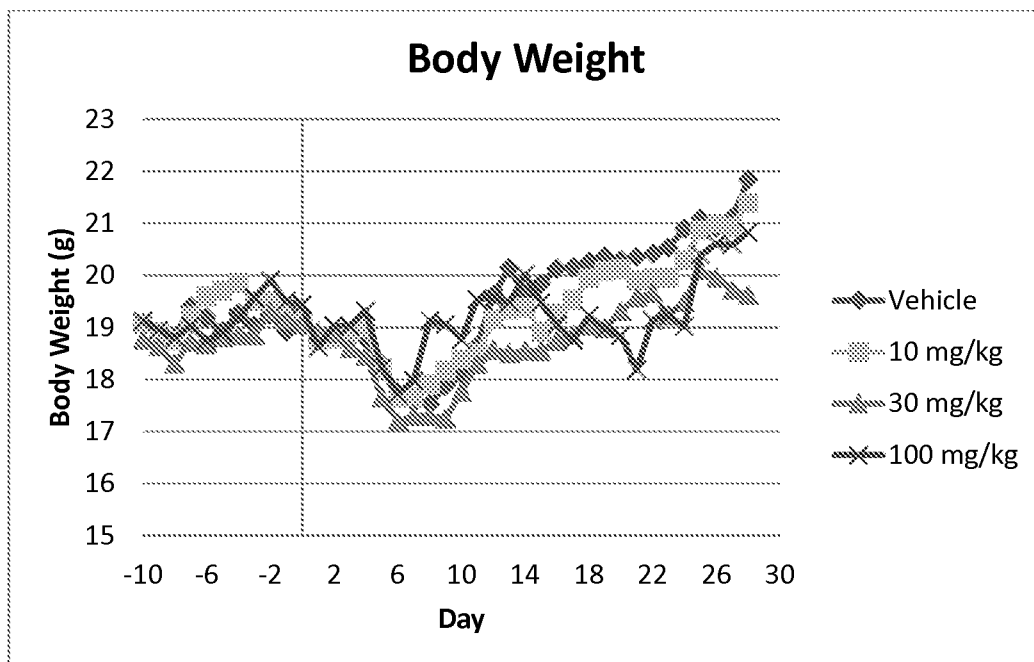


FIGS. 18a & b

Polypa Montch



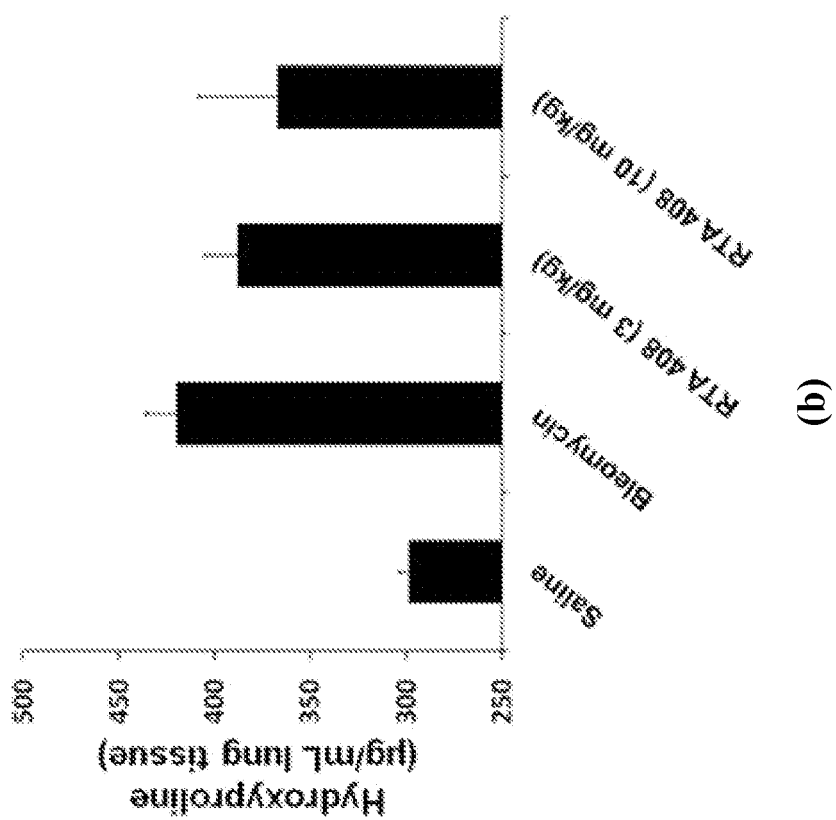
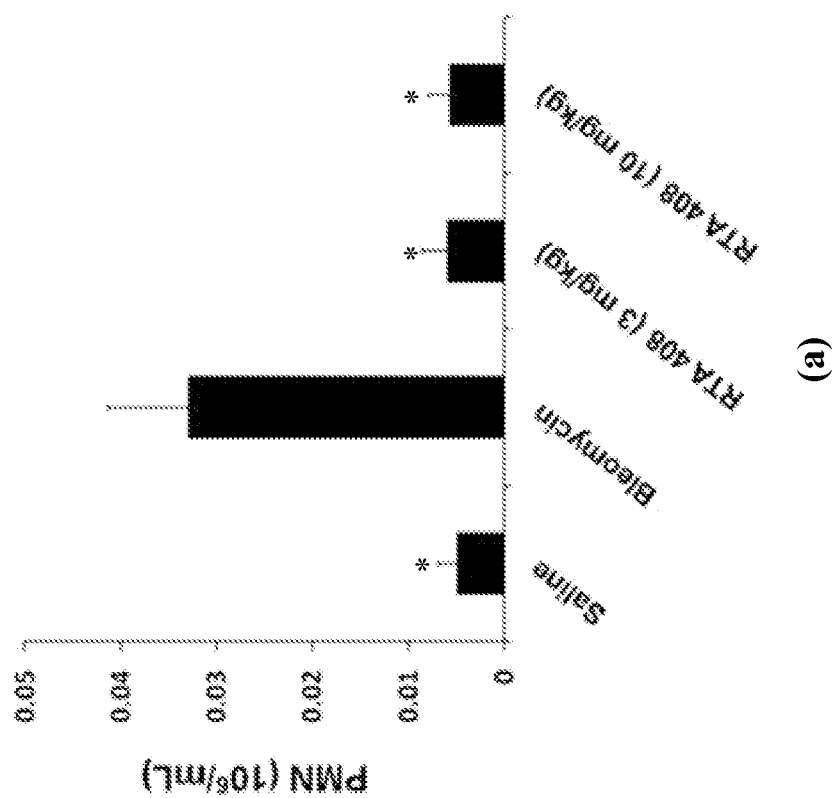
(a)



(b)

FIGS. 19a & b

Philip Monteb



FIGS. 20a & b

Prilys Montel

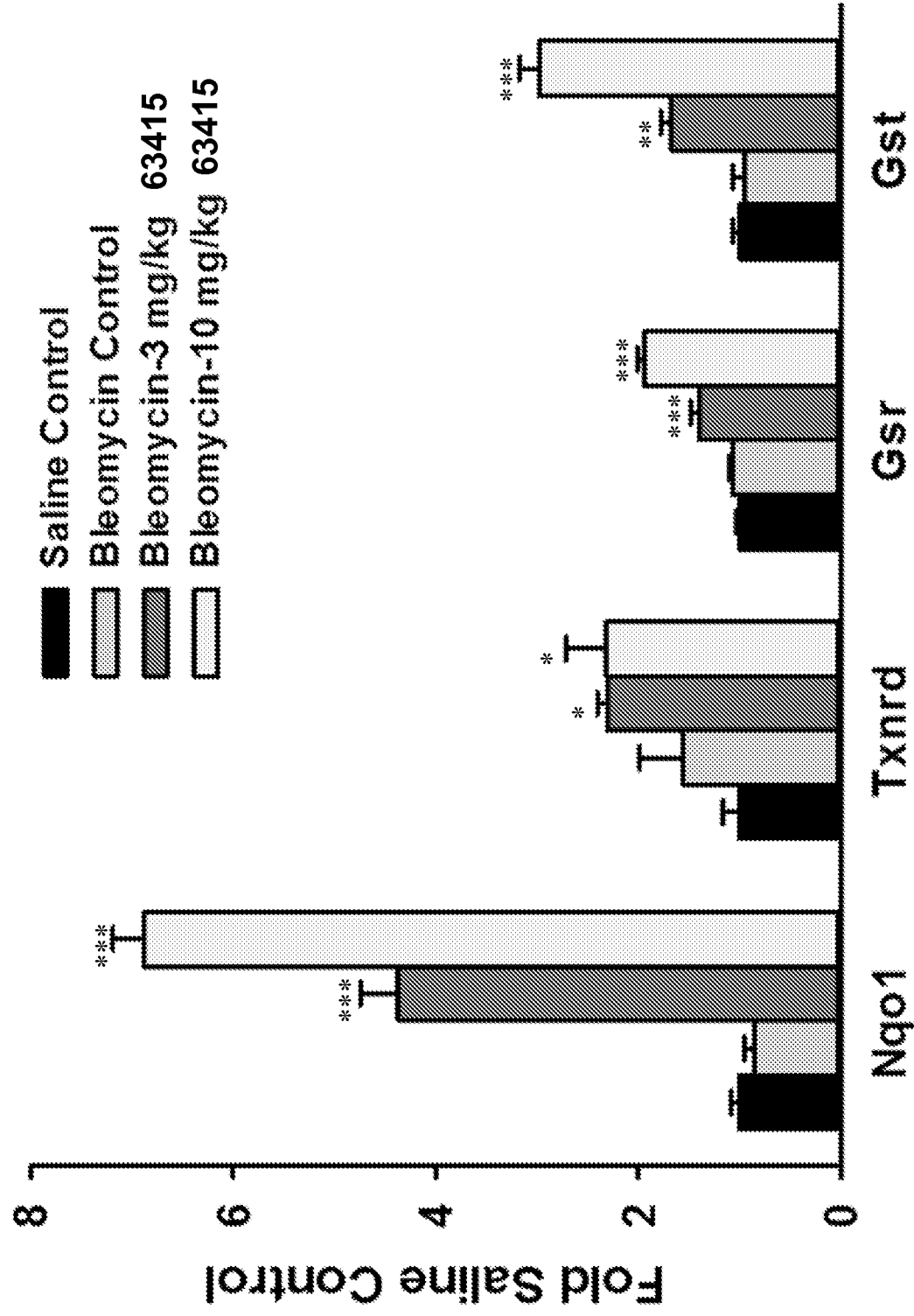
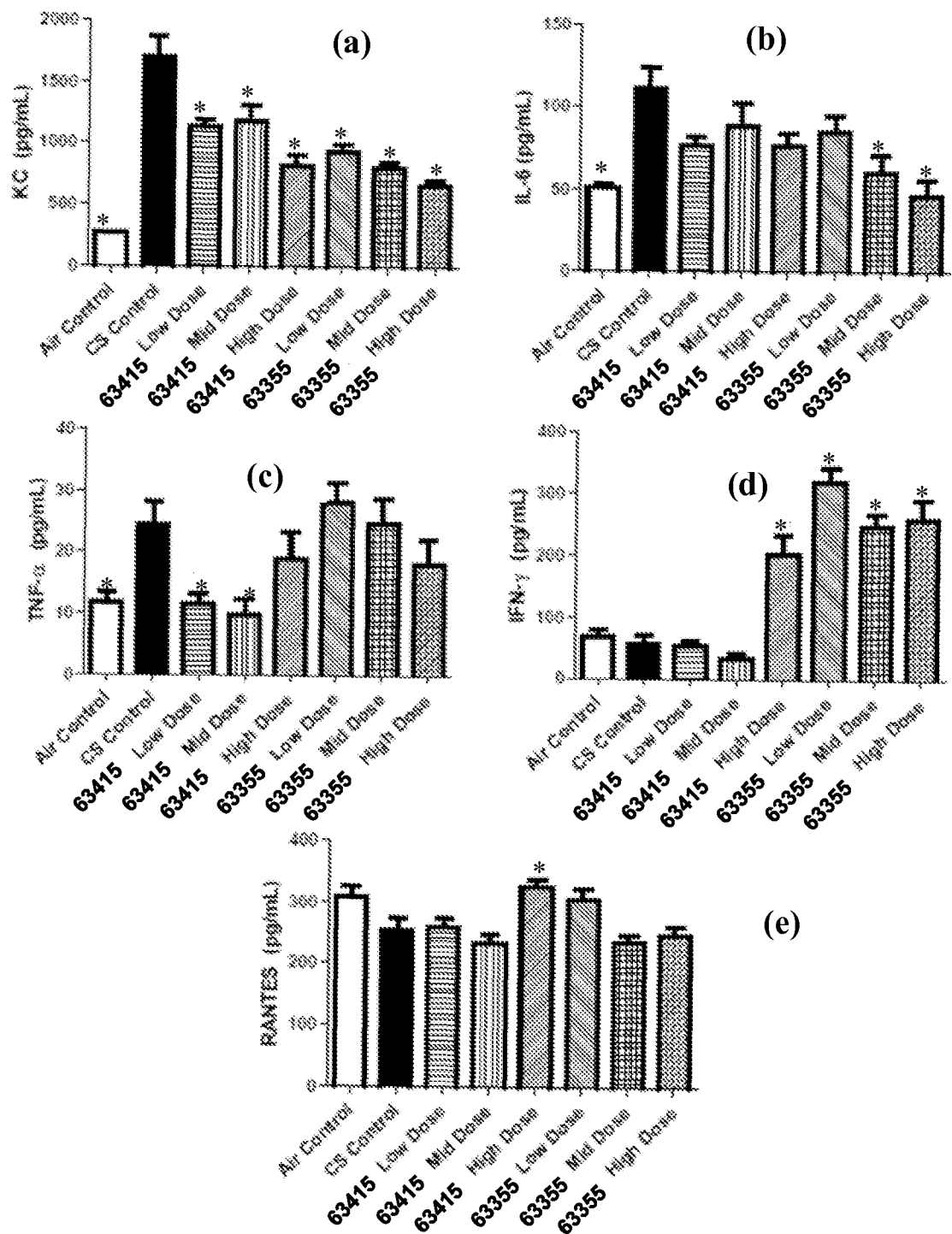


FIG. 21

Allyjo Monteb



FIGS. 22a – e

Polys Montel

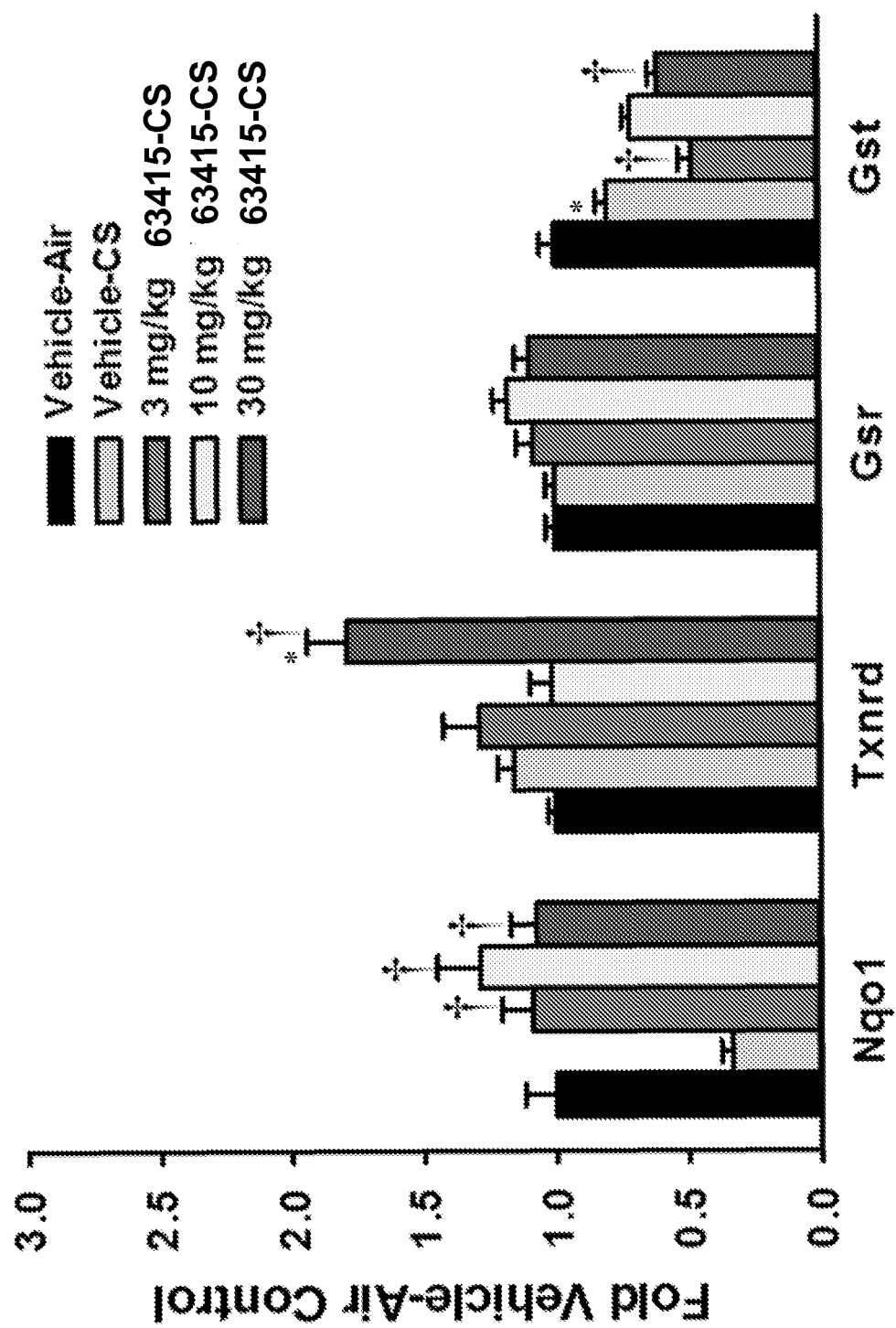
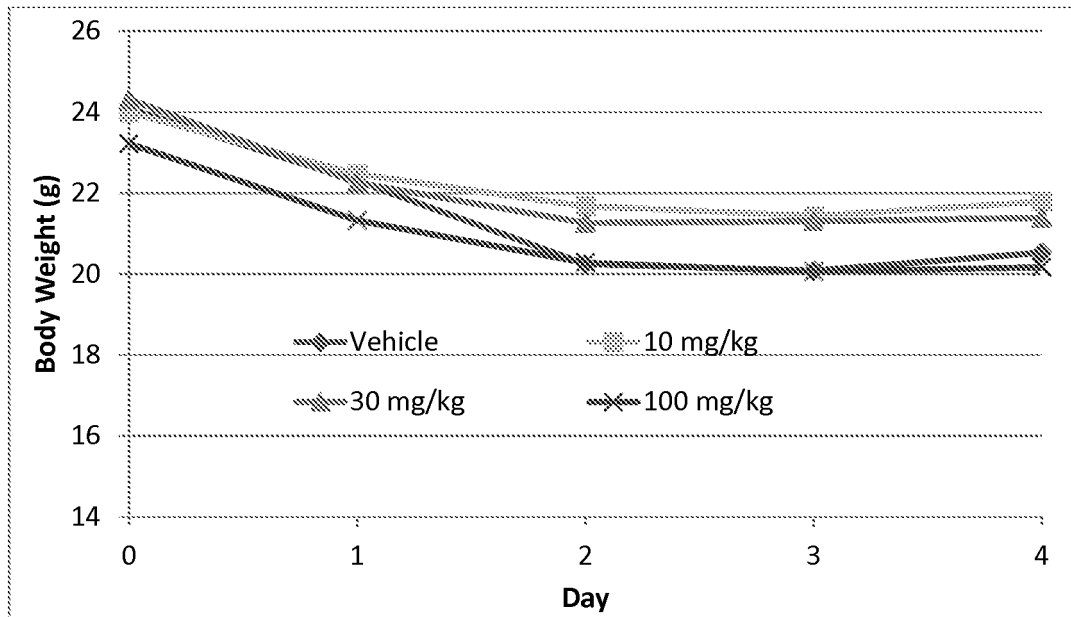


FIG. 23

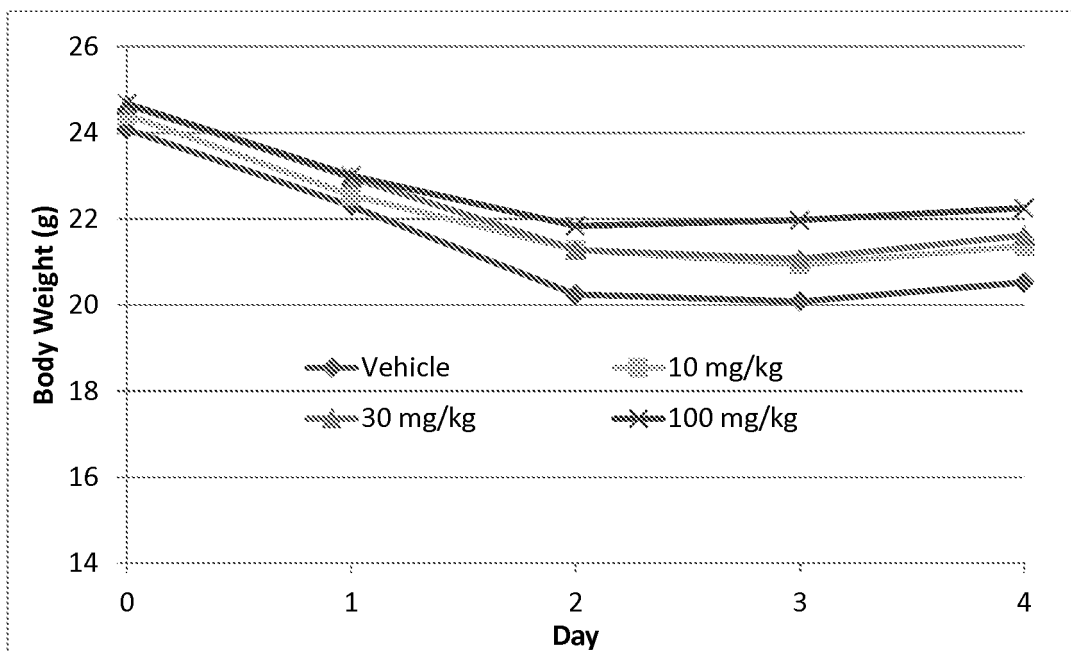
Pilypa Montel

Systemic LPS: Body Weight: 63415



(a)

Systemic LPS: Body Weight: RTA 405

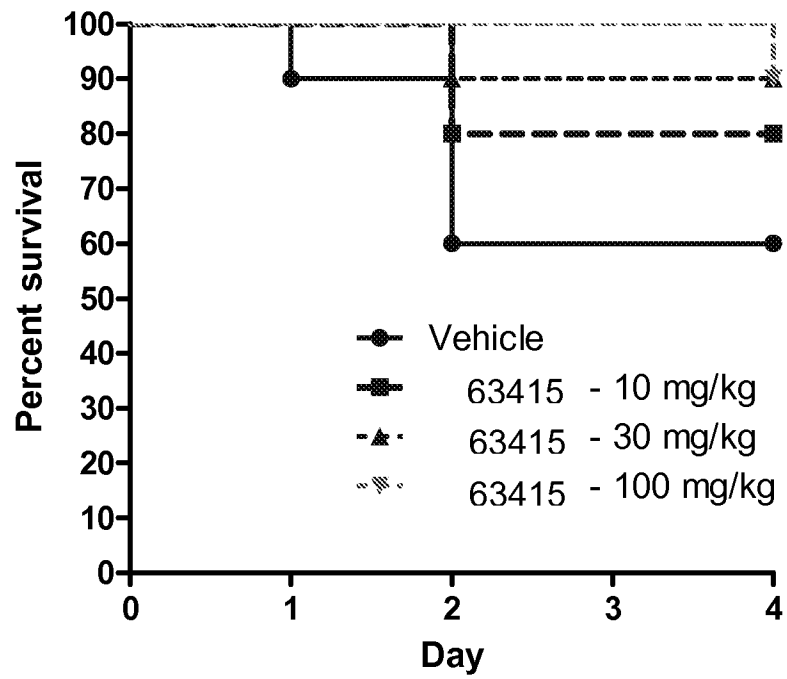


(b)

FIGS. 24a & b

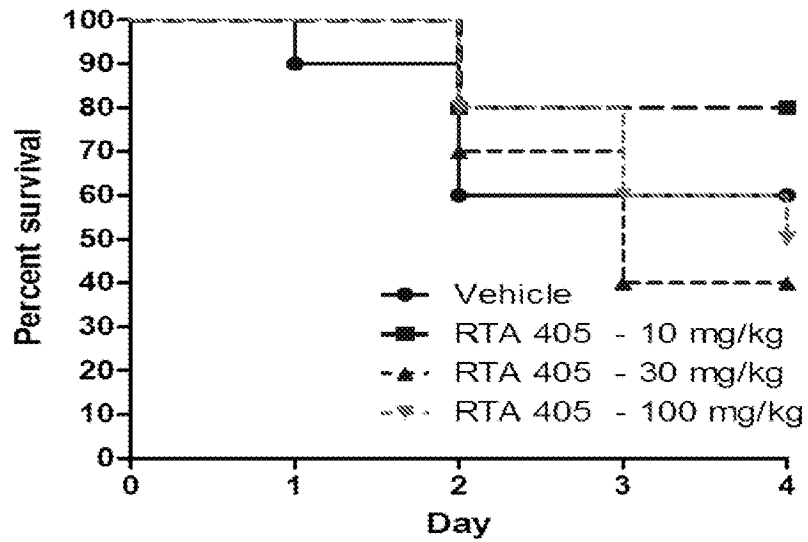
Prilys Montel

Systemic LPS: % Survival: 63415



(c)

Systemic LPS: % Survival: RTA 405



(d)

FIGS. 24c & d

Philip Montell

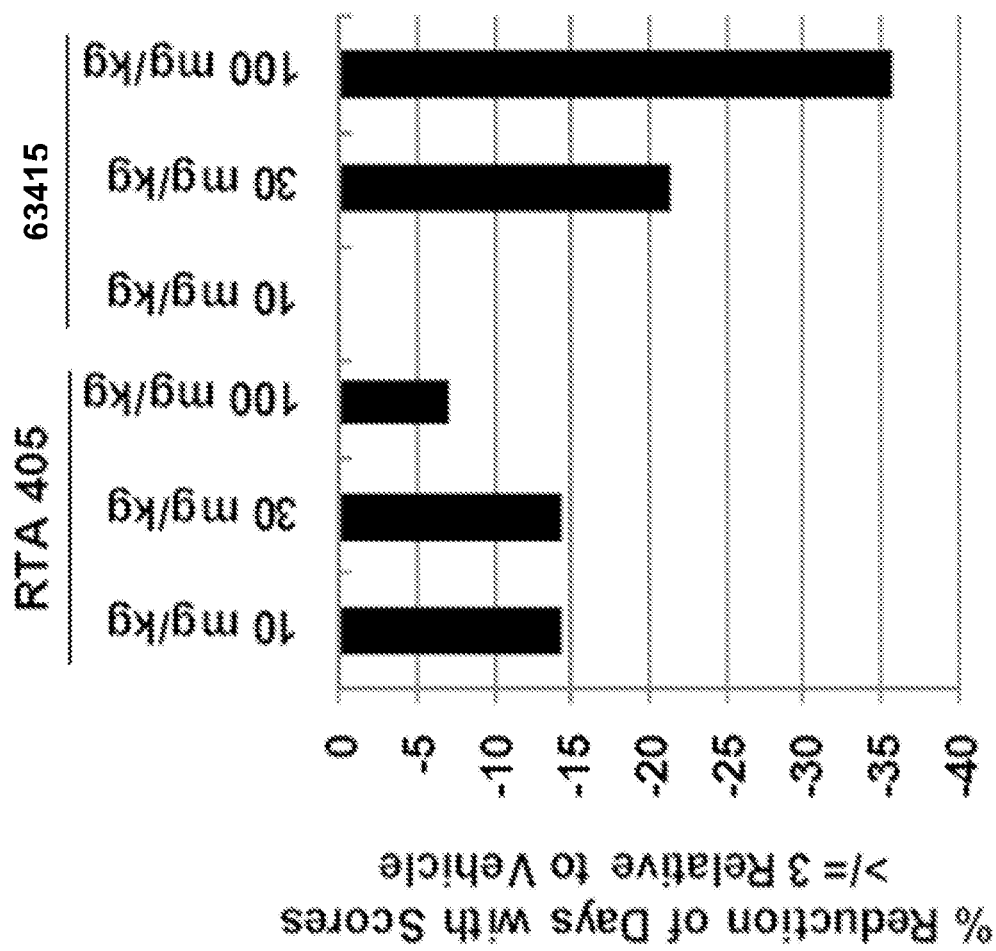


FIG. 25

Polypio Montel

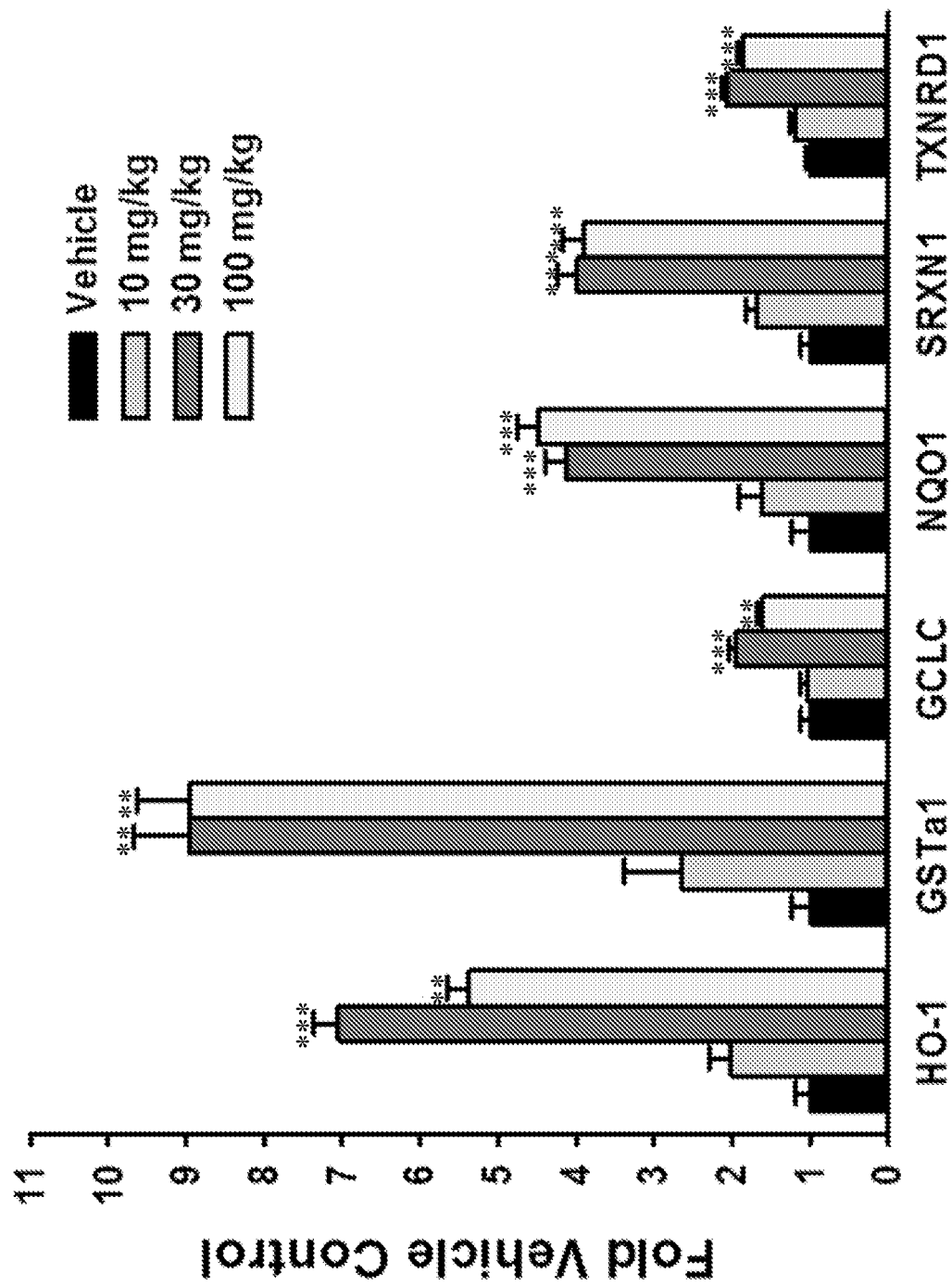
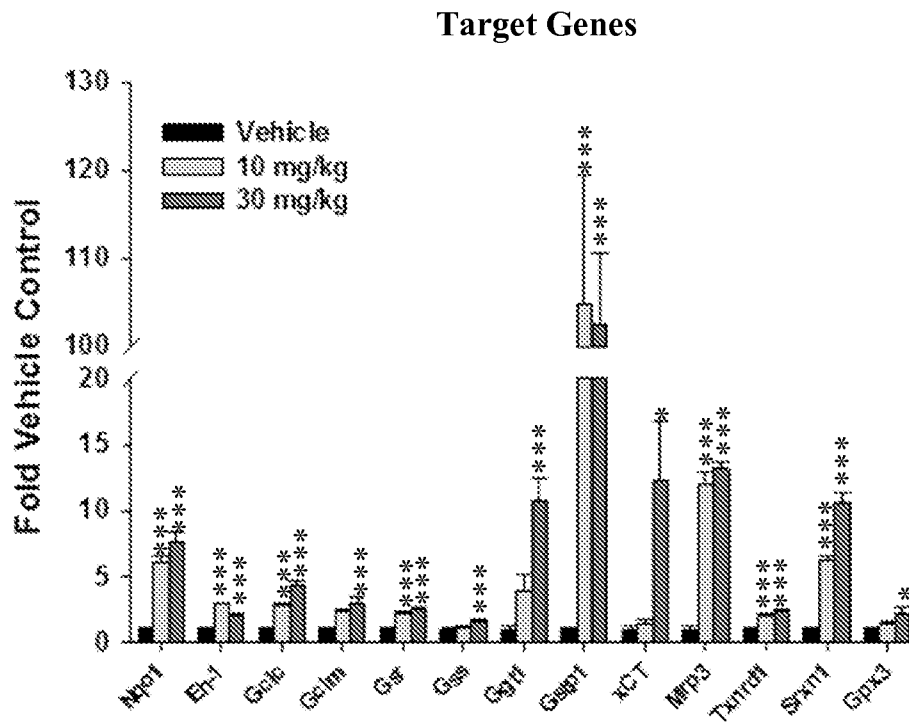
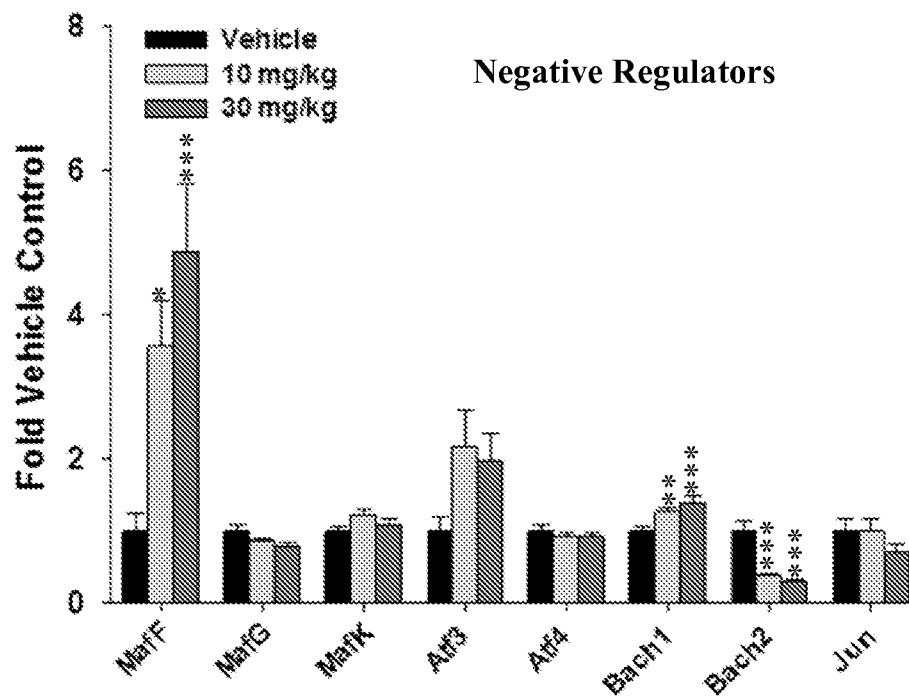


FIG. 26

Prilys Montel



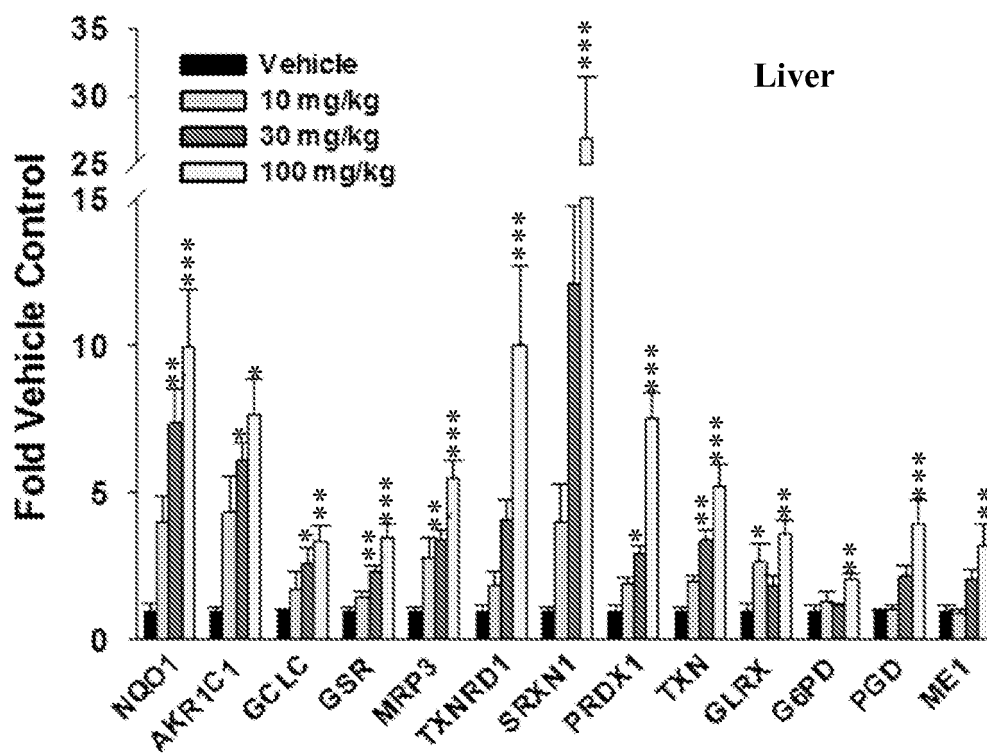
(a)



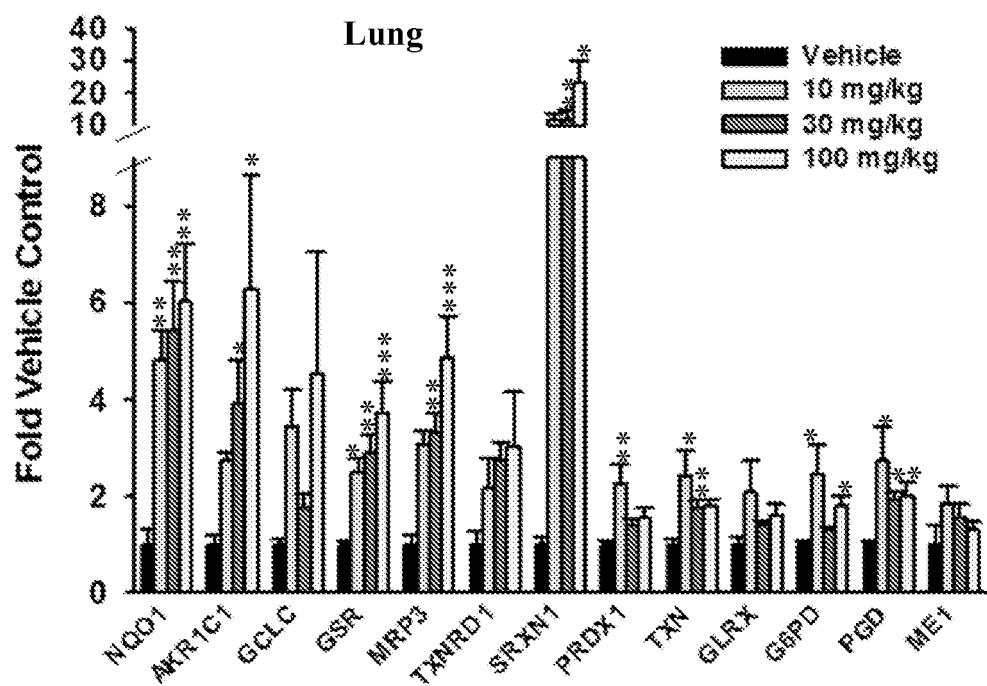
(b)

FIGS. 27a & b

Polys Montel



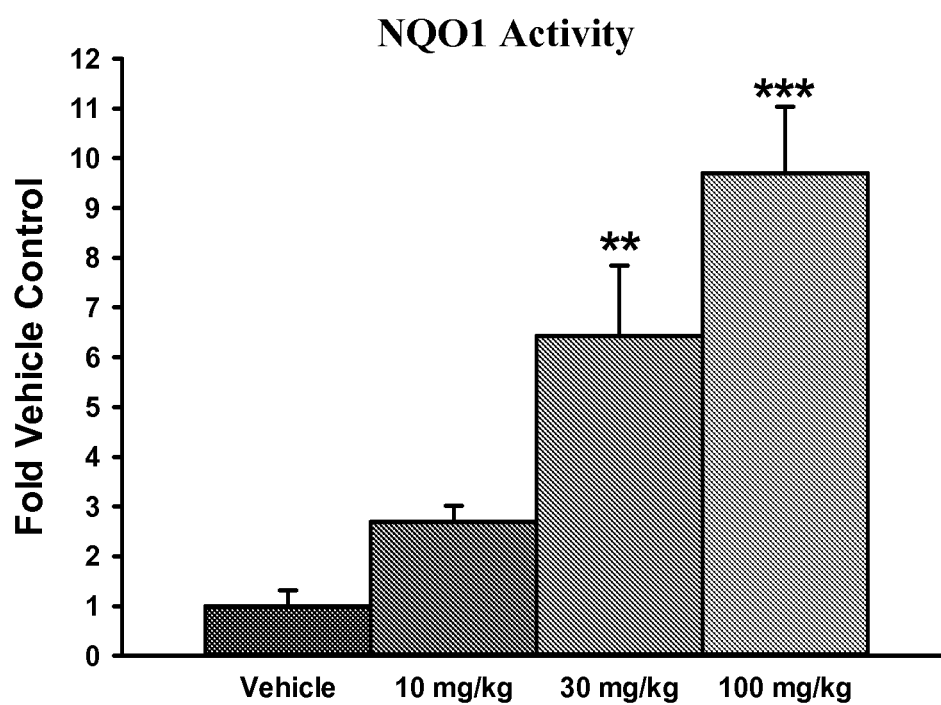
(a)



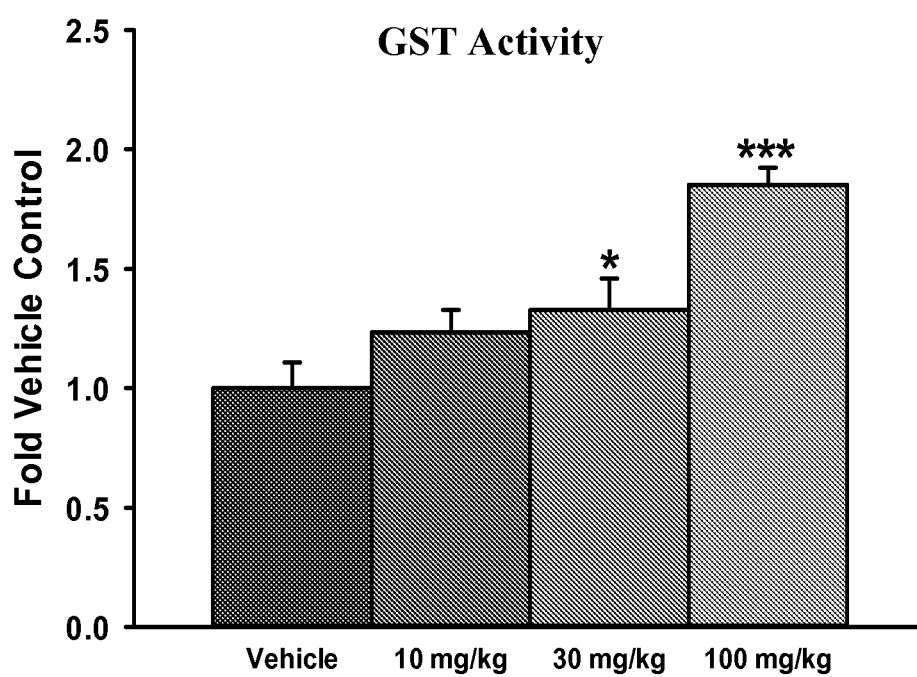
(b)

FIGS. 28a & b

Allyo Monteb



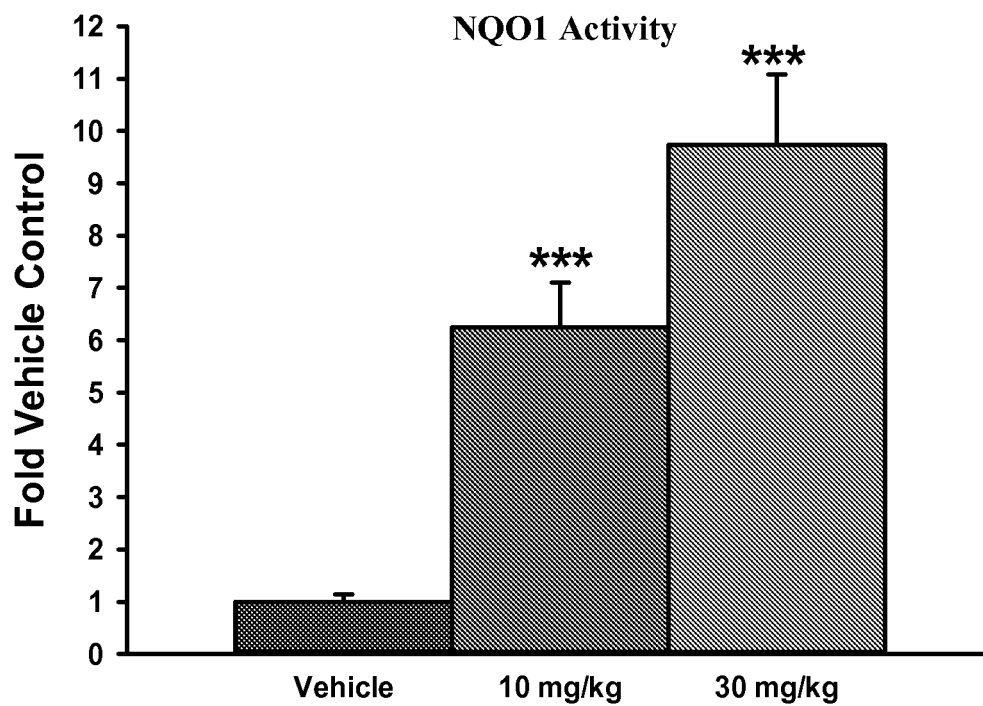
(a)



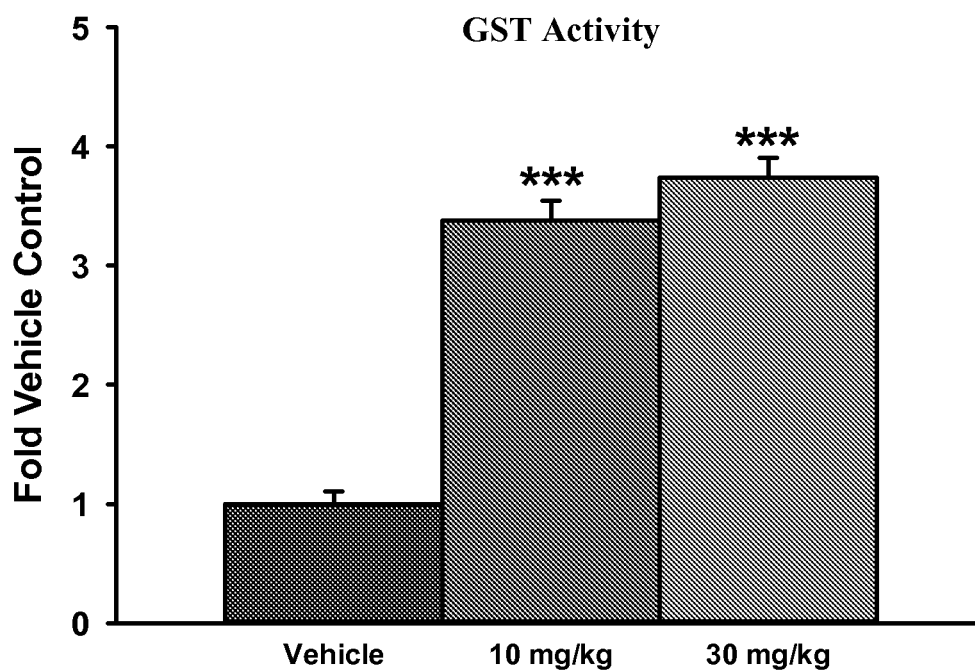
(b)

FIGS. 29a & b

Pradyo Montel



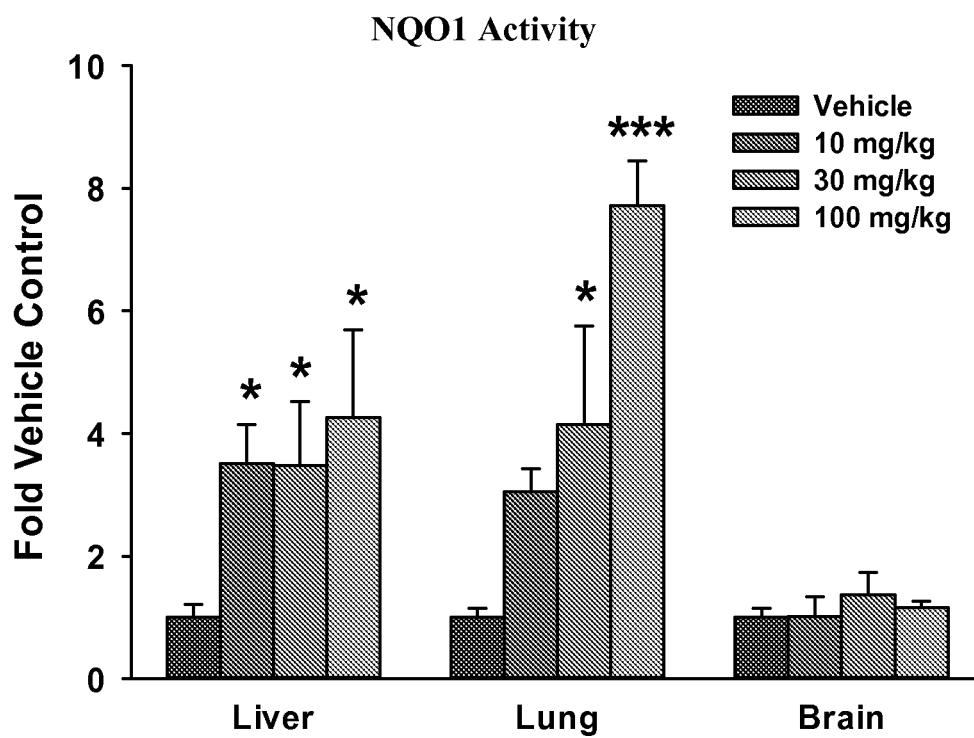
(a)



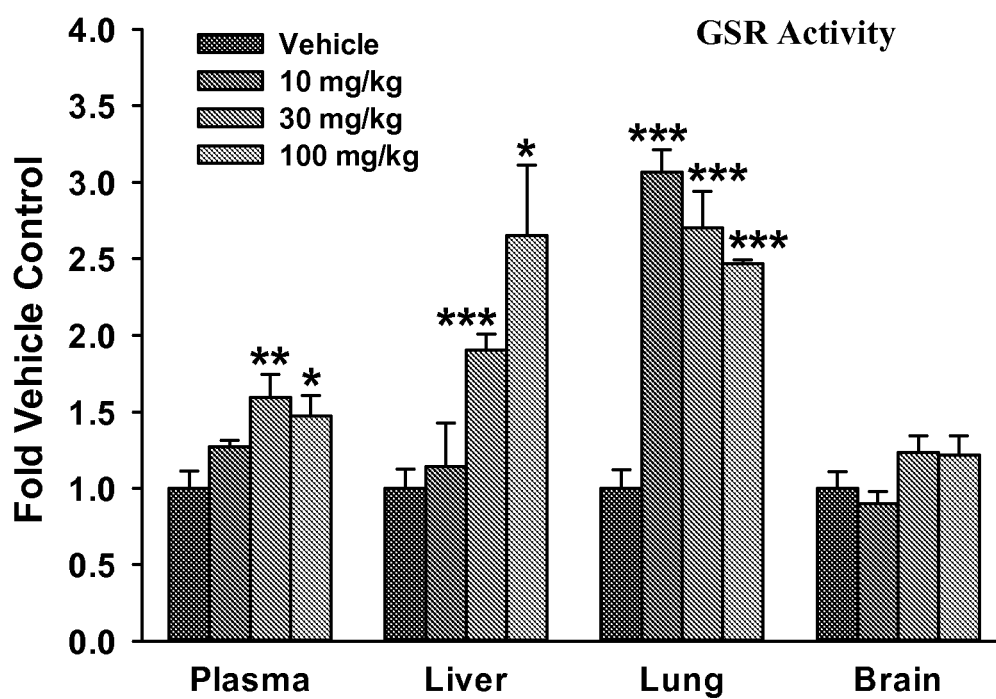
(b)

FIGS. 30a & b

Rajya Montel



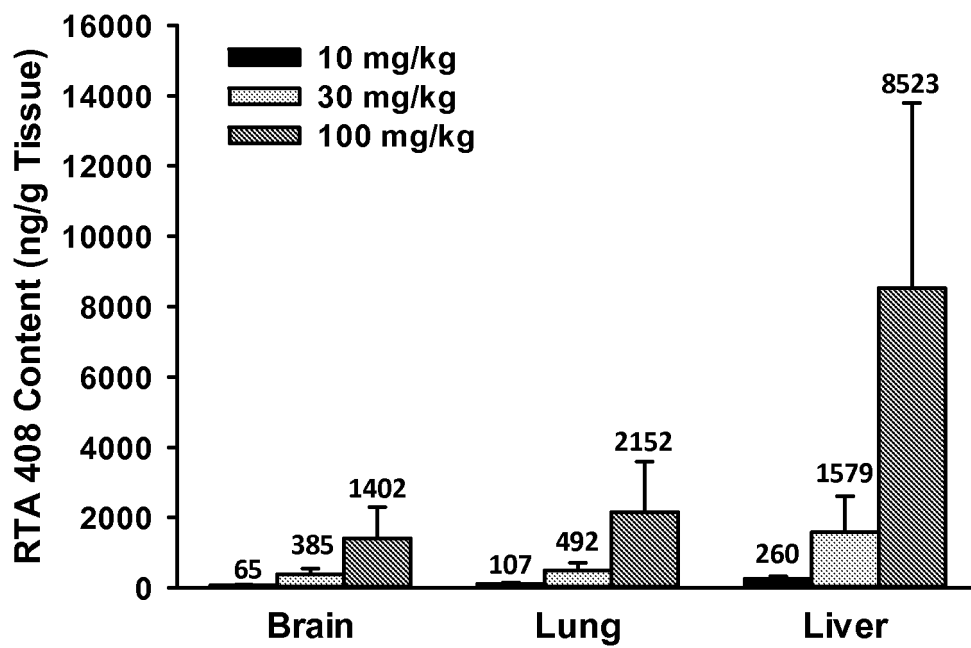
(a)



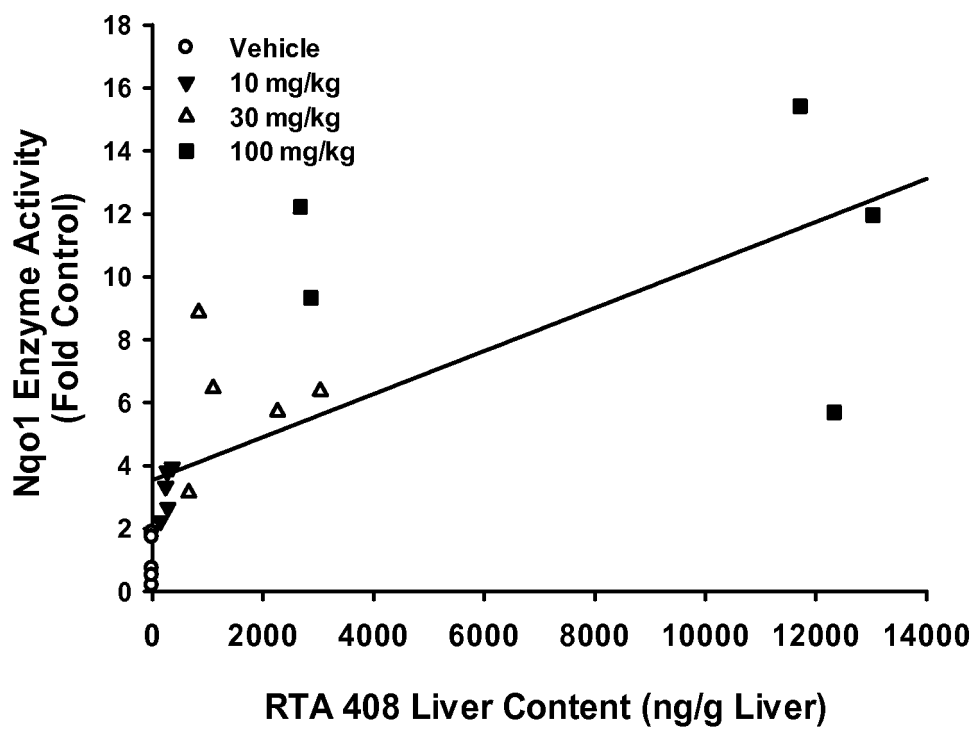
(b)

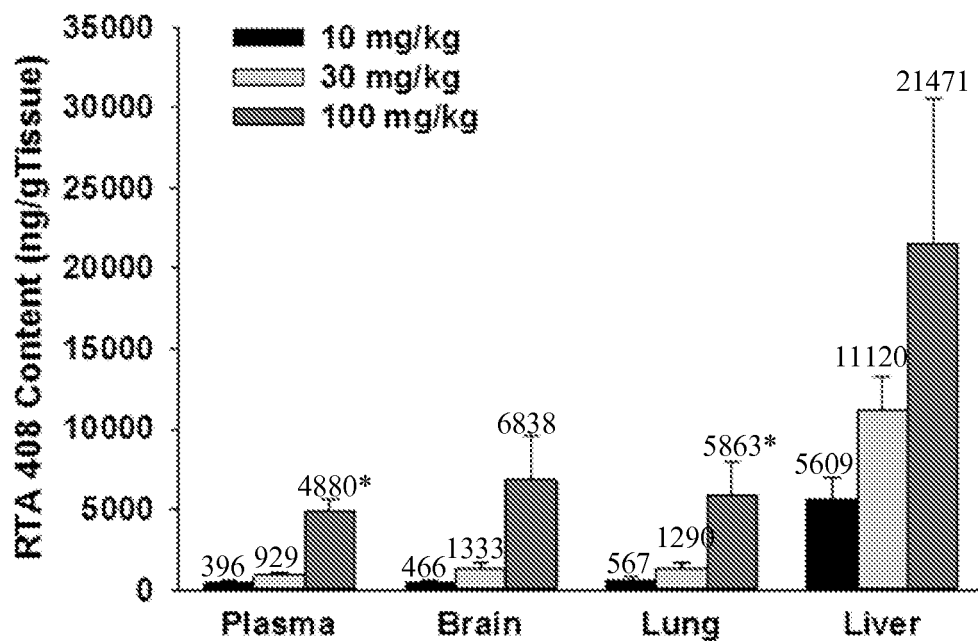
FIGS. 31a & b

Polys Montel

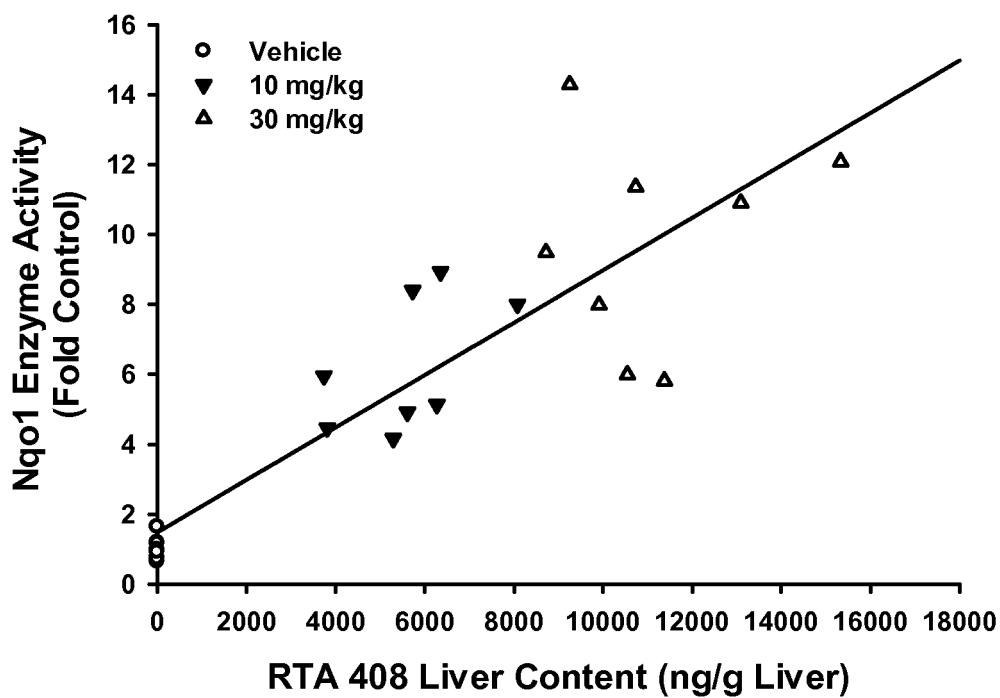


(a)





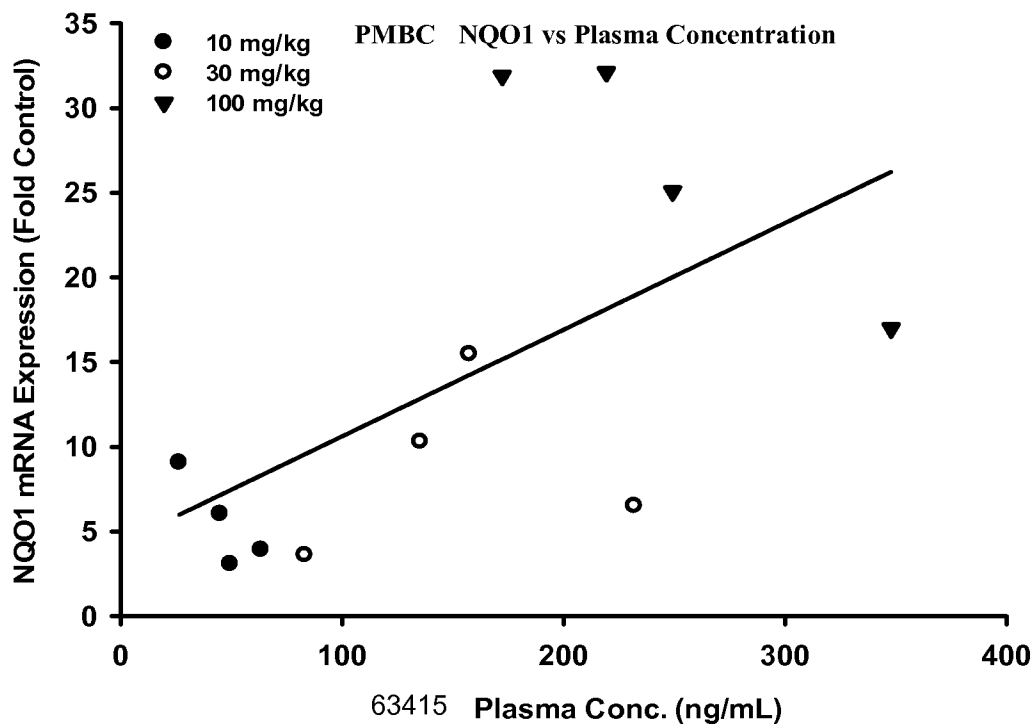
(a)



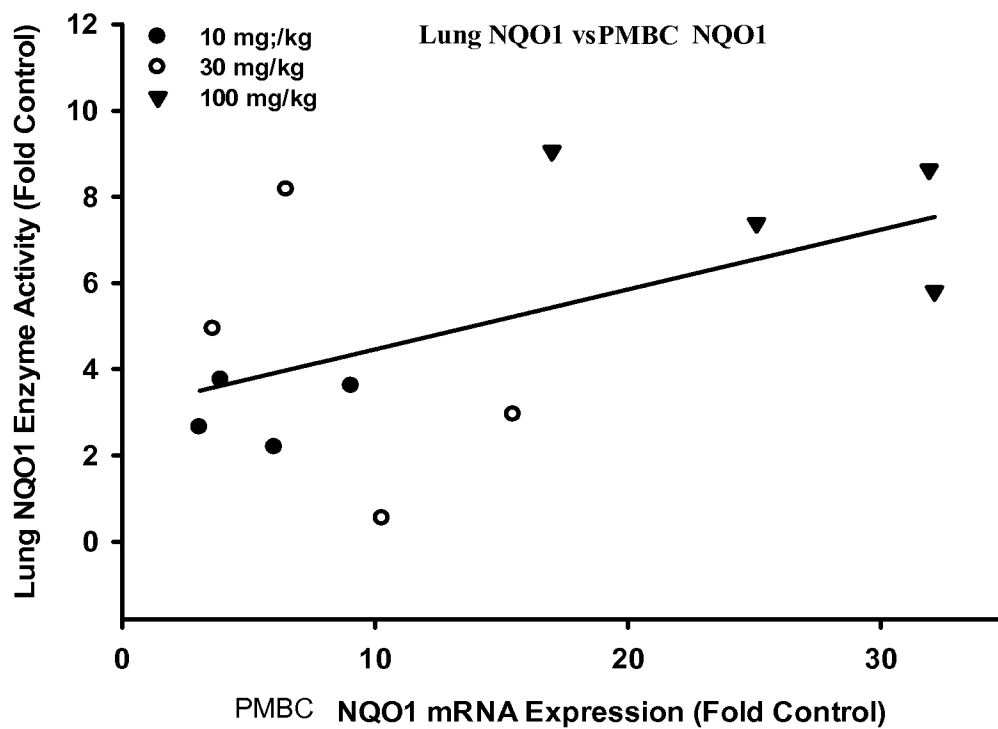
(b)

FIGS. 33a & b

Allyo Monteb



(a)



(b)

FIGS. 34a & b

Mylo Montel

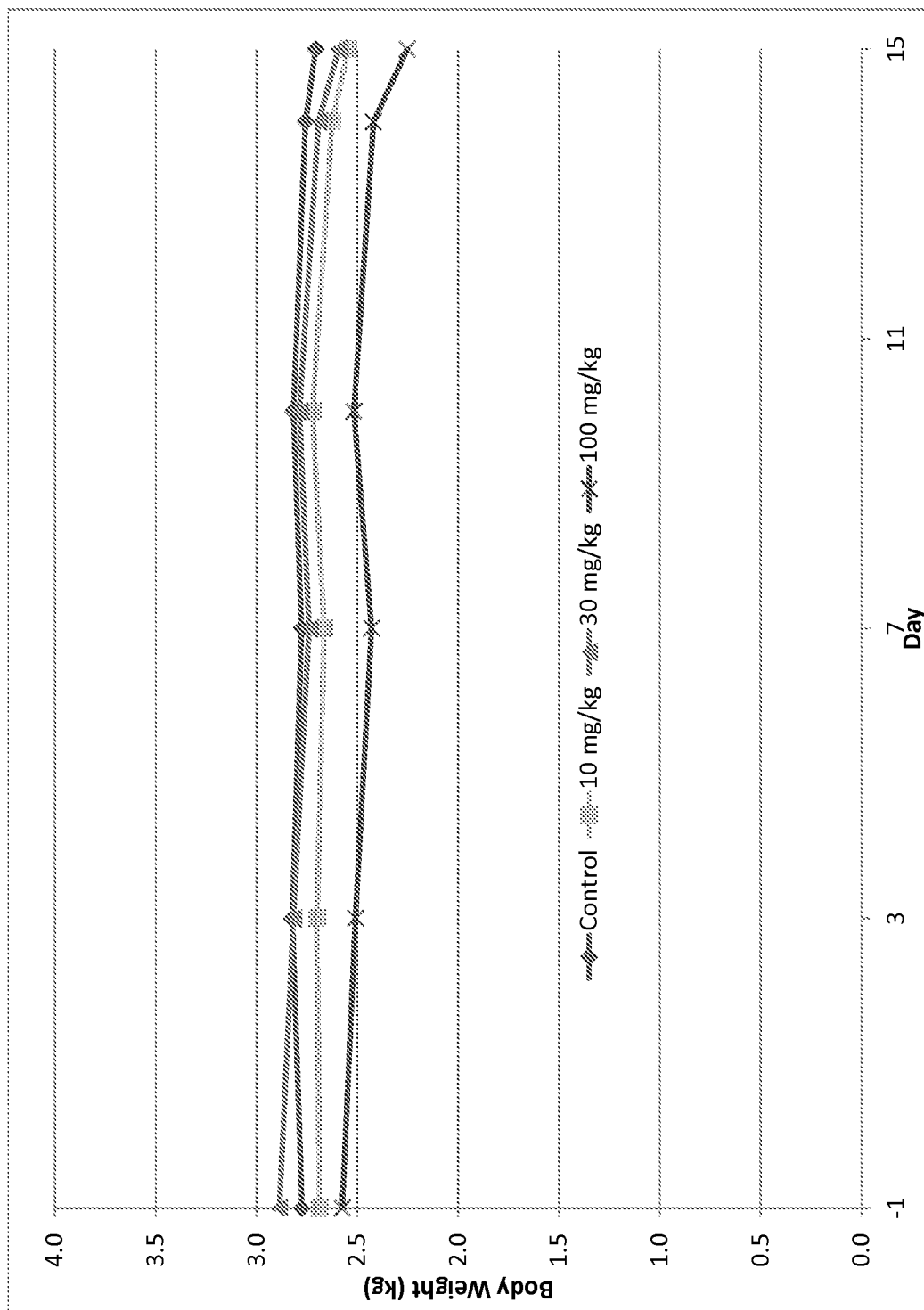


FIG. 35

Prilys Montali

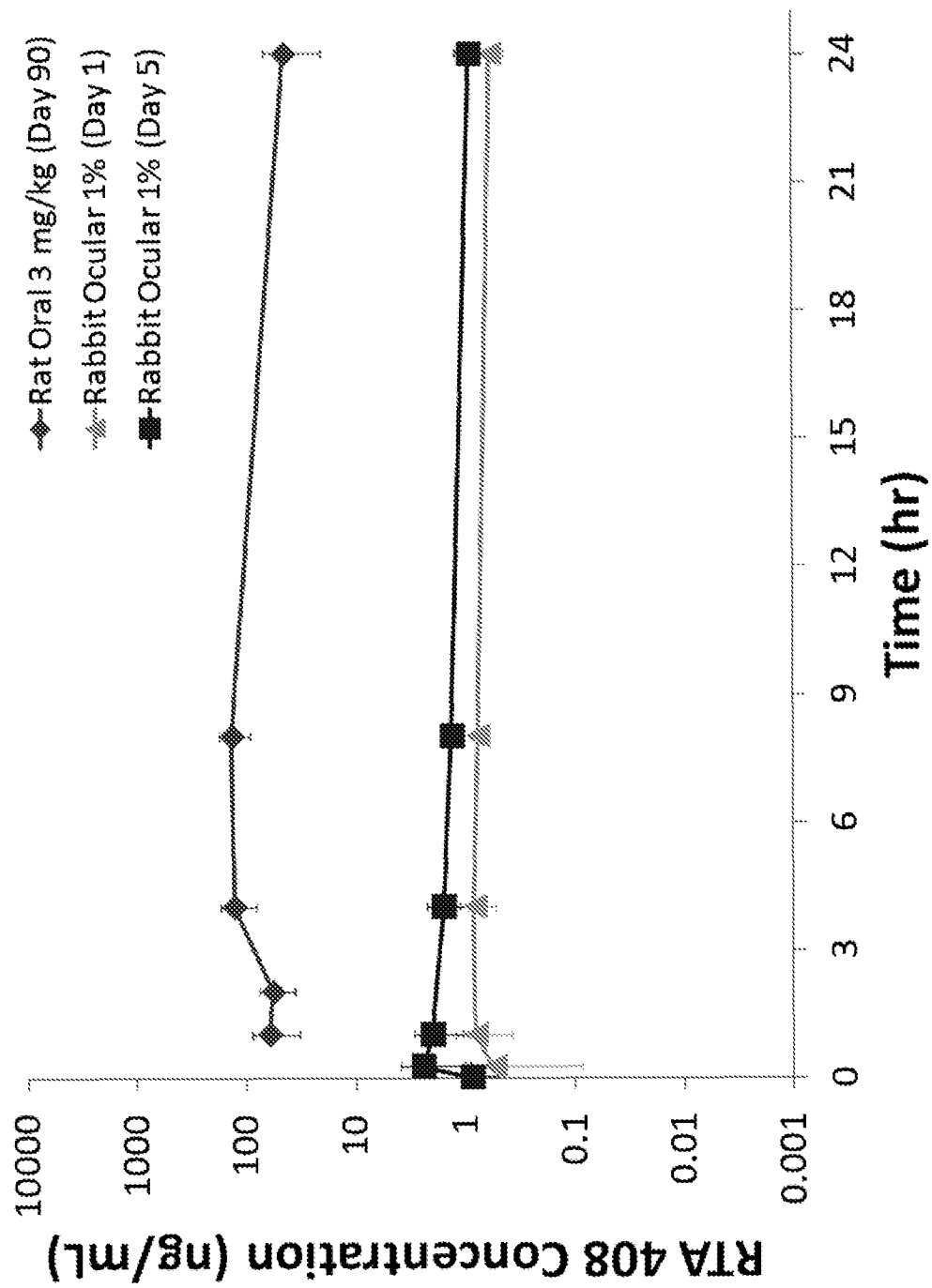
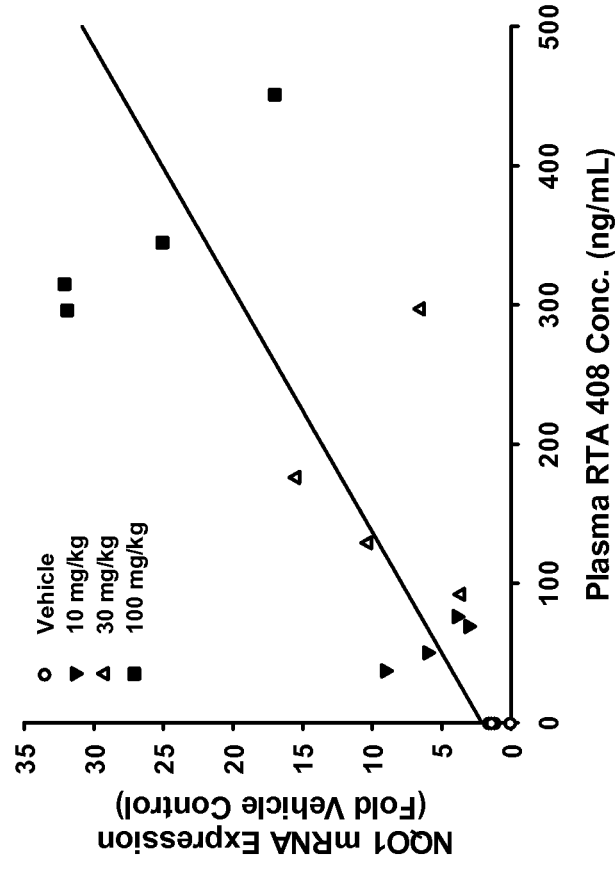


FIG. 36

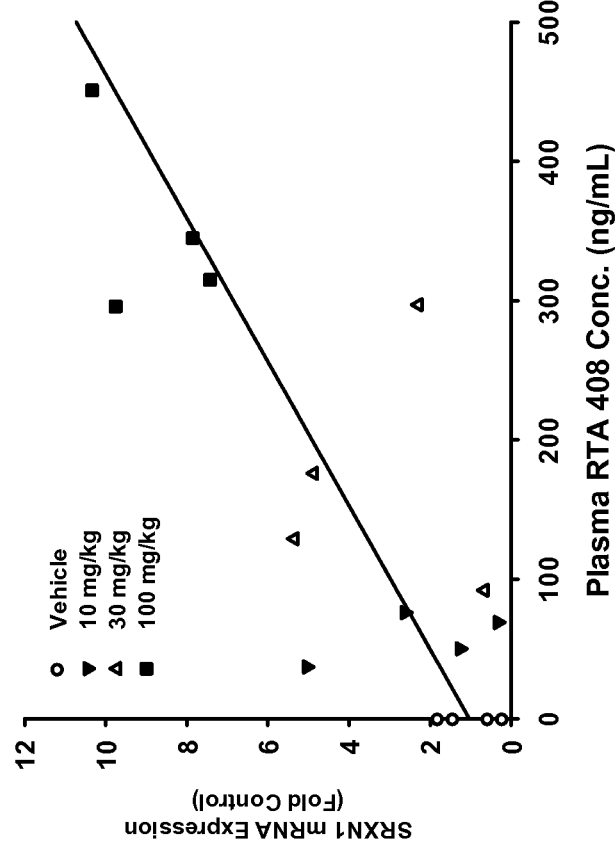
polyo Montel

NQO1



(a)

SRXN1



(b)

FIGS. 37a & b

Allyp Monteb

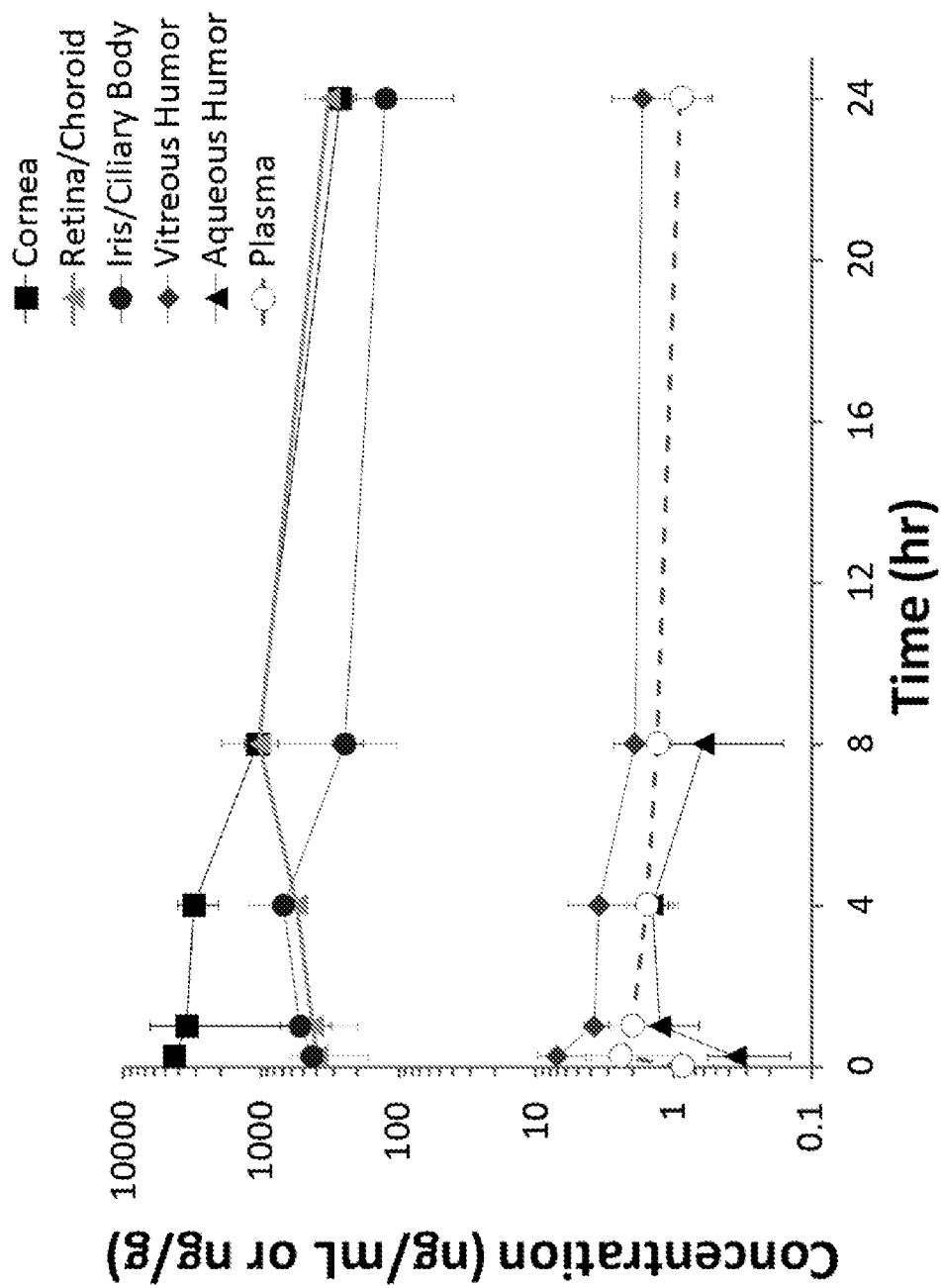


FIG. 38

Mylo Montch

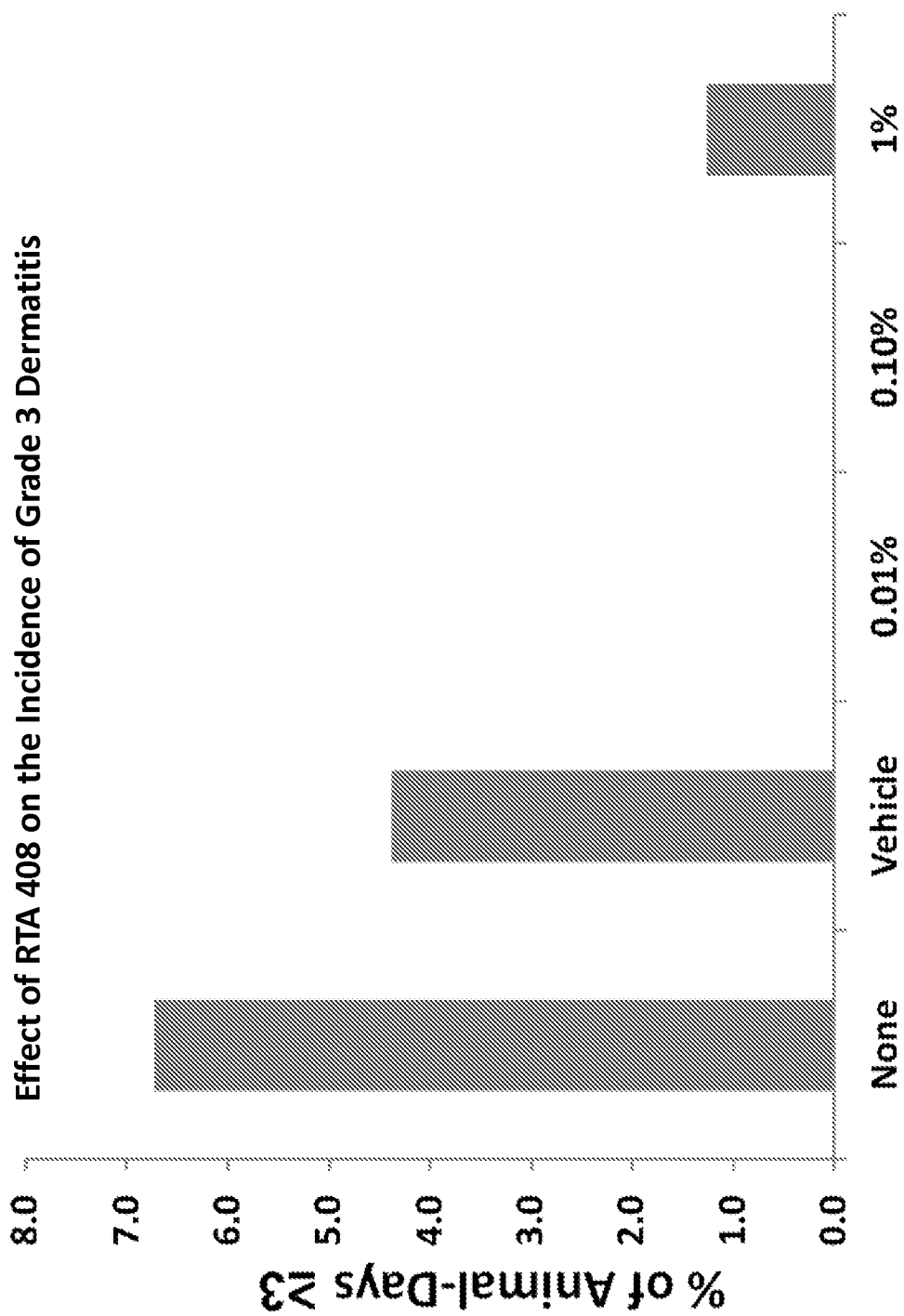


FIG. 39

Prilysa Montel

Effect of RTA 408 on the Incidence of Grade 2 Dermatitis through
Day 30

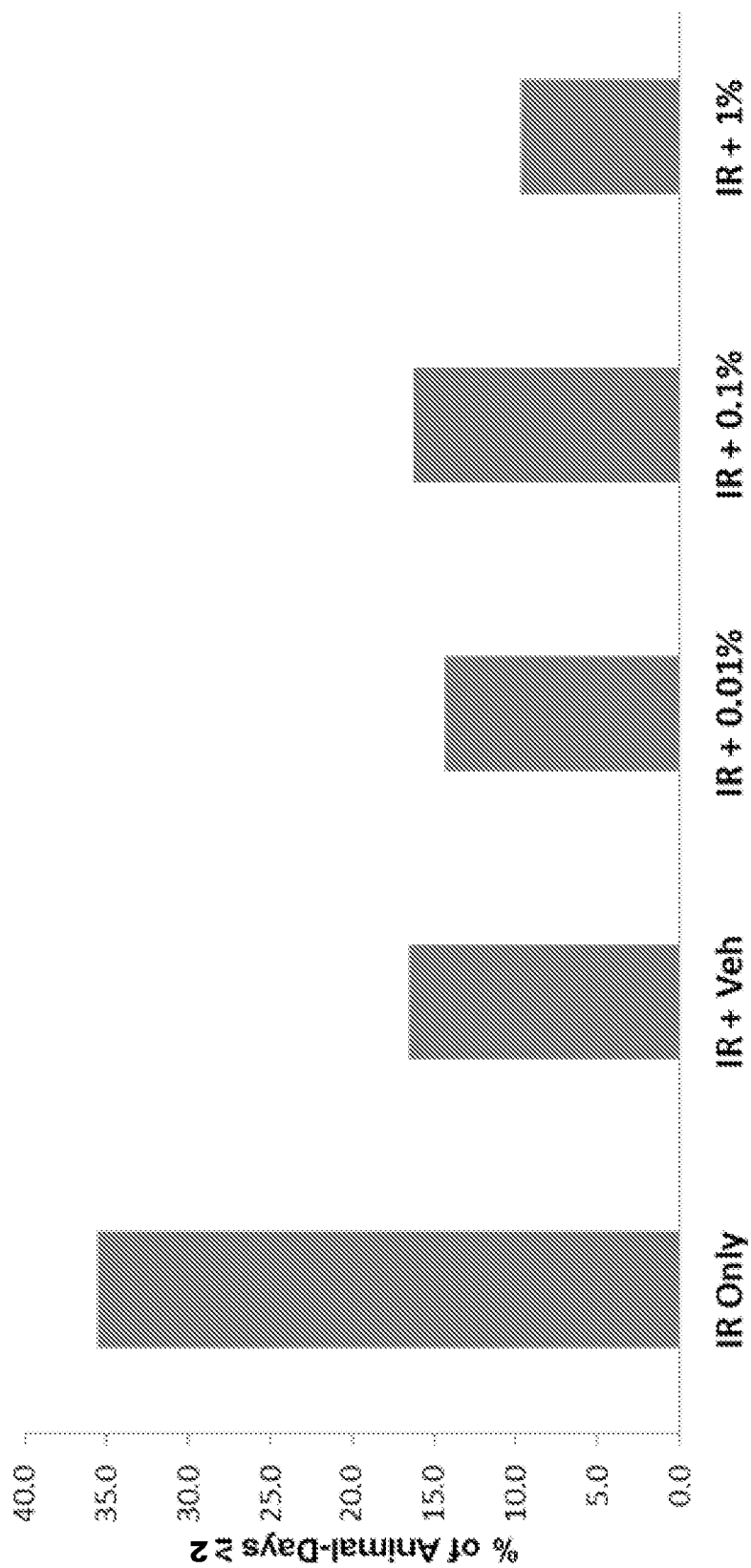


FIG. 40

Philippe Monteban

**Effect of RTA 408 on the Incidence of Grade 3
Dermatitis up to Day 28**

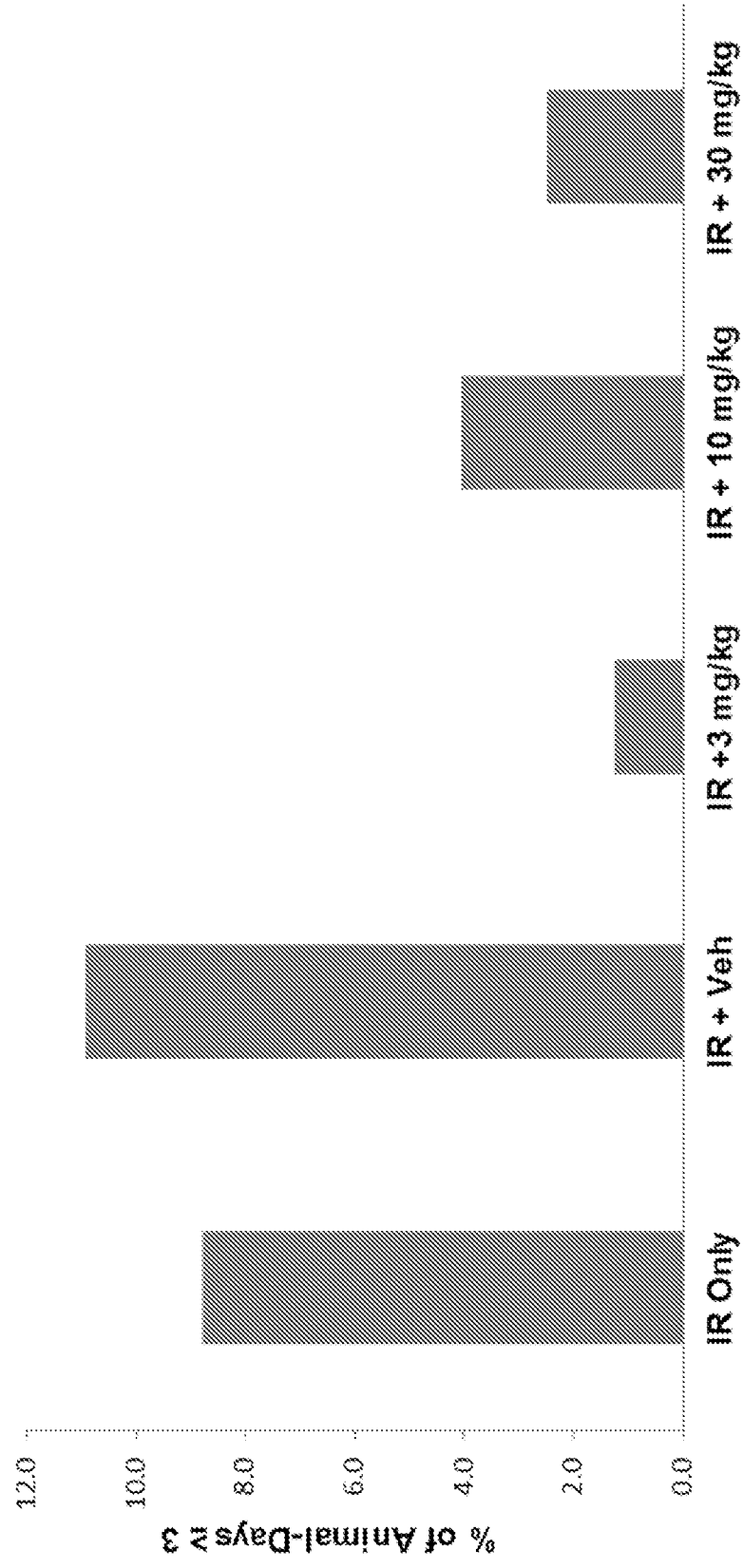


FIG. 41

poly Monteb

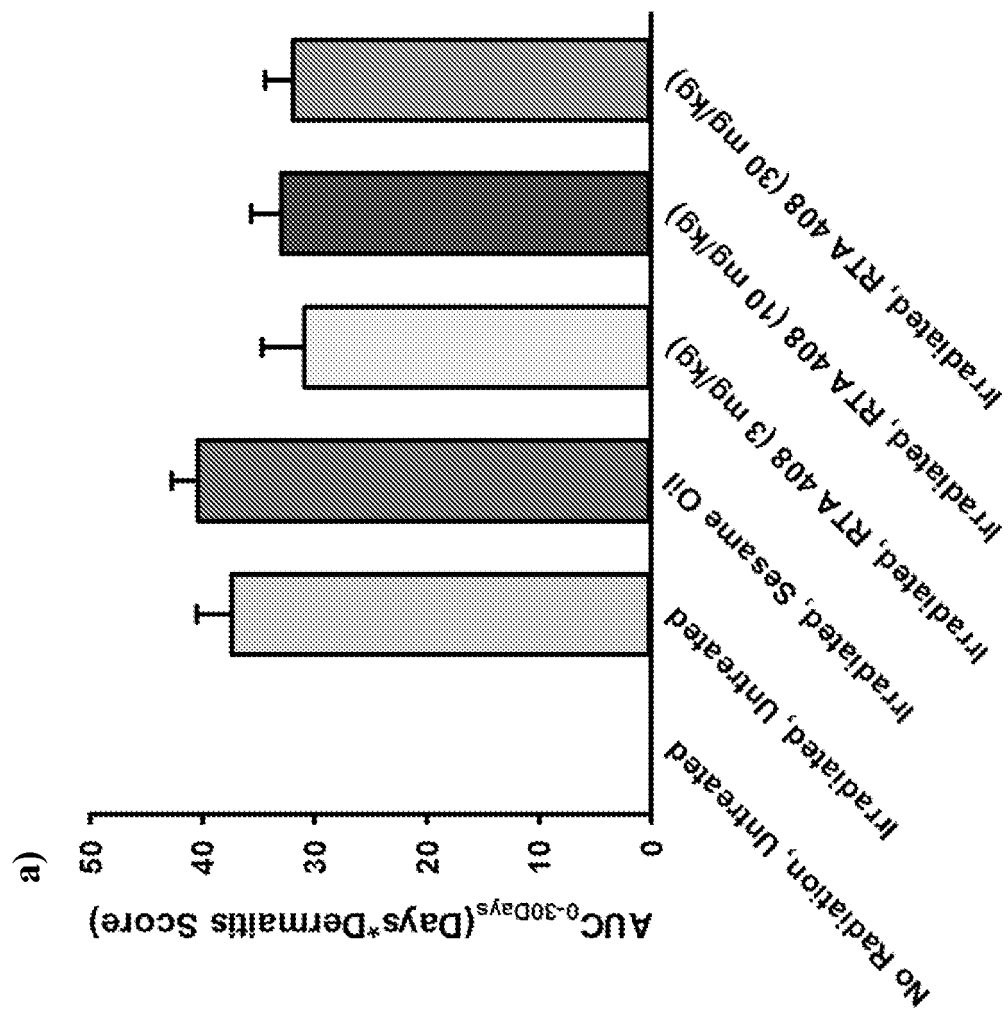


FIG 42a

Pylyp Montel

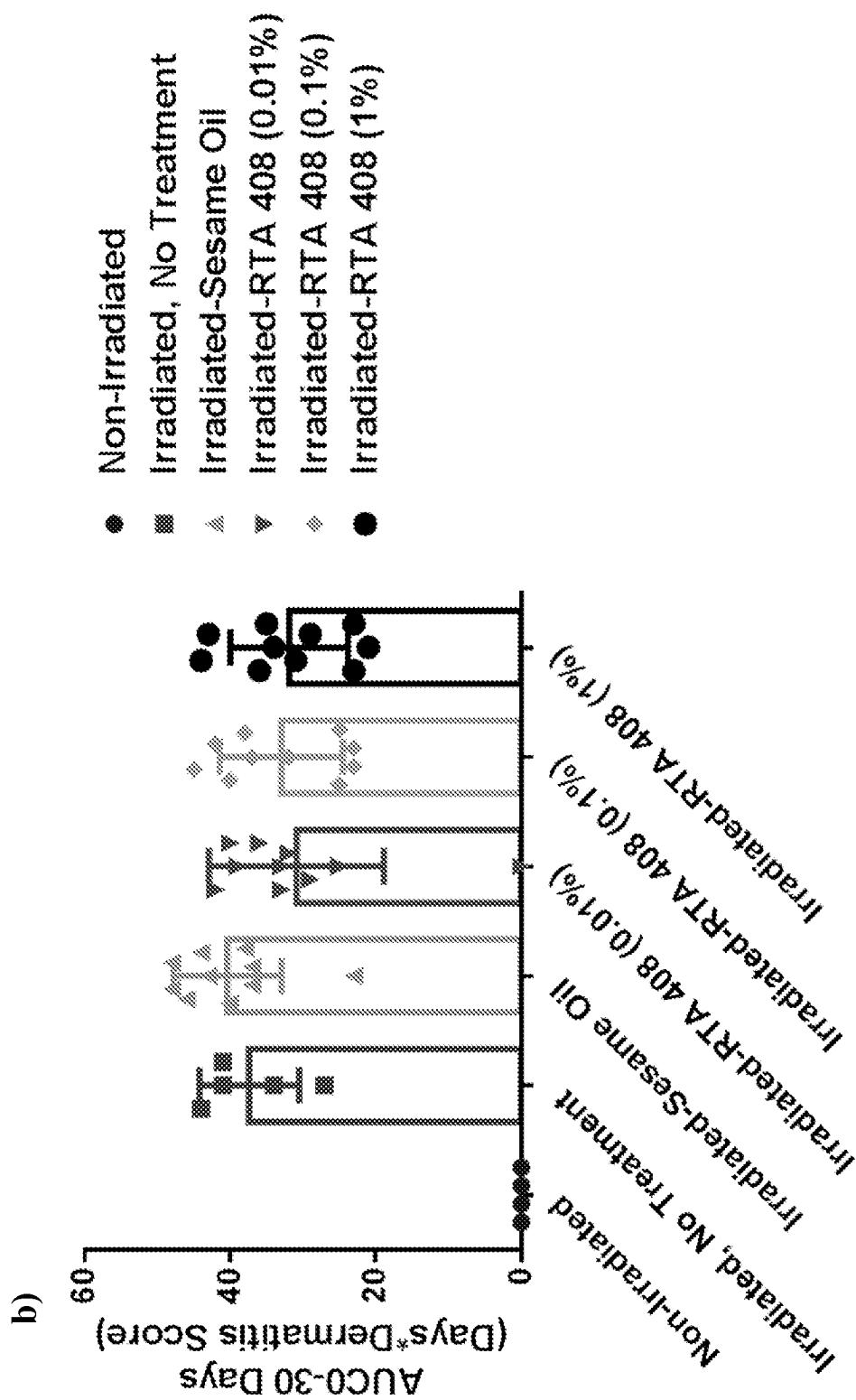


FIG 42b

polya Montel

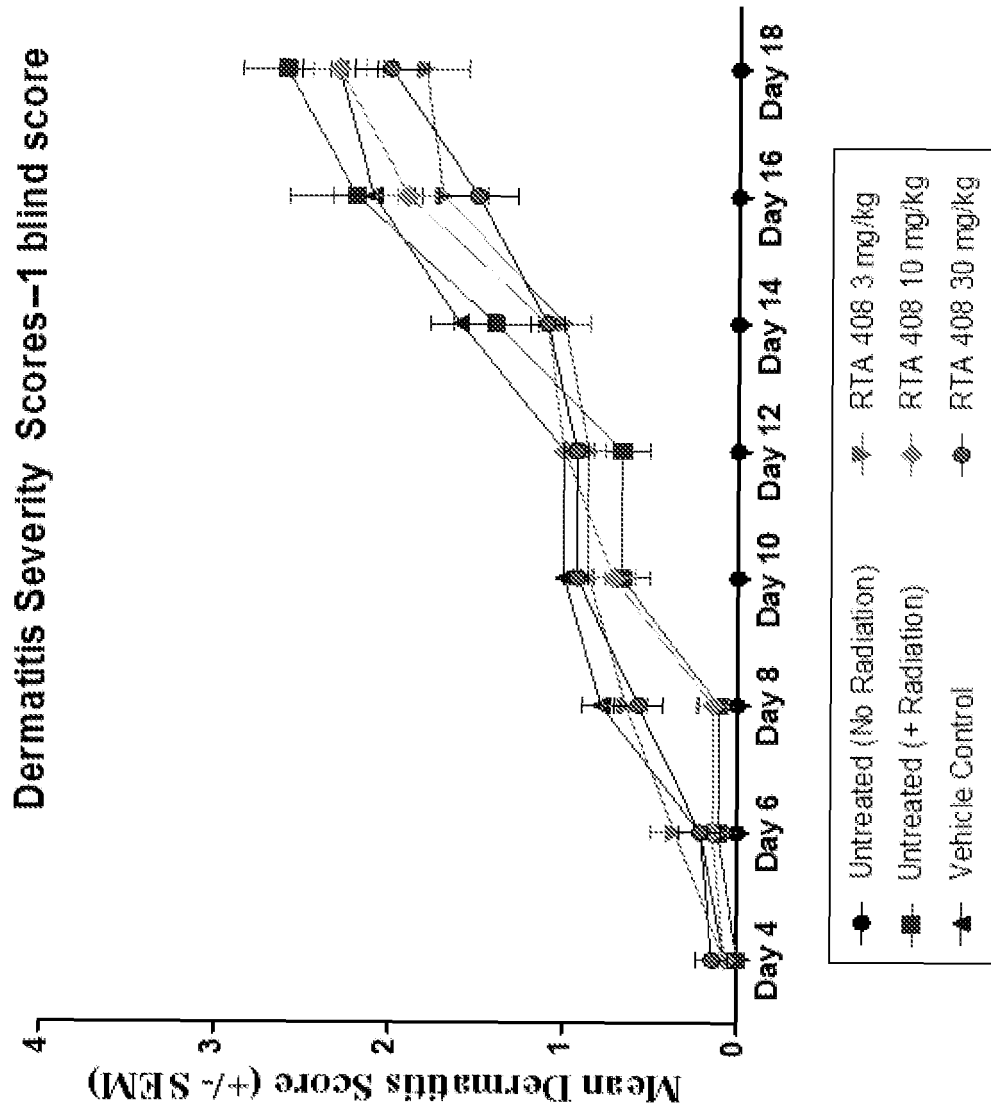


FIG. 43

Polysciences Montech

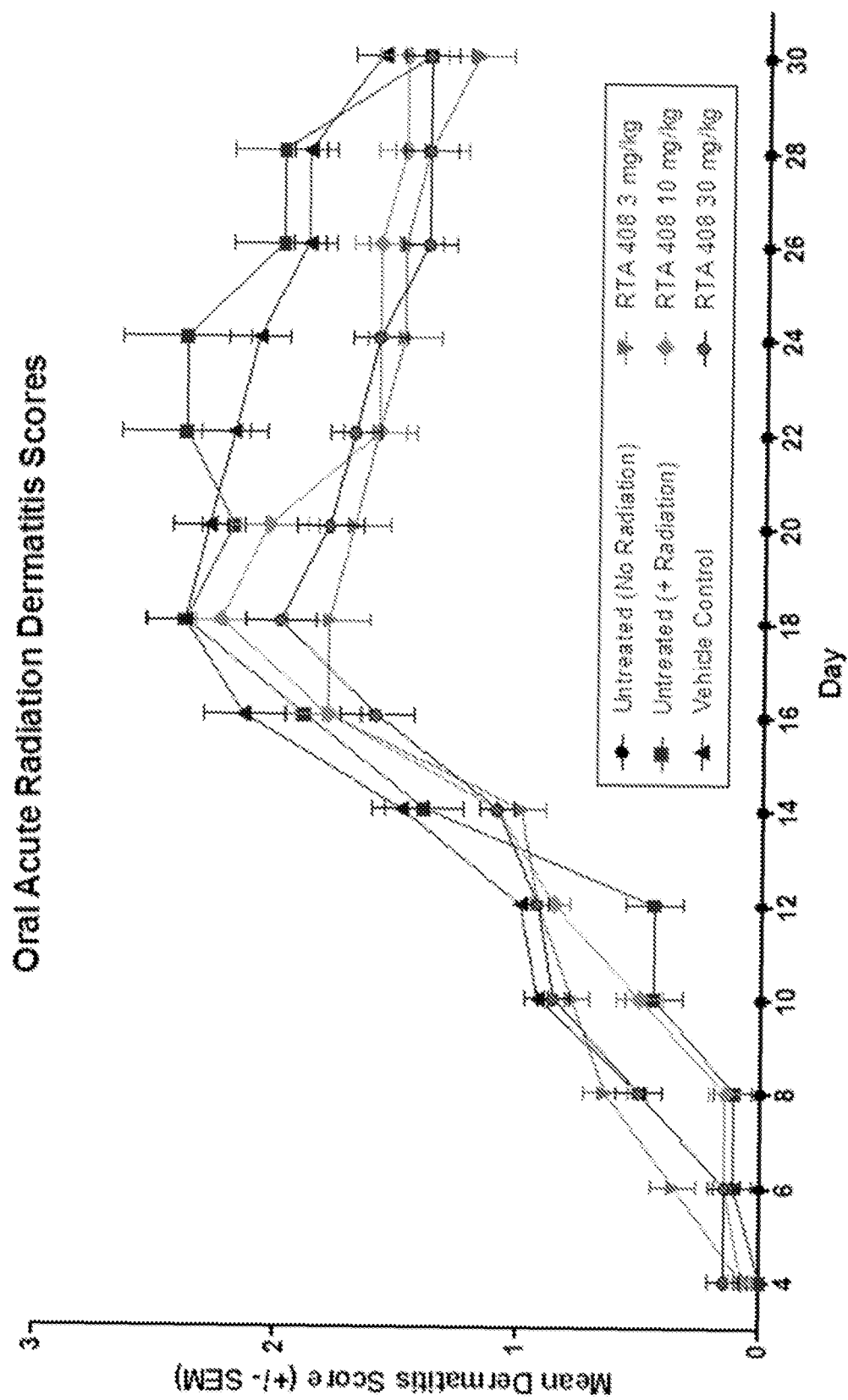


FIG 44

Philip Monteleone

Topical Acute Radiation Dermatitis Scores

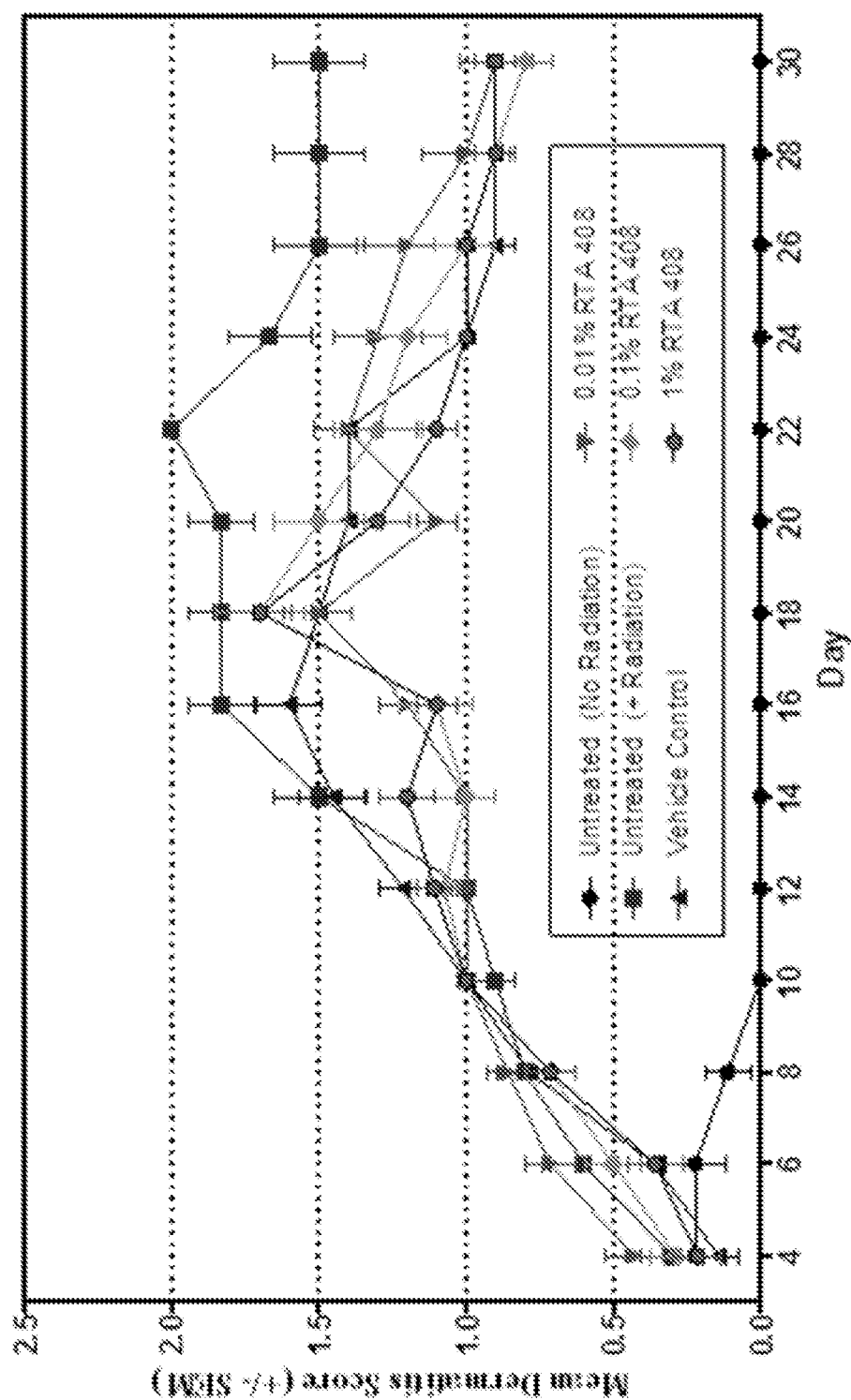


FIG. 45

Allyo Montel

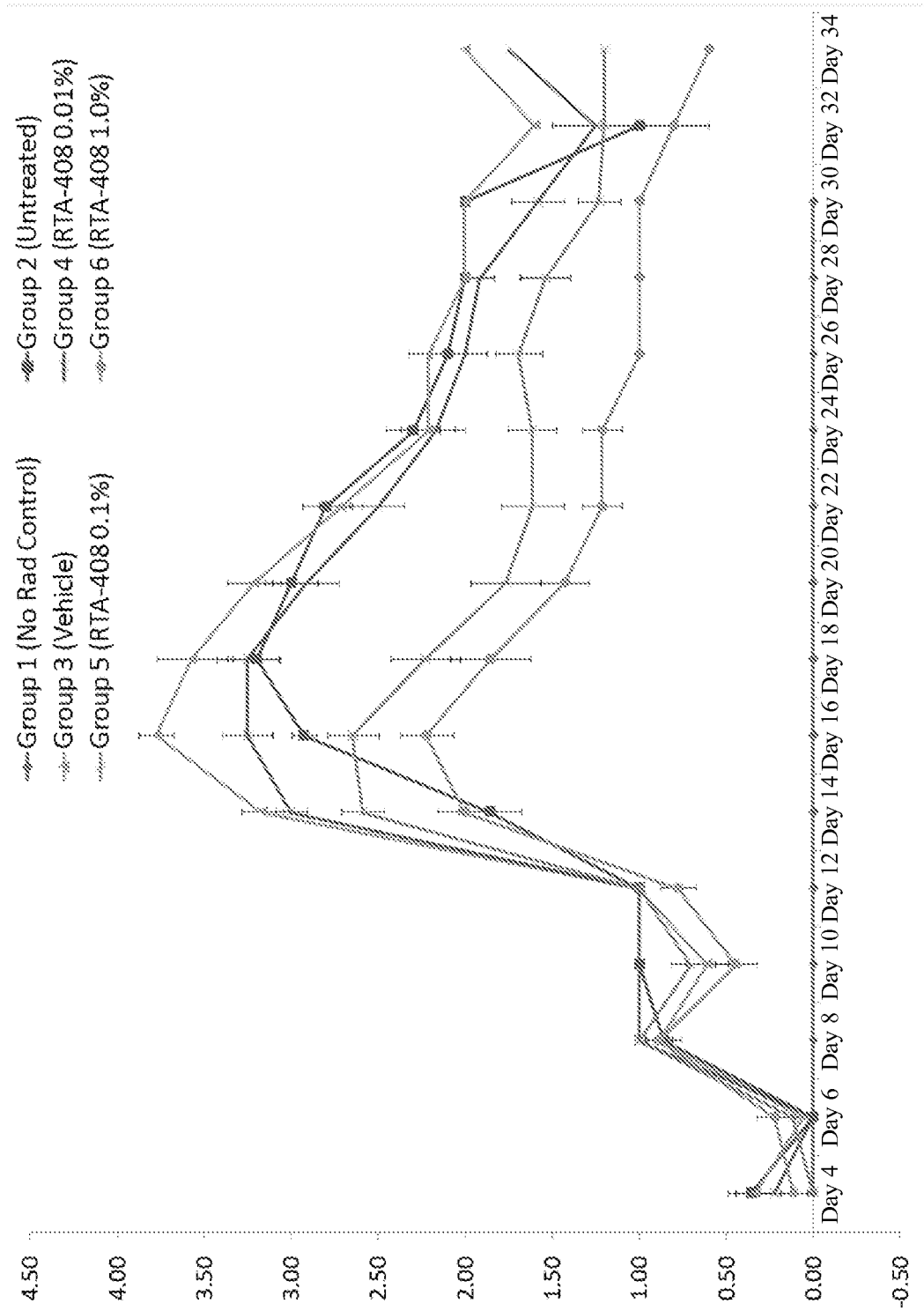


FIG. 46

Patricia Montiel

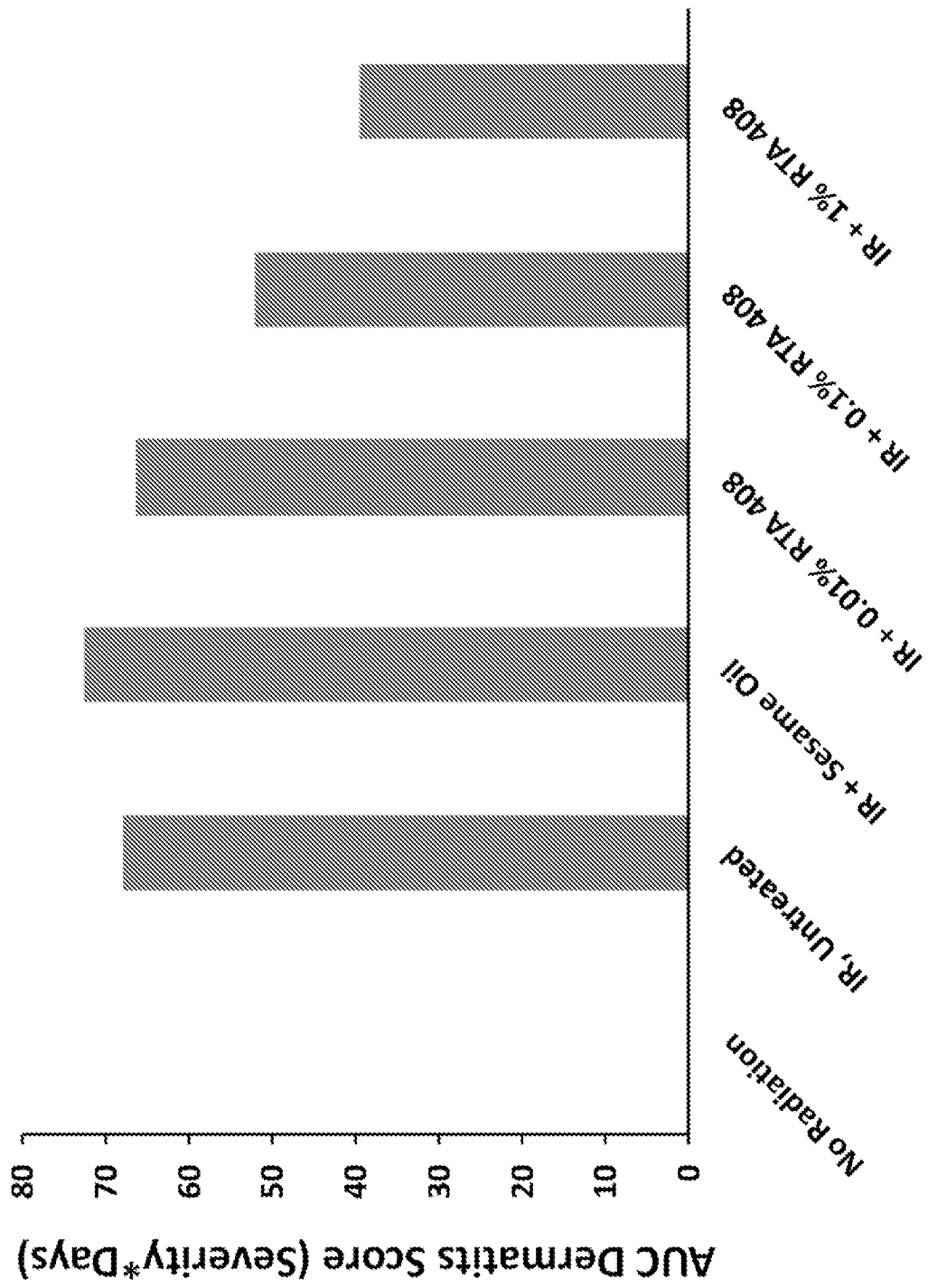


FIG. 47

Philip Monteleone

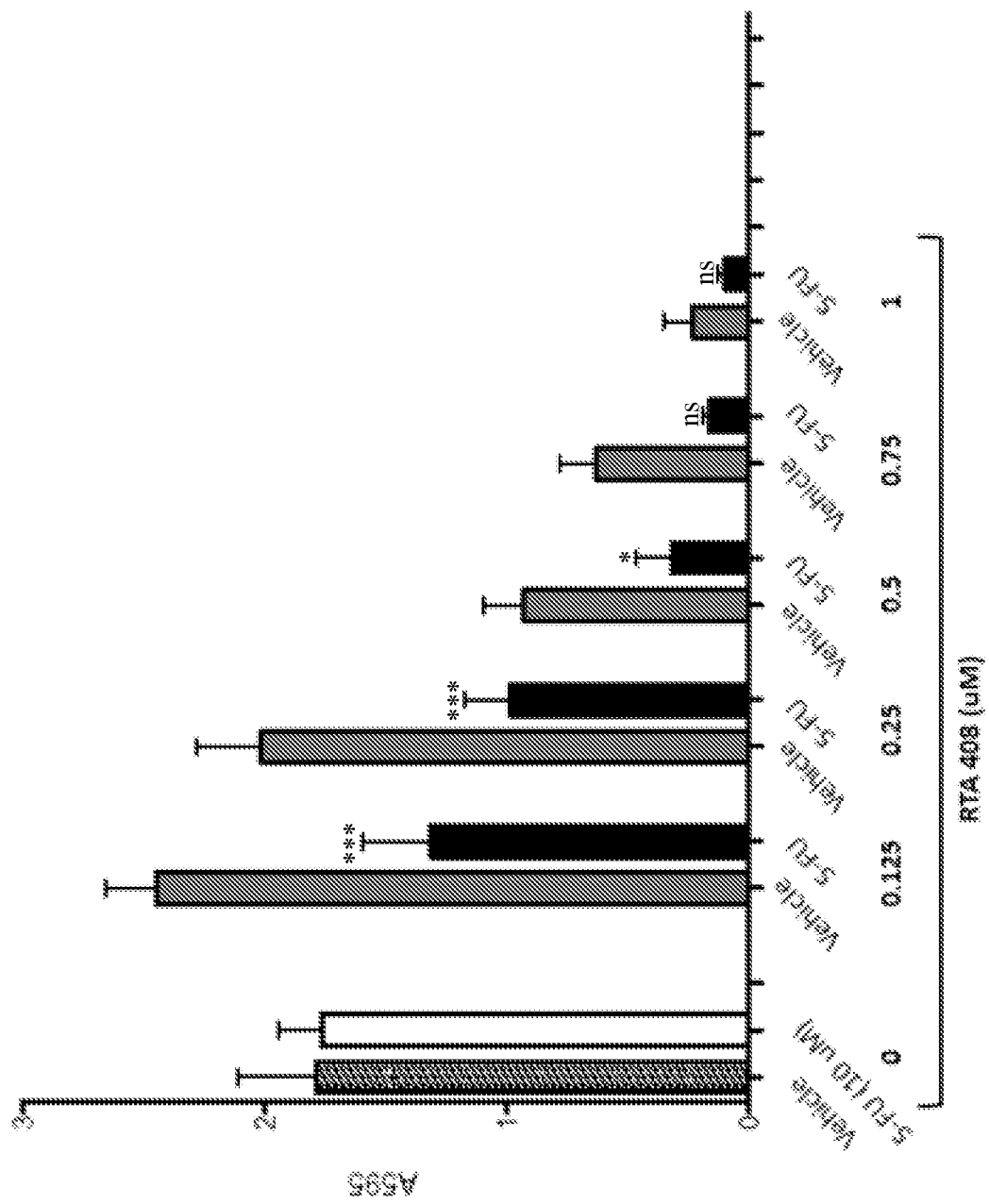


FIG. 48a

Polyp Montchi

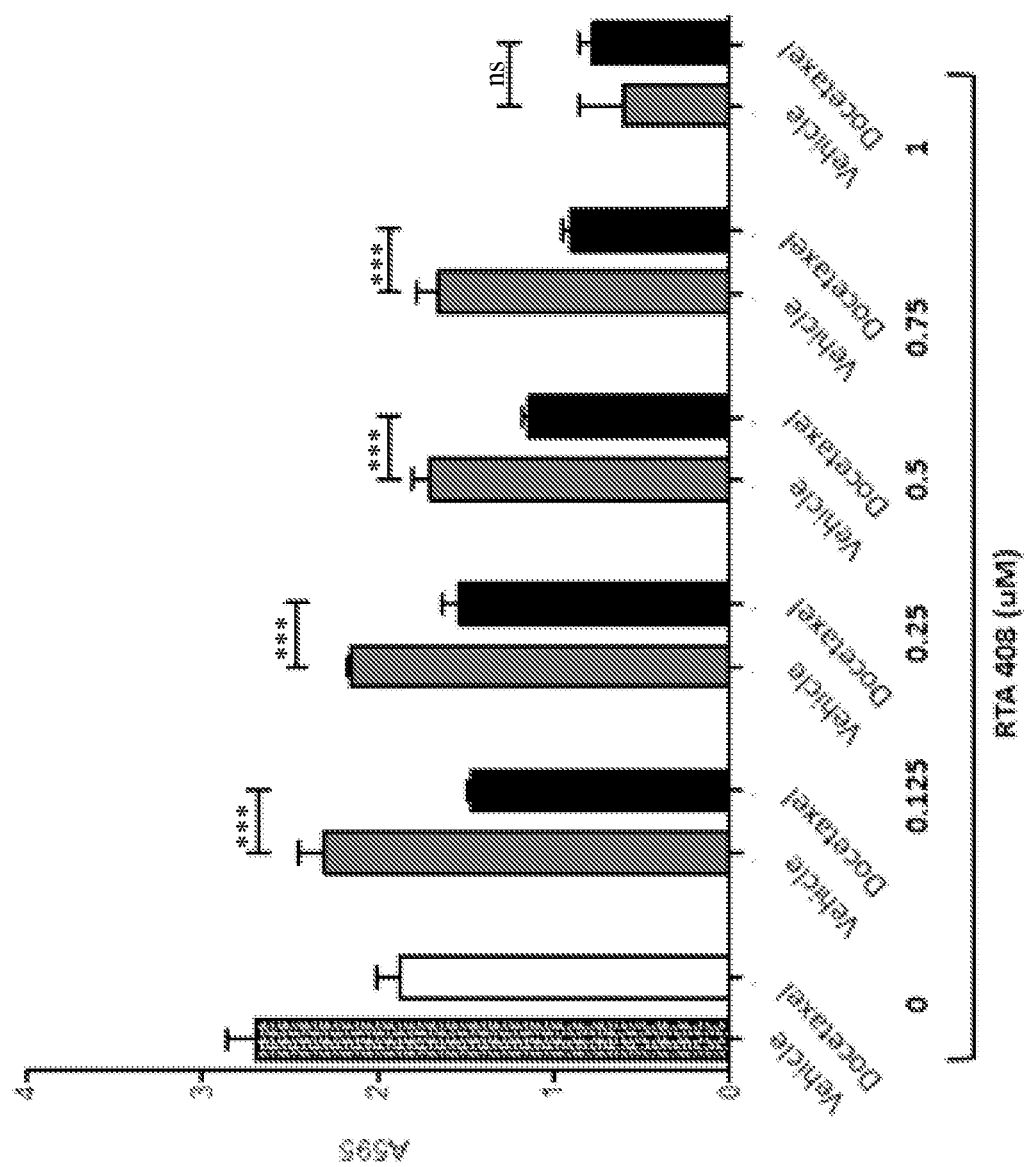
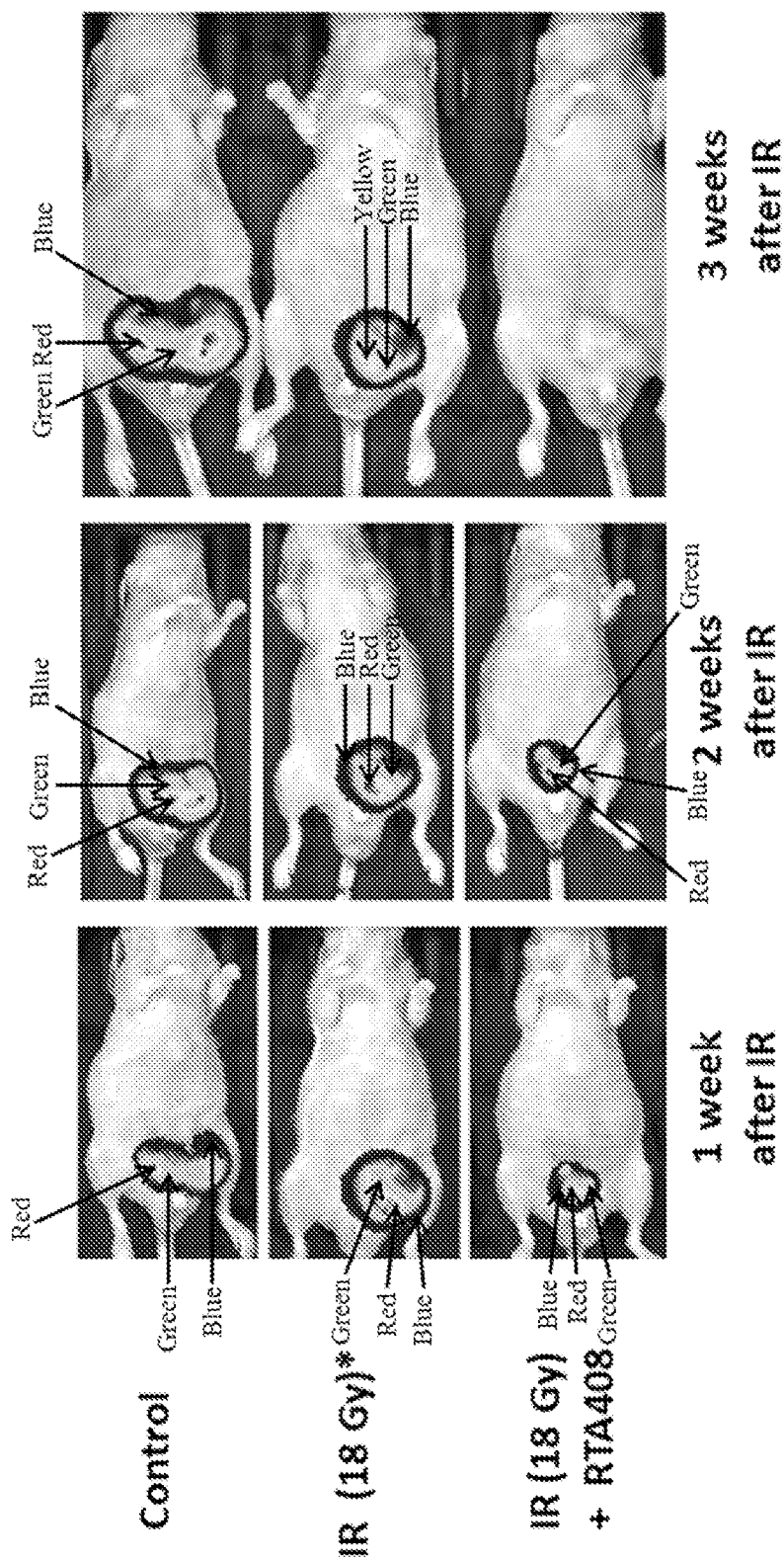


FIG. 48b

Mylo Montel



* Single dose IR administered to the pelvic area of tumor-bearing animals

FIG. 49

Polyo Montel

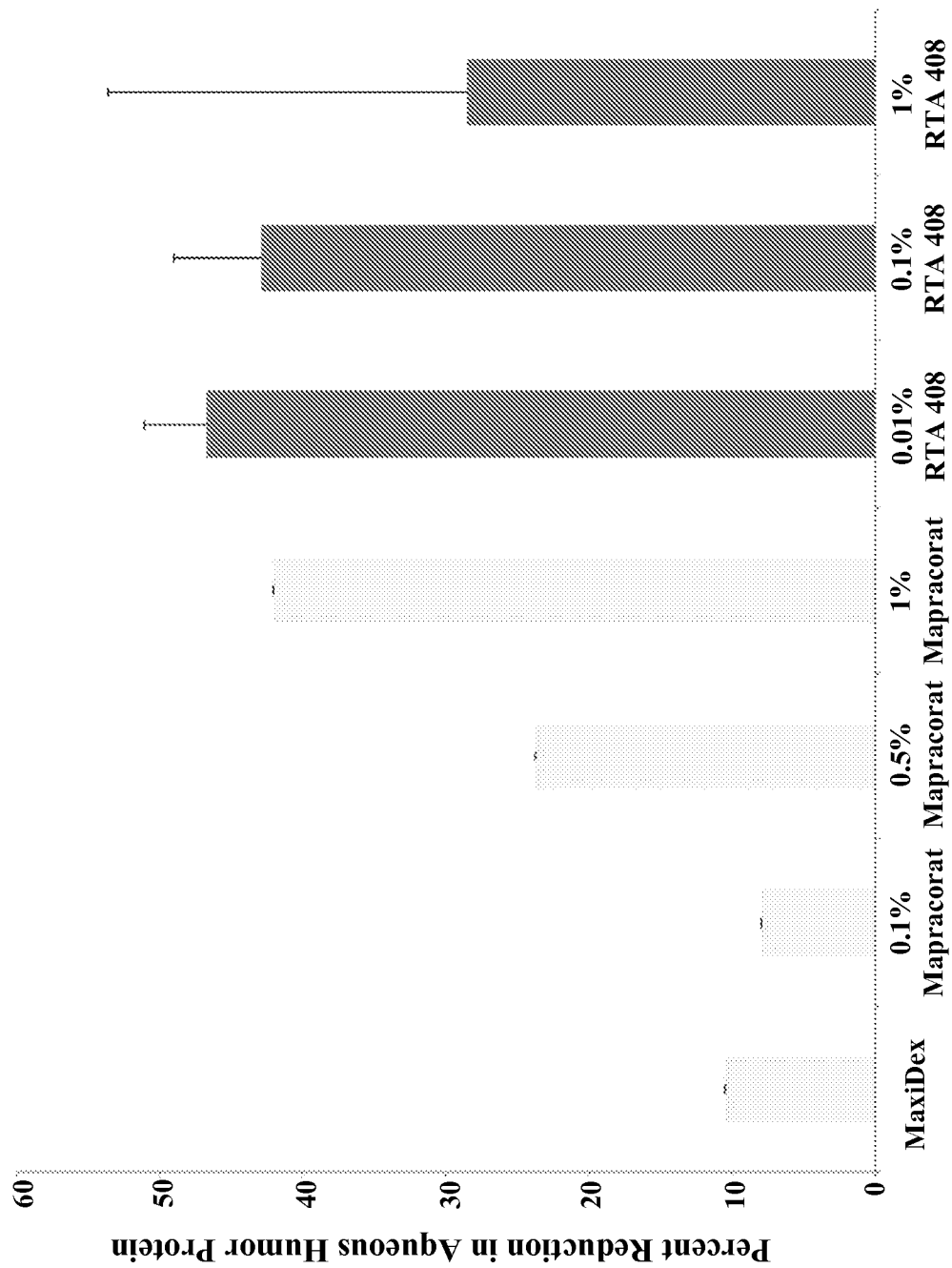


FIG. 50

polya Montch

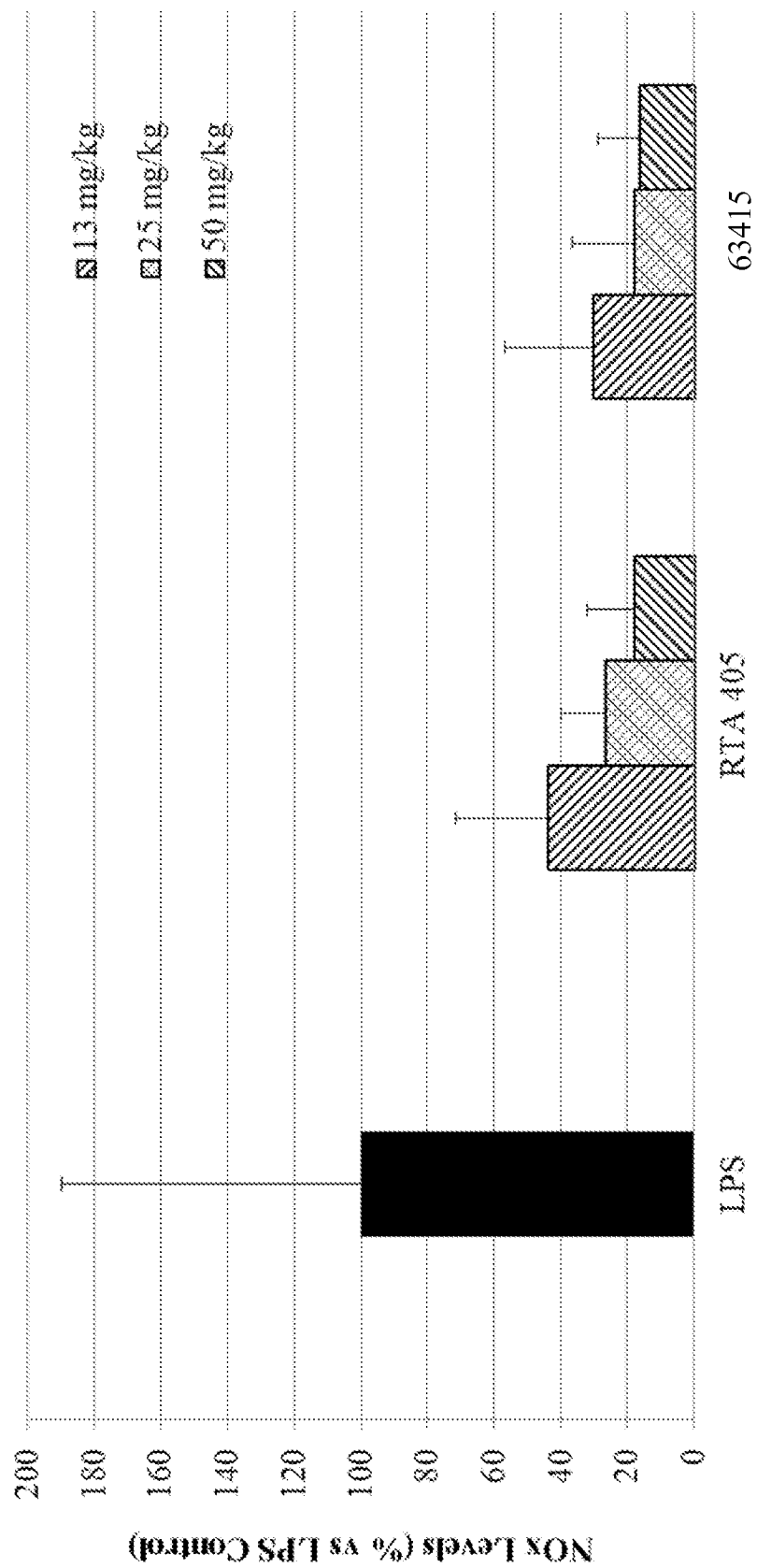


FIG. 51

Myo Monteb

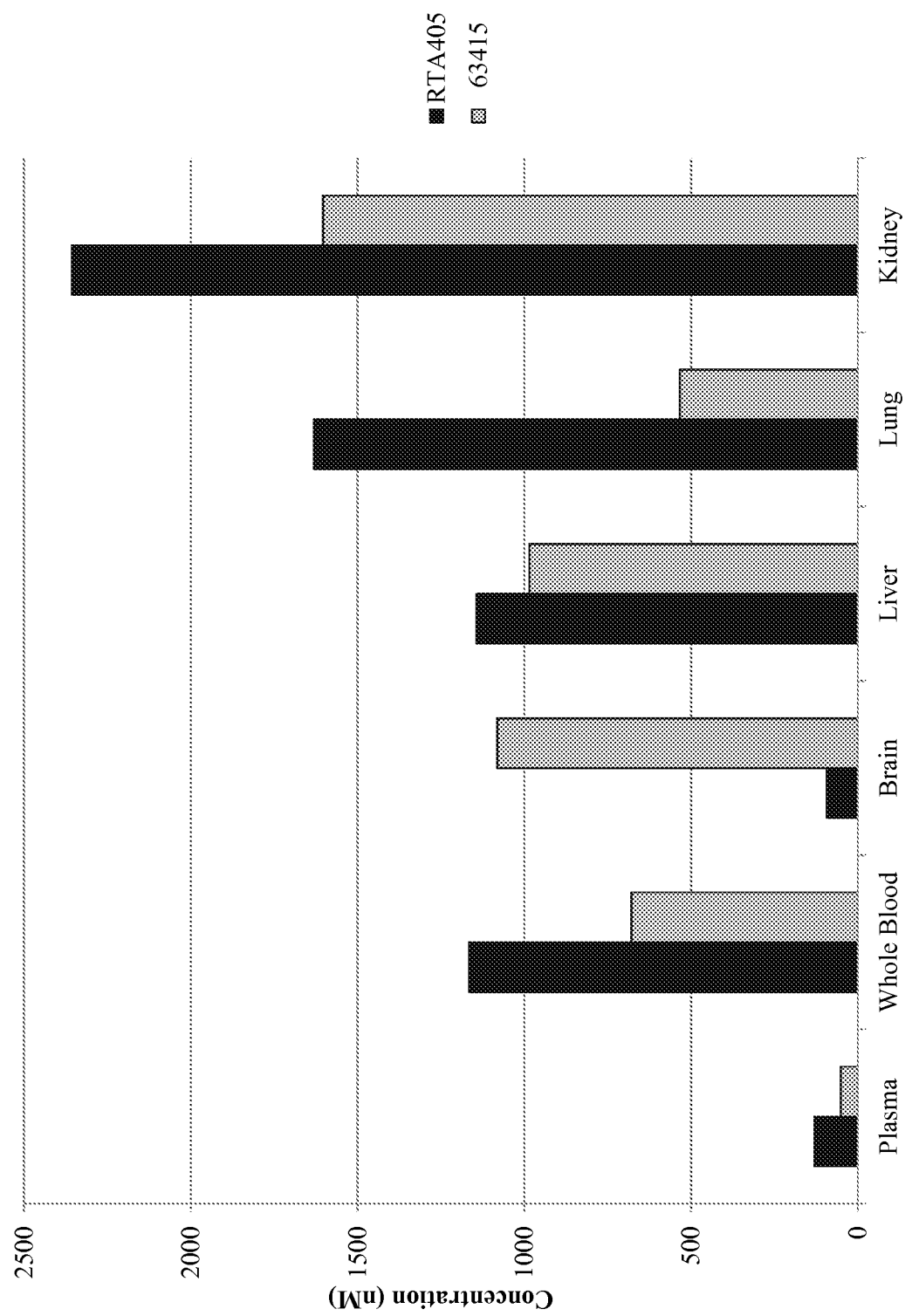


FIG. 52

Allyp Montel

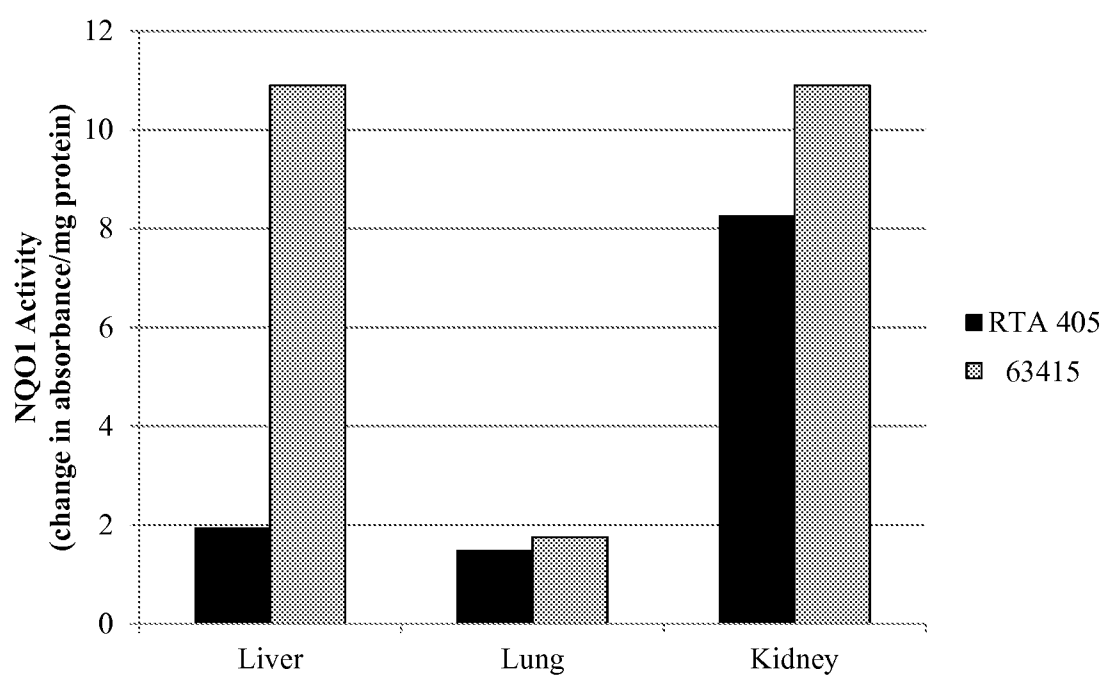


FIG. 53

Prilys Montel

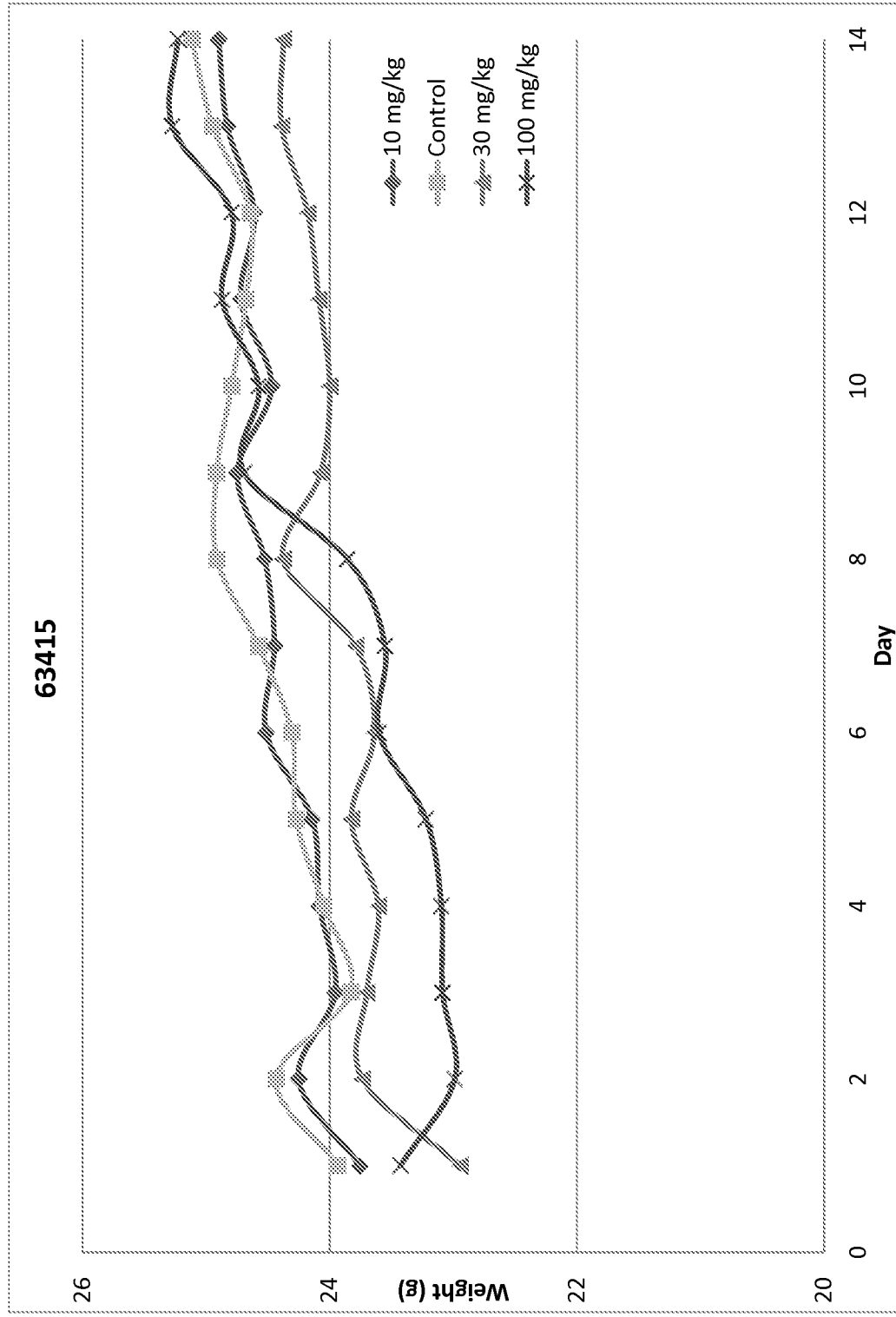


FIG. 54

polyo Montel

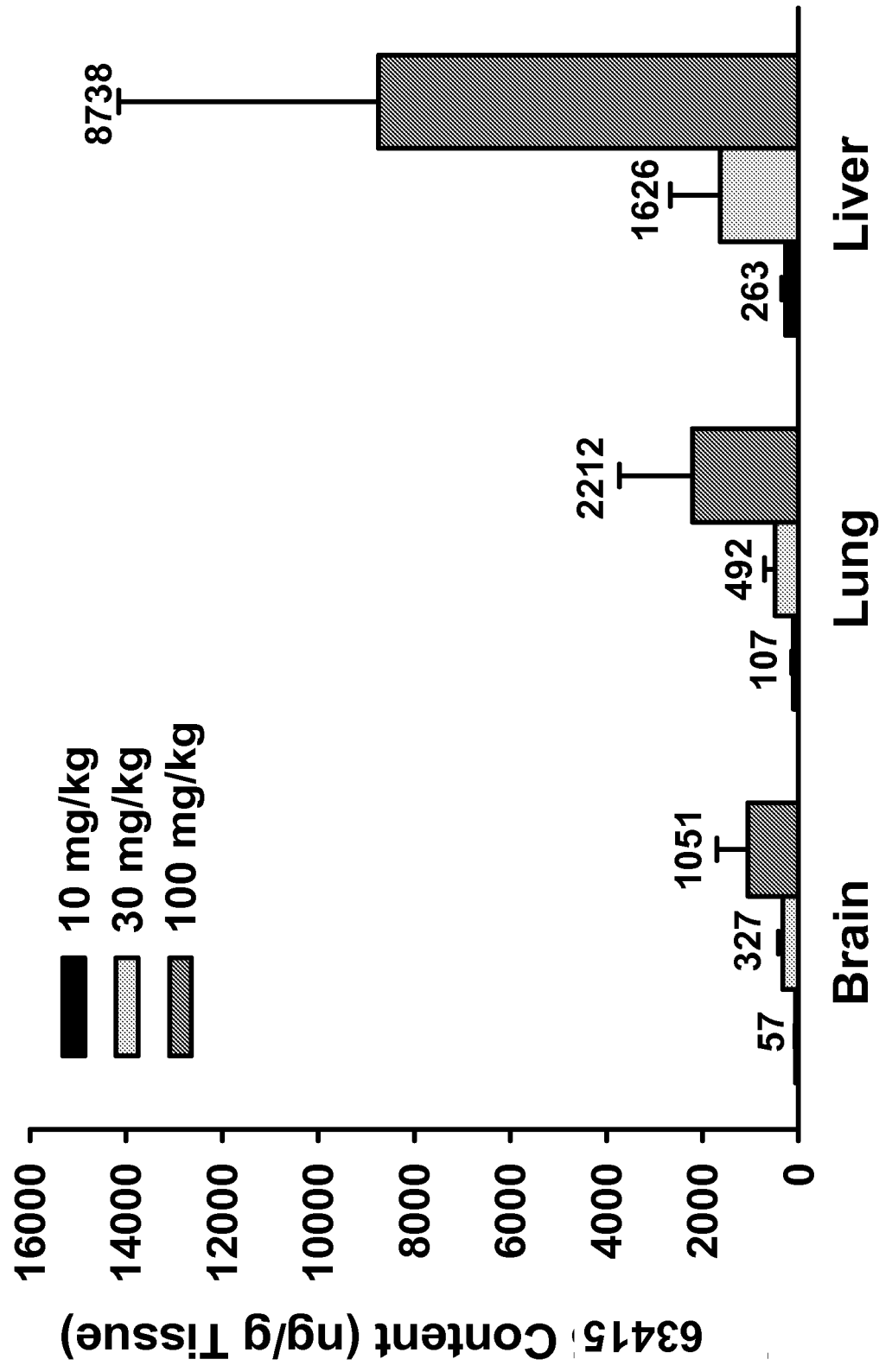


FIG. 55

polya Montel

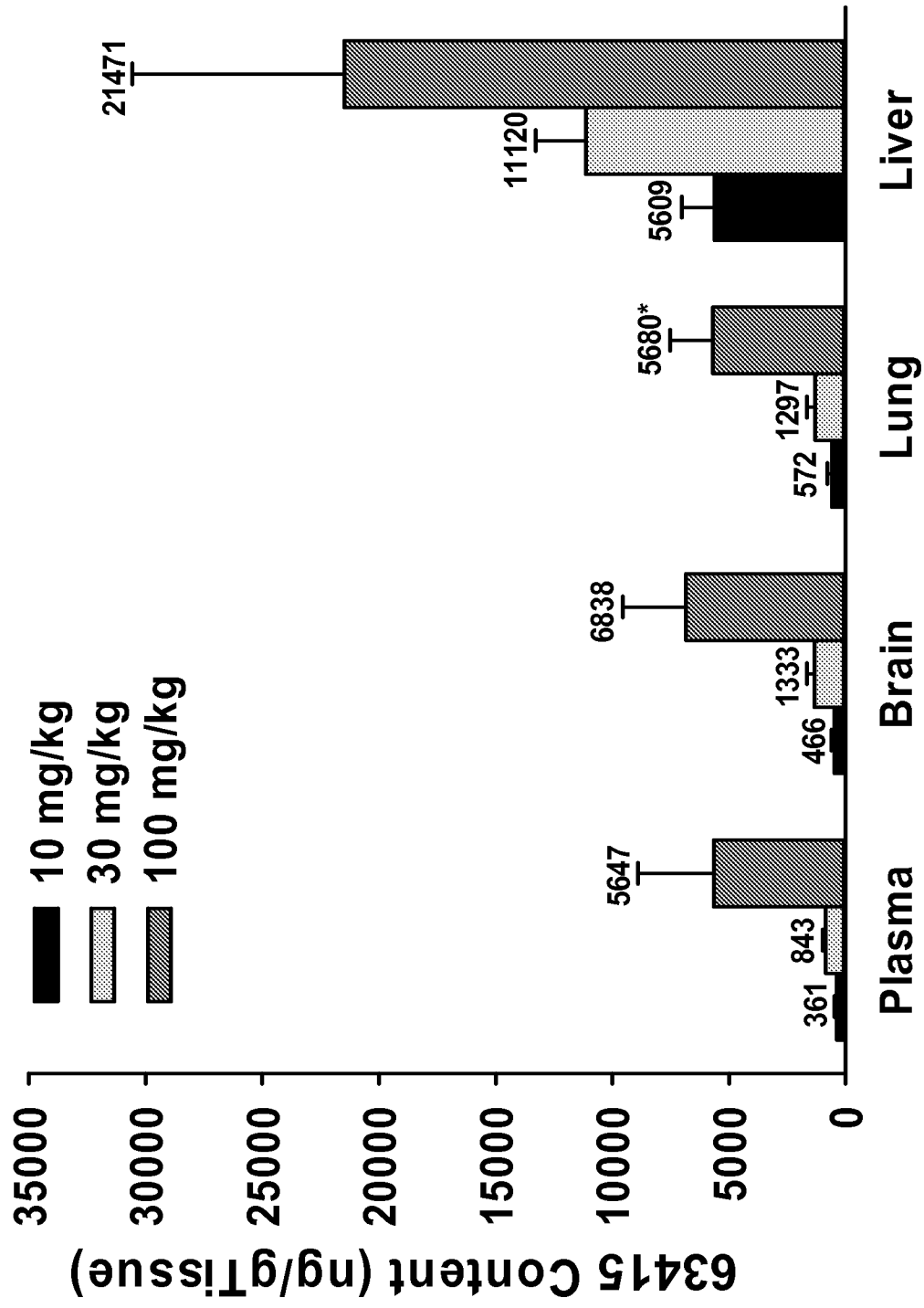


FIG. 56

Allyo Montech

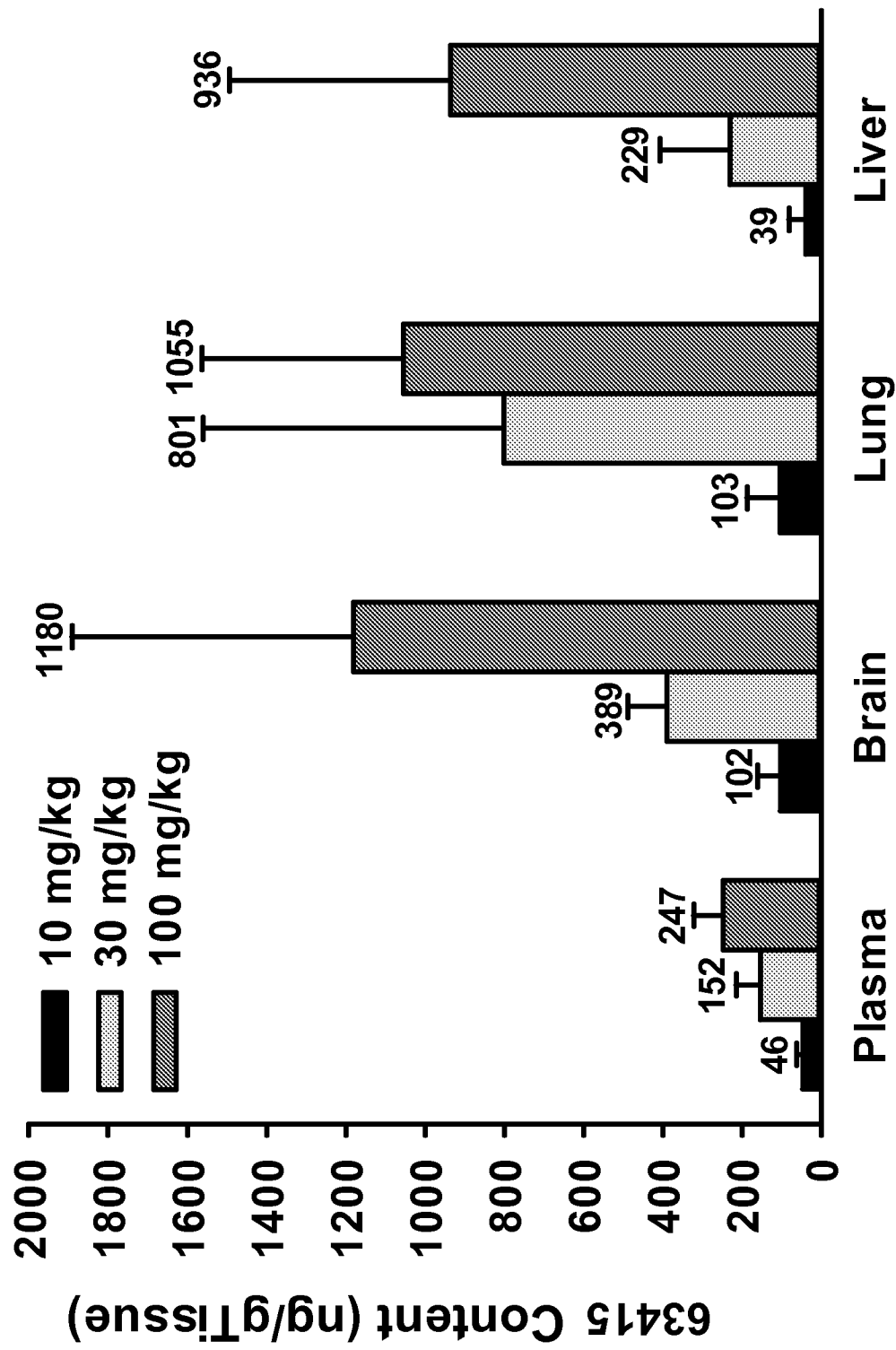


FIG. 57

Allyo Monteb

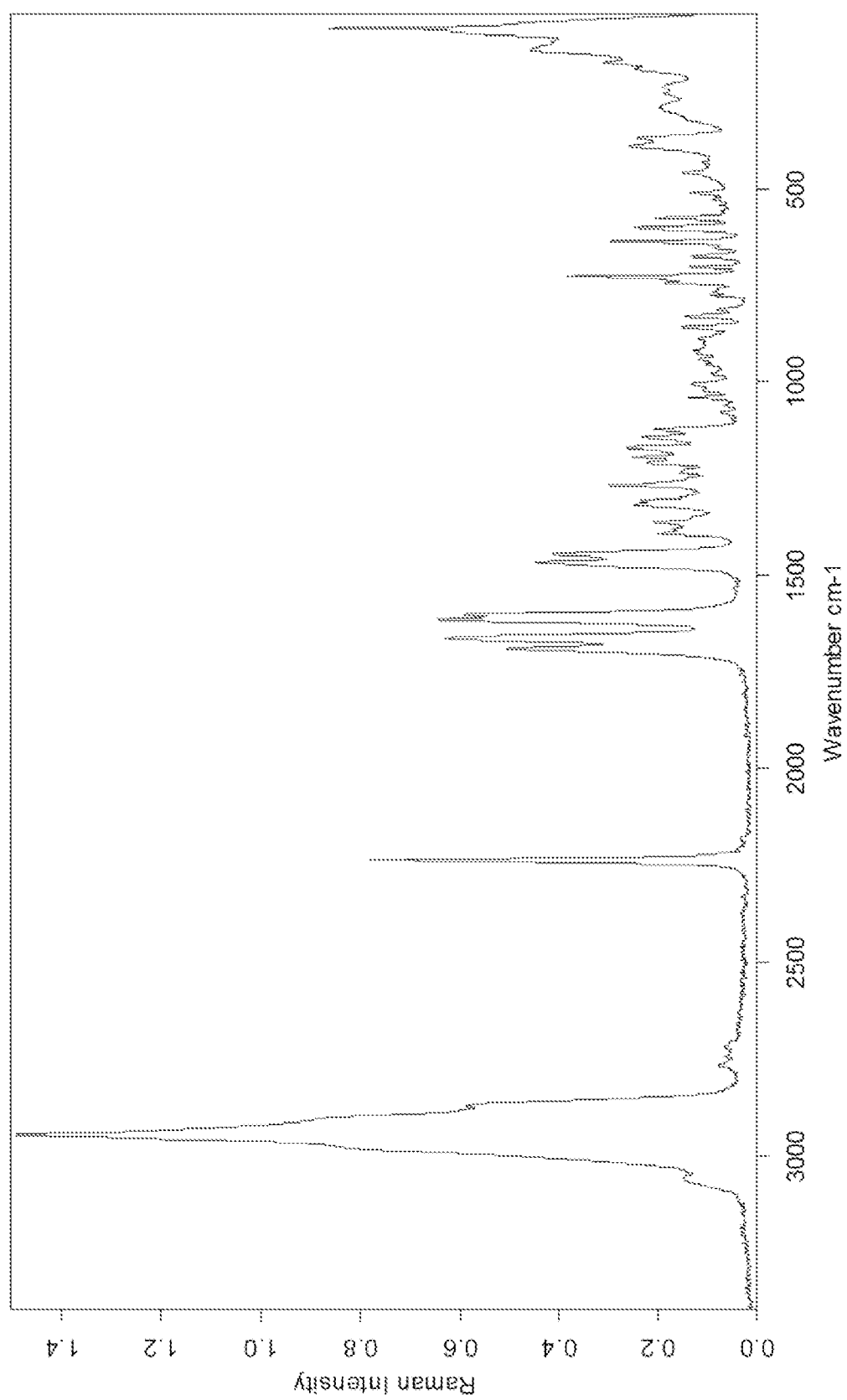


FIG. 58

Prilys Montel

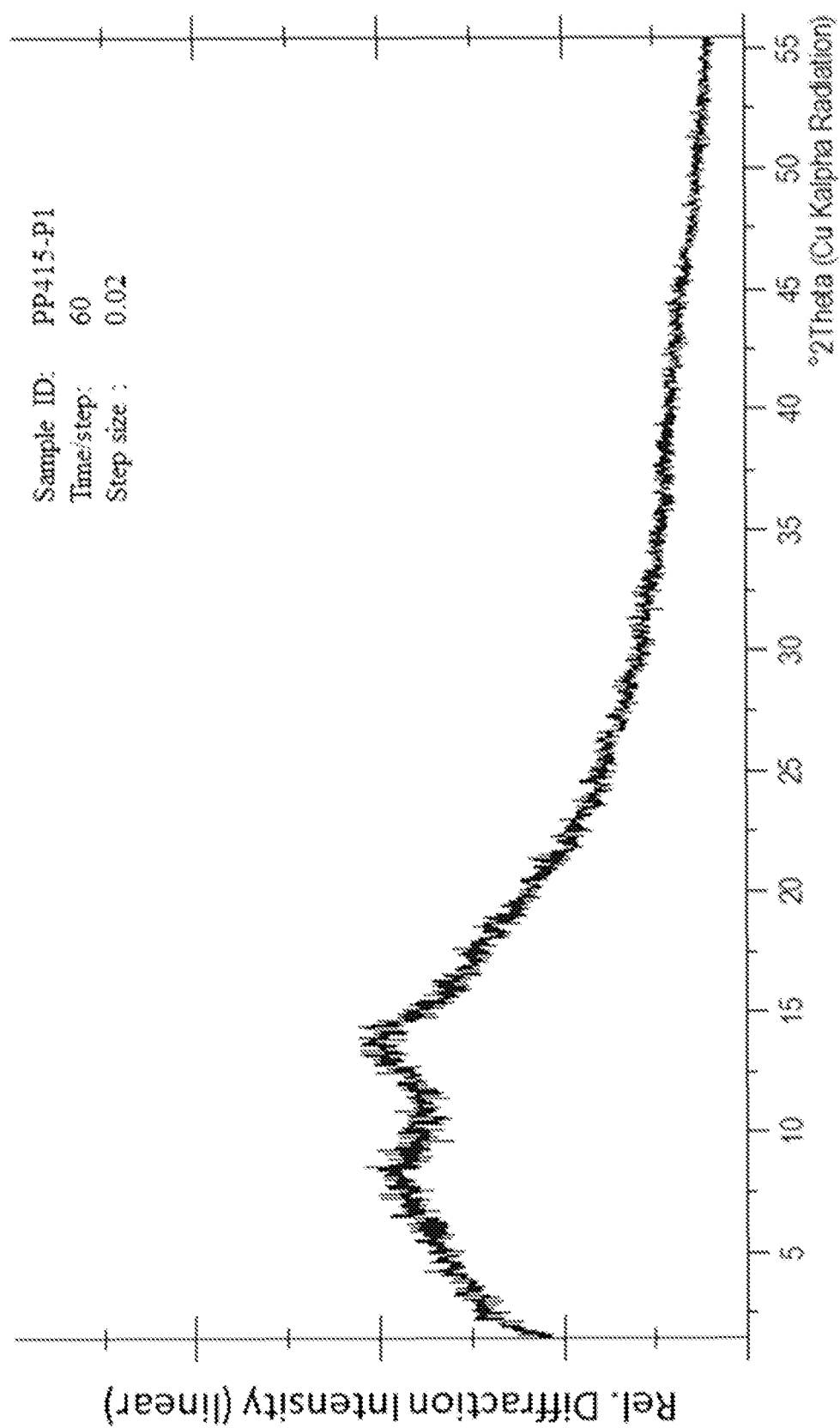


FIG. 59

Philip Montali

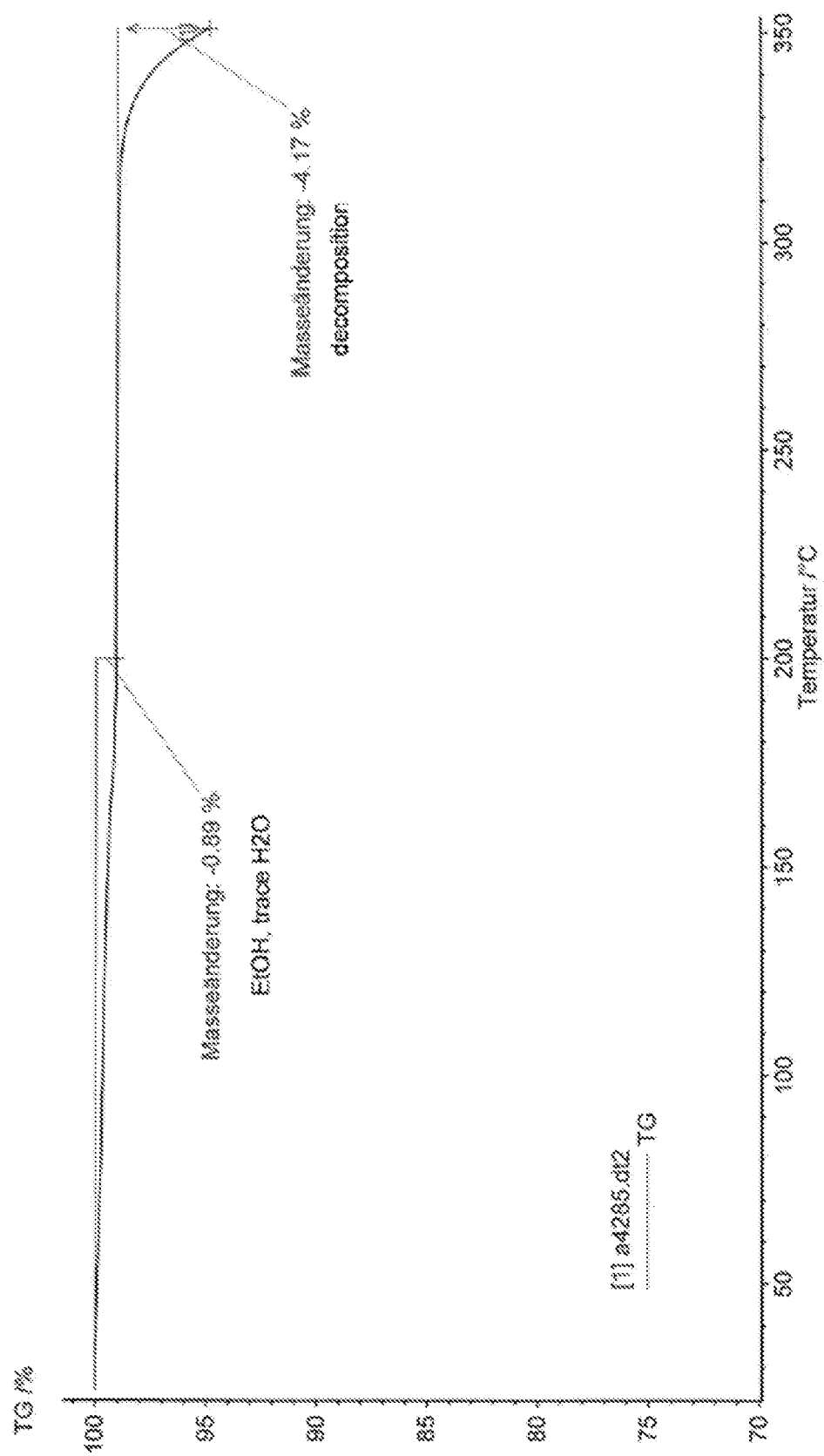


FIG. 60

polyo Montchi

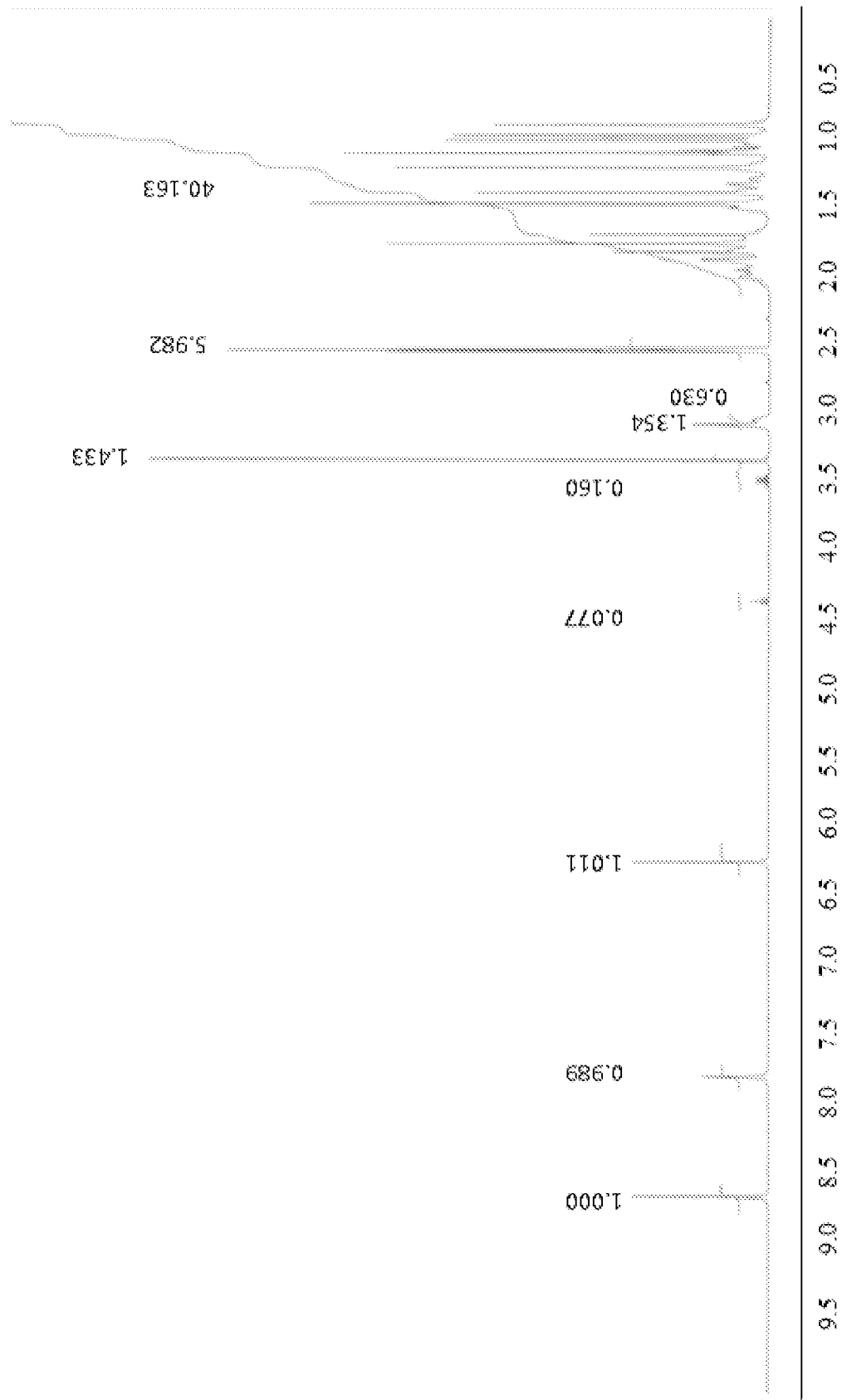


FIG. 61

Philip Montel

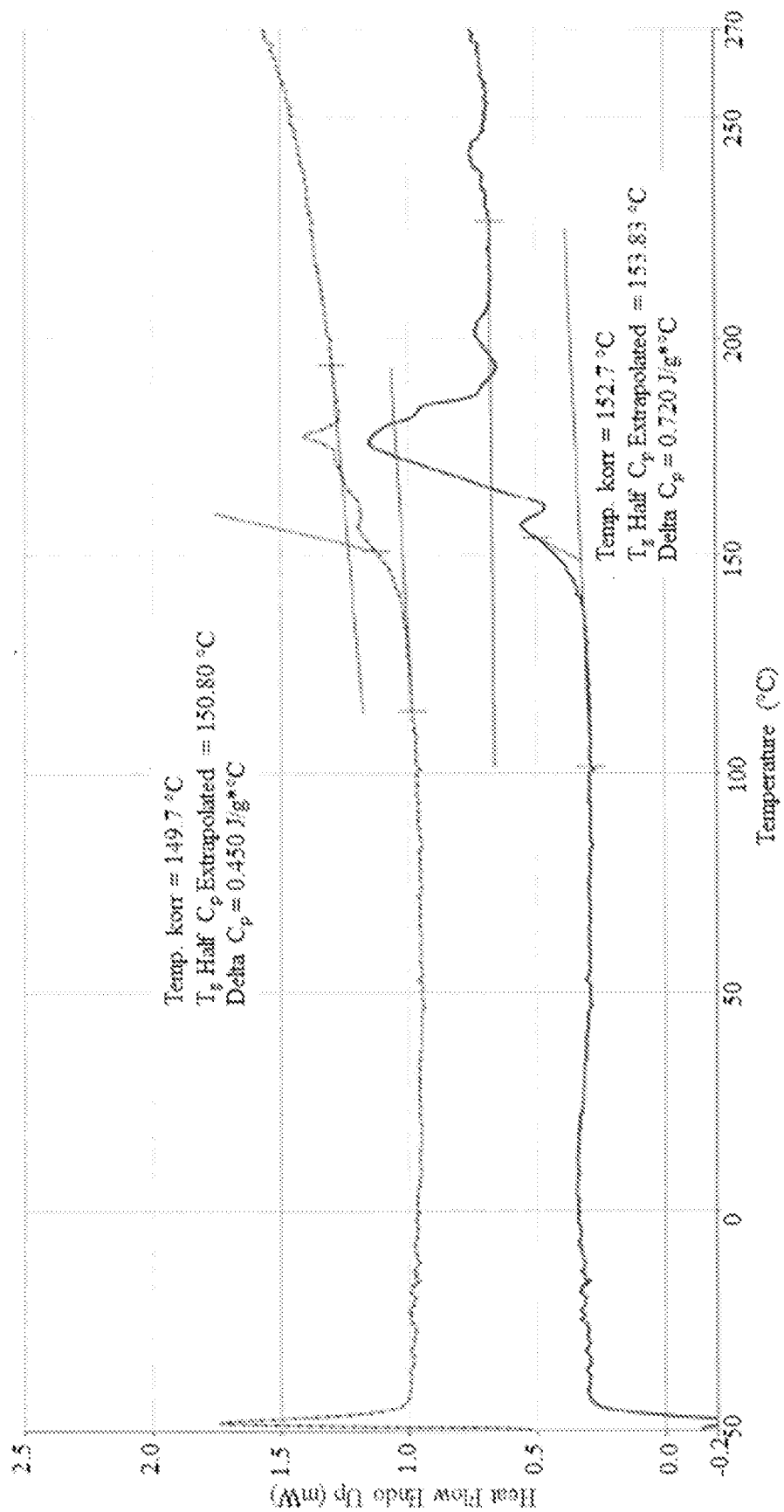


FIG. 62

Philip Montali

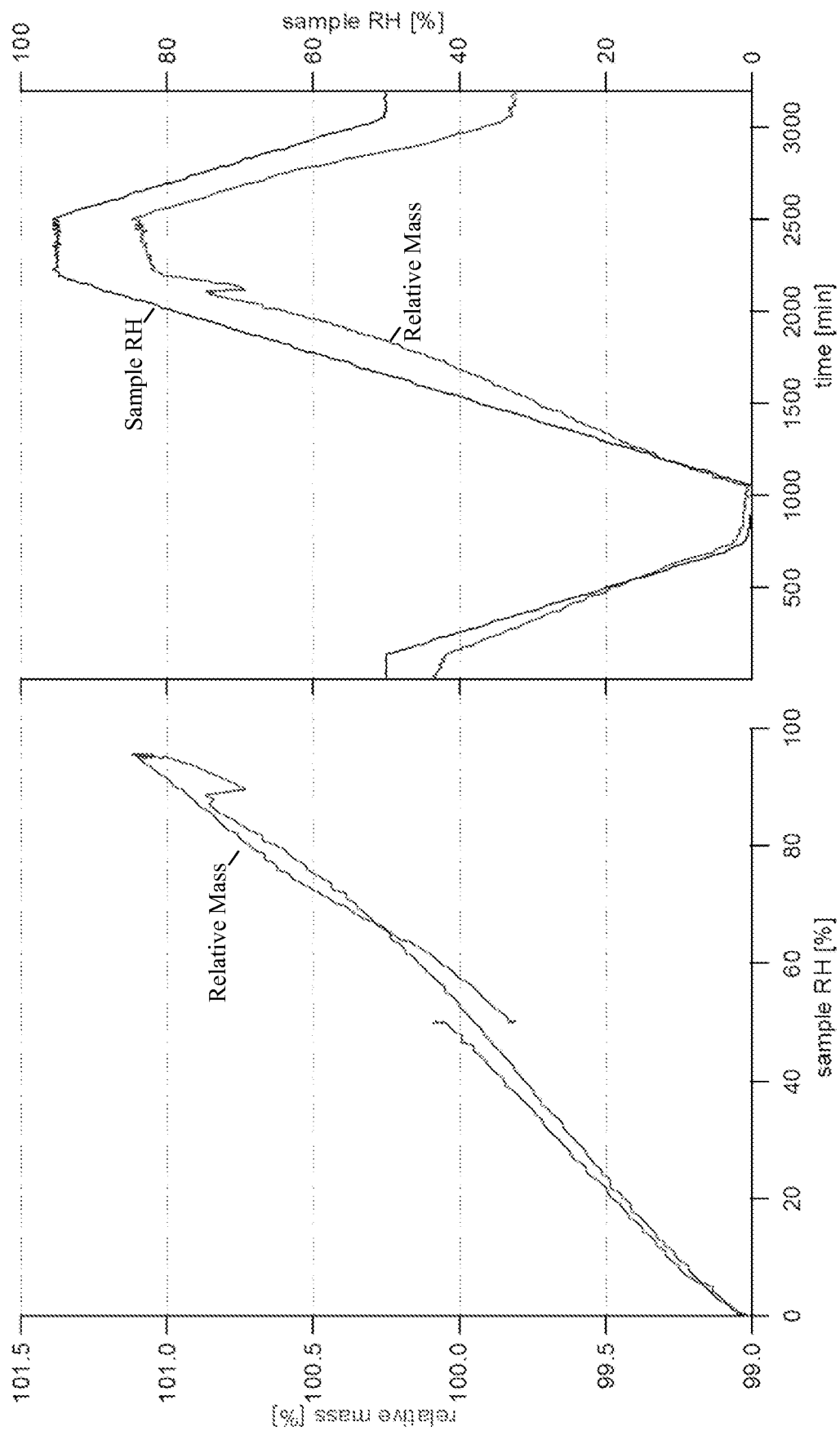


FIG. 63

Polyo Montech

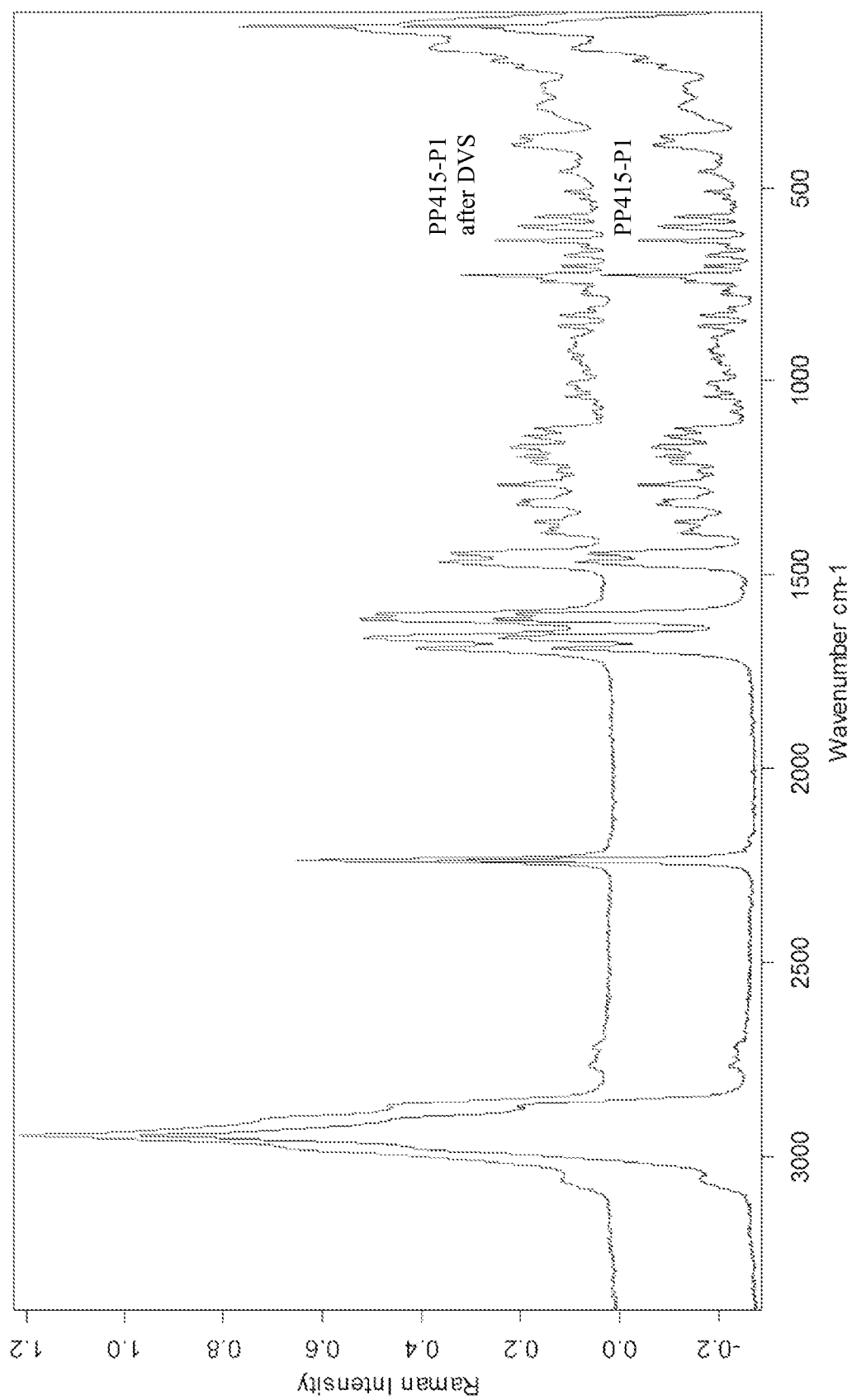


FIG. 64

Pritya Montel

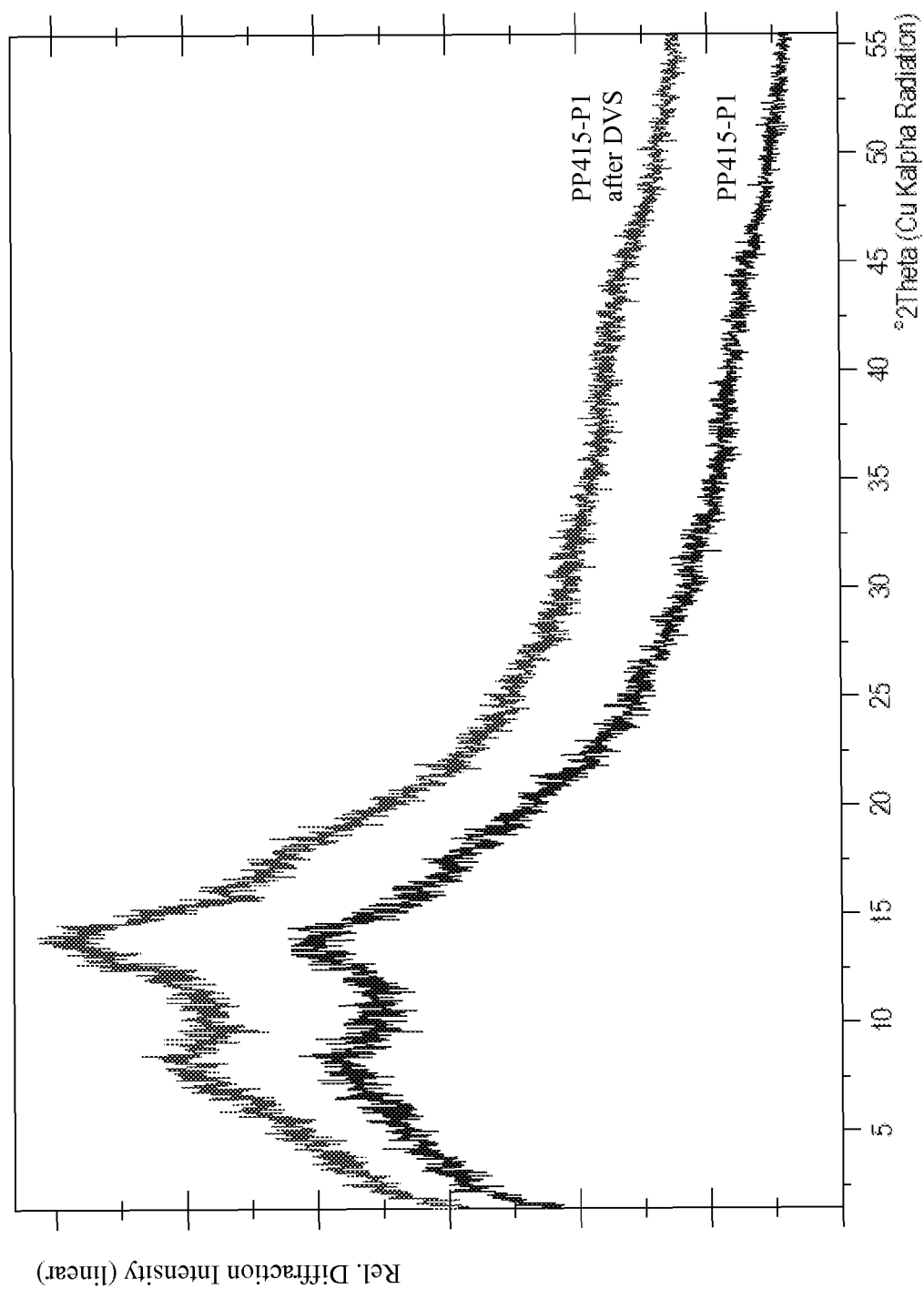


FIG. 65

poly Montch

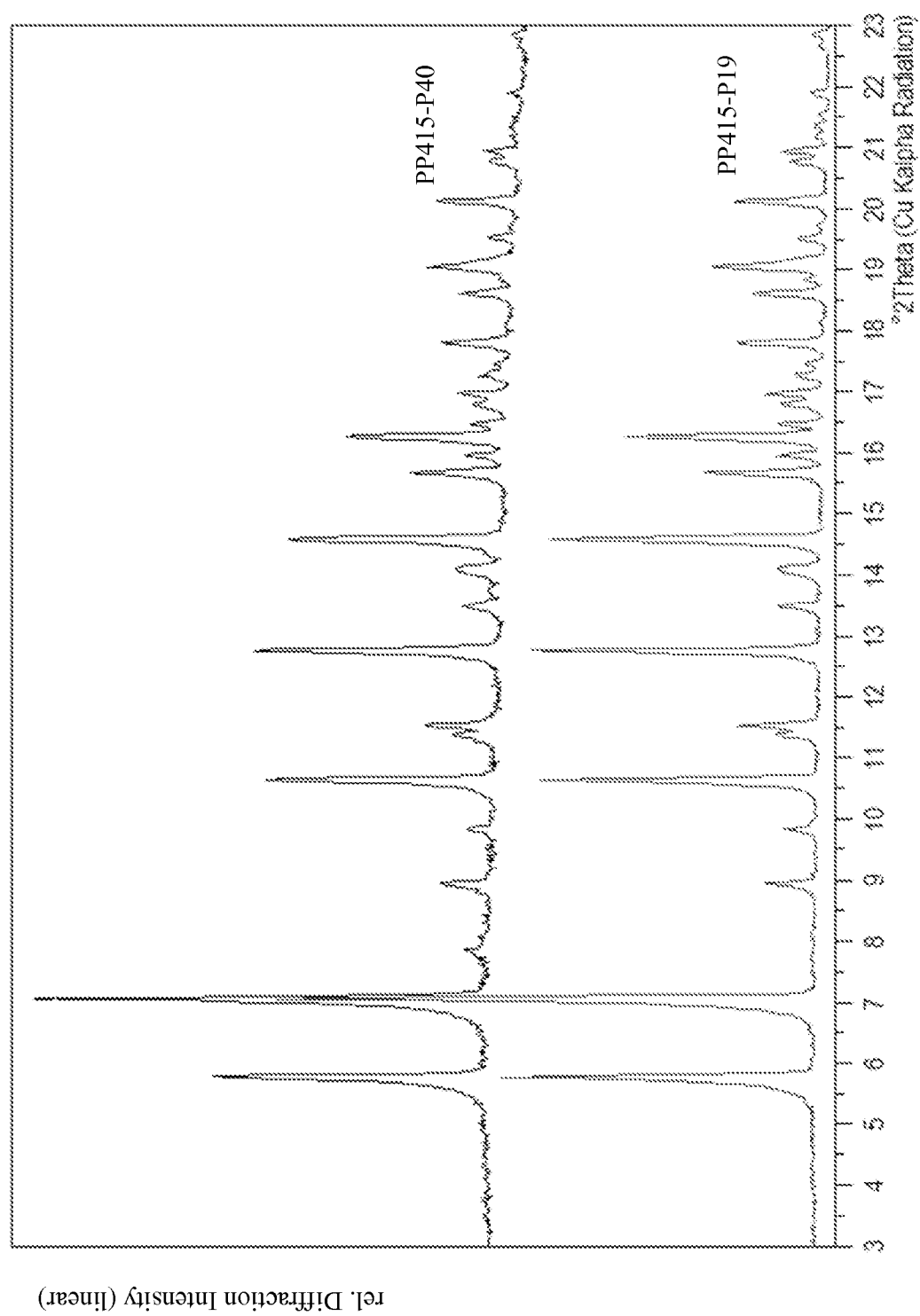


FIG. 66

Ally Montel

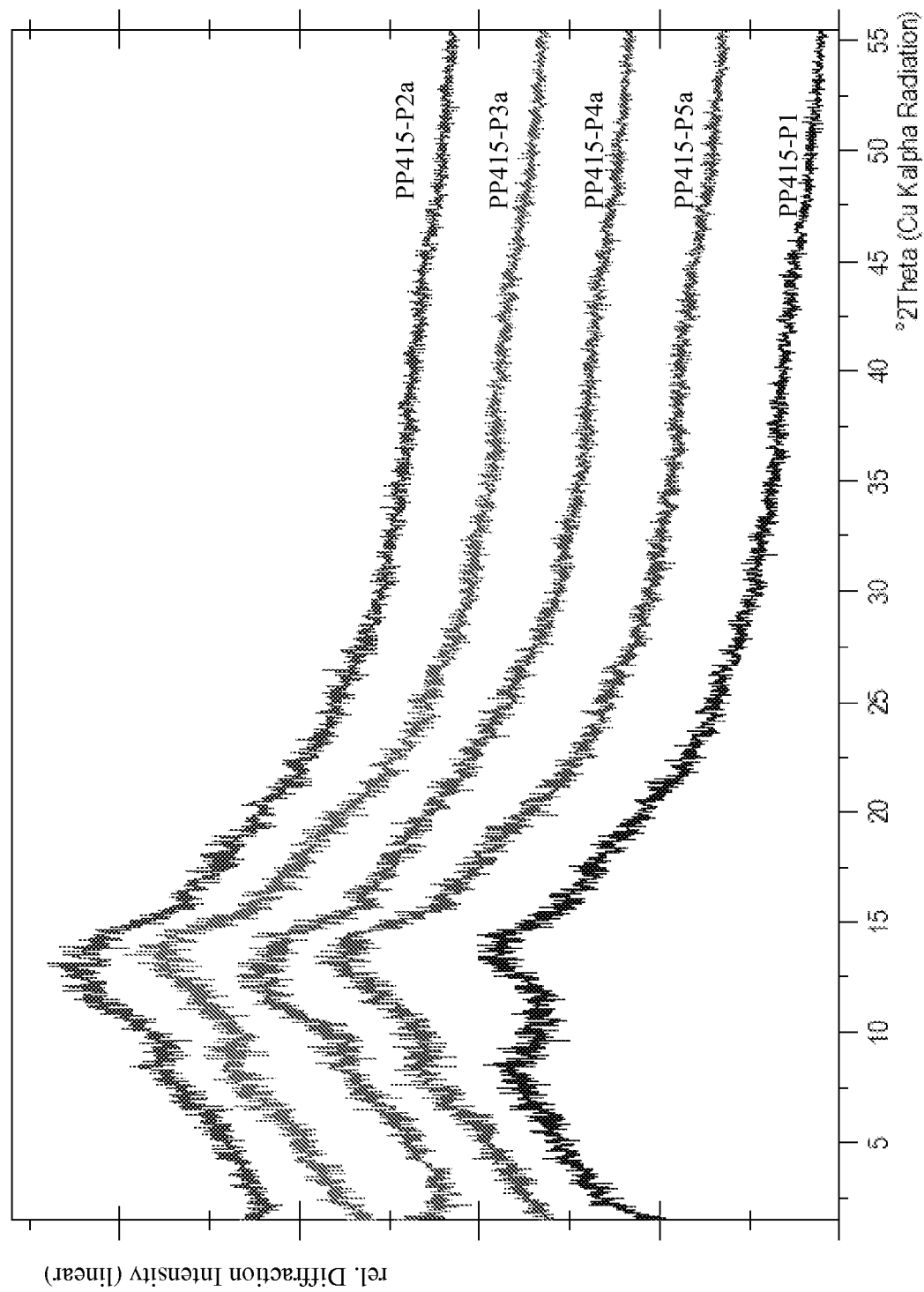


FIG. 67

Prilys Montel

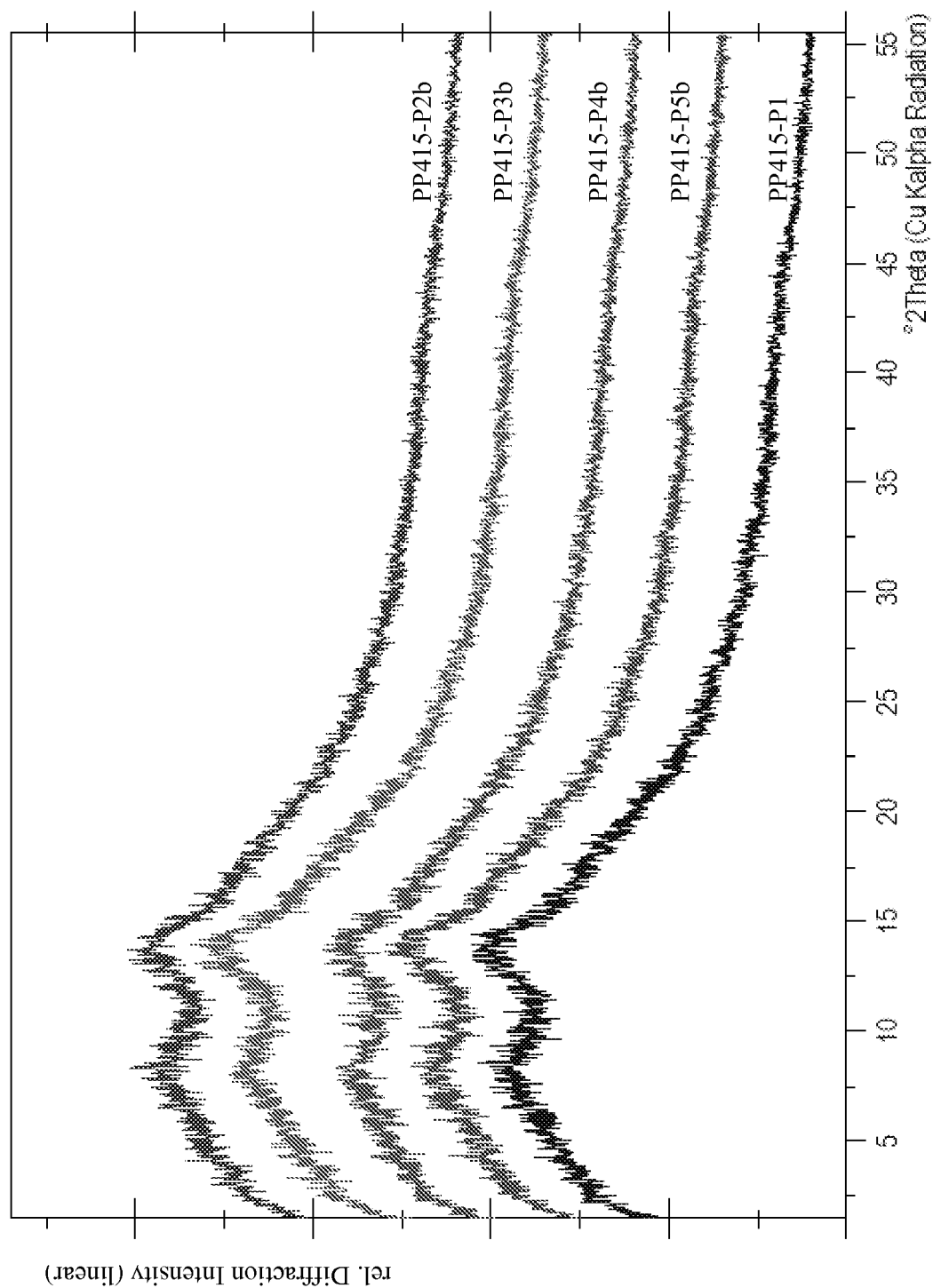


FIG. 68

poly Montel

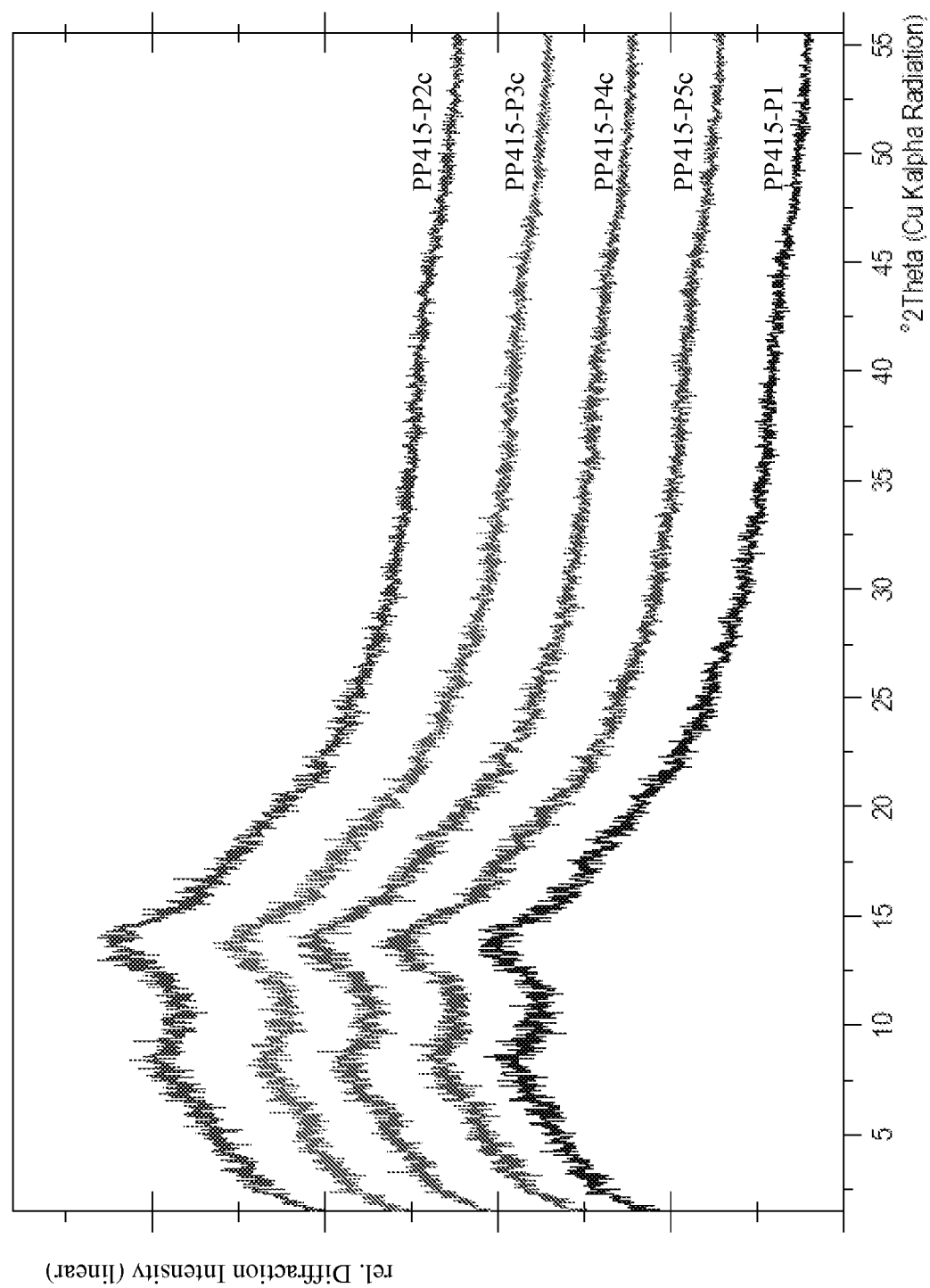


FIG. 69

Polya Montali

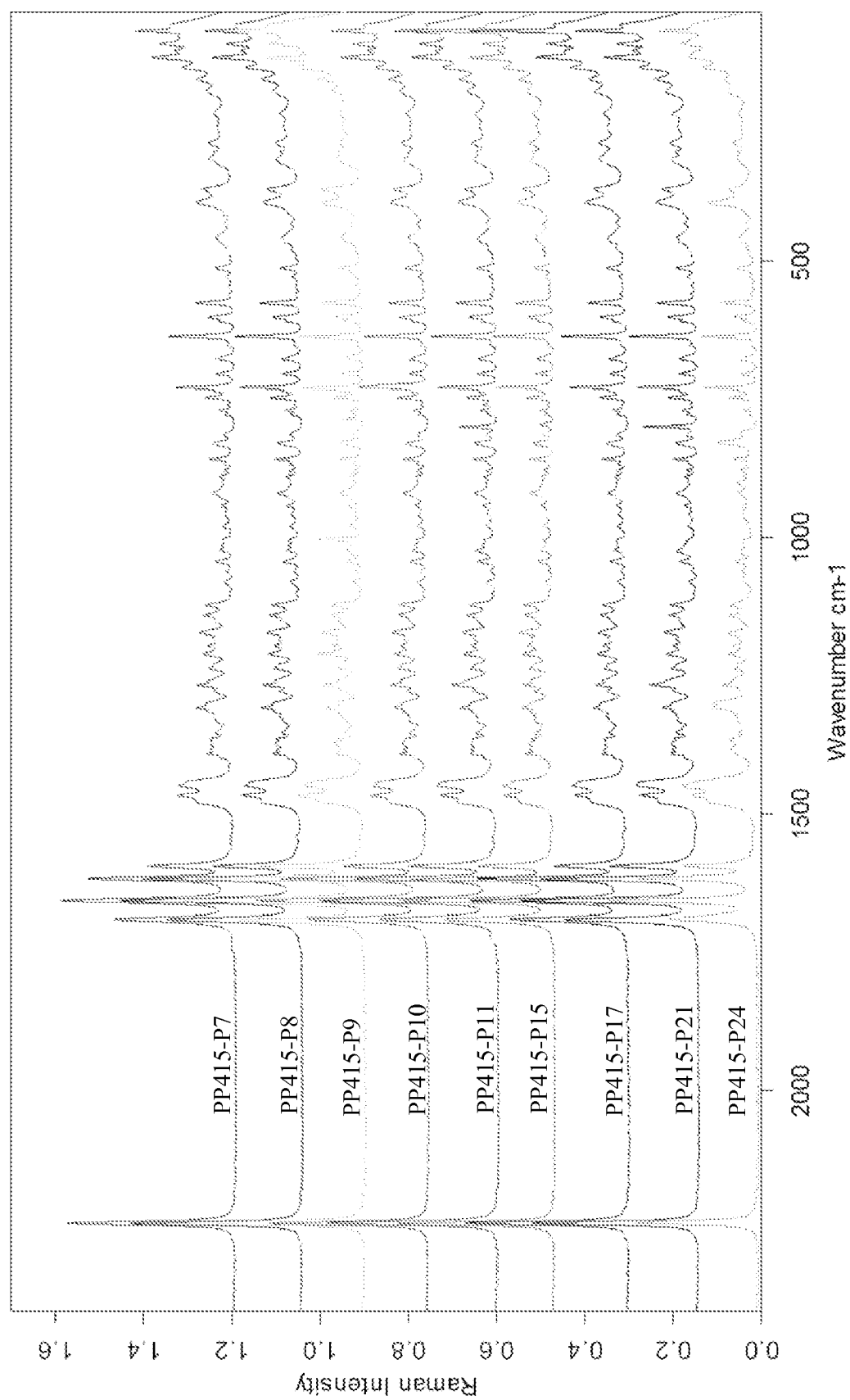


FIG. 70

poly Montch

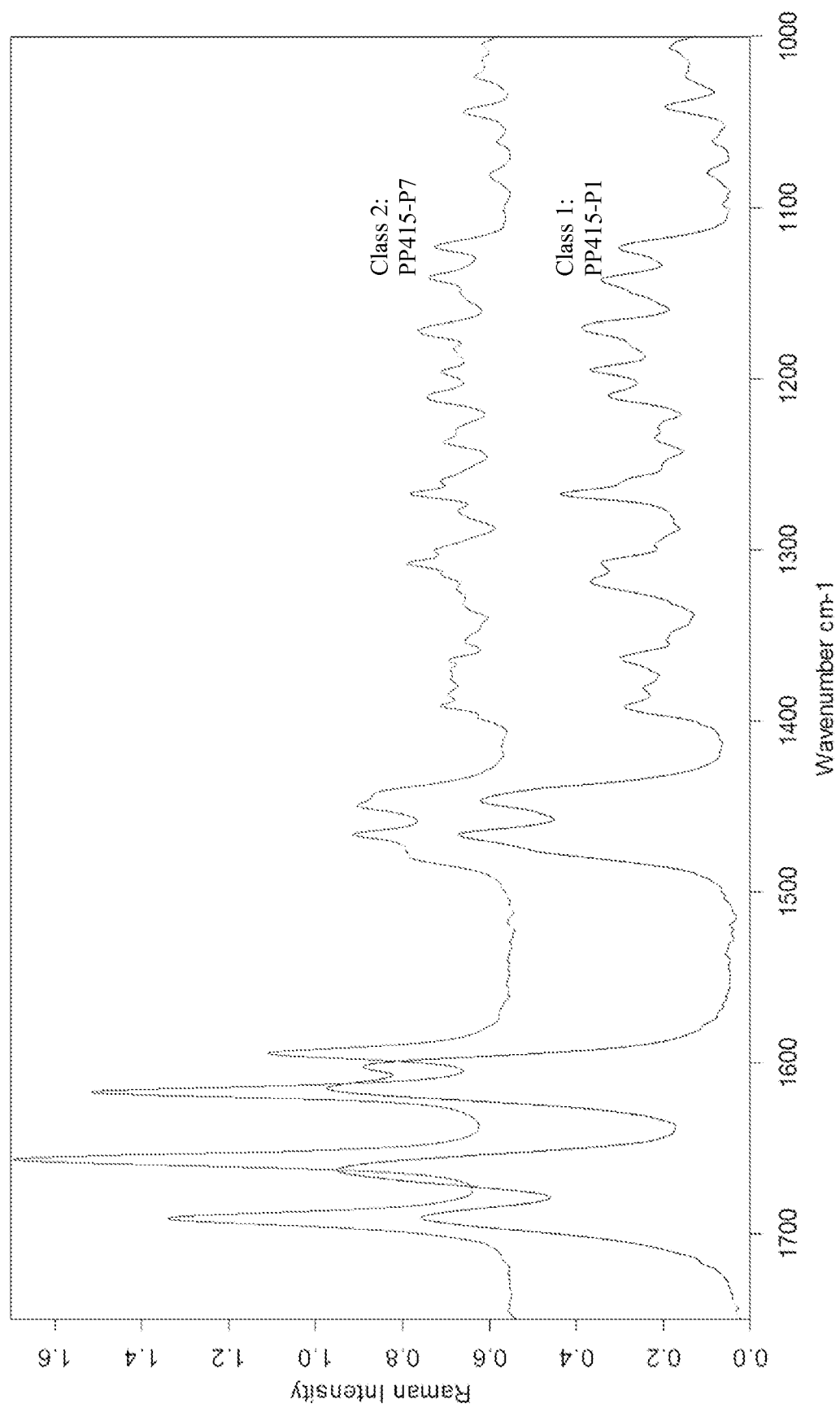


FIG. 71

polyo Montch

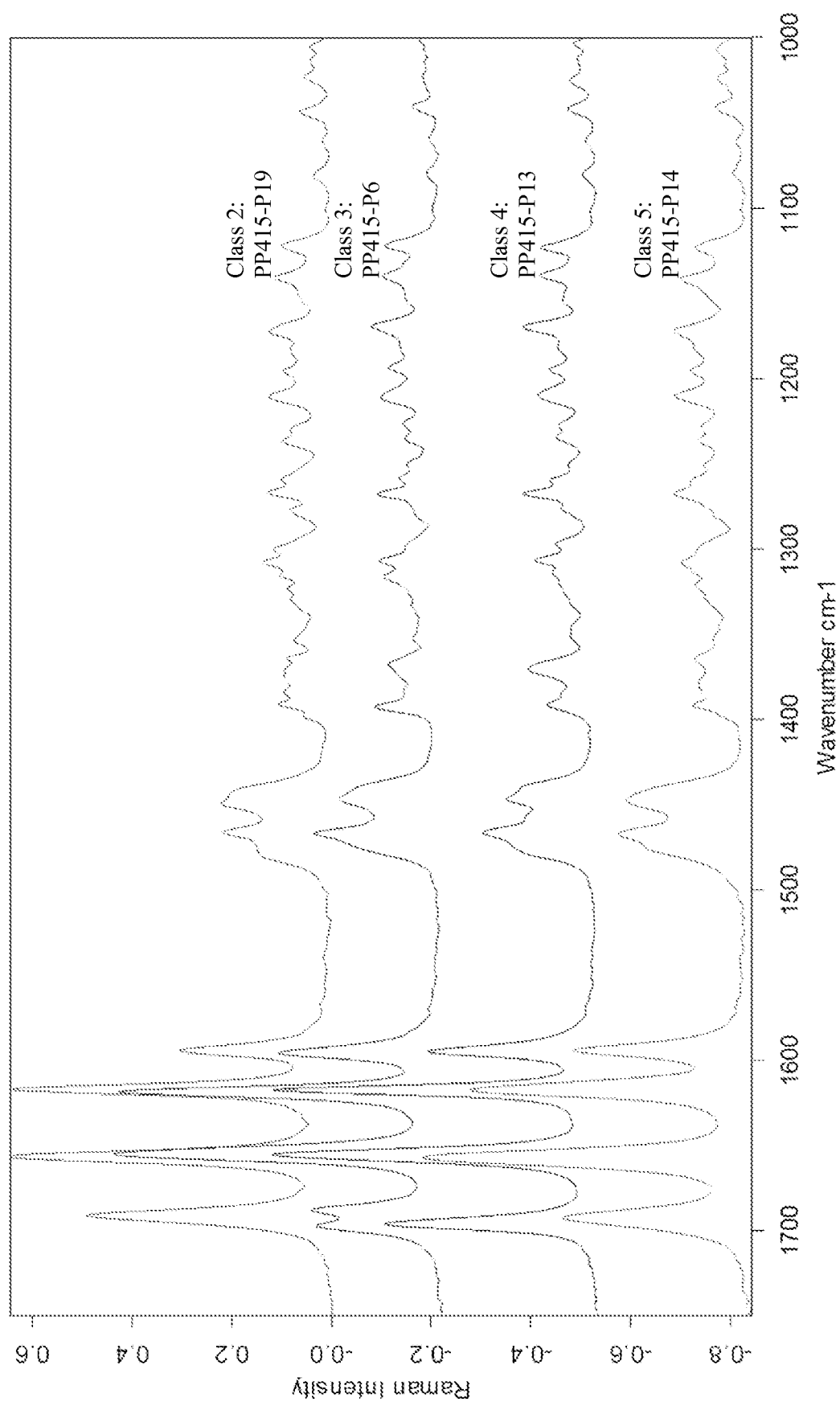


FIG. 72

Allyp Montel

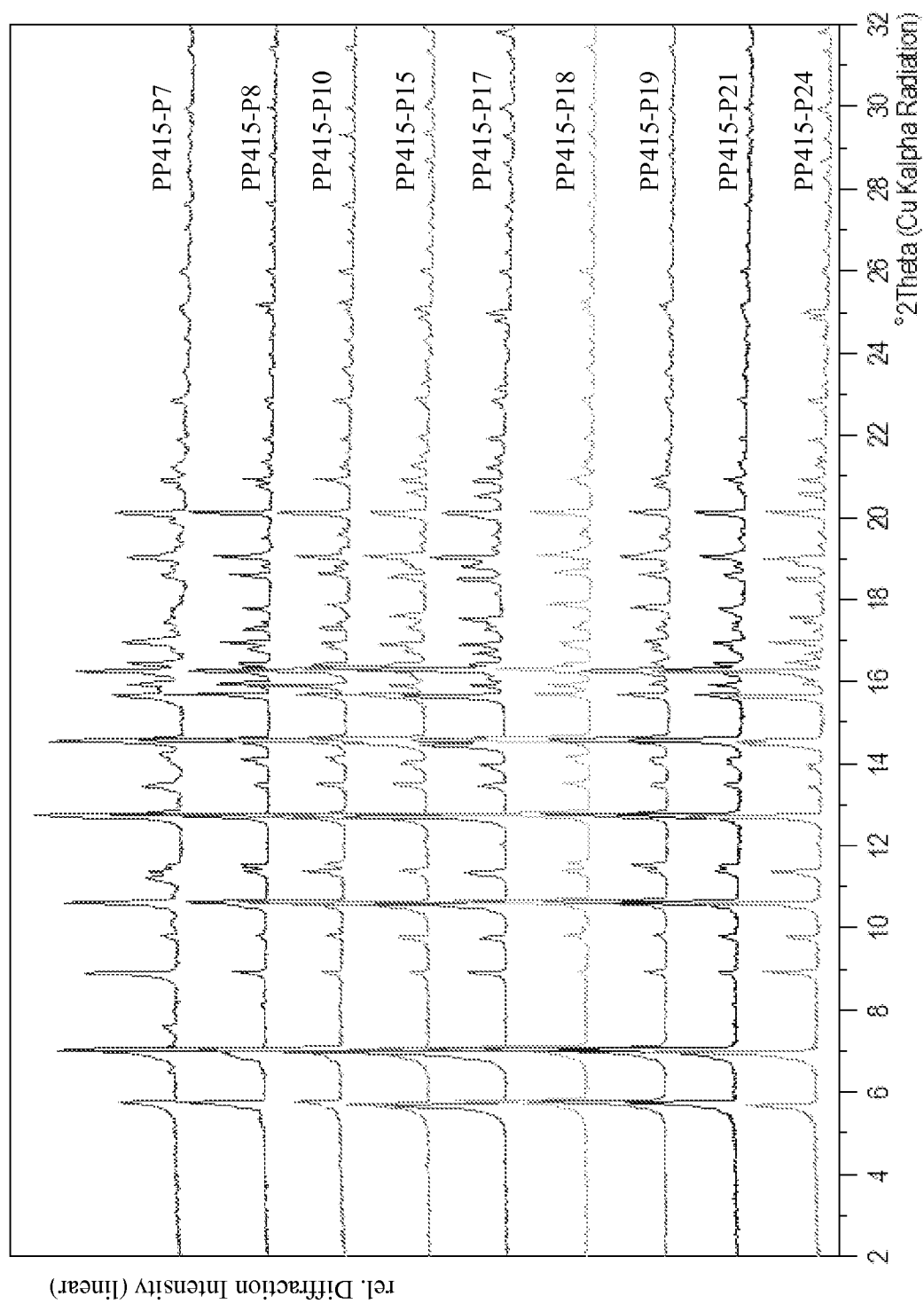


FIG. 73

polyo Montel

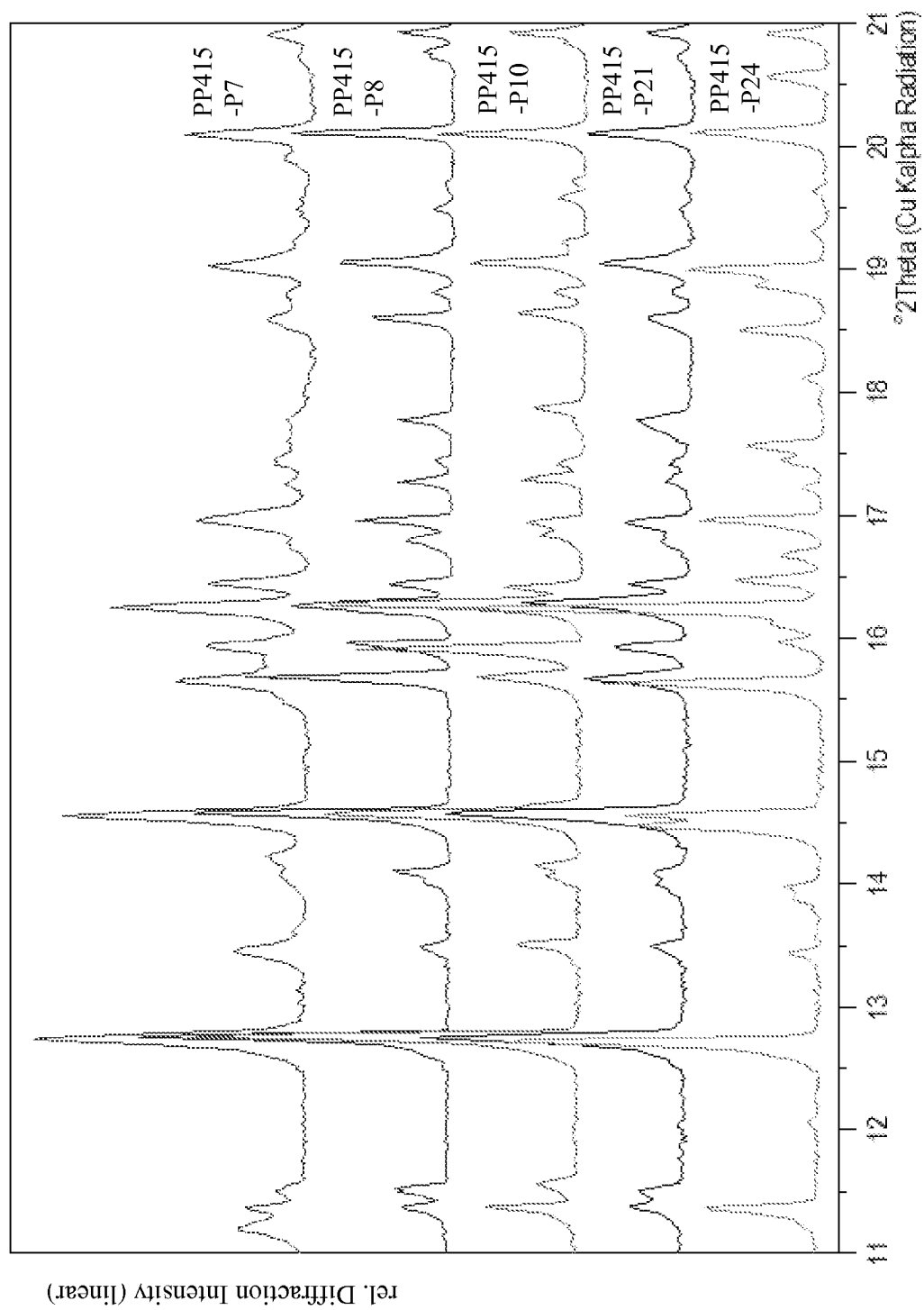


FIG. 74

Polymo Montech

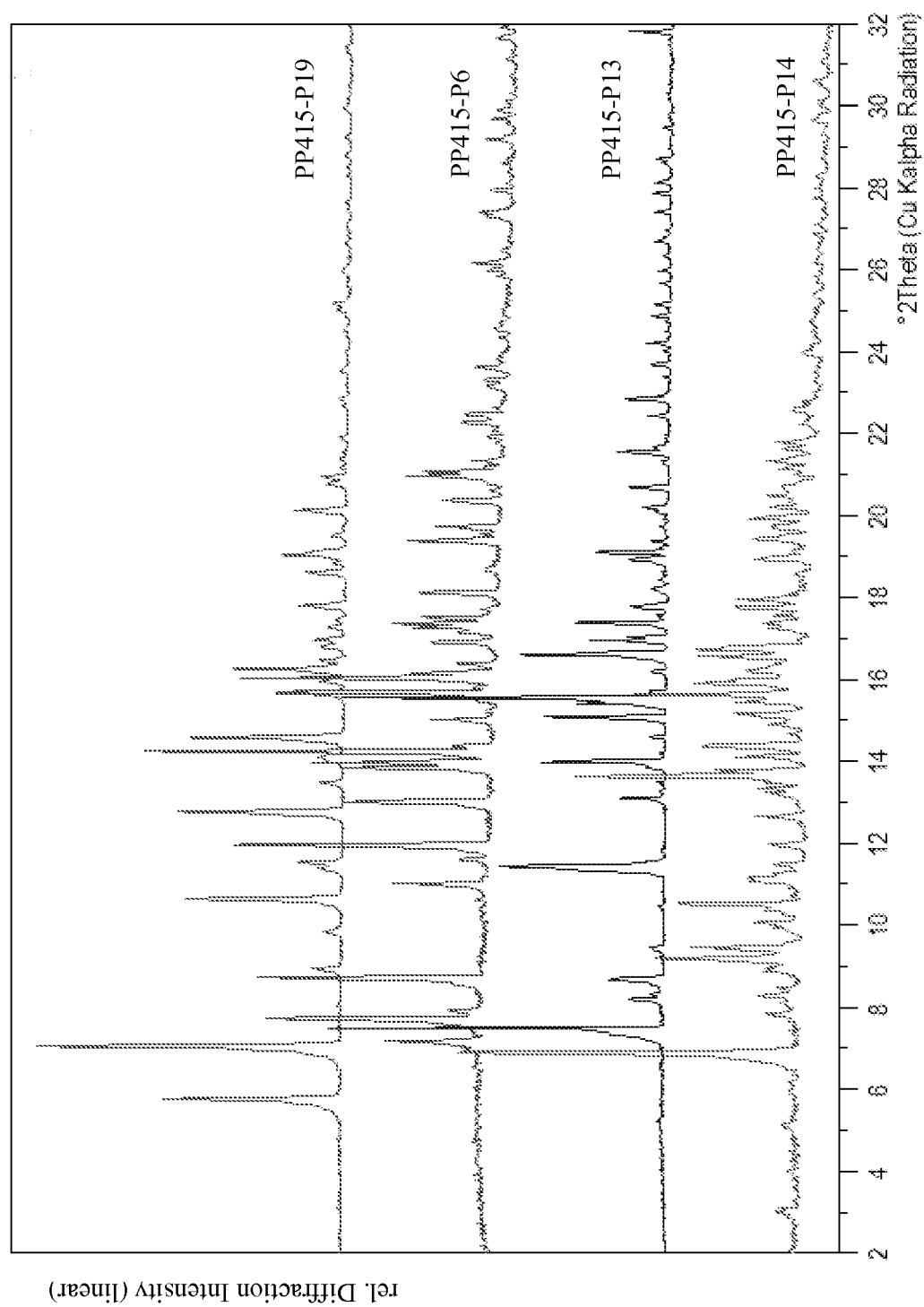


FIG. 75

polya Montel

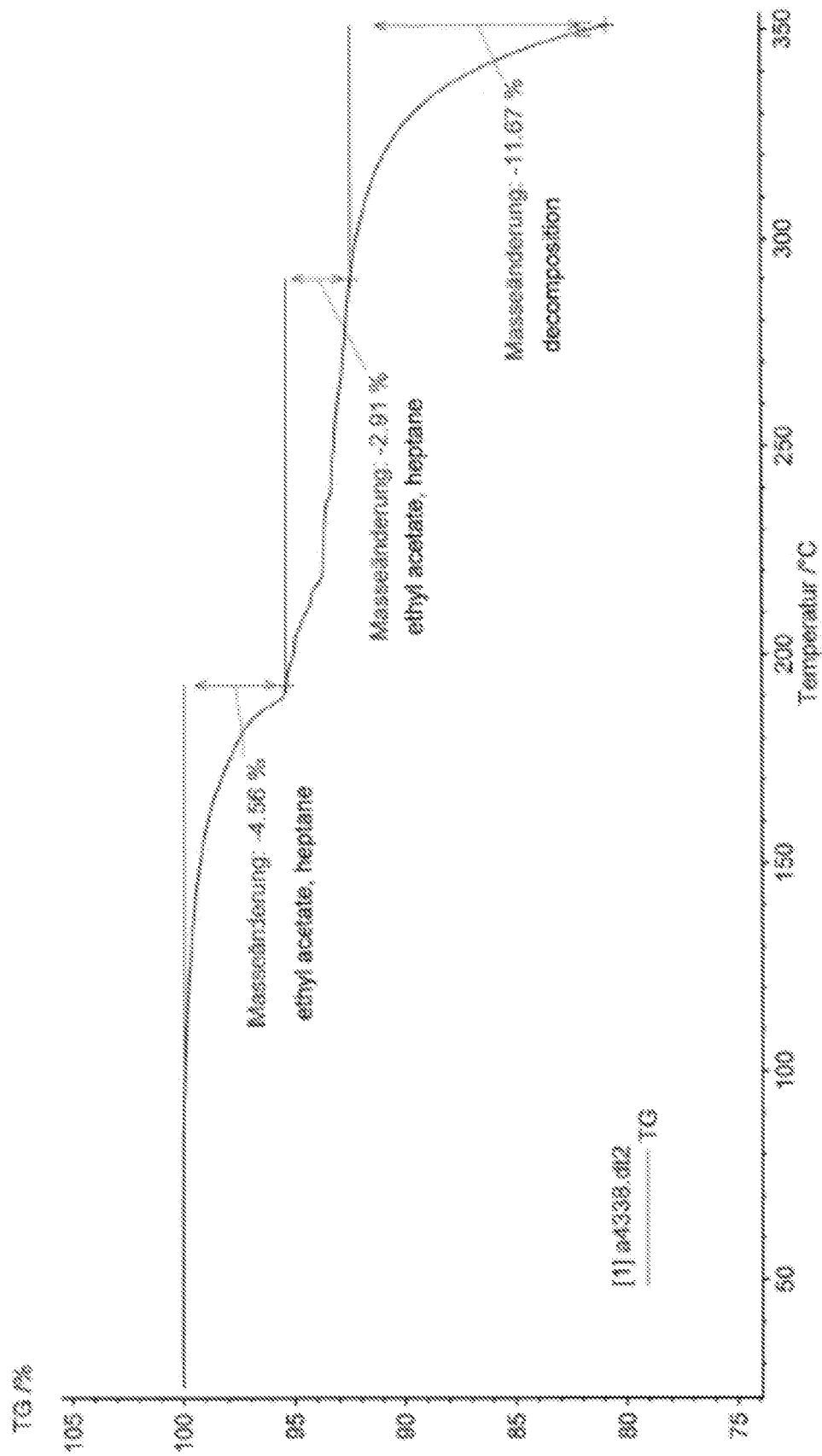


FIG. 76

Pilyp Montel

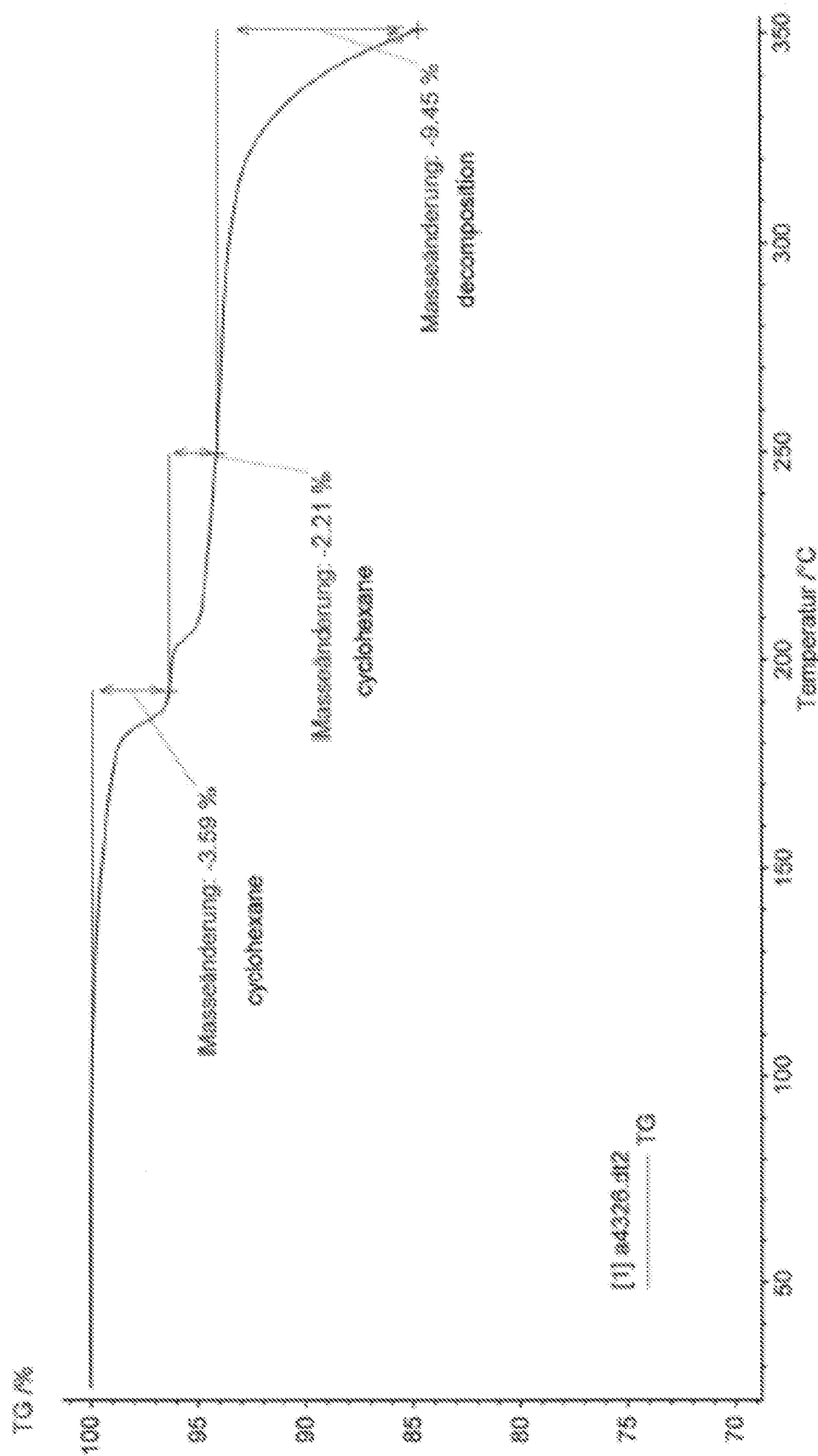


FIG. 77

Philippe Montebelli

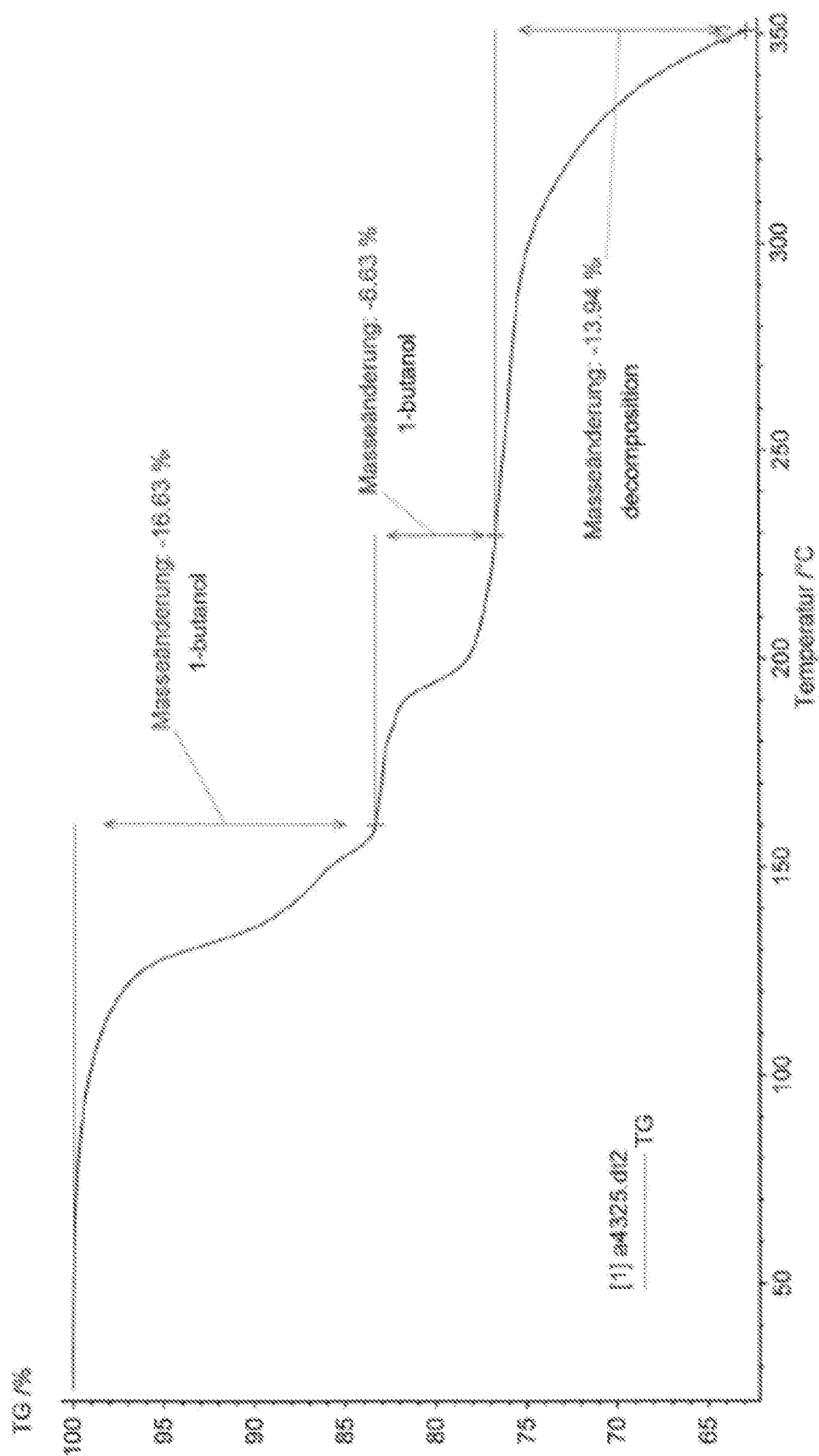


FIG. 78

polyo Montel

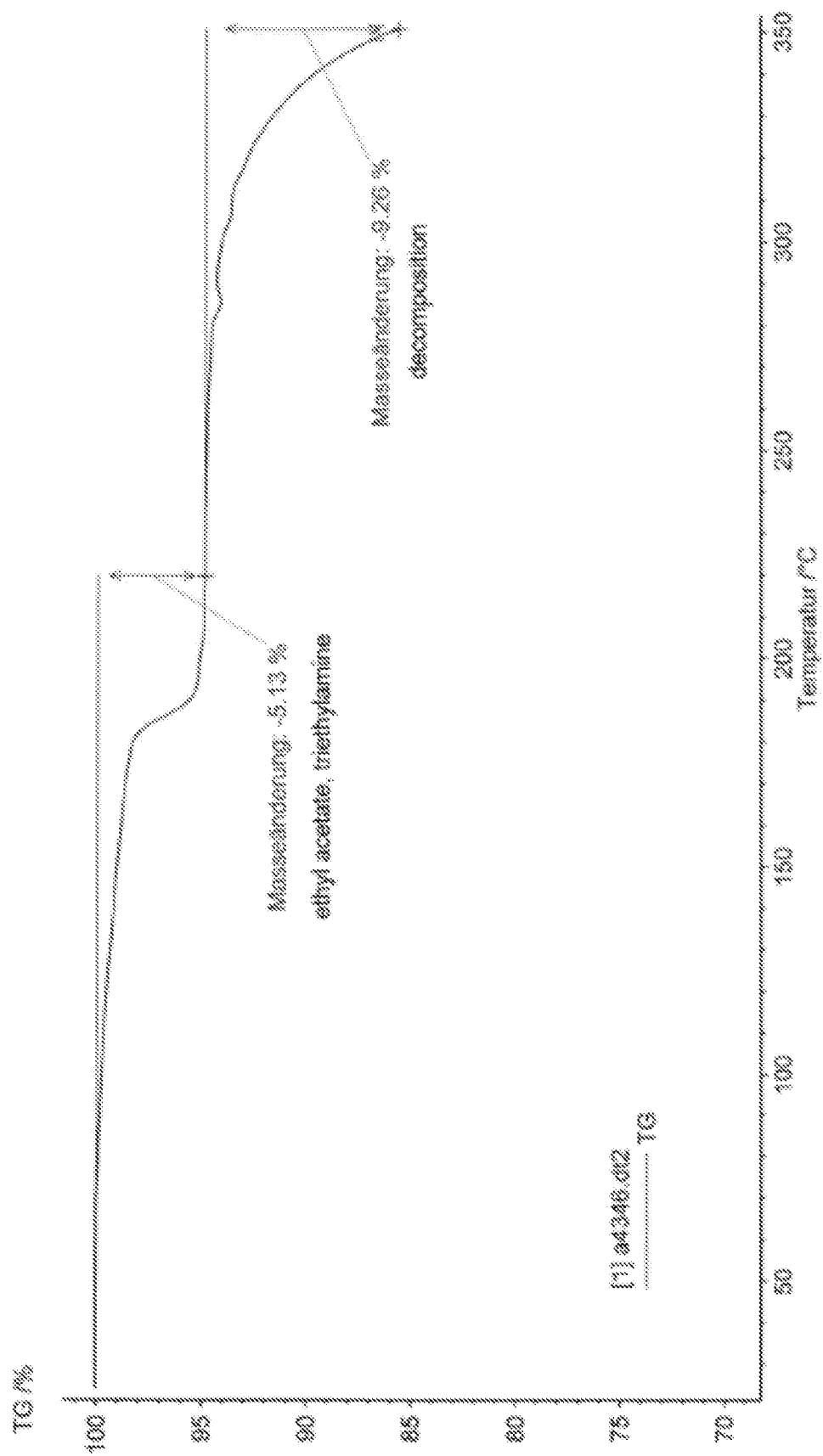


FIG. 79

polyo Montch

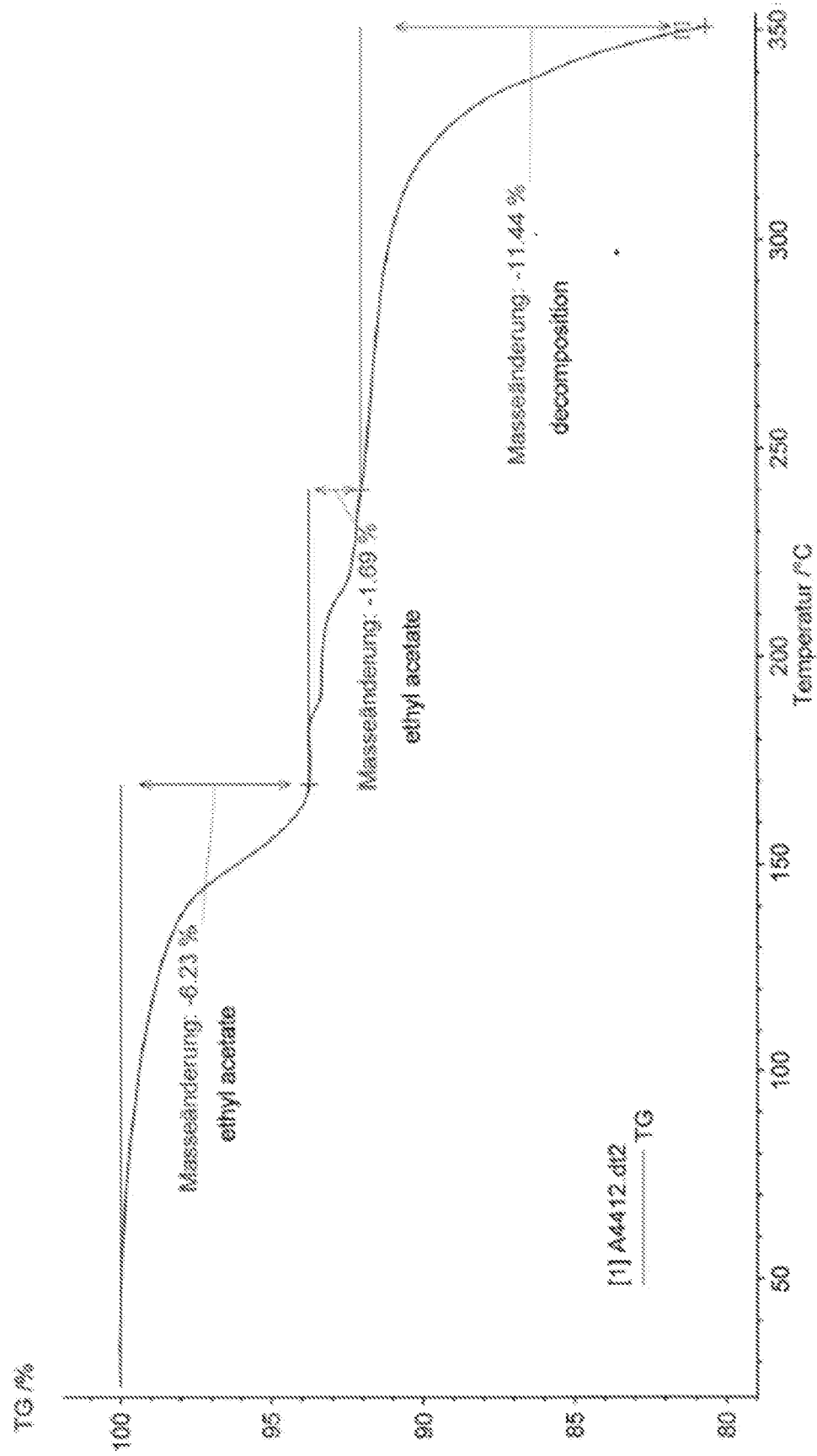


FIG. 80

poly Montel

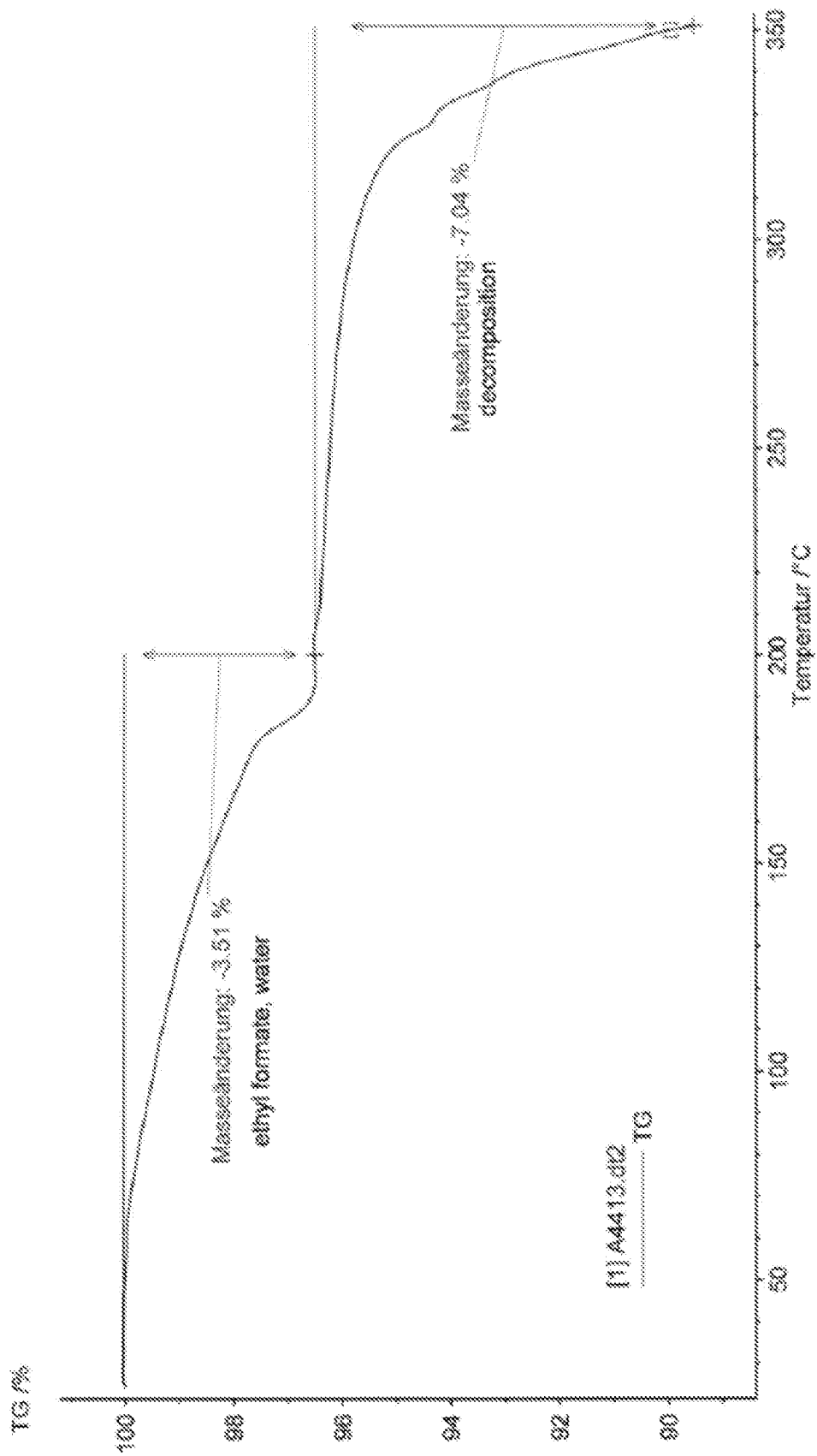


FIG. 81

Philippe Montcler

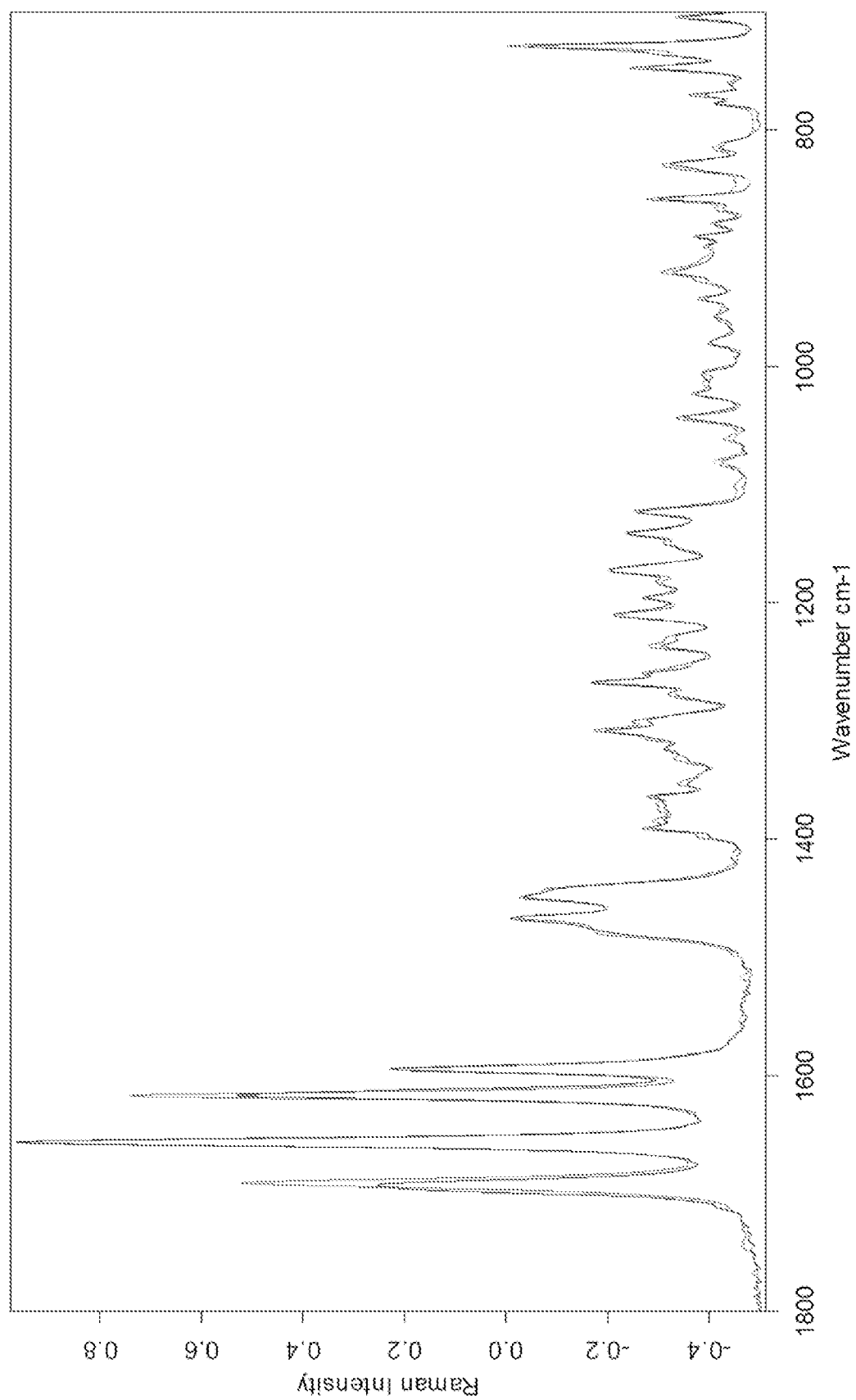


FIG. 82

Allyp Montch

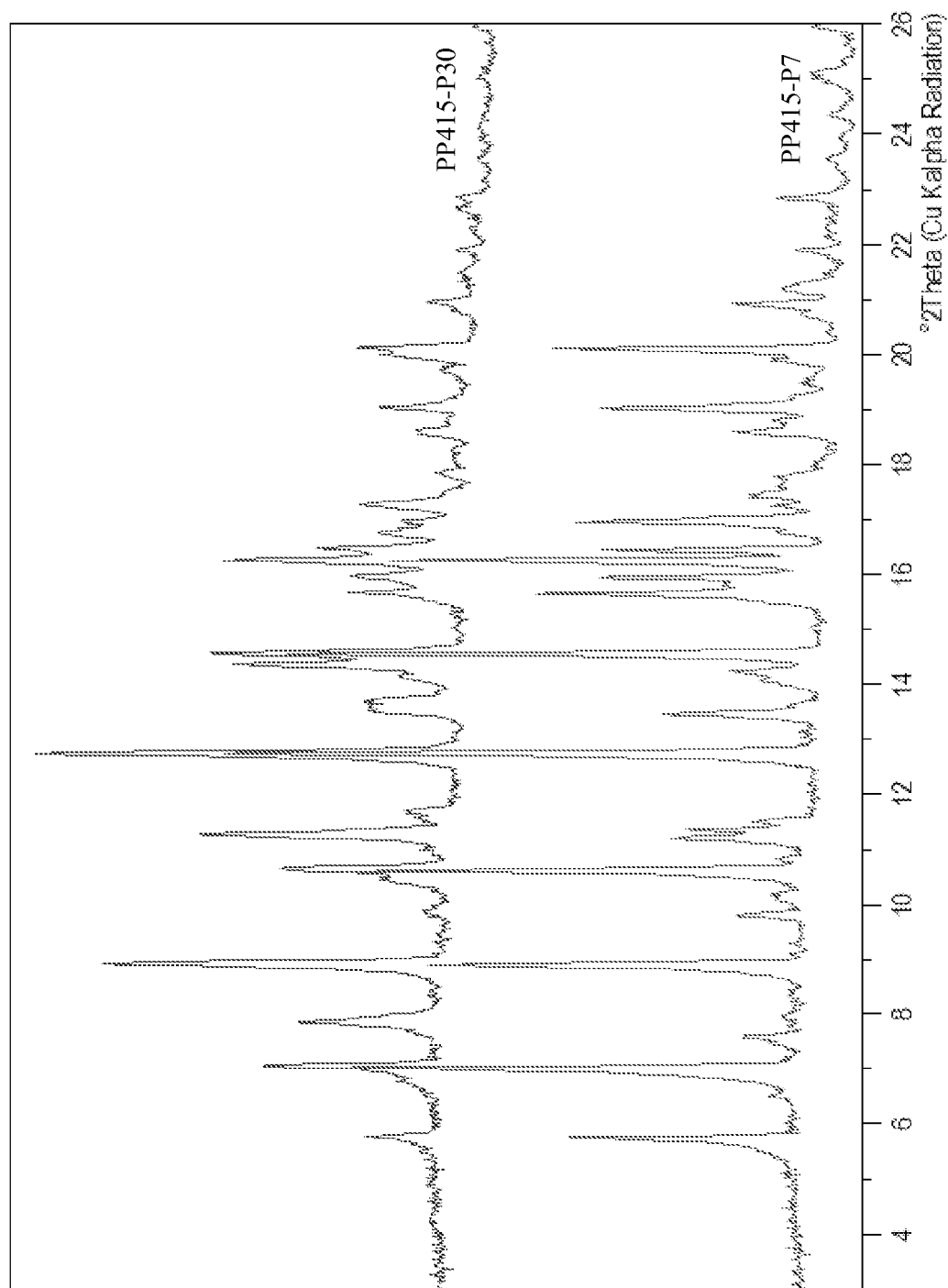


FIG. 83

Polym. Monte

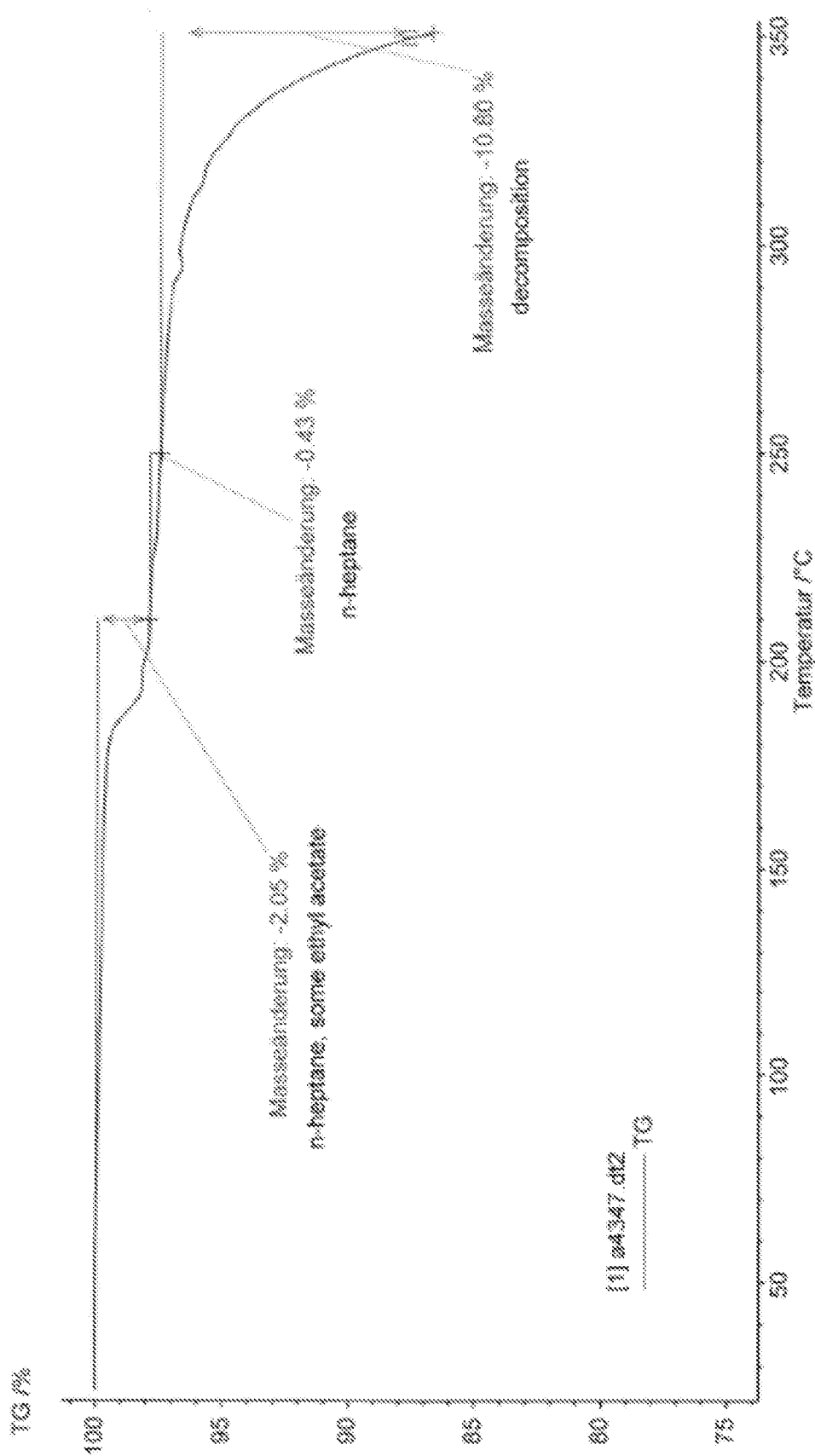


FIG. 84

polyo Montch

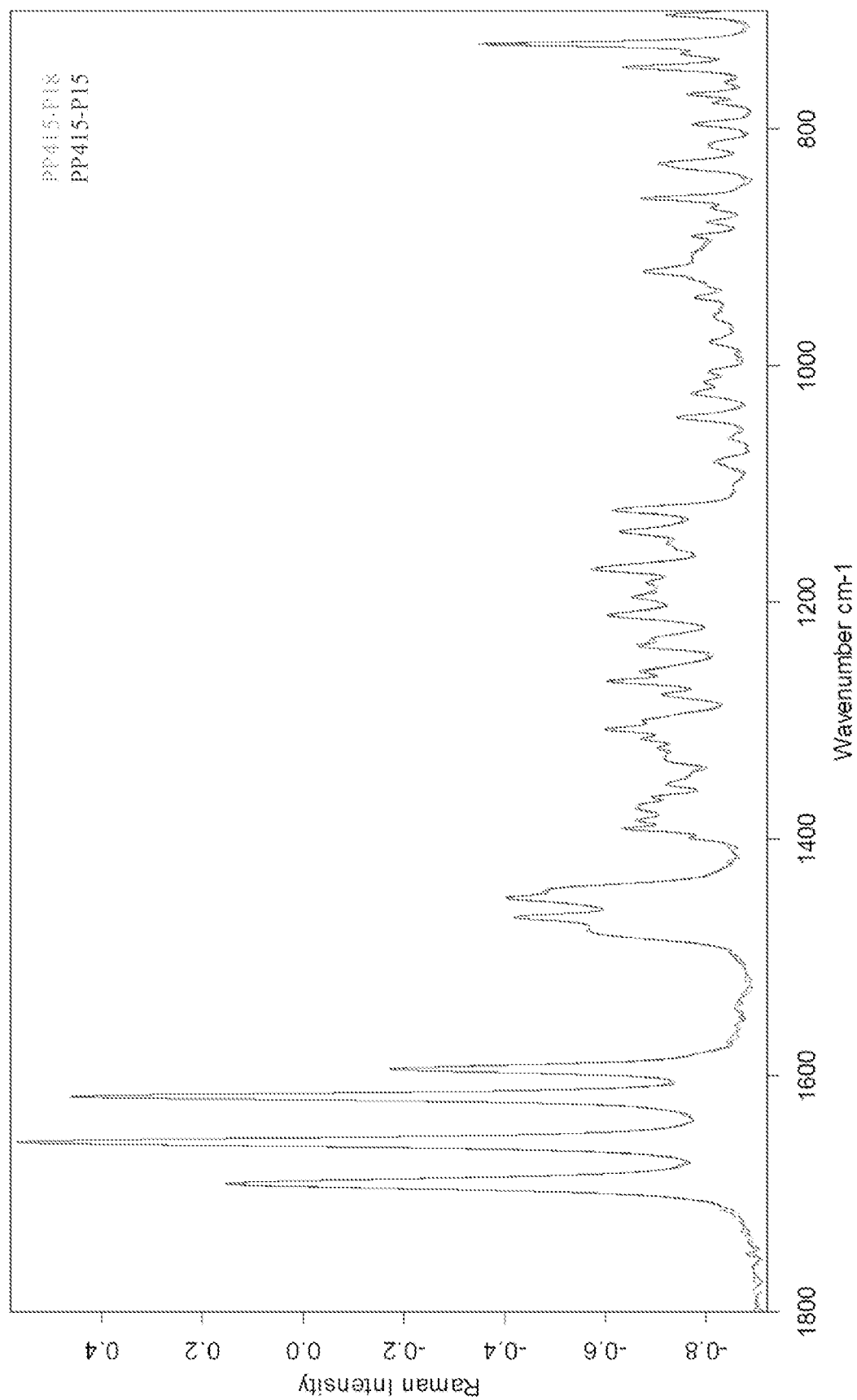


FIG. 85

polyo Monteb

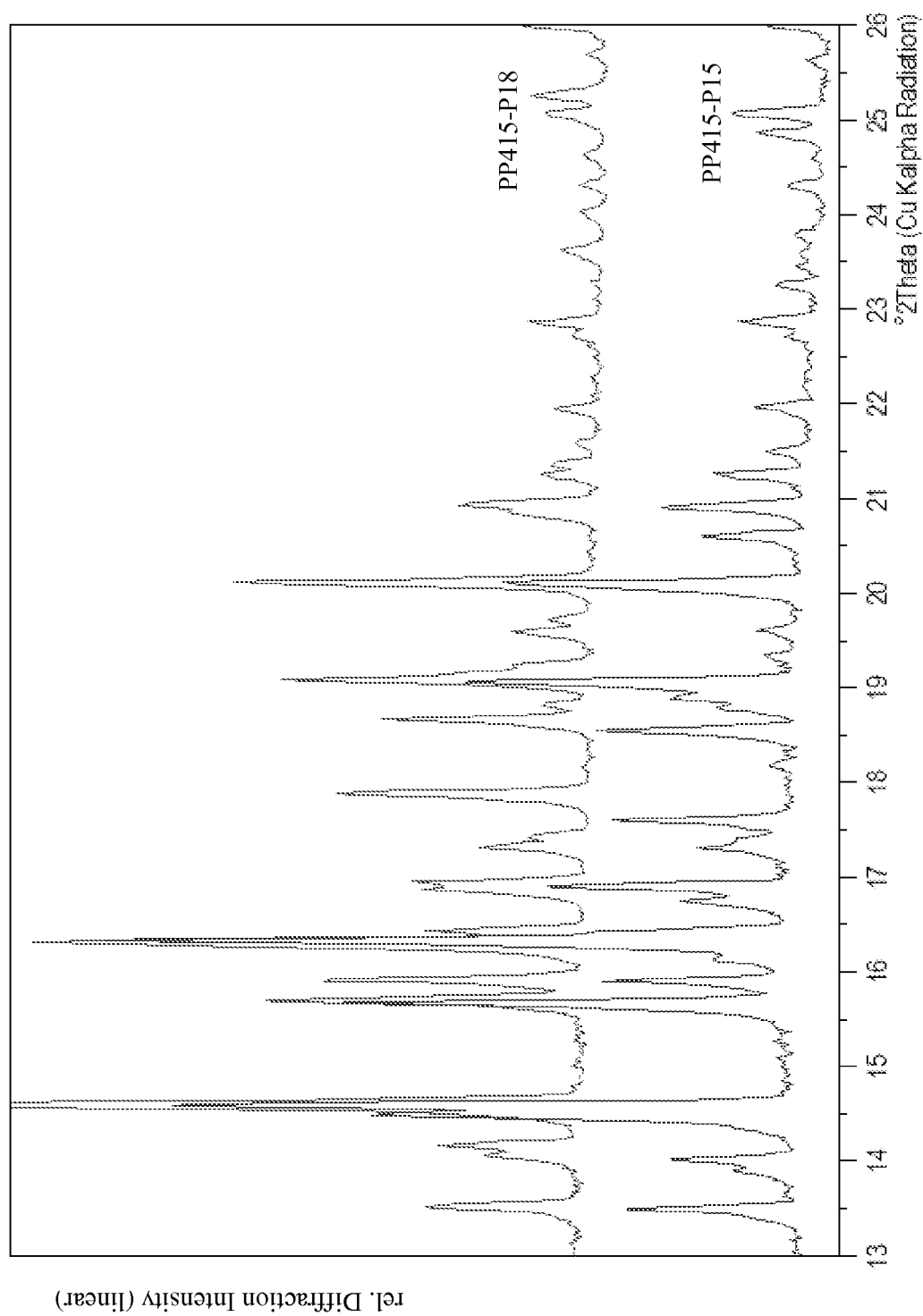


FIG. 86

Prilypa Montech

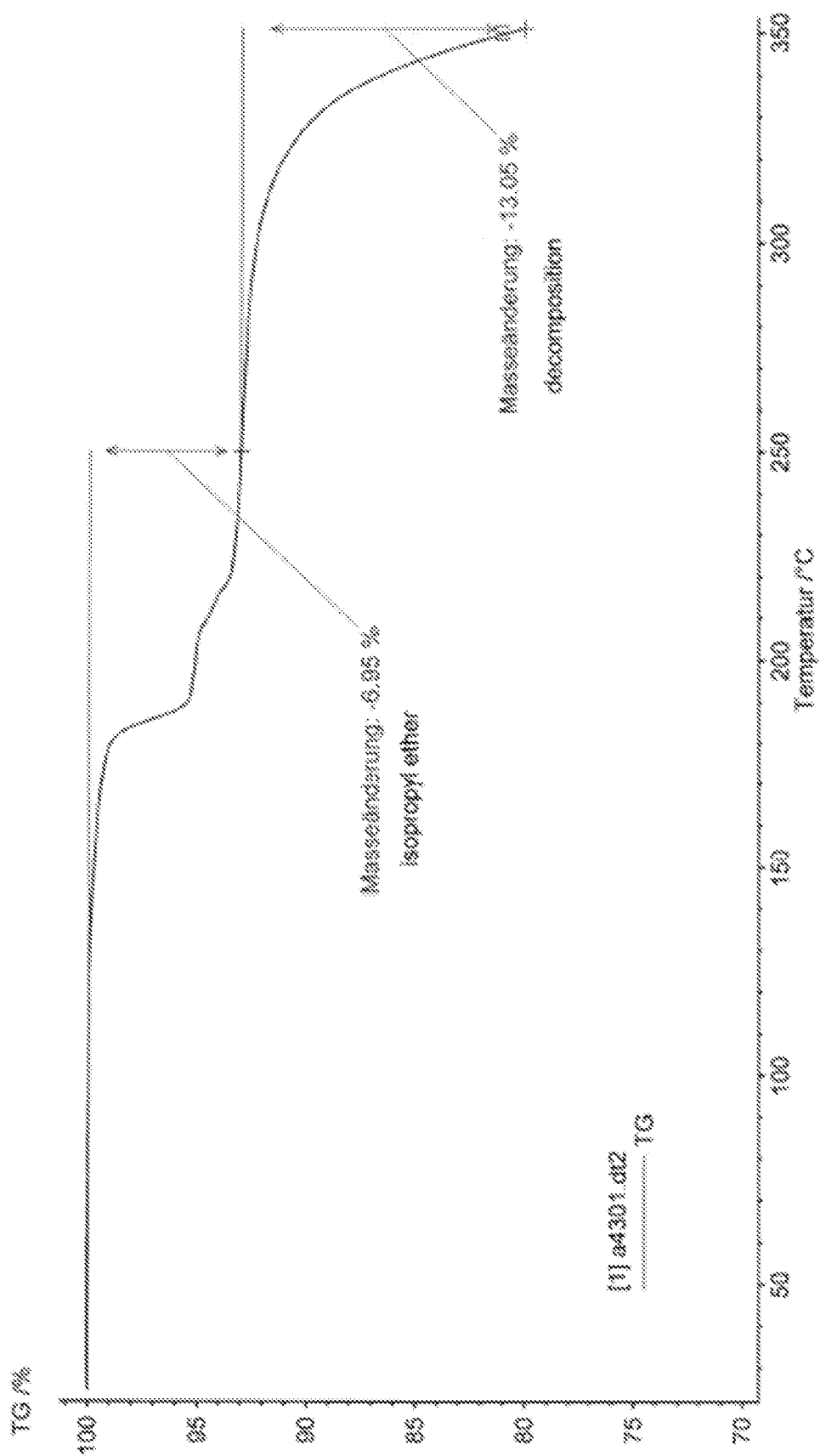


FIG. 87

Polypro Montech

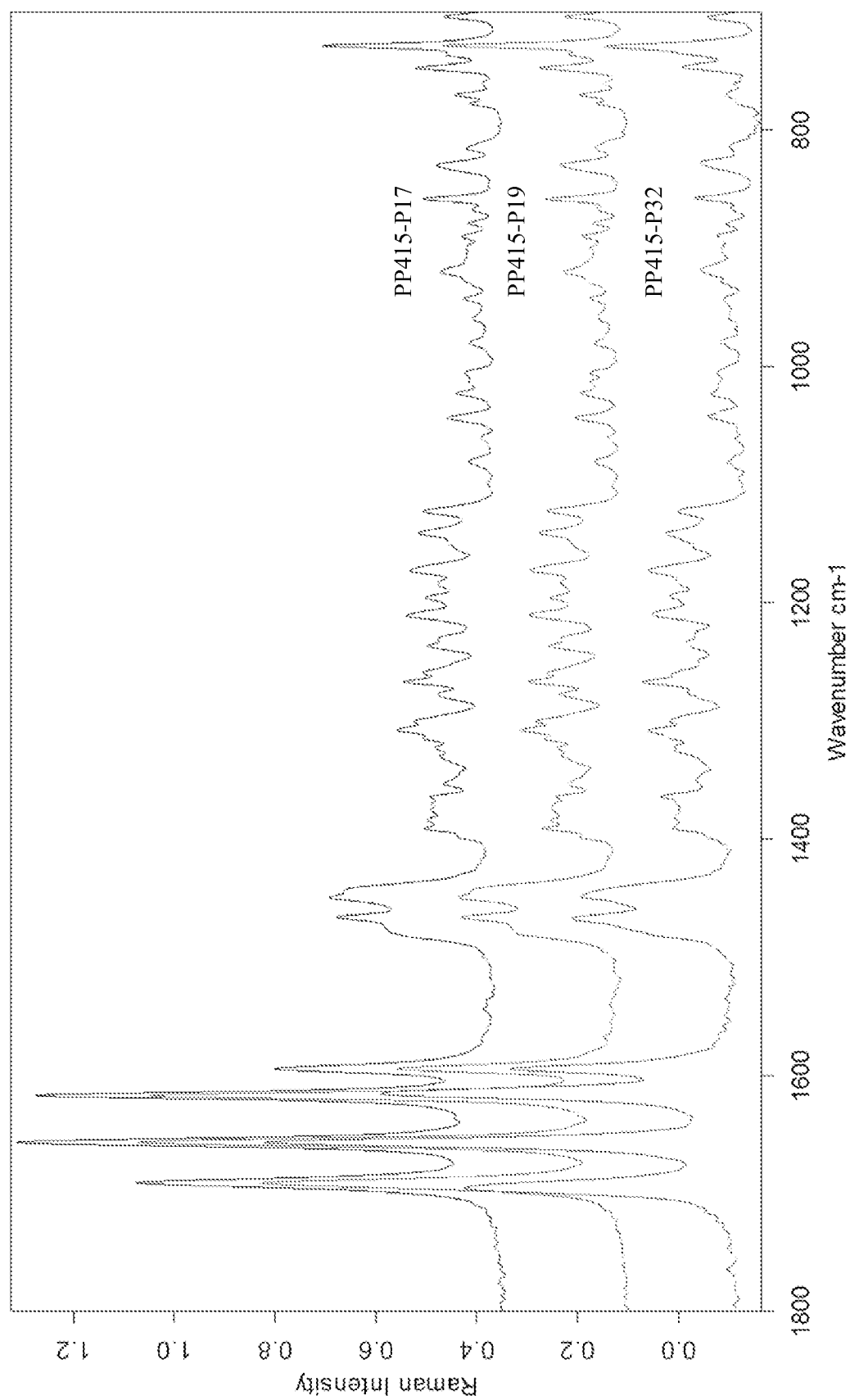


FIG. 88

Polym. Montch

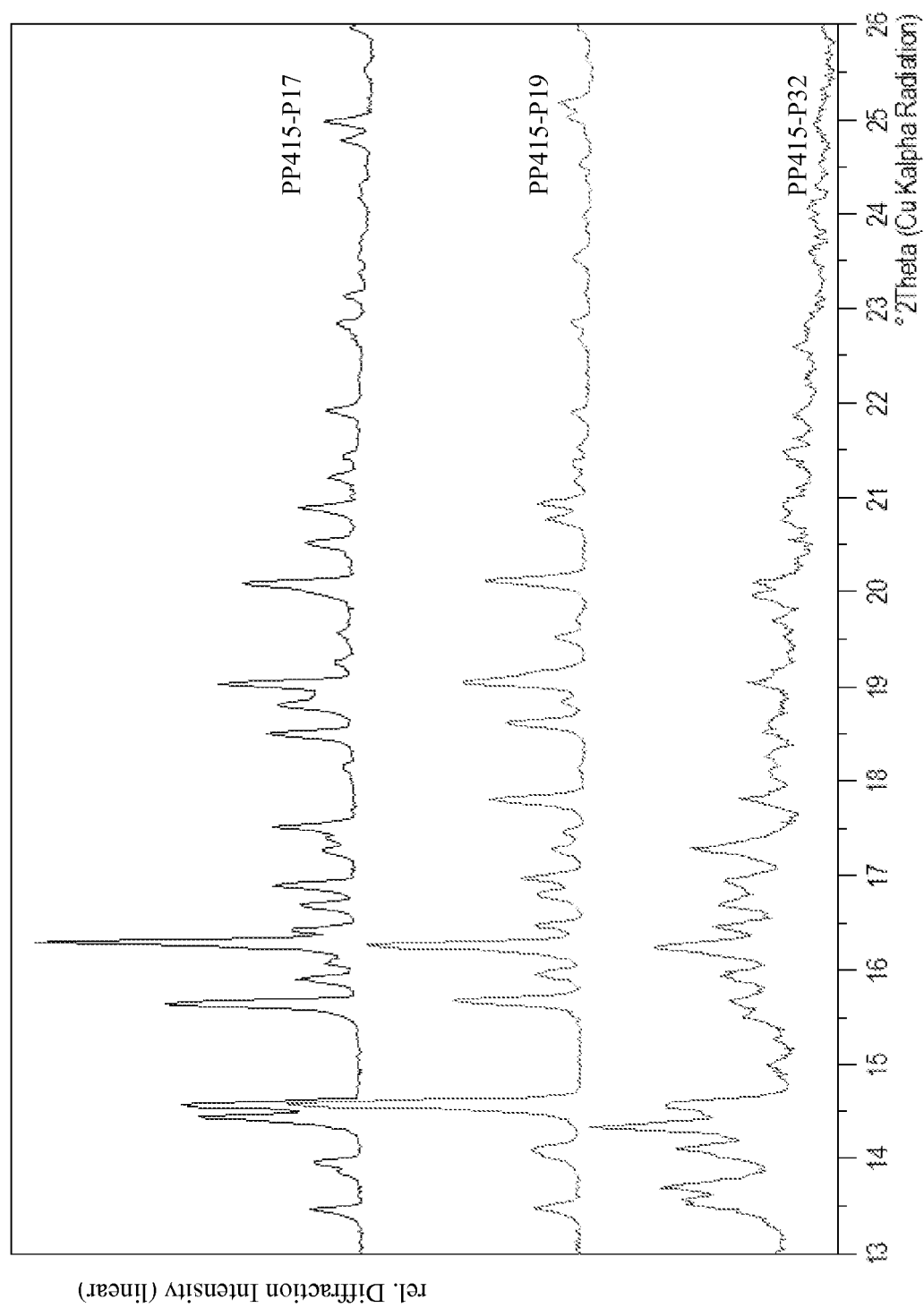


FIG. 89

Philip Monteleone

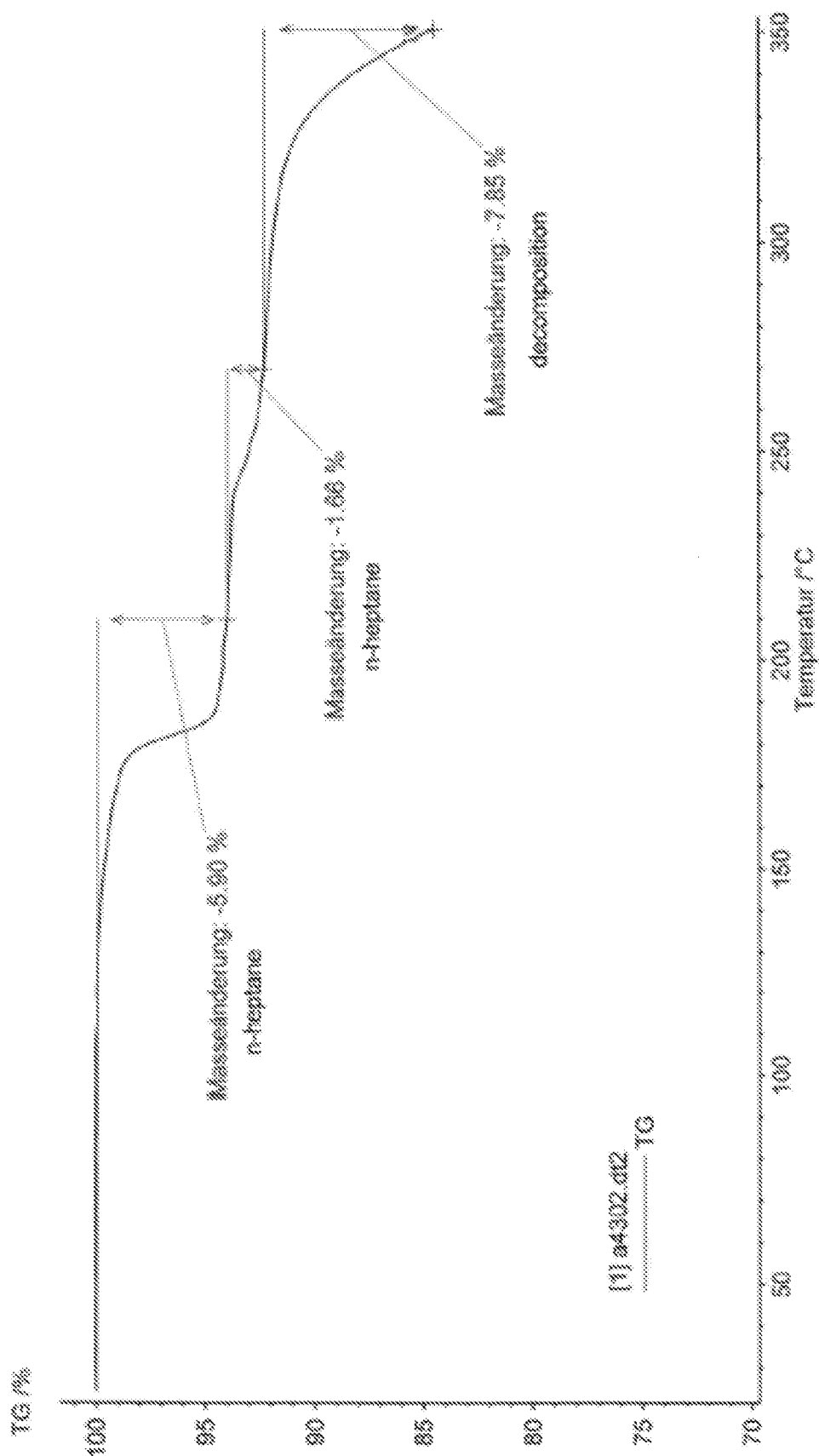


FIG. 90

Polys Montel

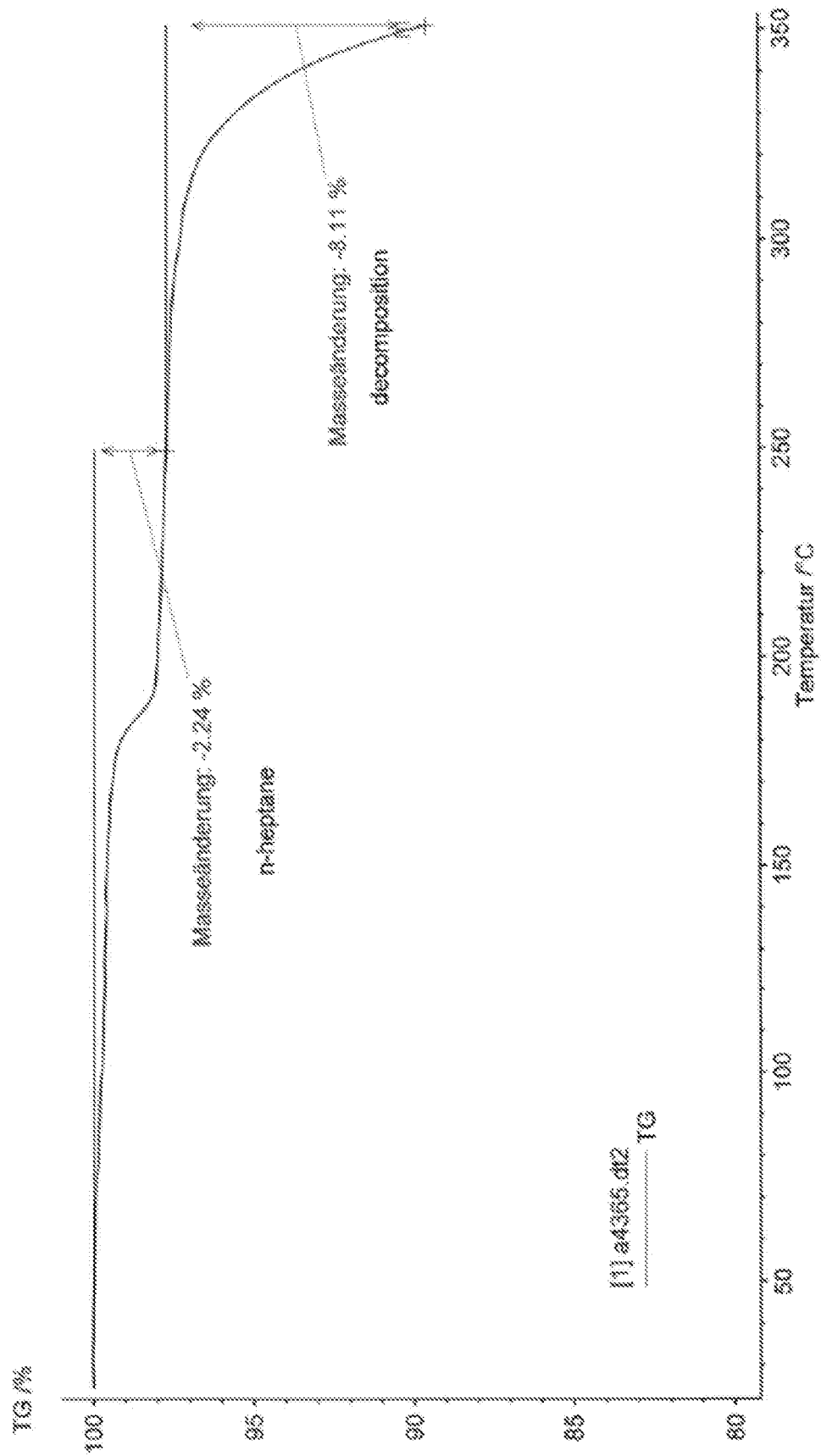


FIG. 91

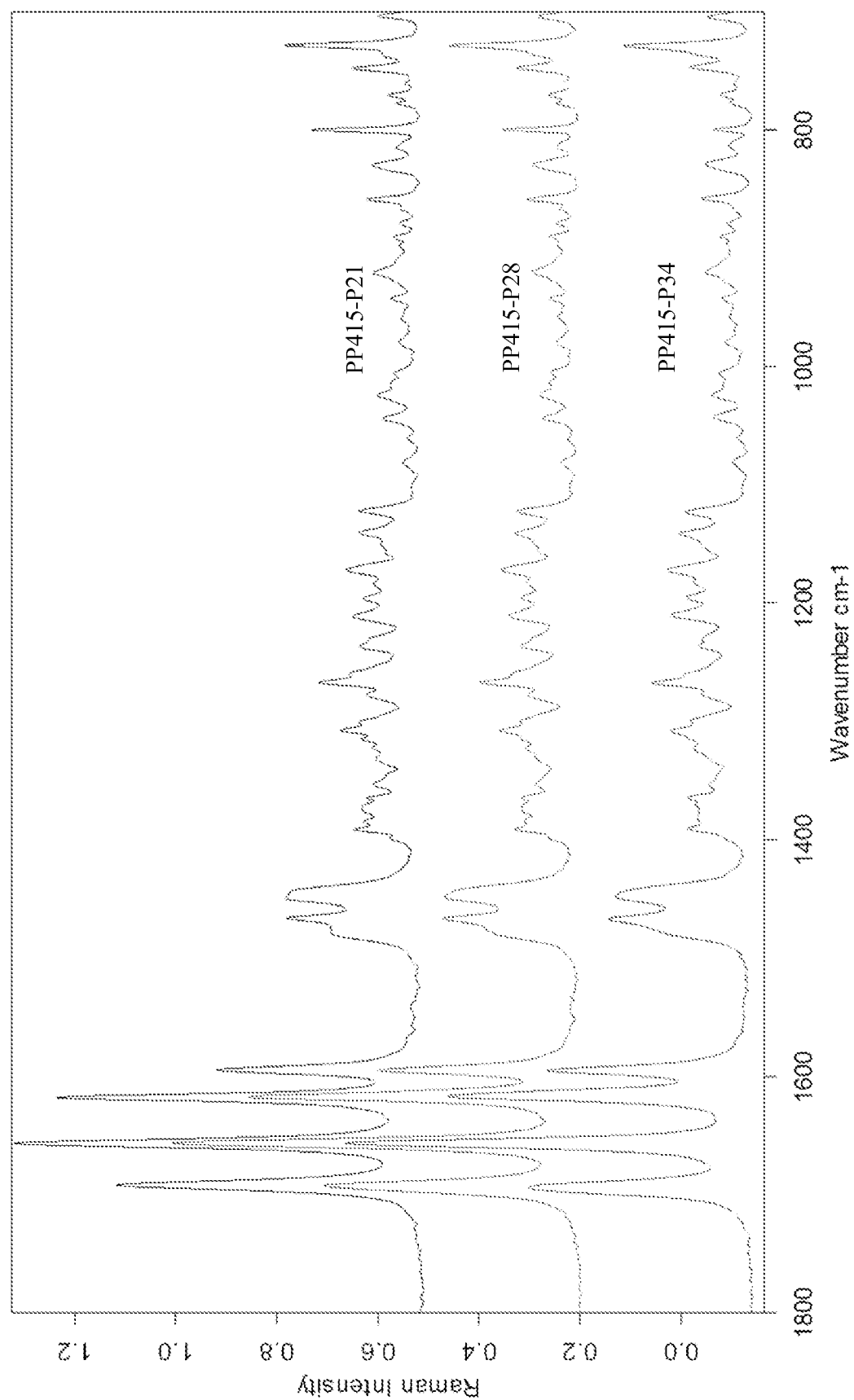


FIG. 92

Ally Montel

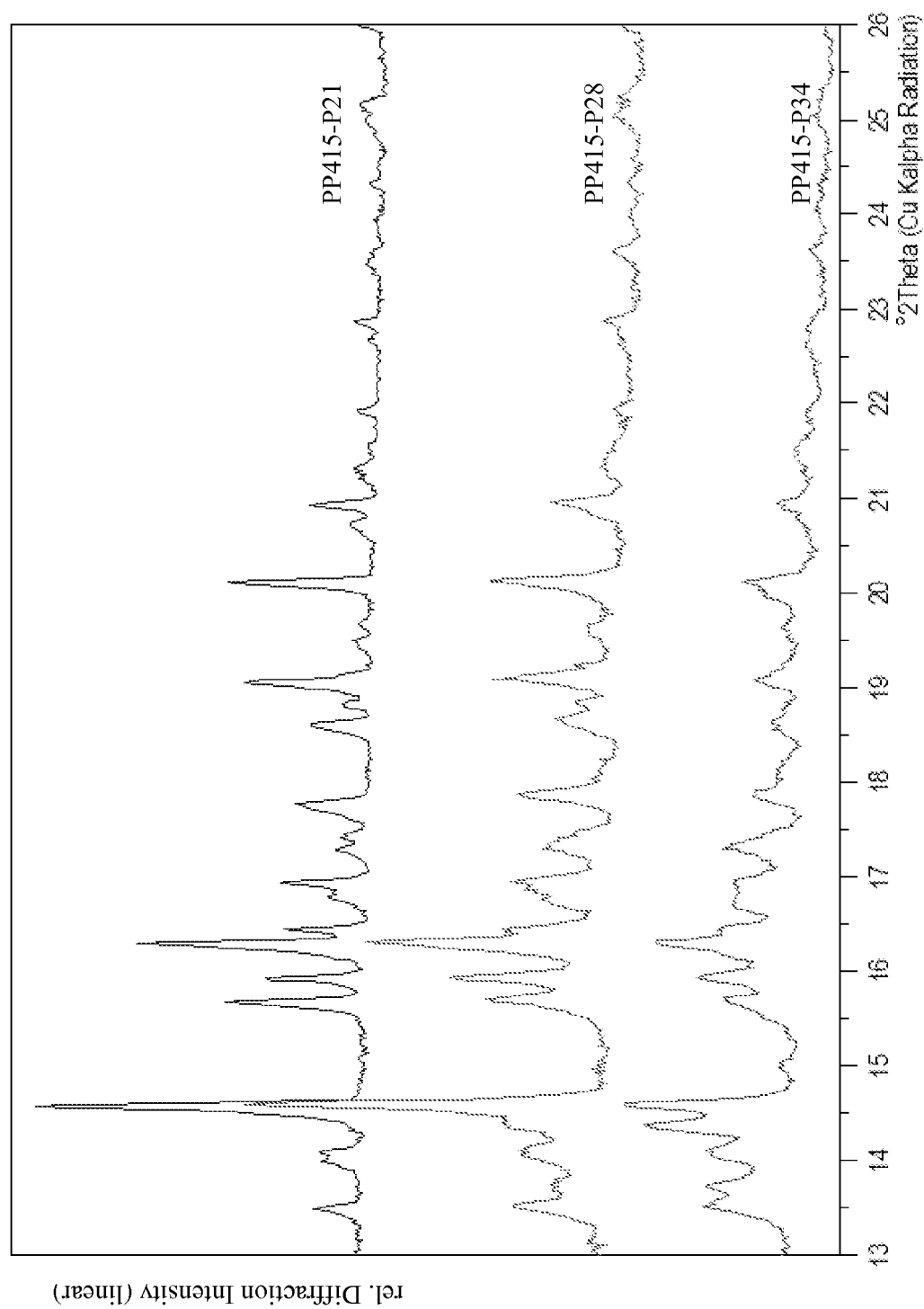


FIG. 93

Allyp Montel

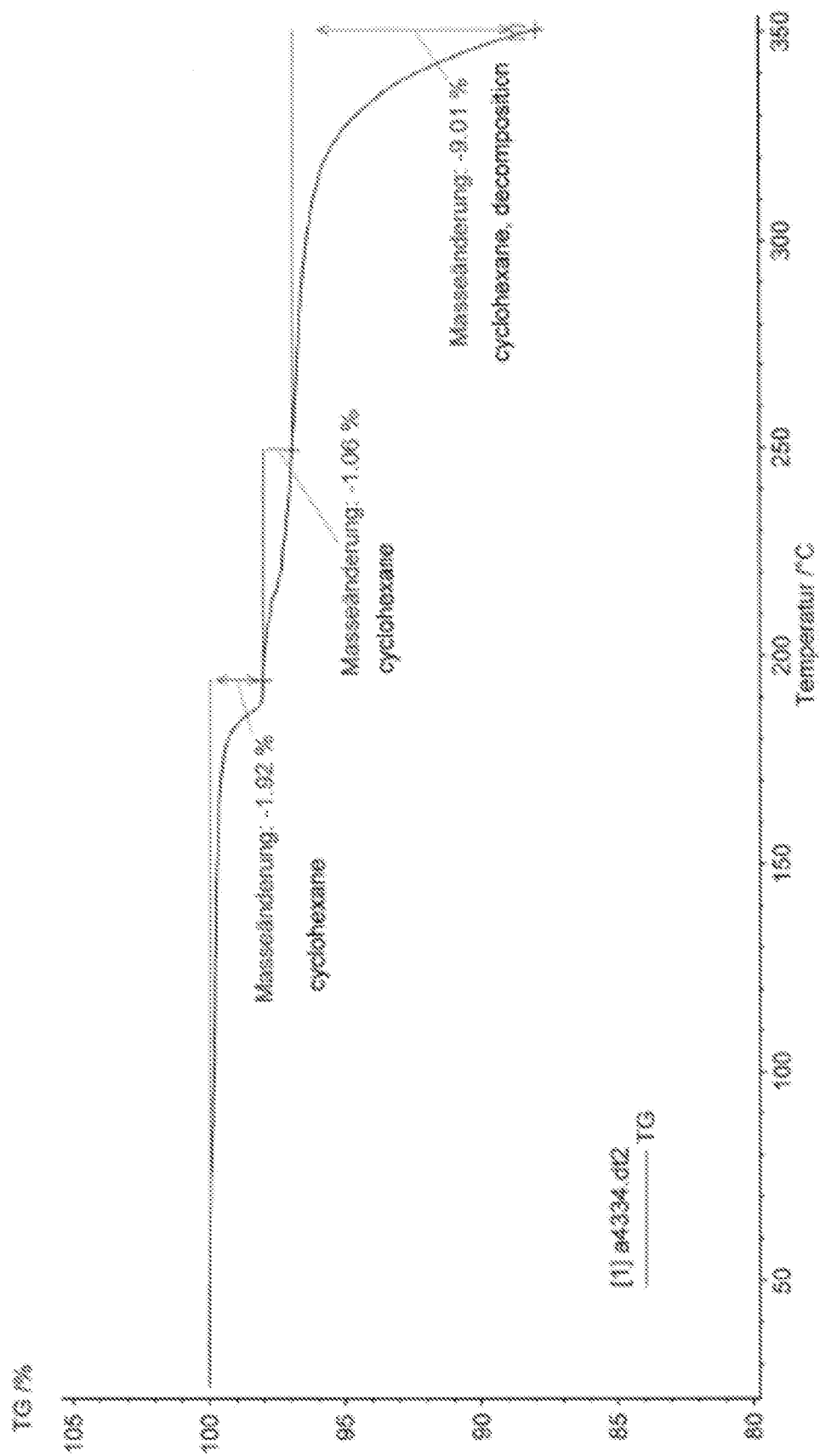


FIG. 94

Polyp Montel

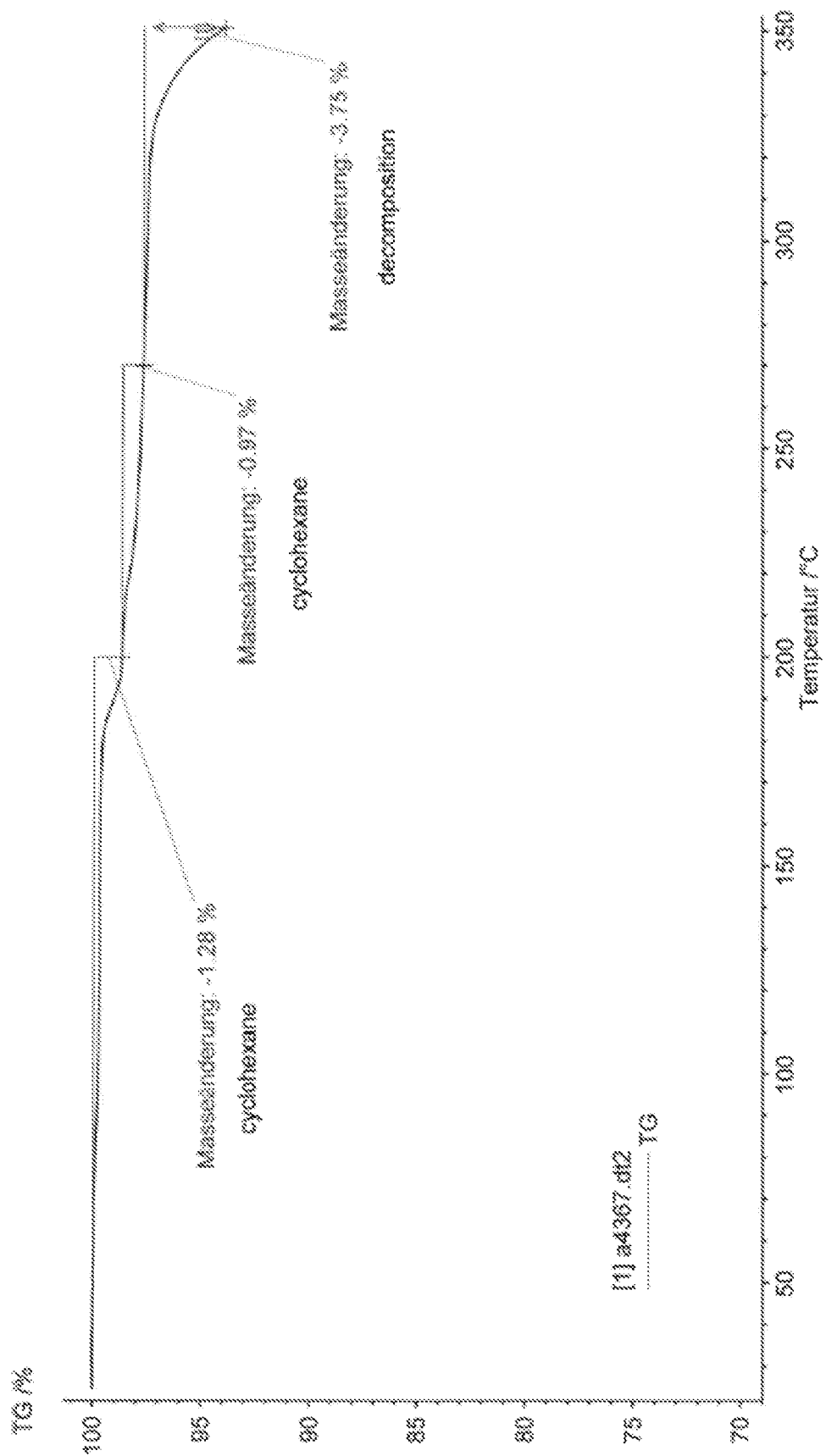


FIG. 95

polya Montch

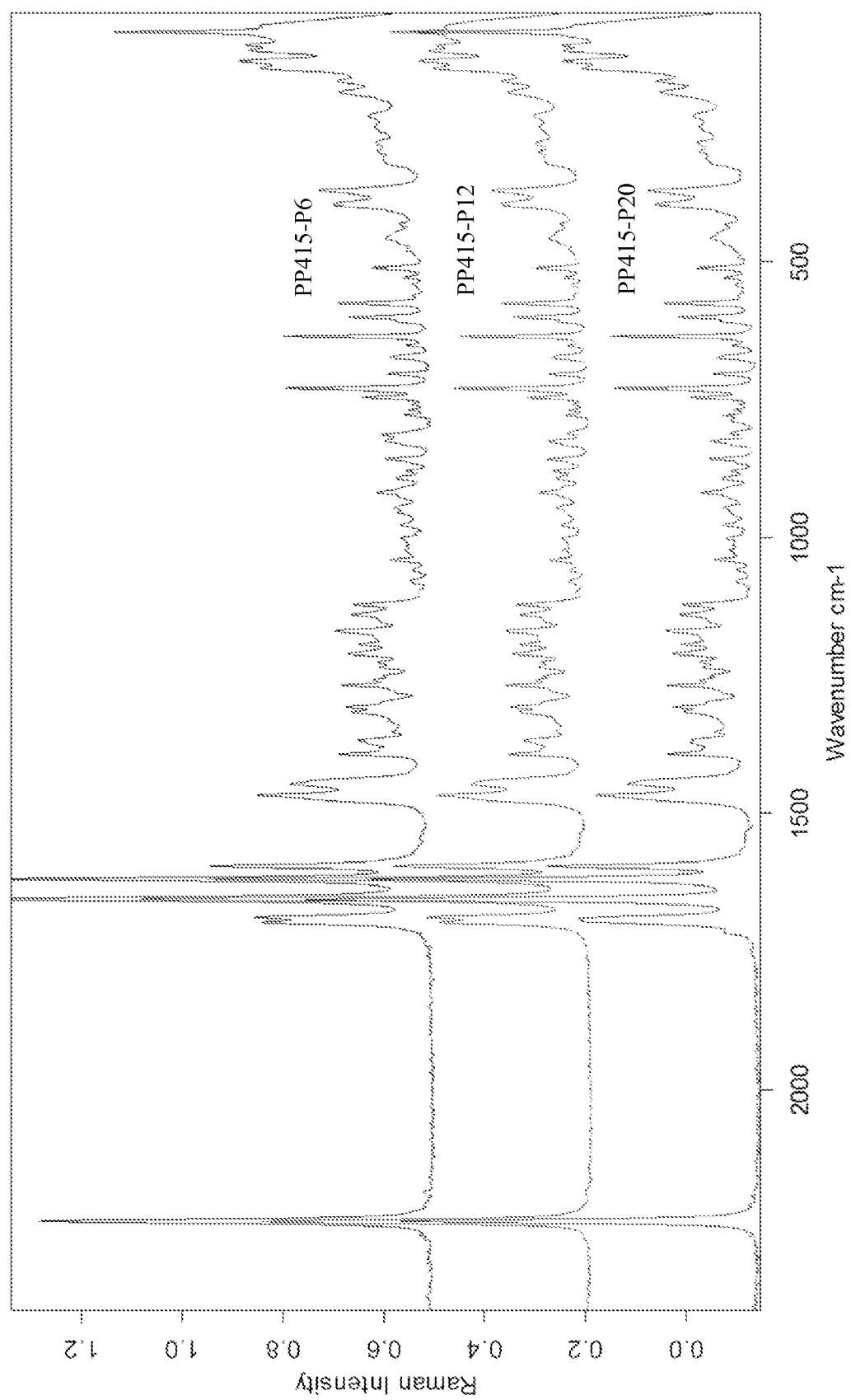


FIG. 96

Allyp Montel

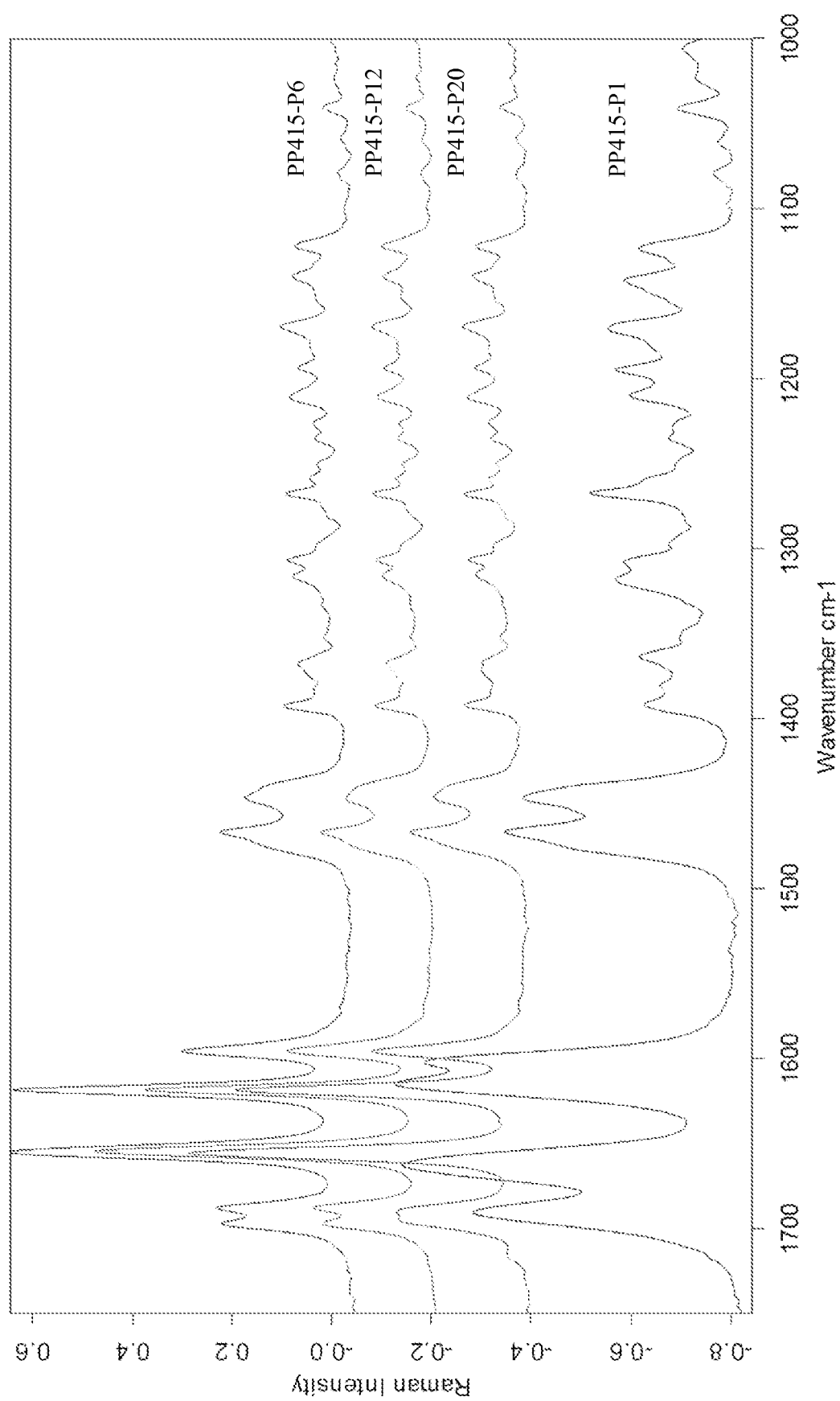


FIG. 97

Allyp Montech

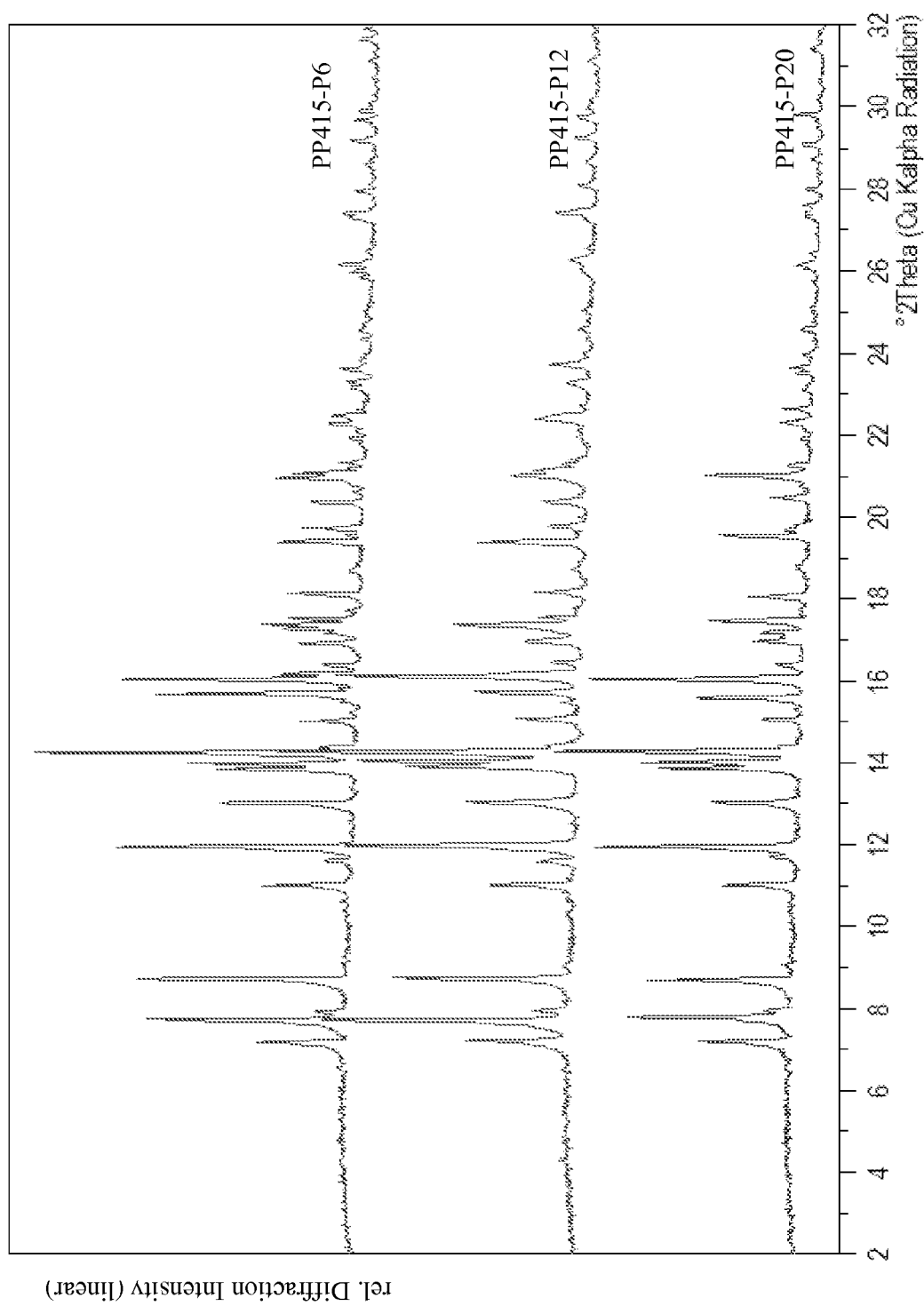


FIG. 98

poly Montech

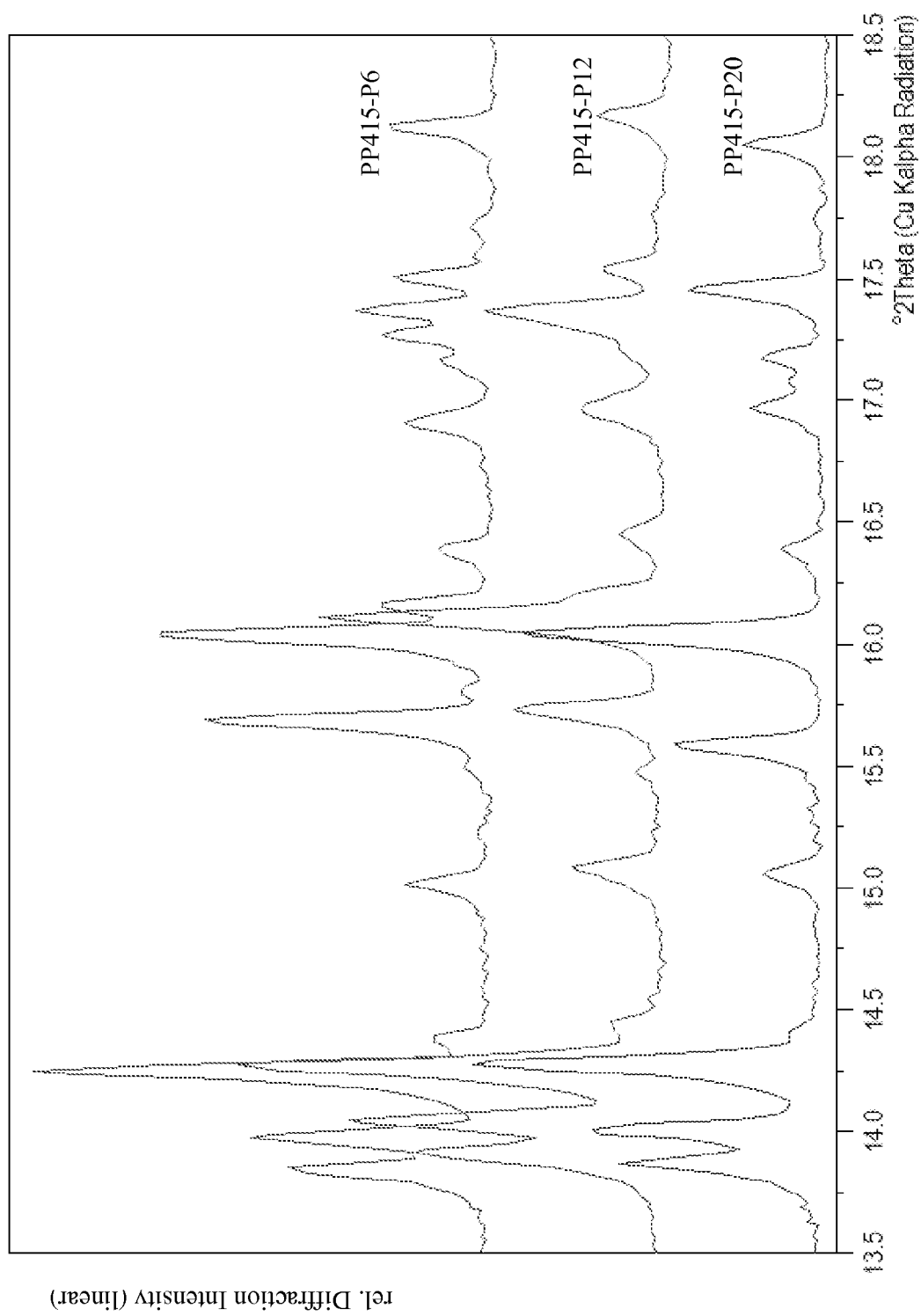


FIG. 99

Polym. Montch

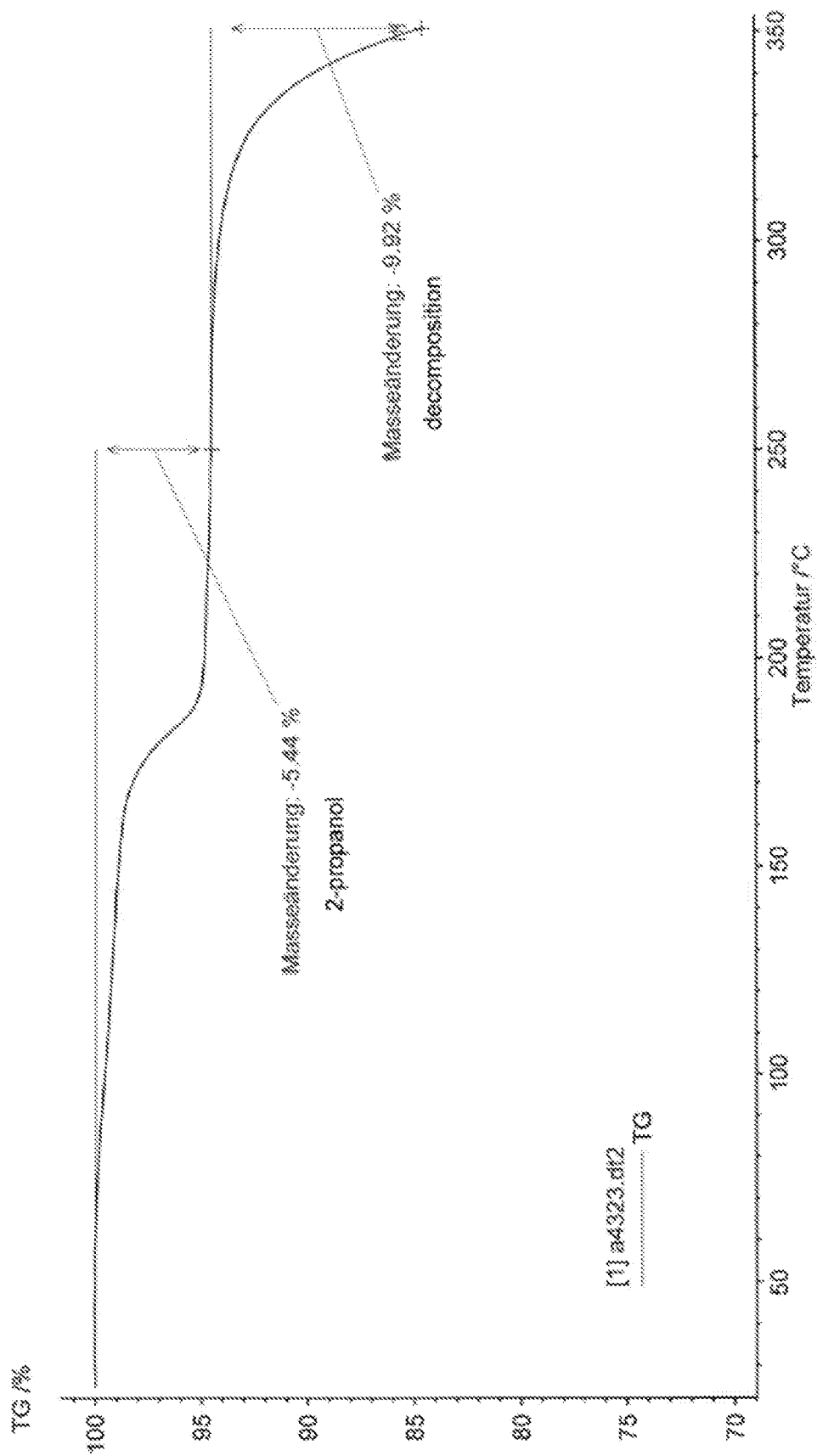


FIG. 100

Philippe Montel

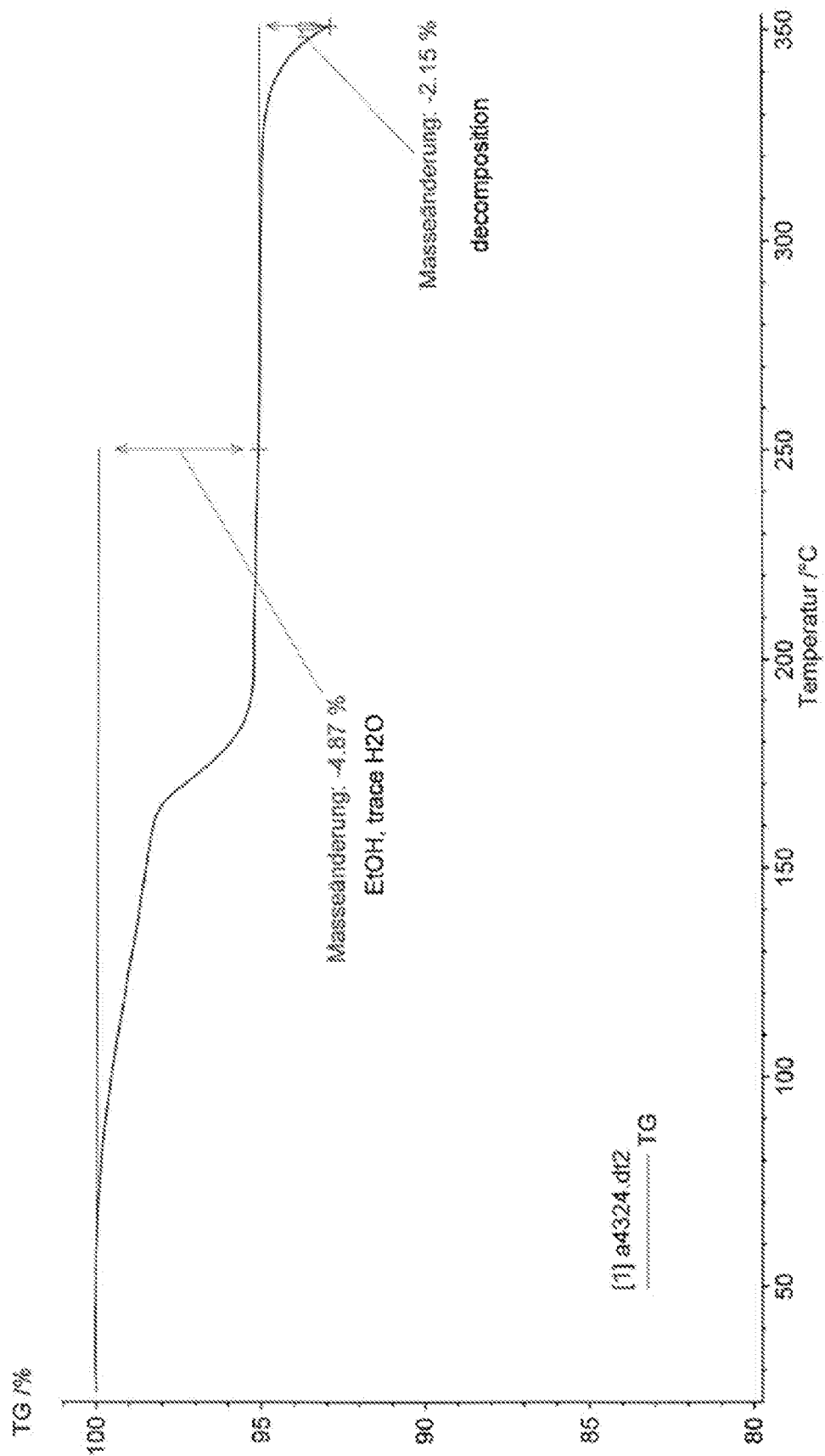


FIG. 101

Philippe Monteb...

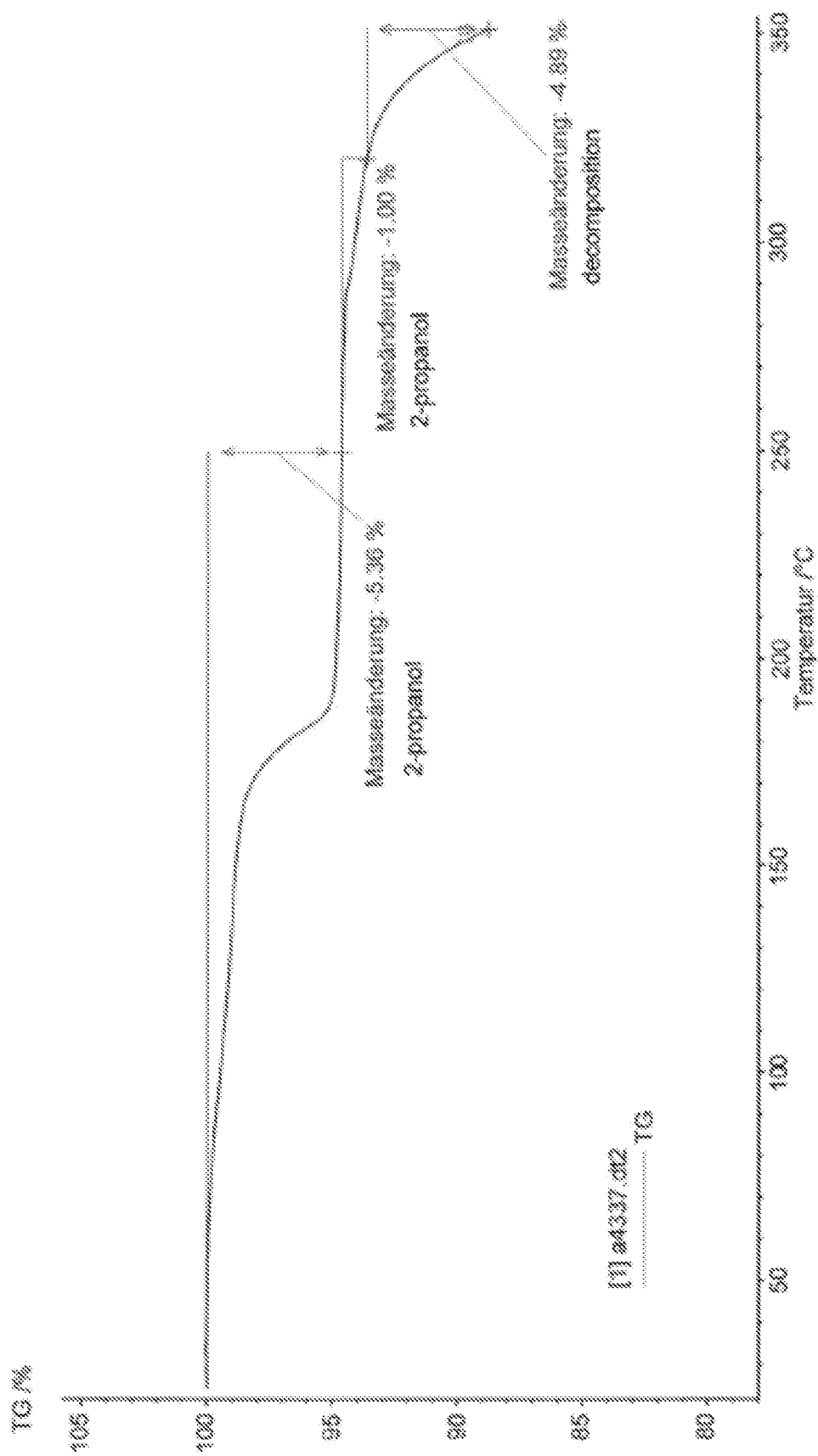


FIG. 102

Ellyo Montel

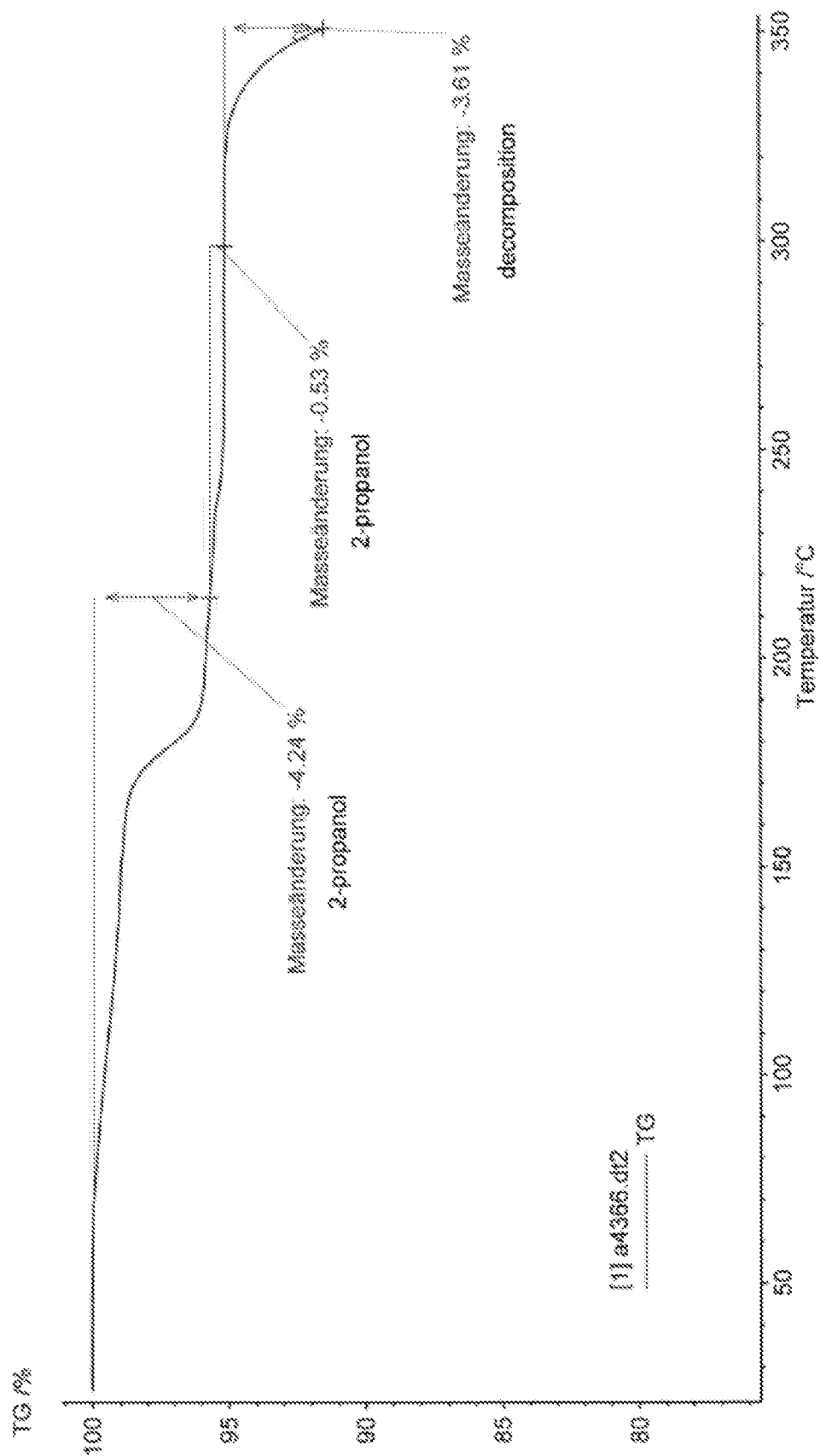


FIG. 103

polyo Montch

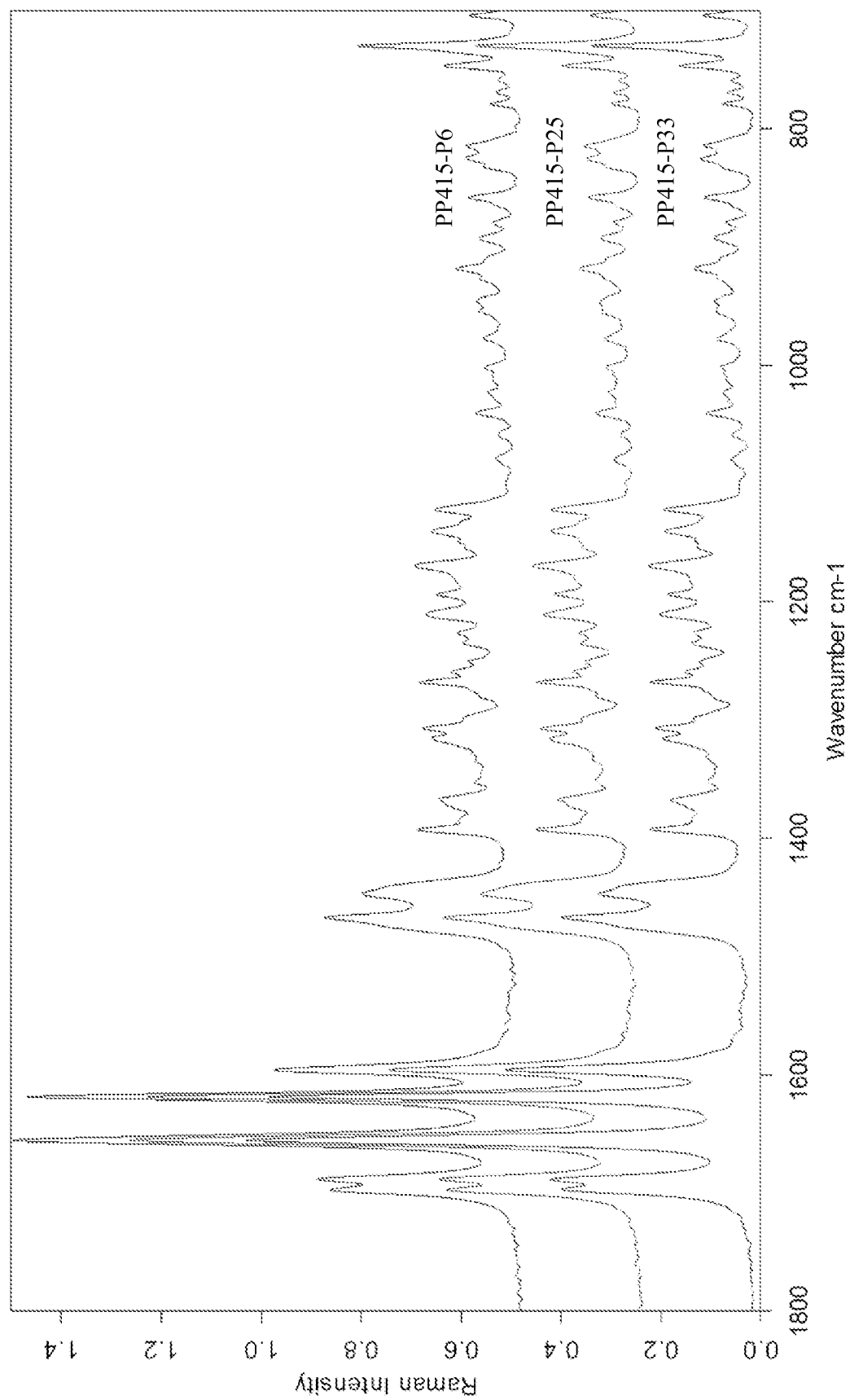


FIG. 104

Ally Montel

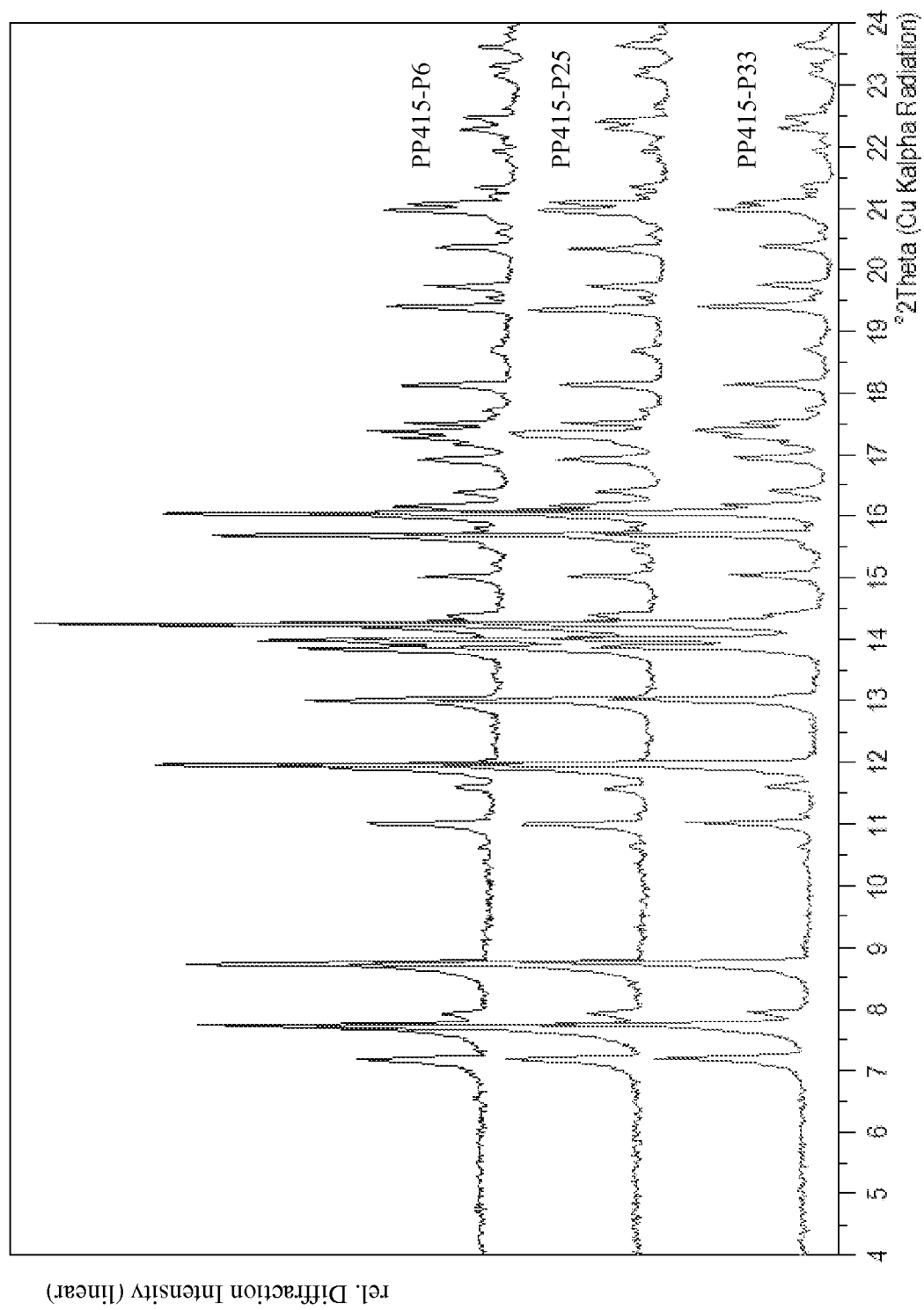


FIG. 105

poly Montel

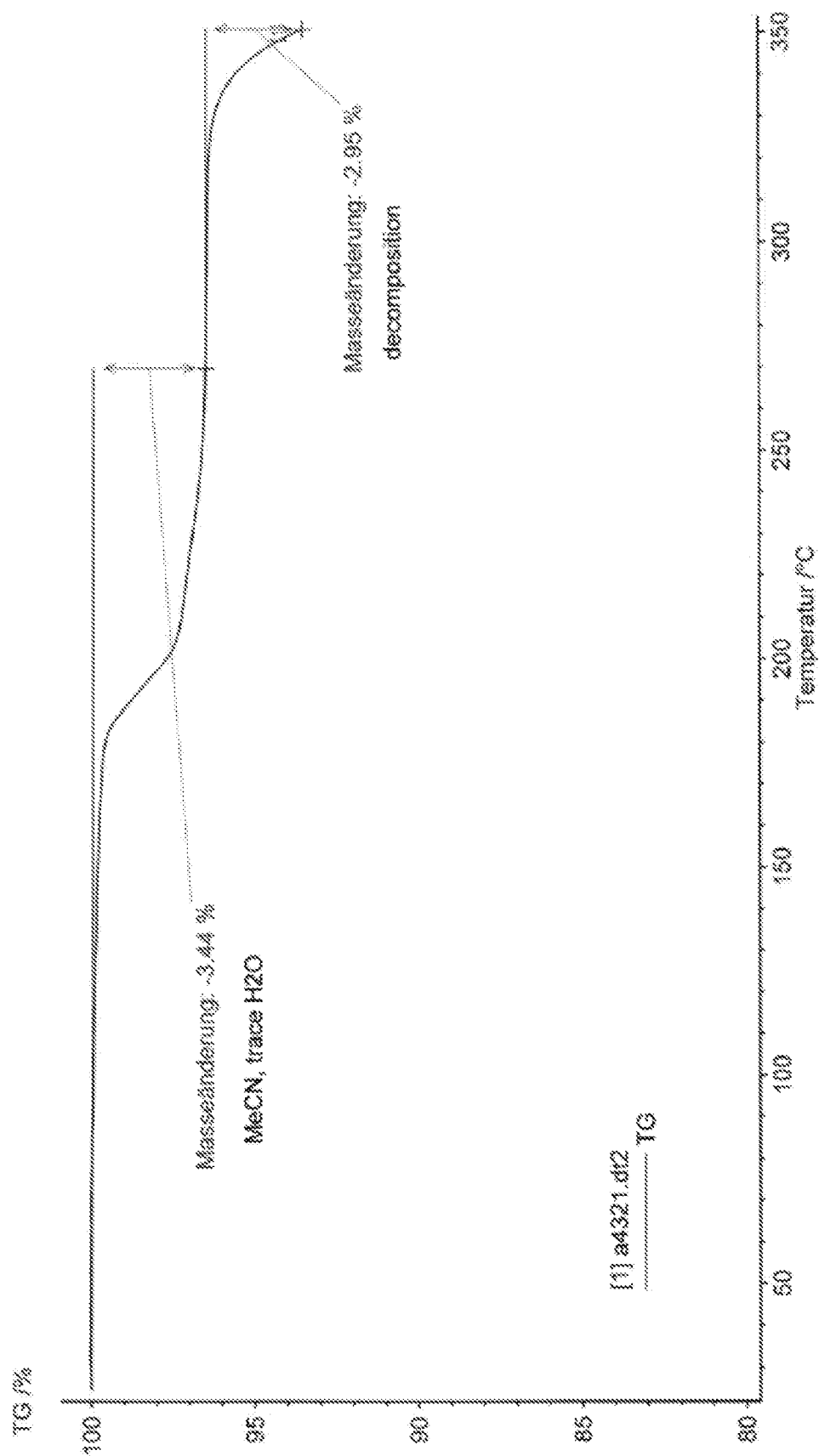


FIG. 106

Philippe Montebelli

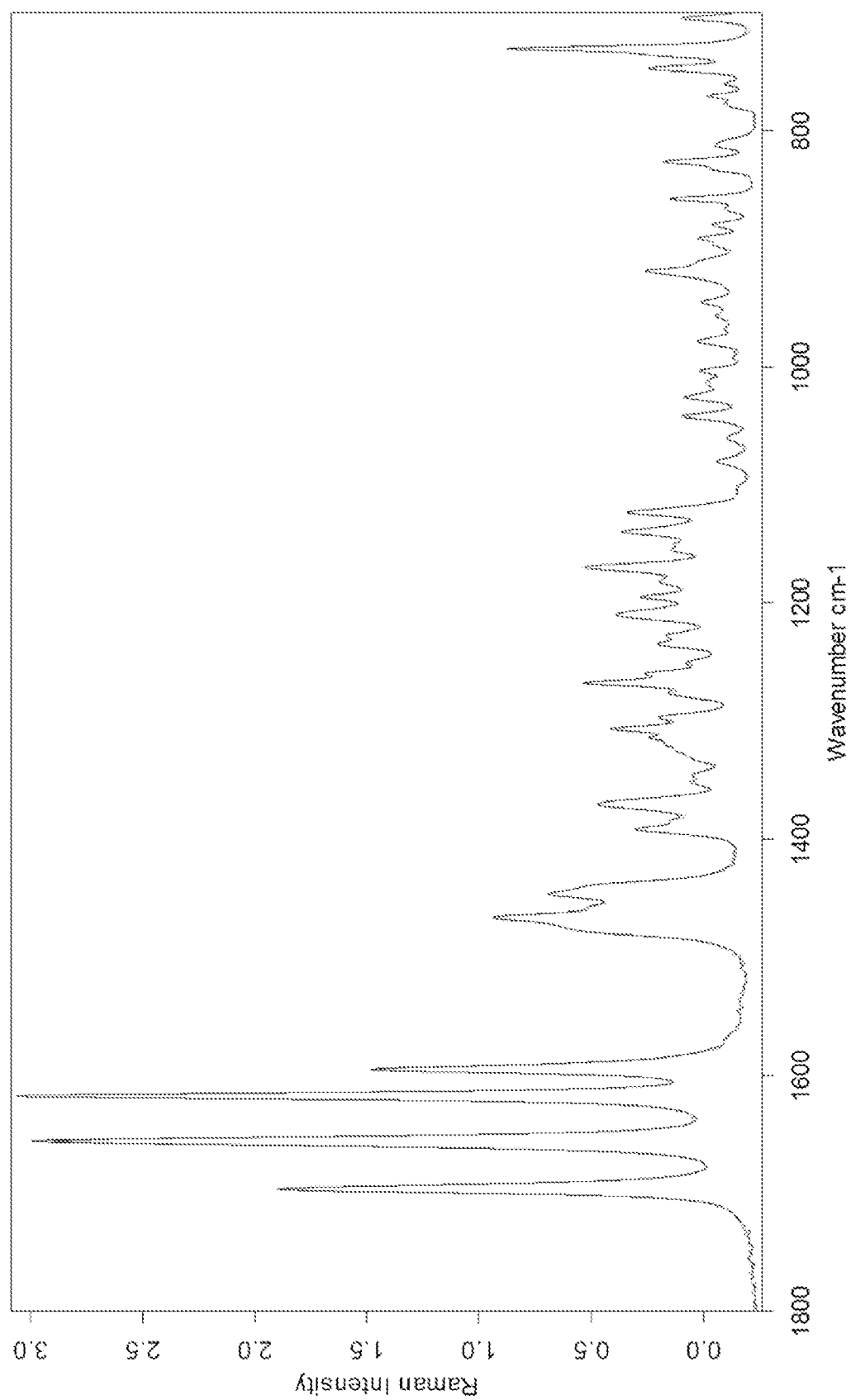


FIG. 107

Pylyp Montel

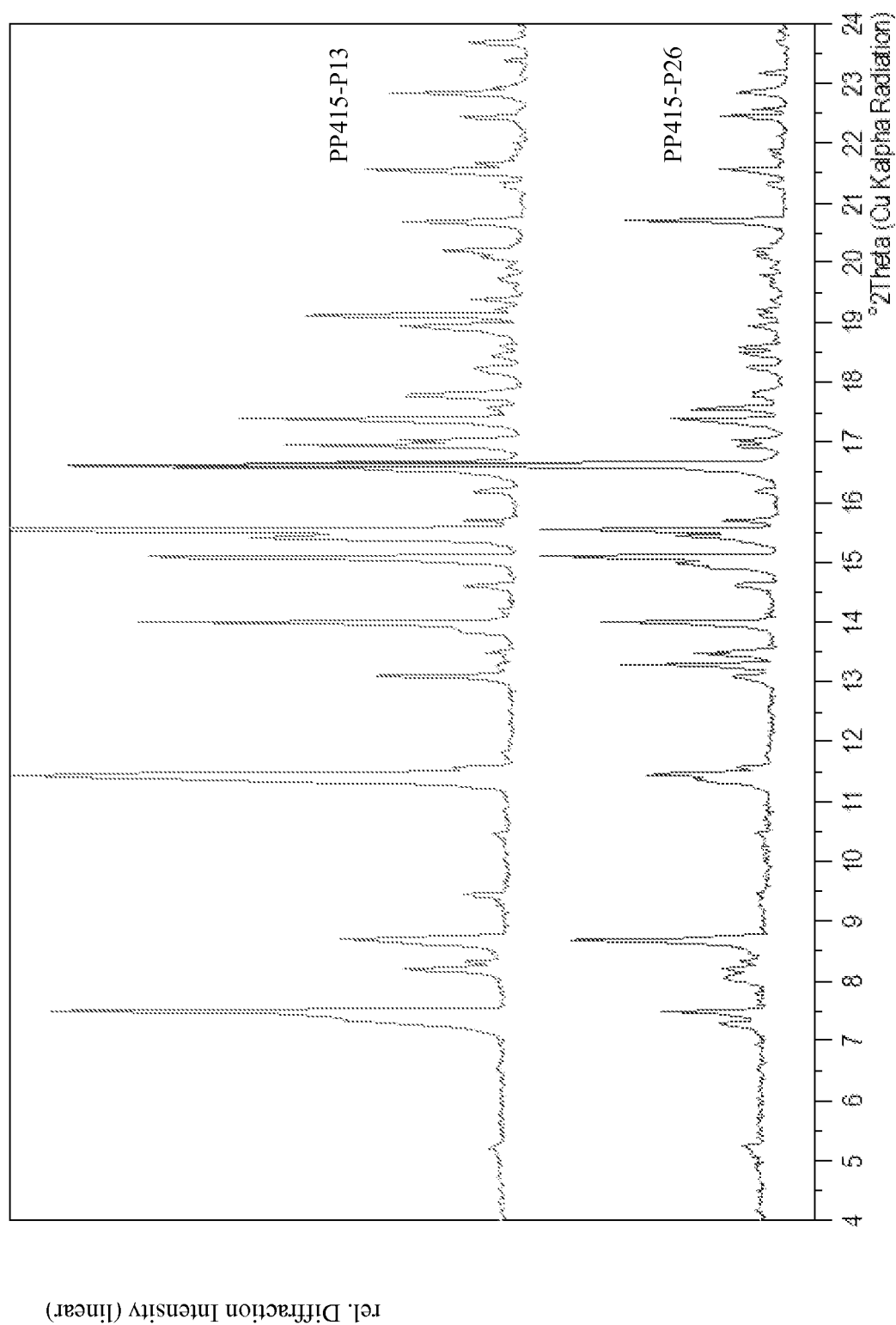


FIG. 108

Prilys Montech

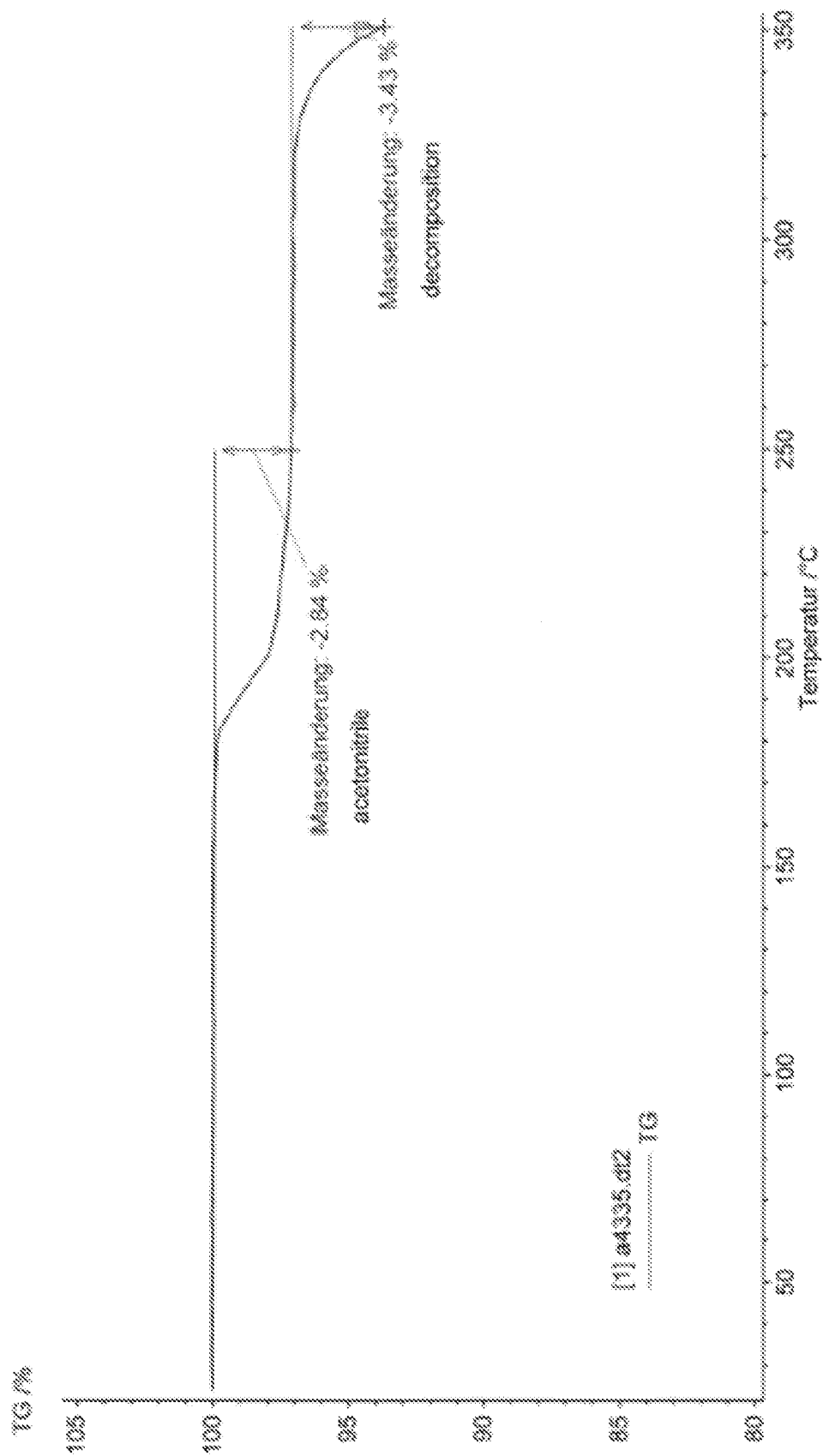


FIG. 109

Pilyp Montel

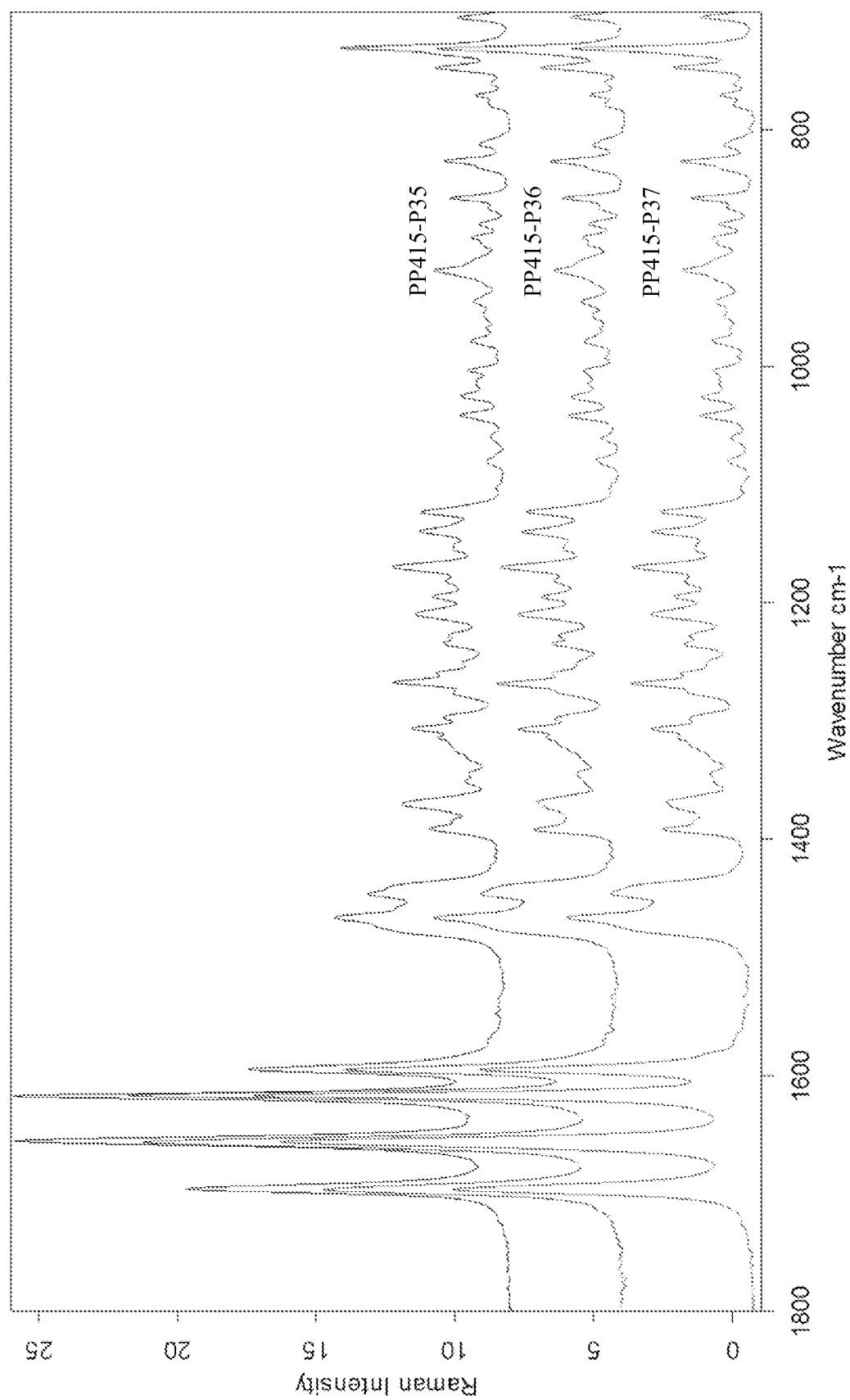


FIG. 110

Pritya Montali

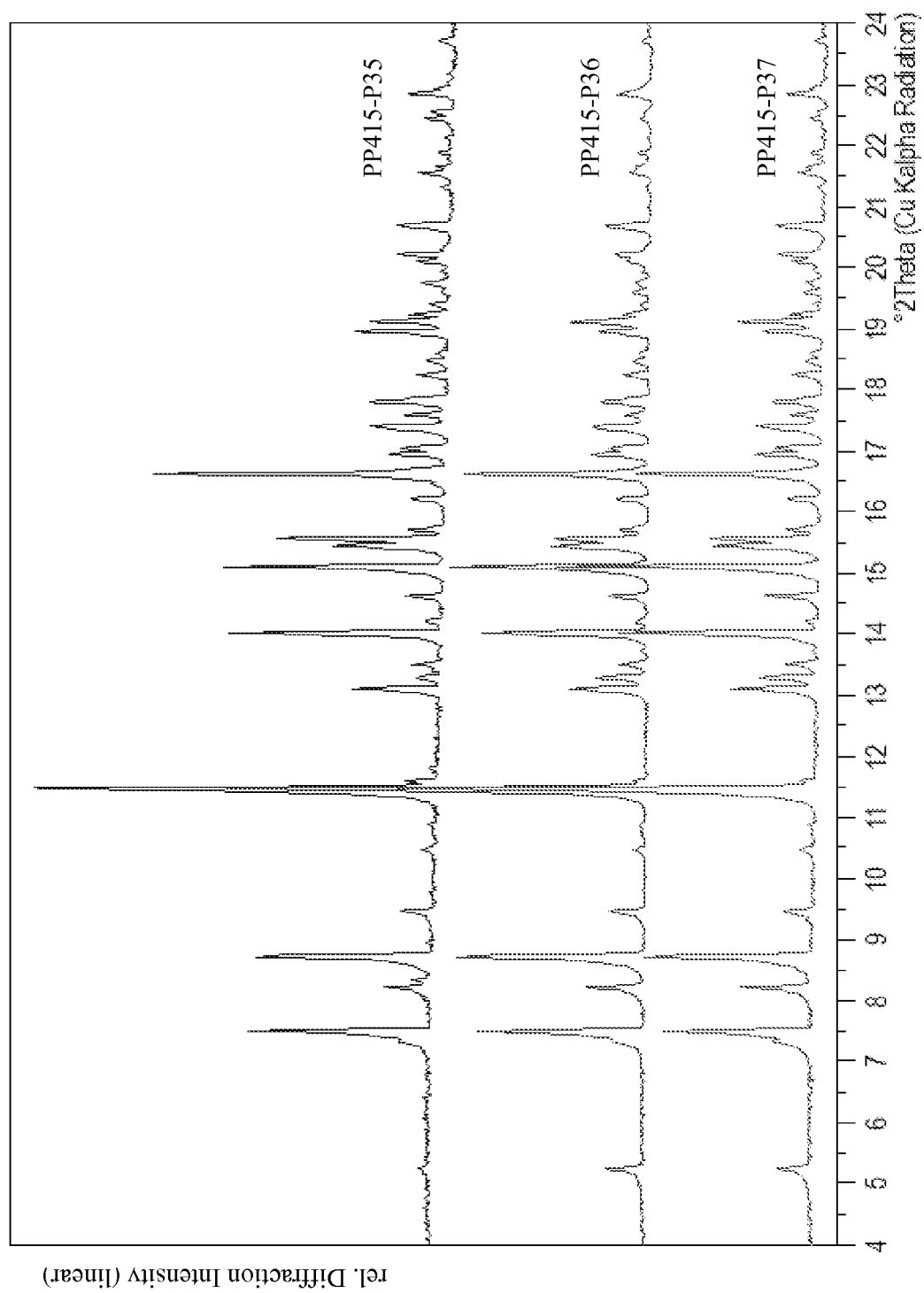


FIG. 111

Allyp Montel

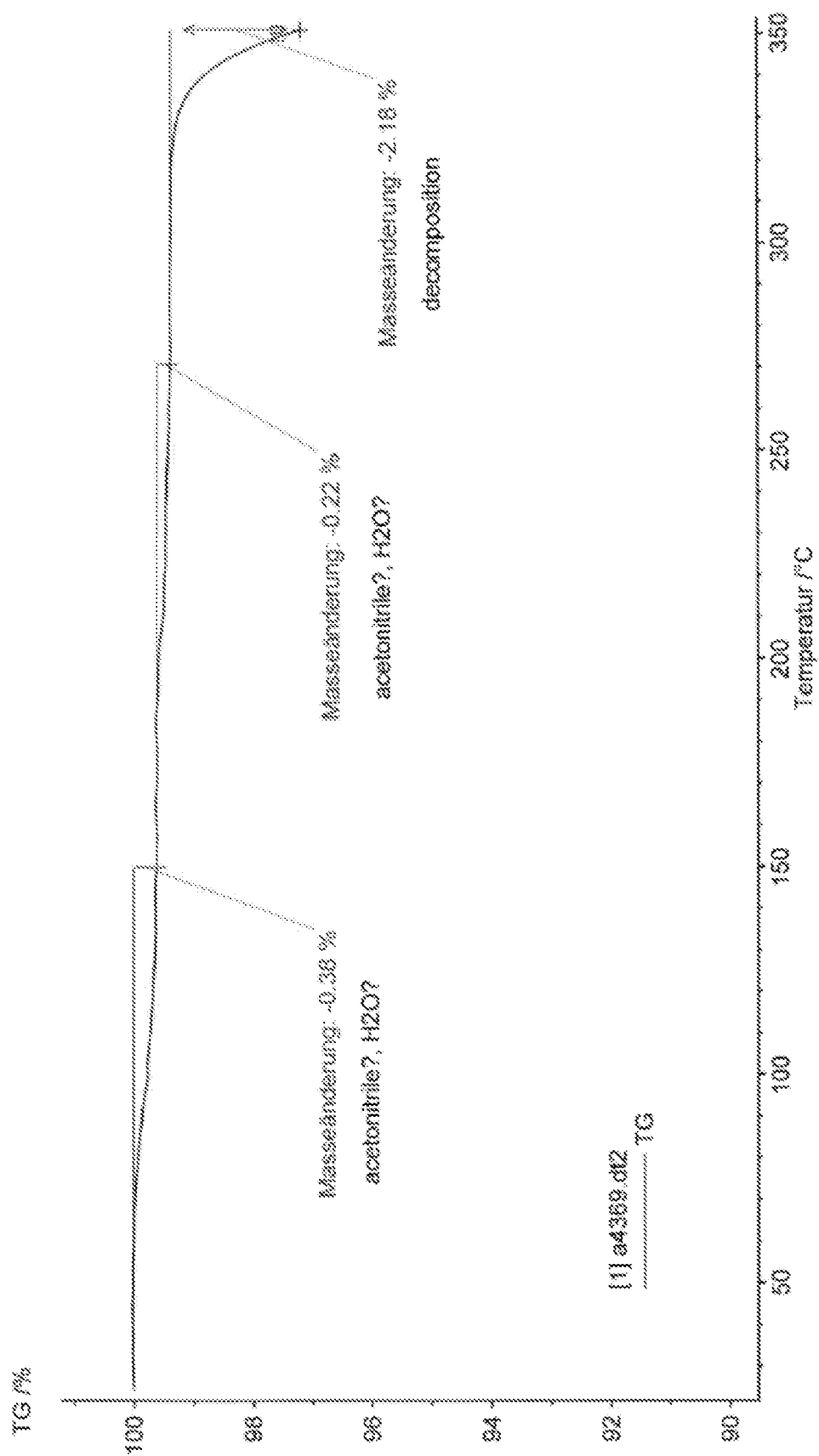


FIG. 112

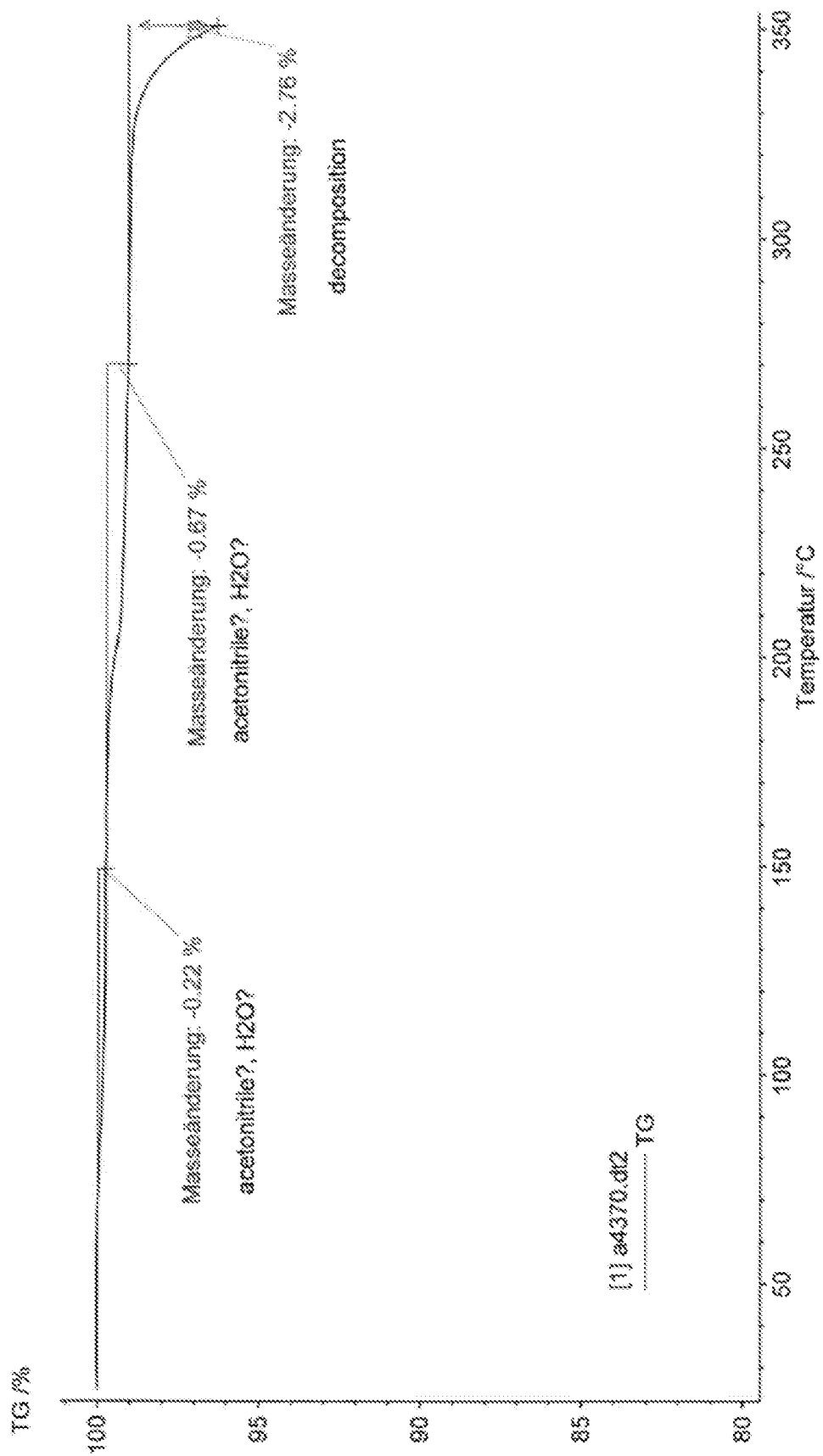


FIG. 113

polyo Monteb

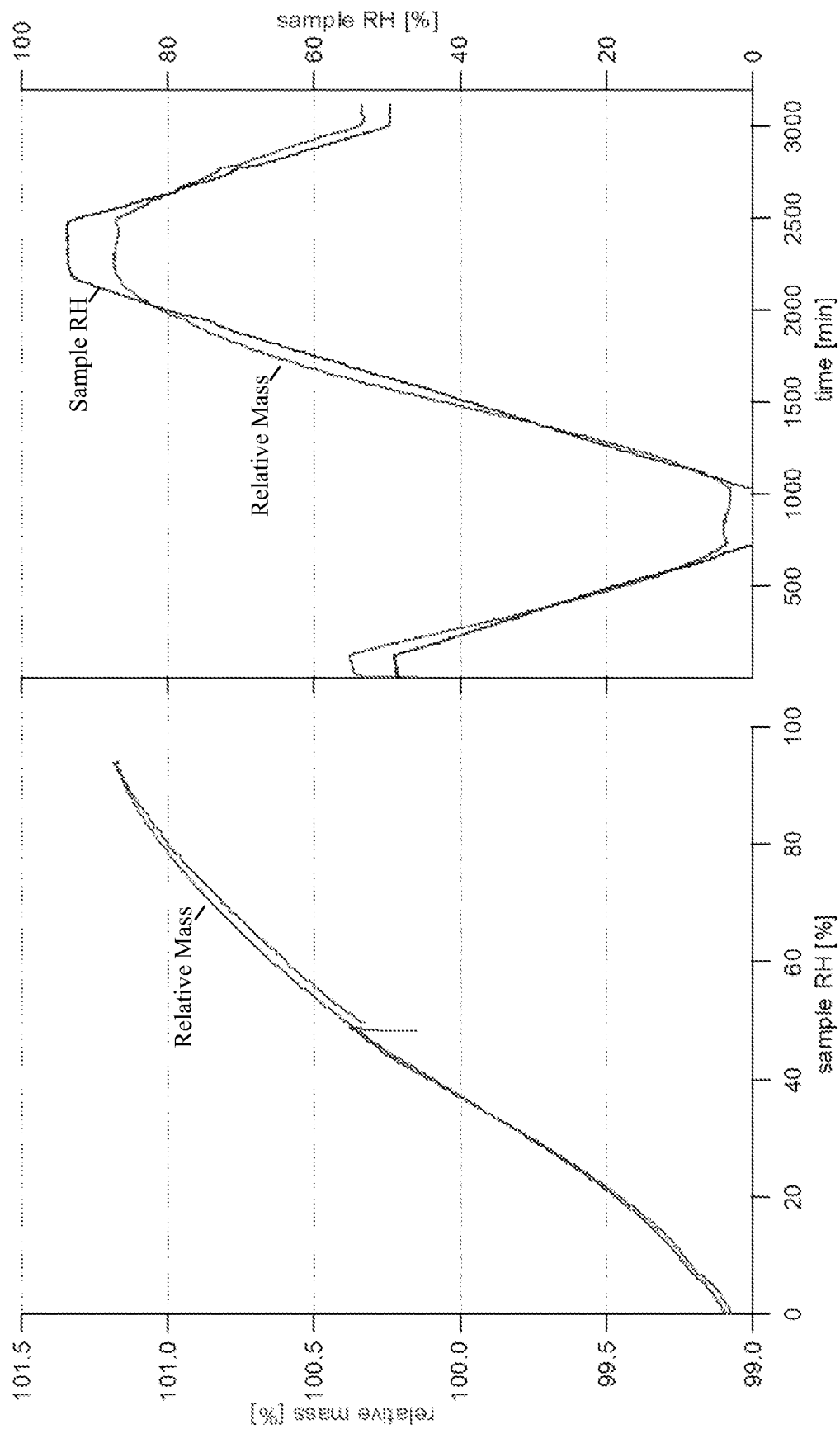


FIG. 114

Polyo Montech

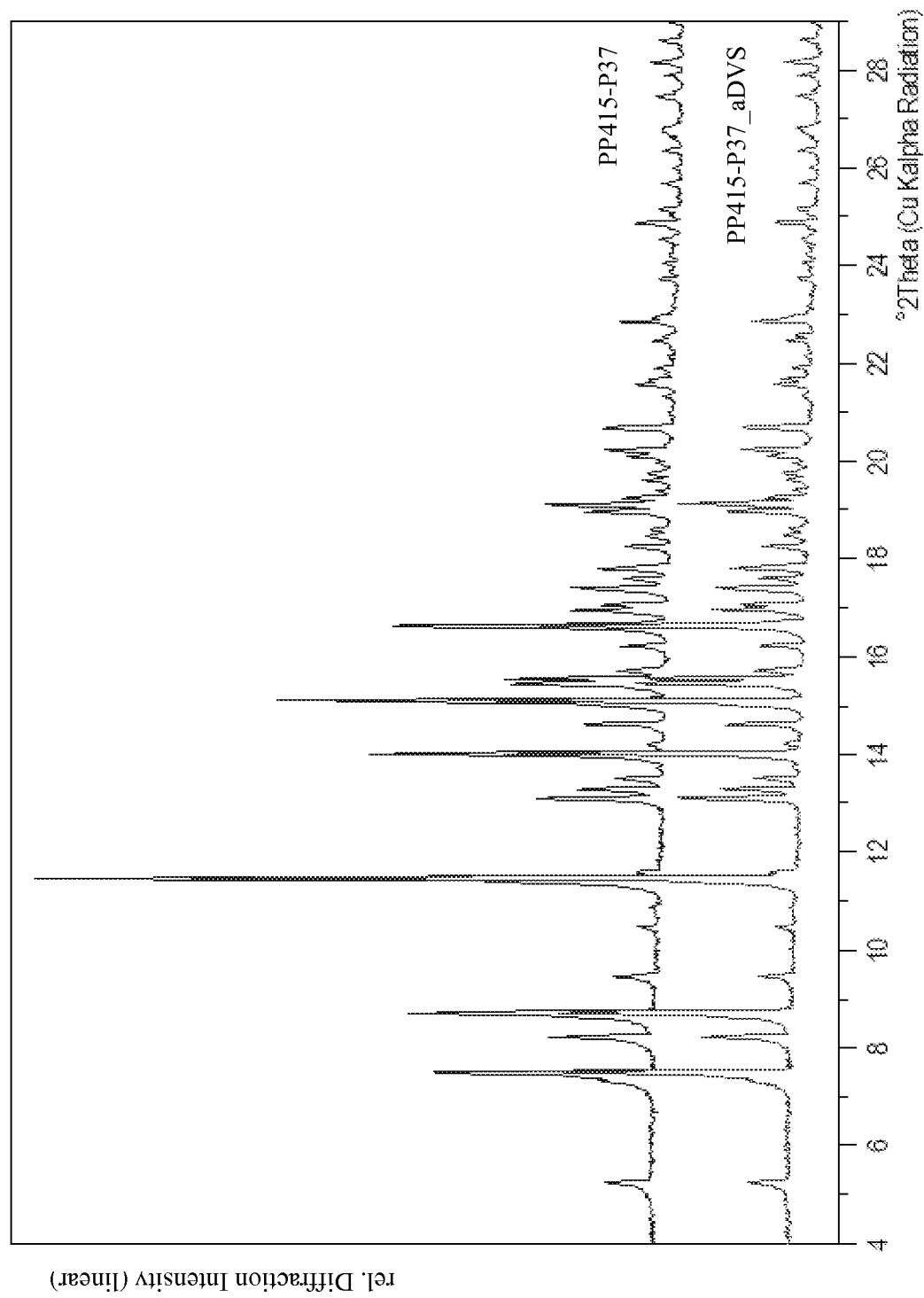


FIG. 115

polyo Montel

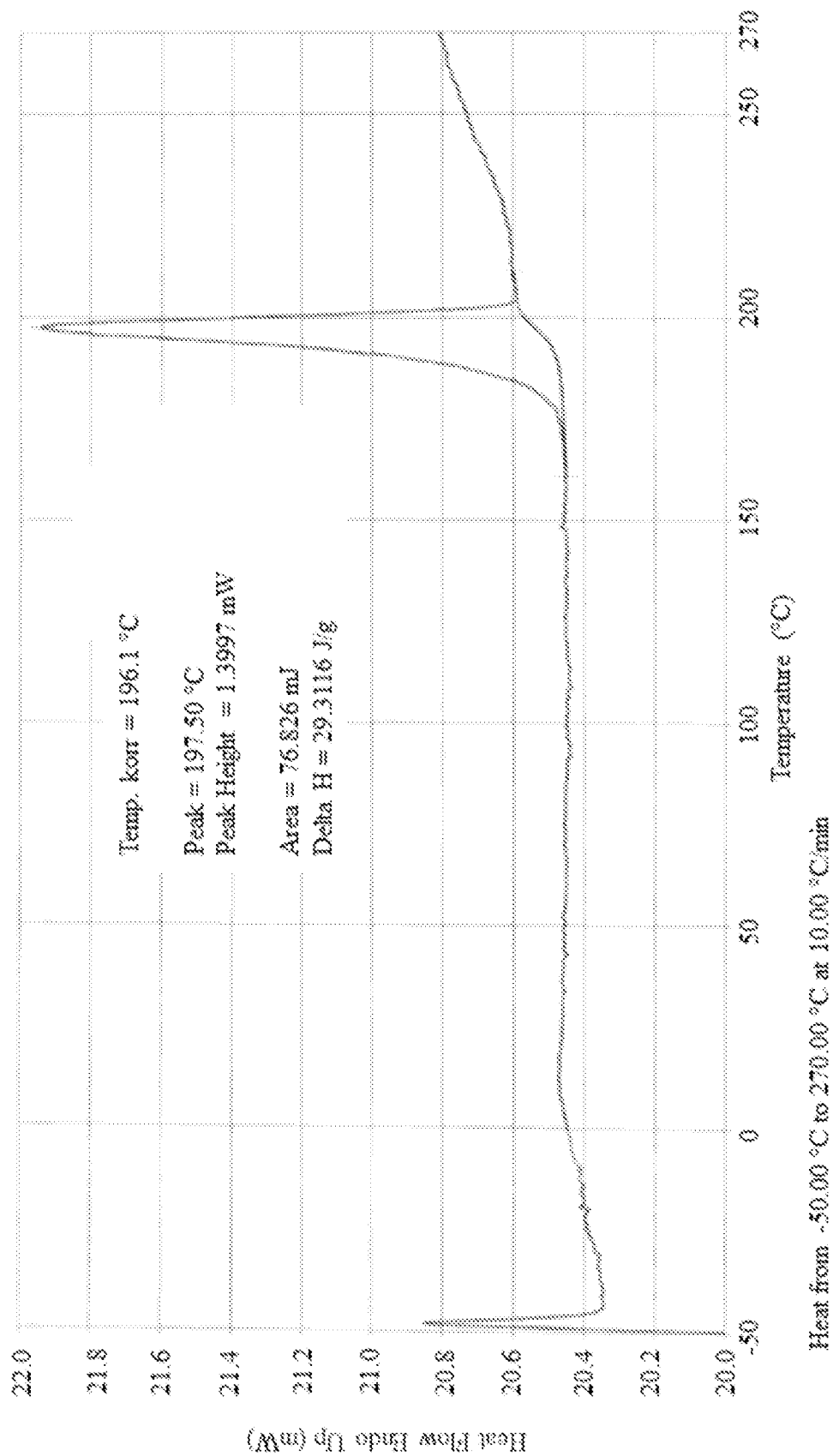


FIG. 116

Philip Montel

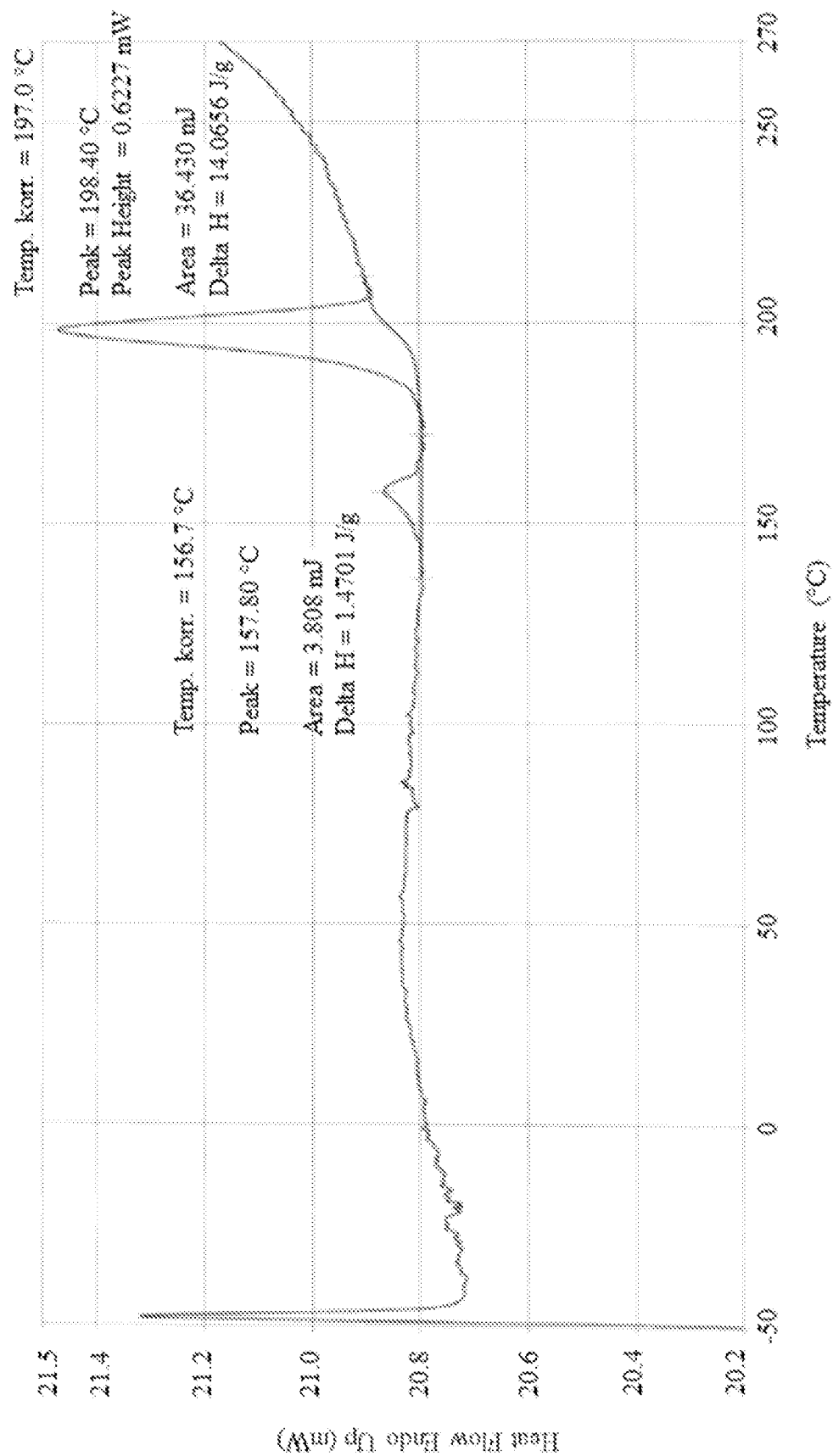
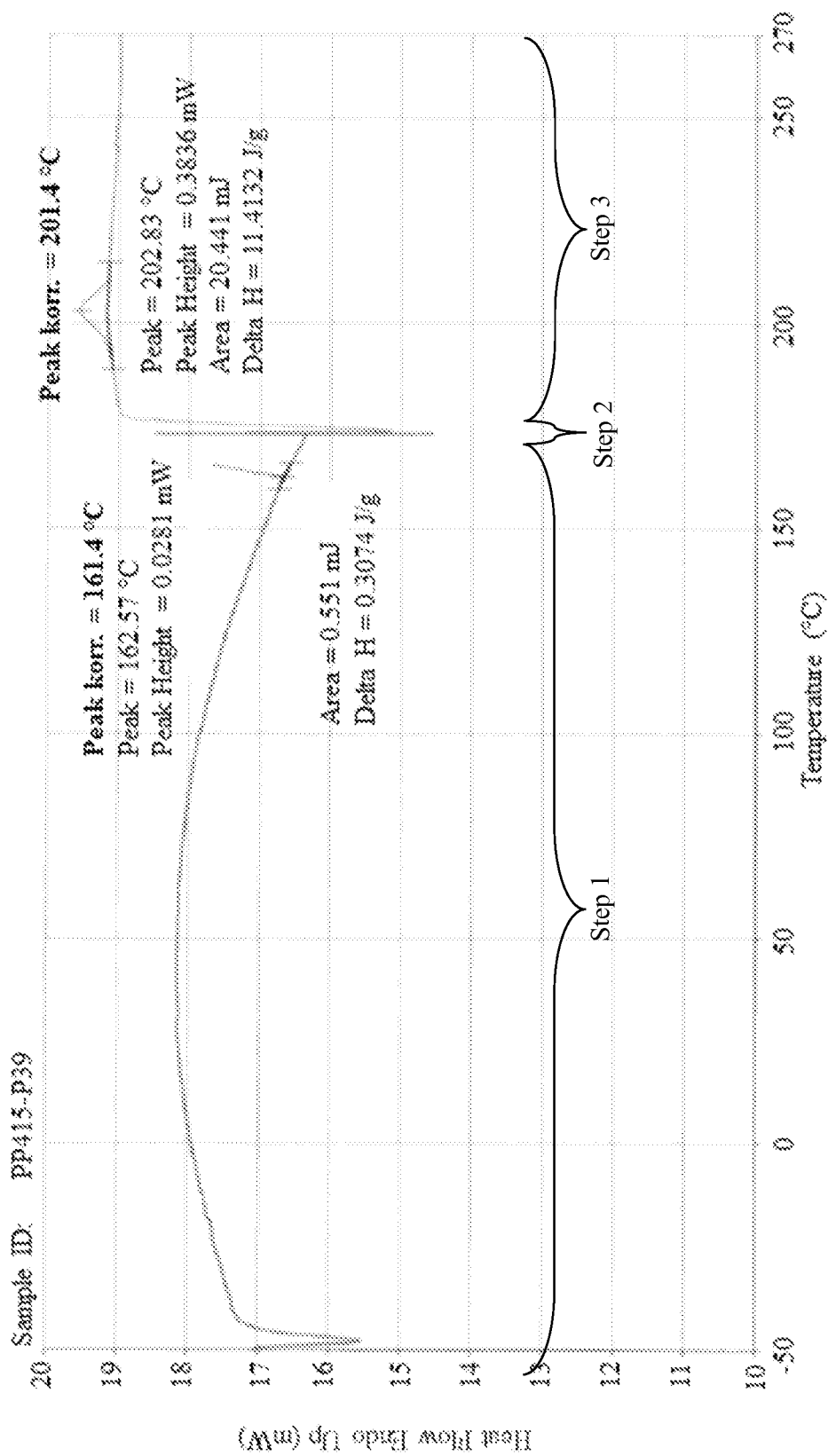


FIG. 117

Polymo Montchi



- 1) Heat from -50.00 °C to 173.00 °C at 10.00 °C/min
- 2) Hold for 30.0 min at 173.00 °C
- 3) Heat from 173.00 °C to 270.00 °C at 10.00 °C/min

FIG. 118

Polymo Montech

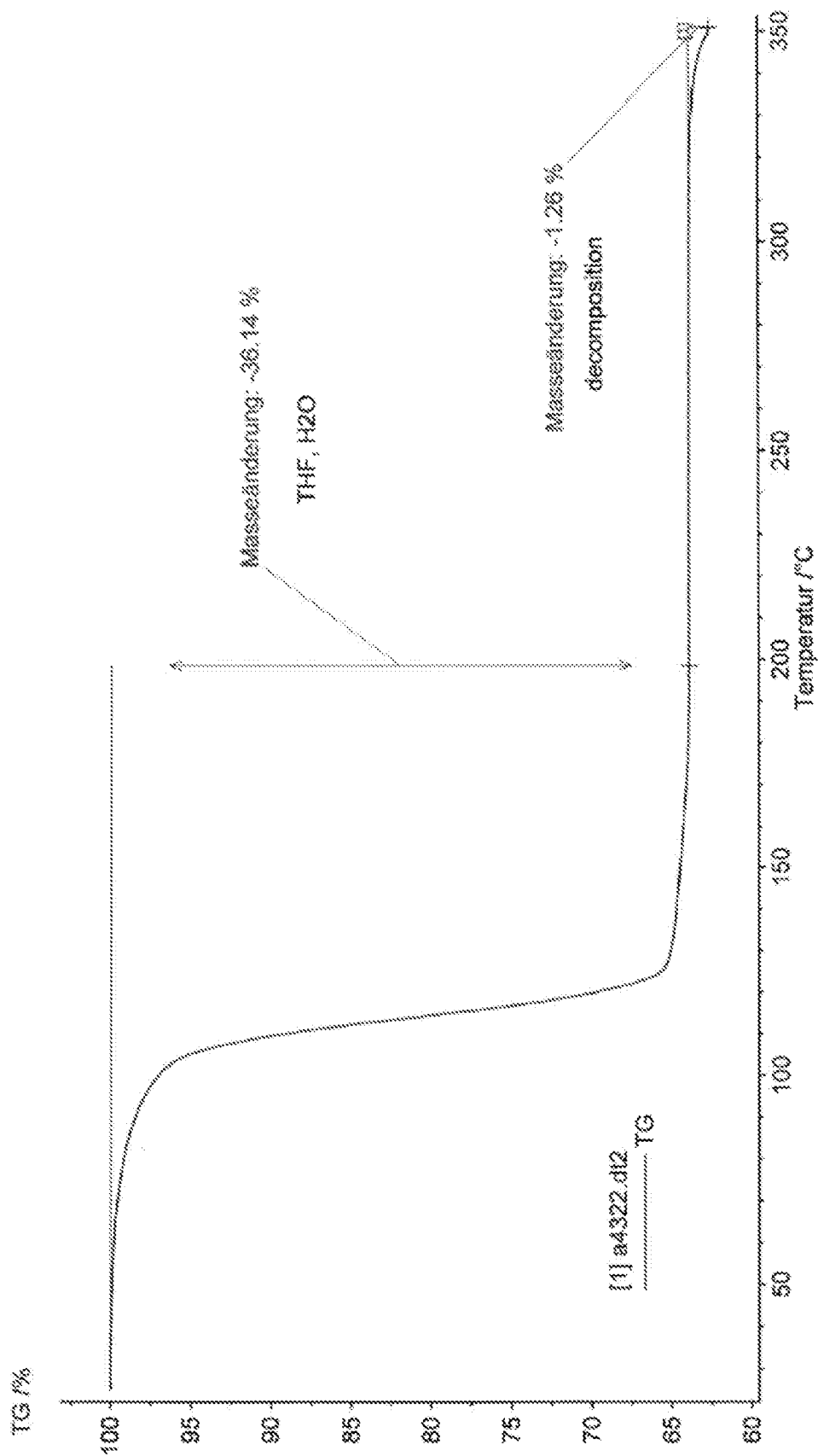


FIG. 119

polyo Montel

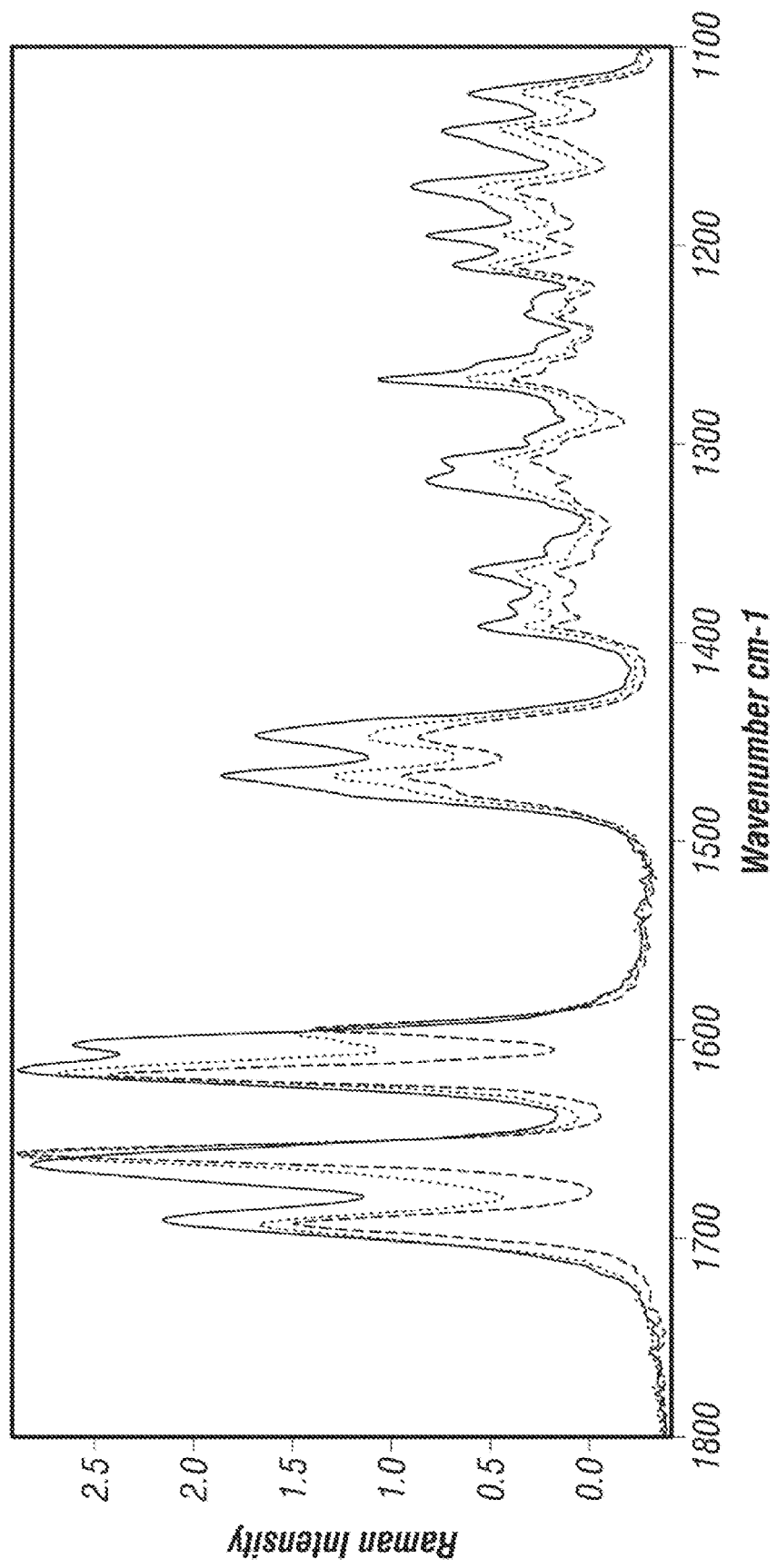


FIG. 120

polyo Montech

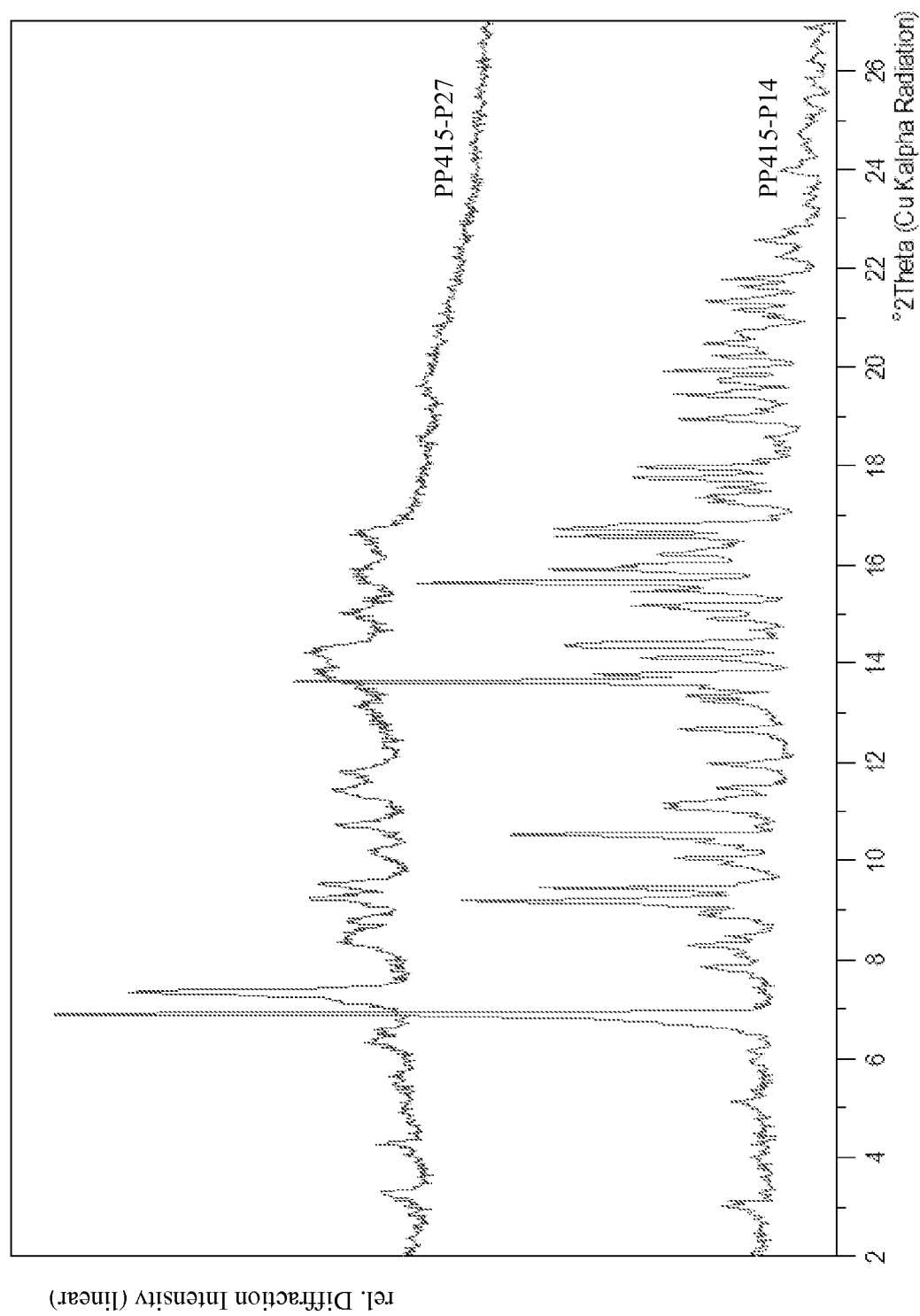


FIG. 121

Ally Montel

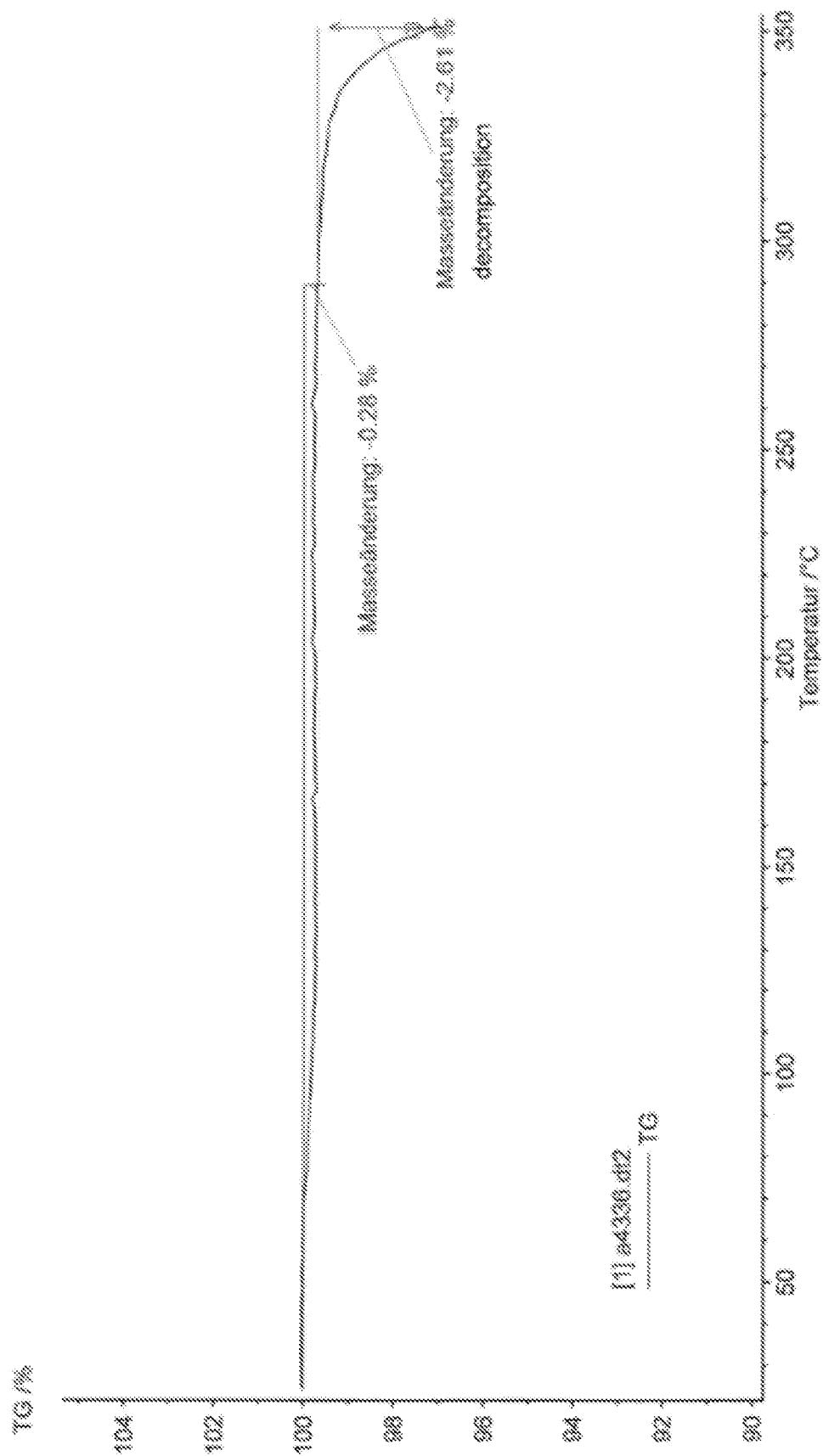


FIG. 122

Philippe Montebelli

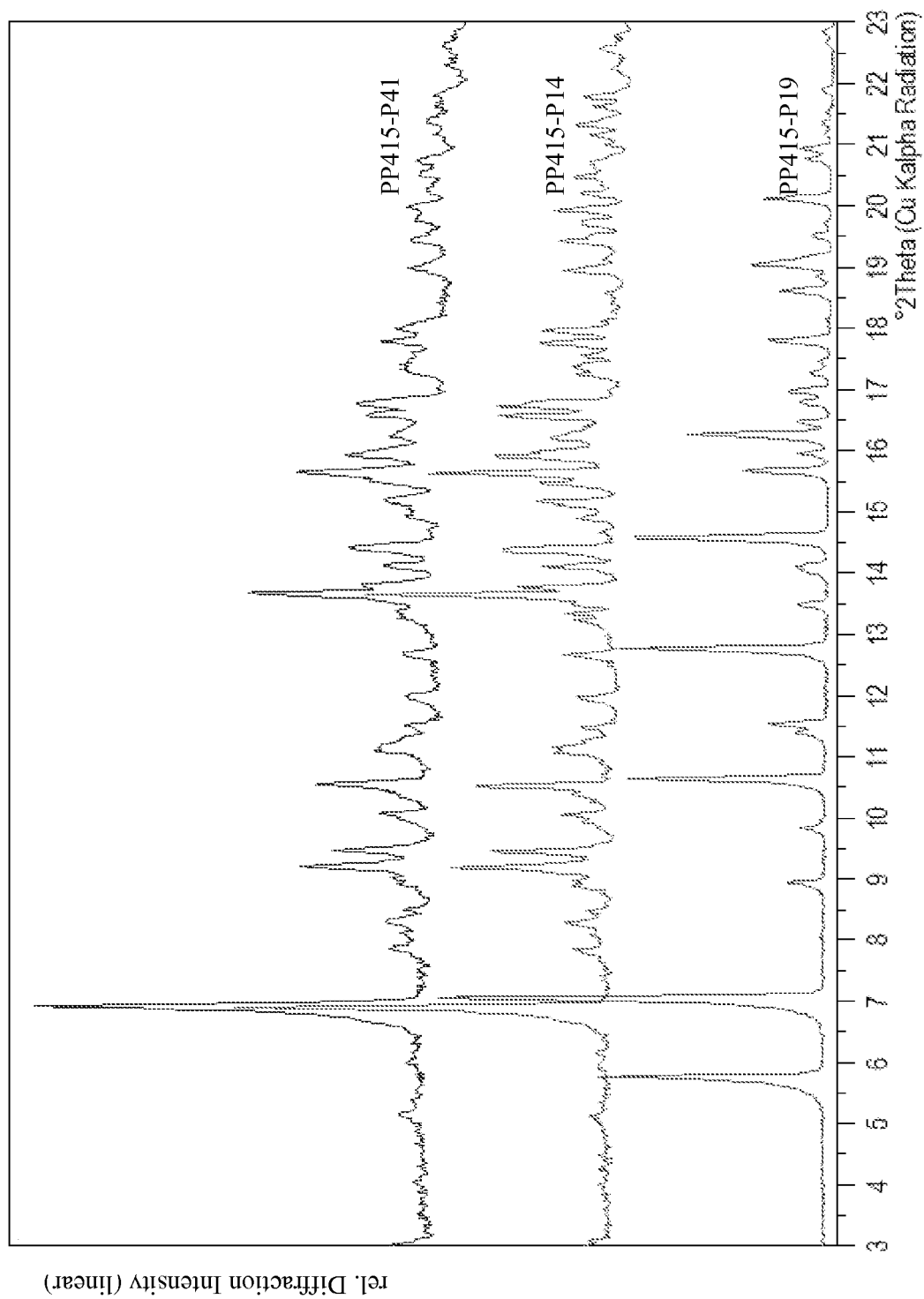


FIG. 123

poly Montech

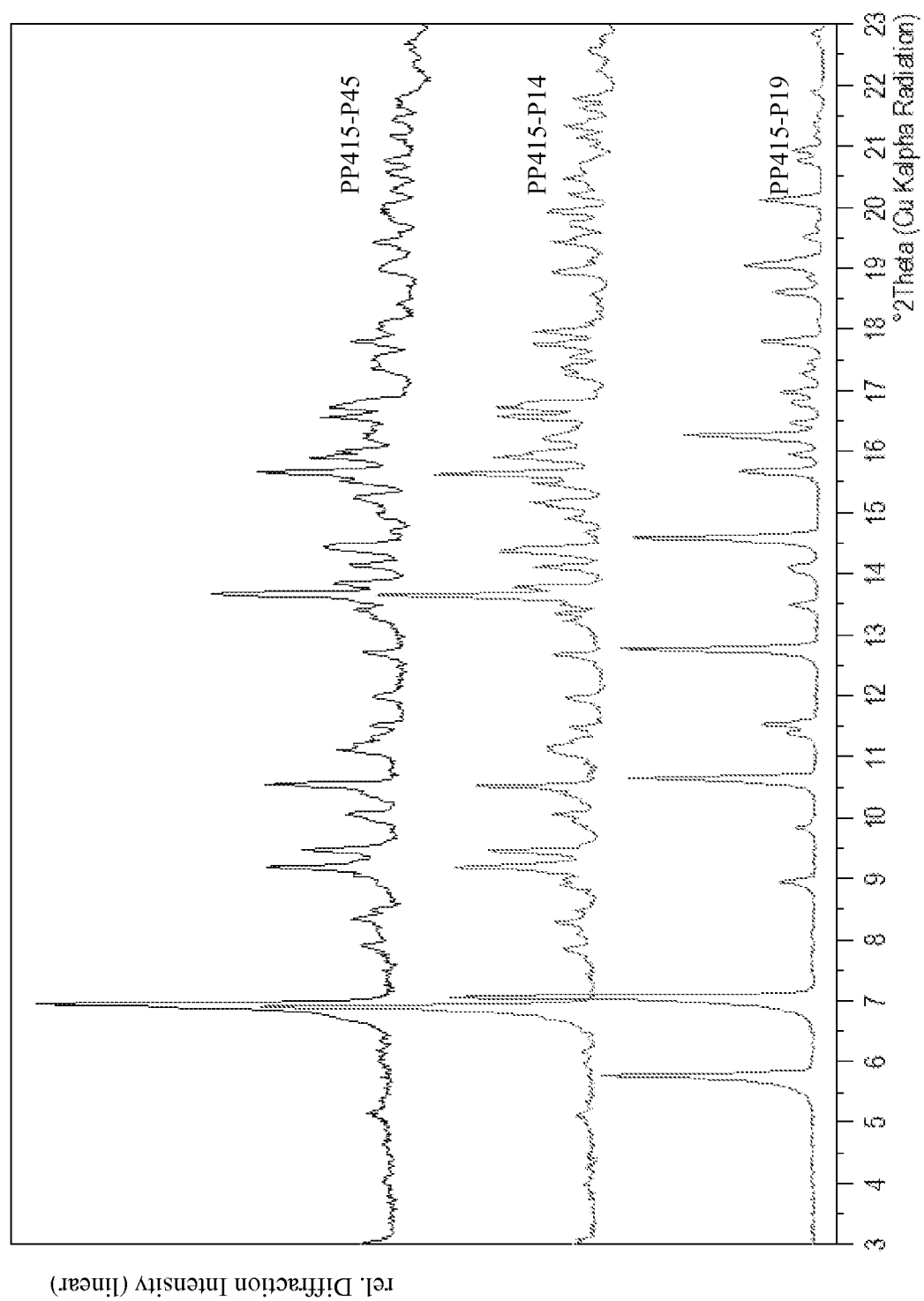


FIG. 124

polya Montel

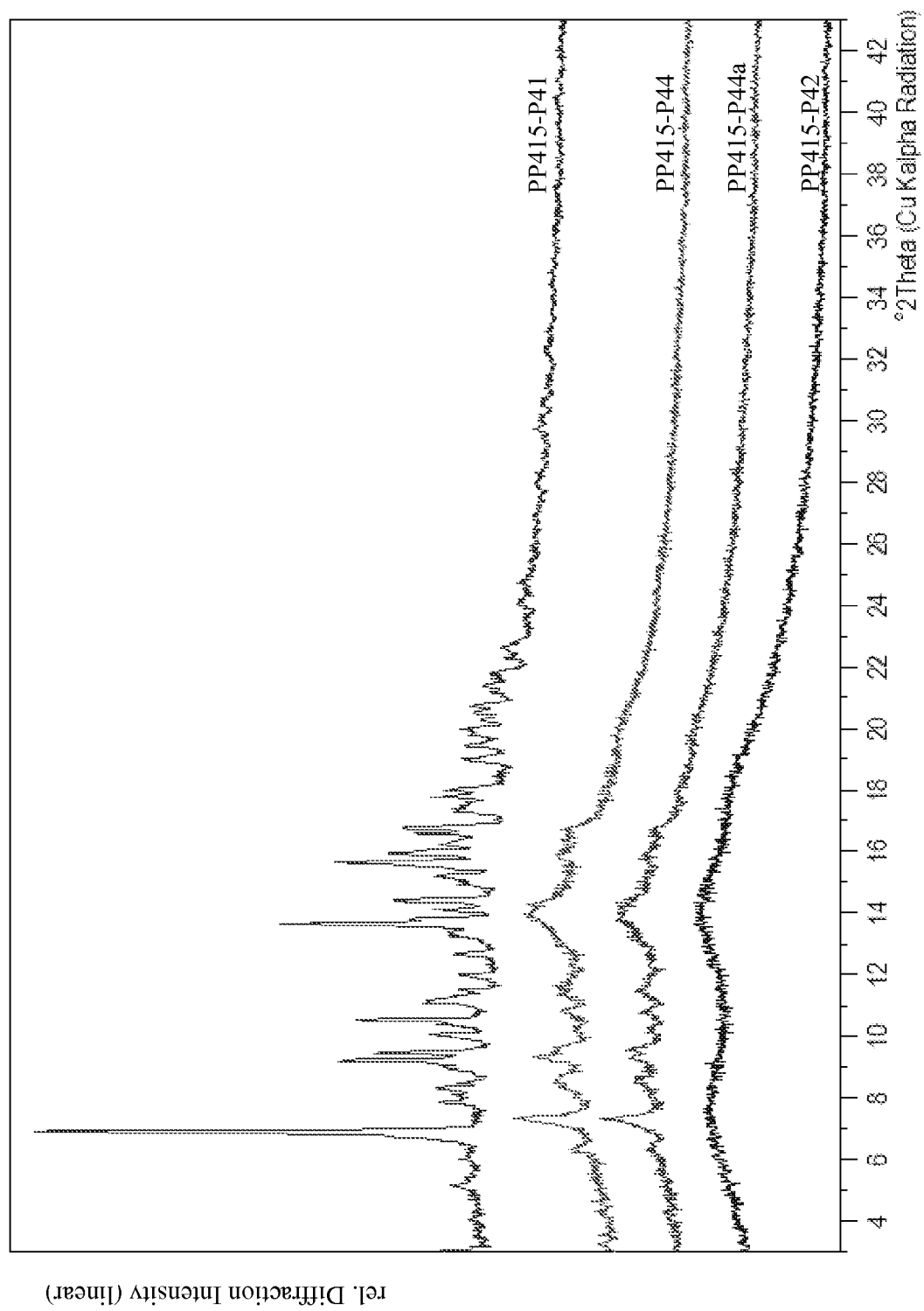


FIG. 125

Polym. Monte

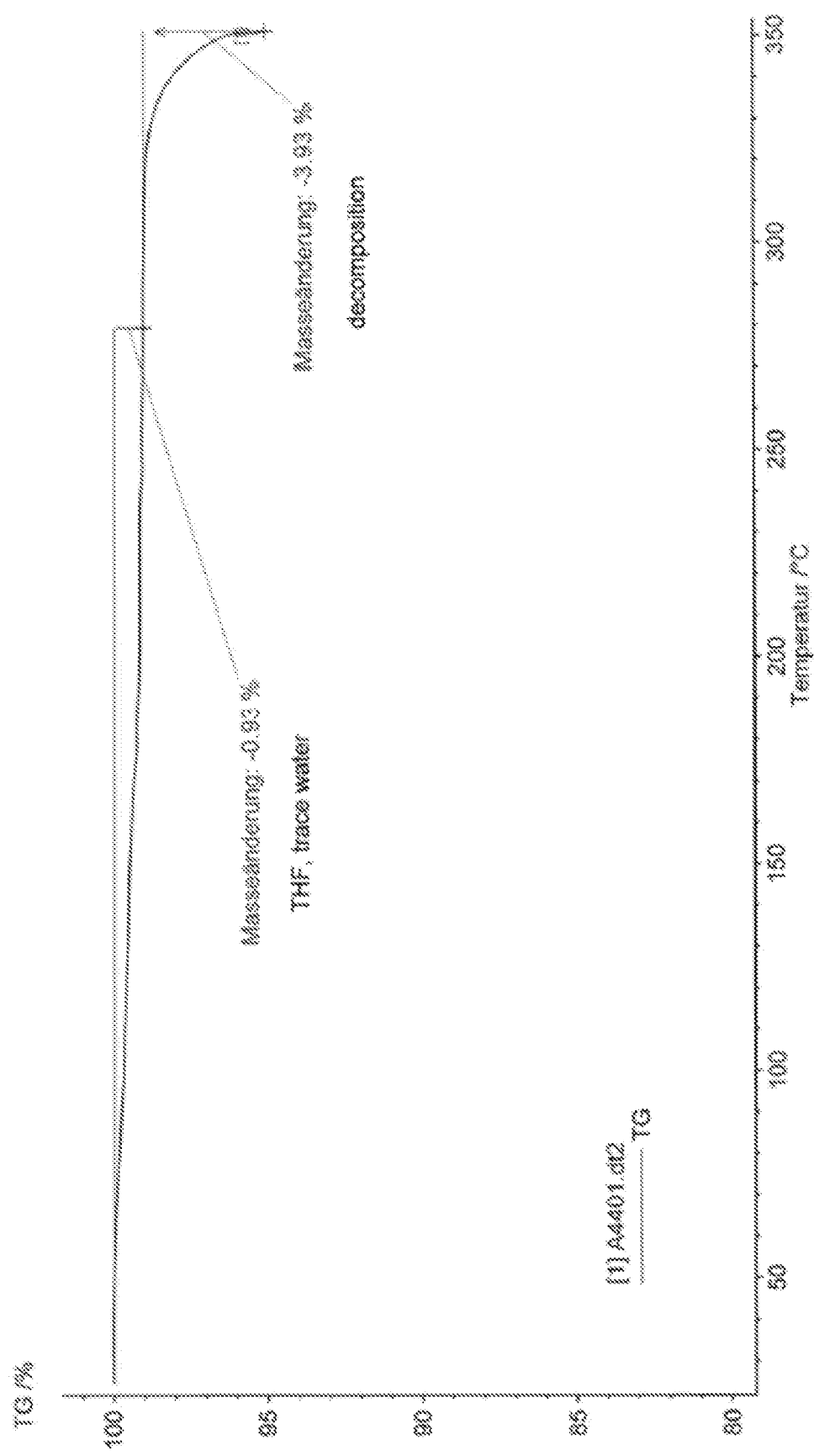


FIG. 126

polyo Montech

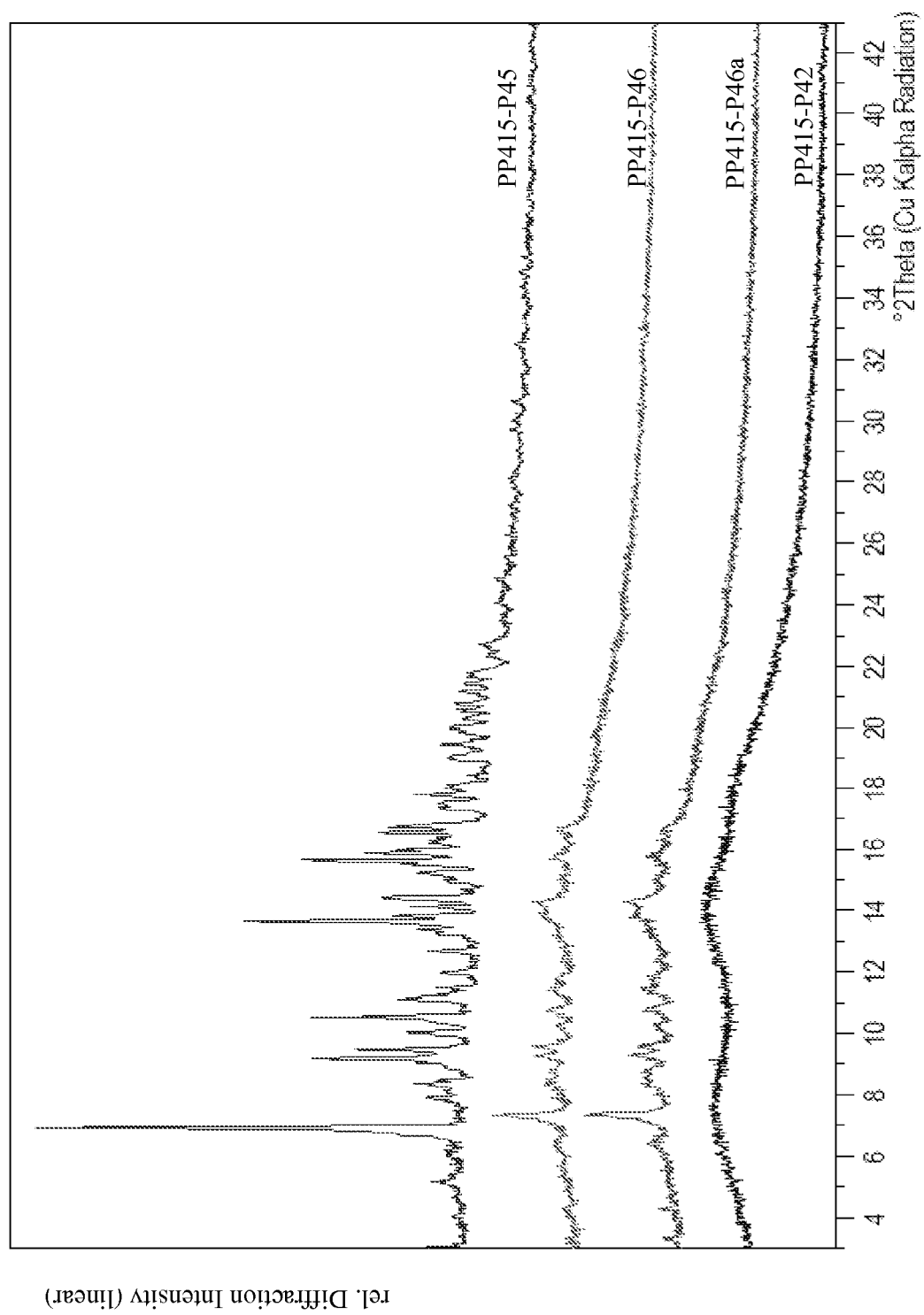


FIG. 127

Polym. Montch

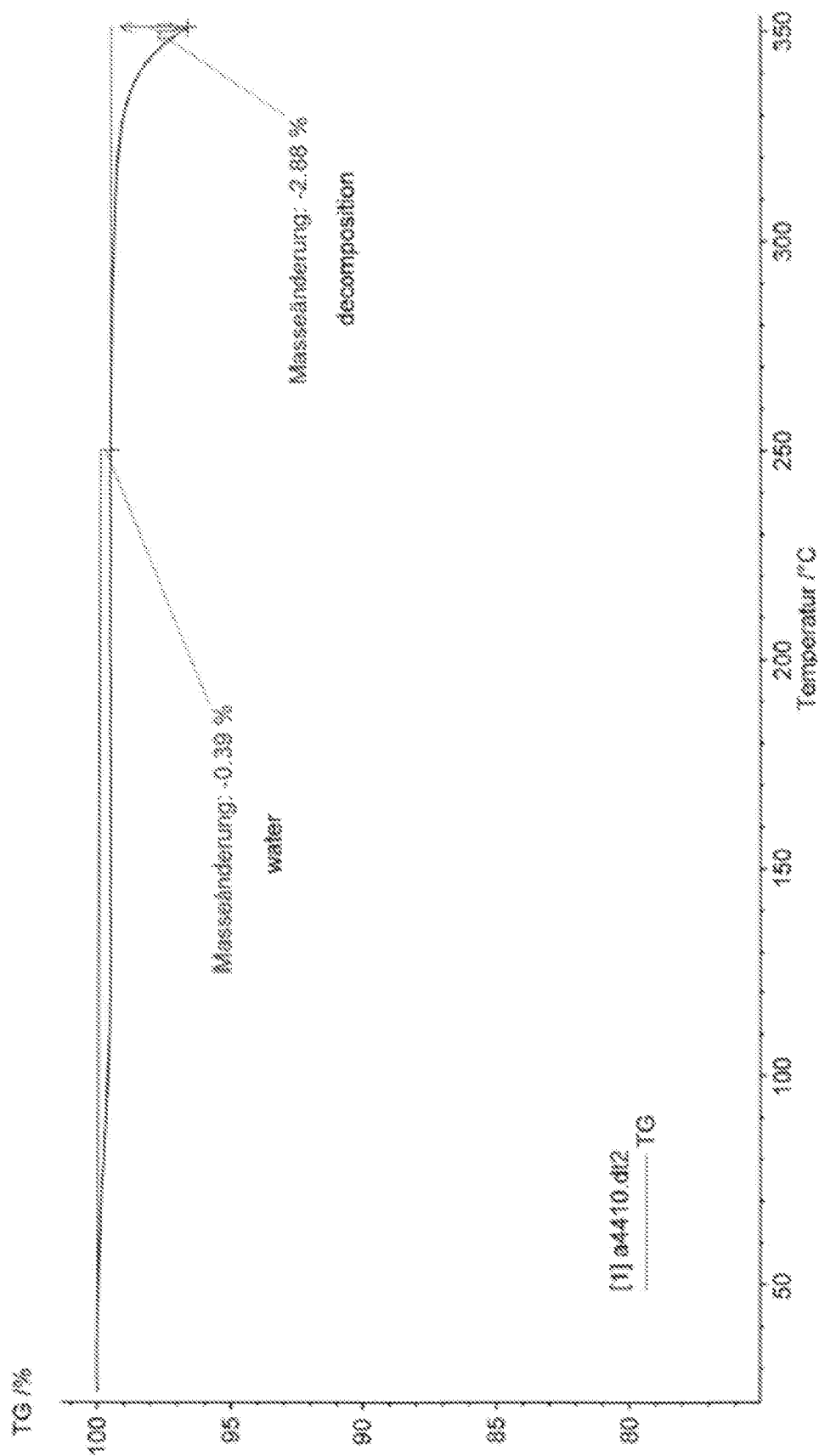


FIG. 128

Polygo Montech

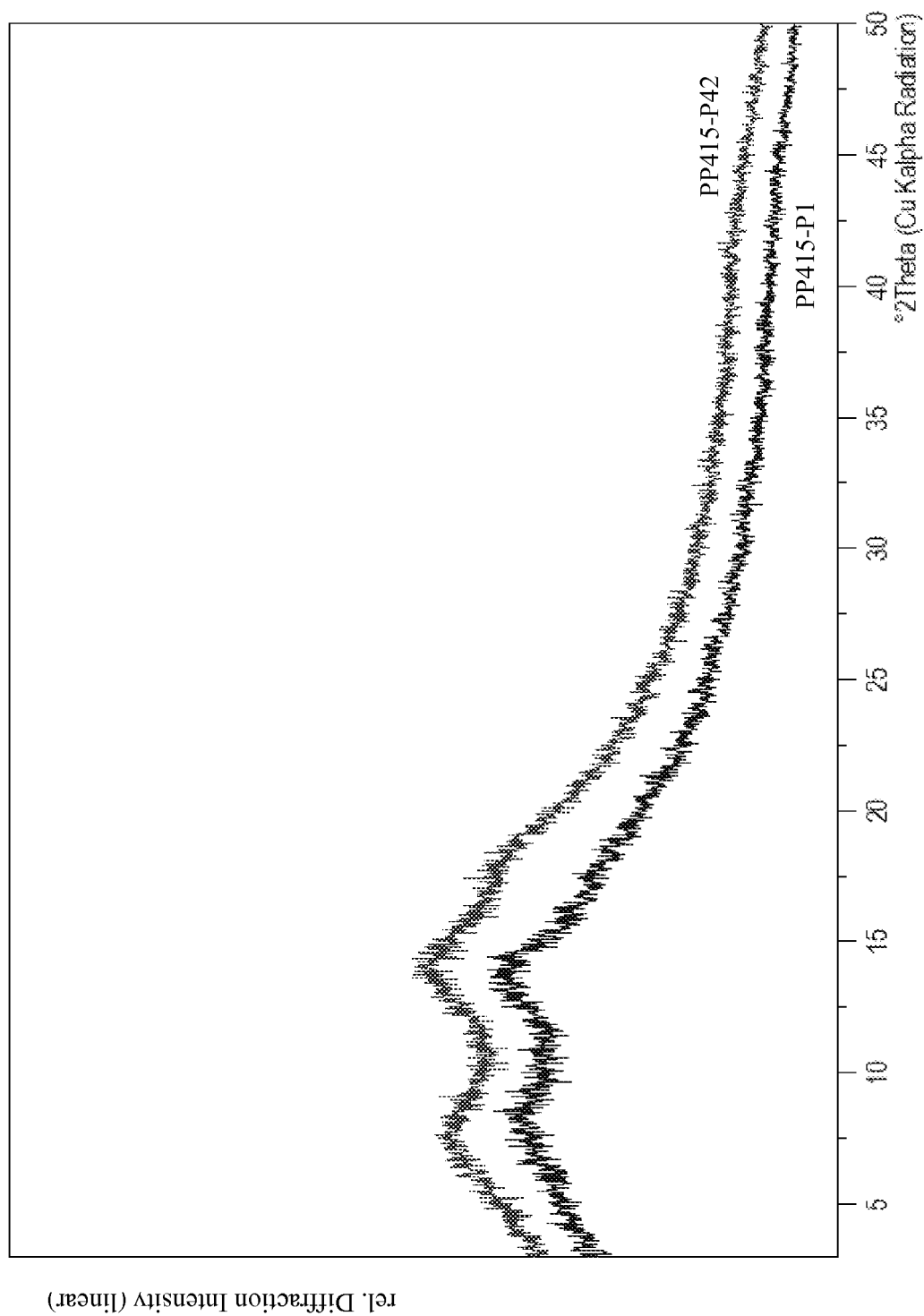


FIG. 129

poly Montch

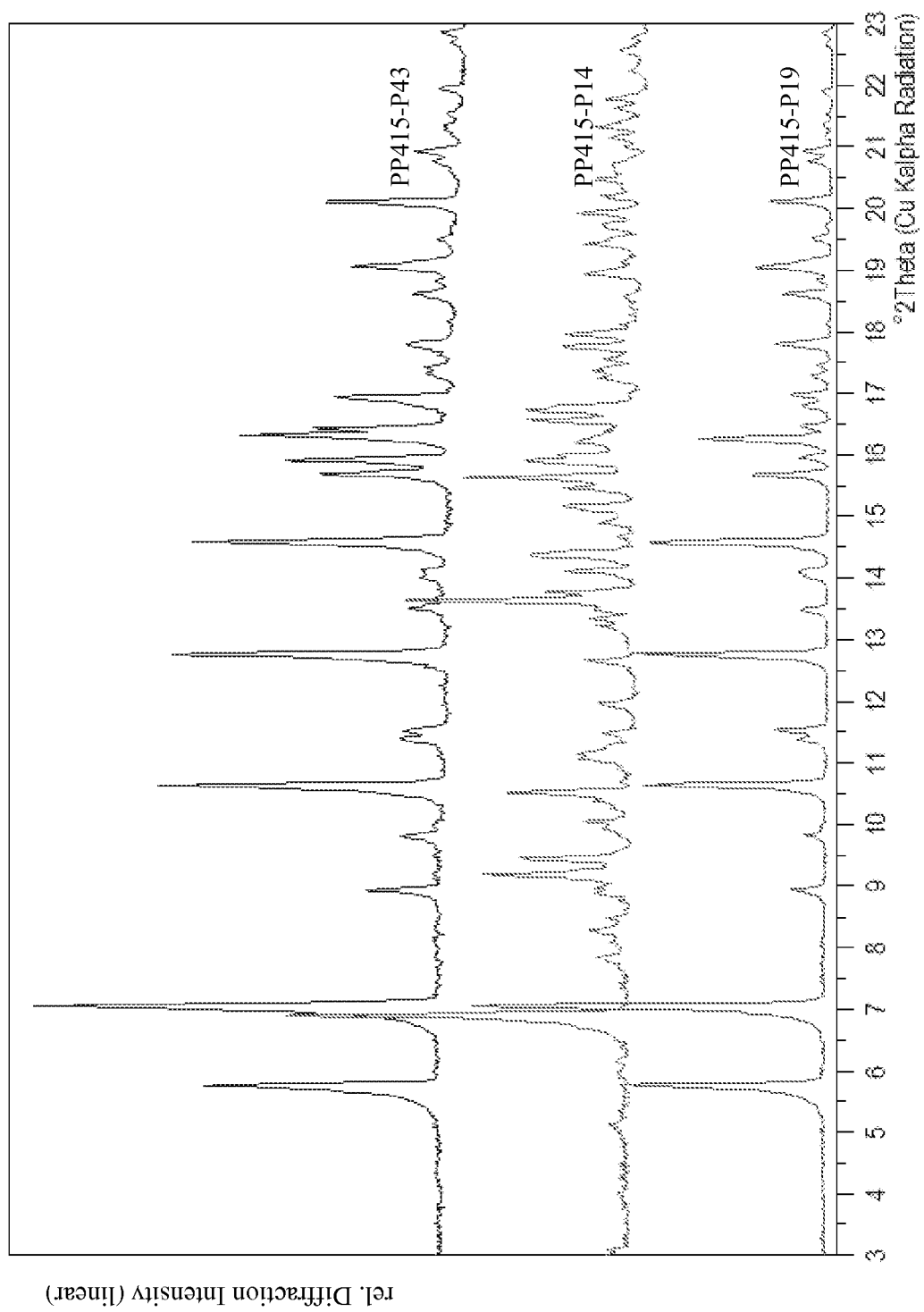


FIG. 130

Myo Montel

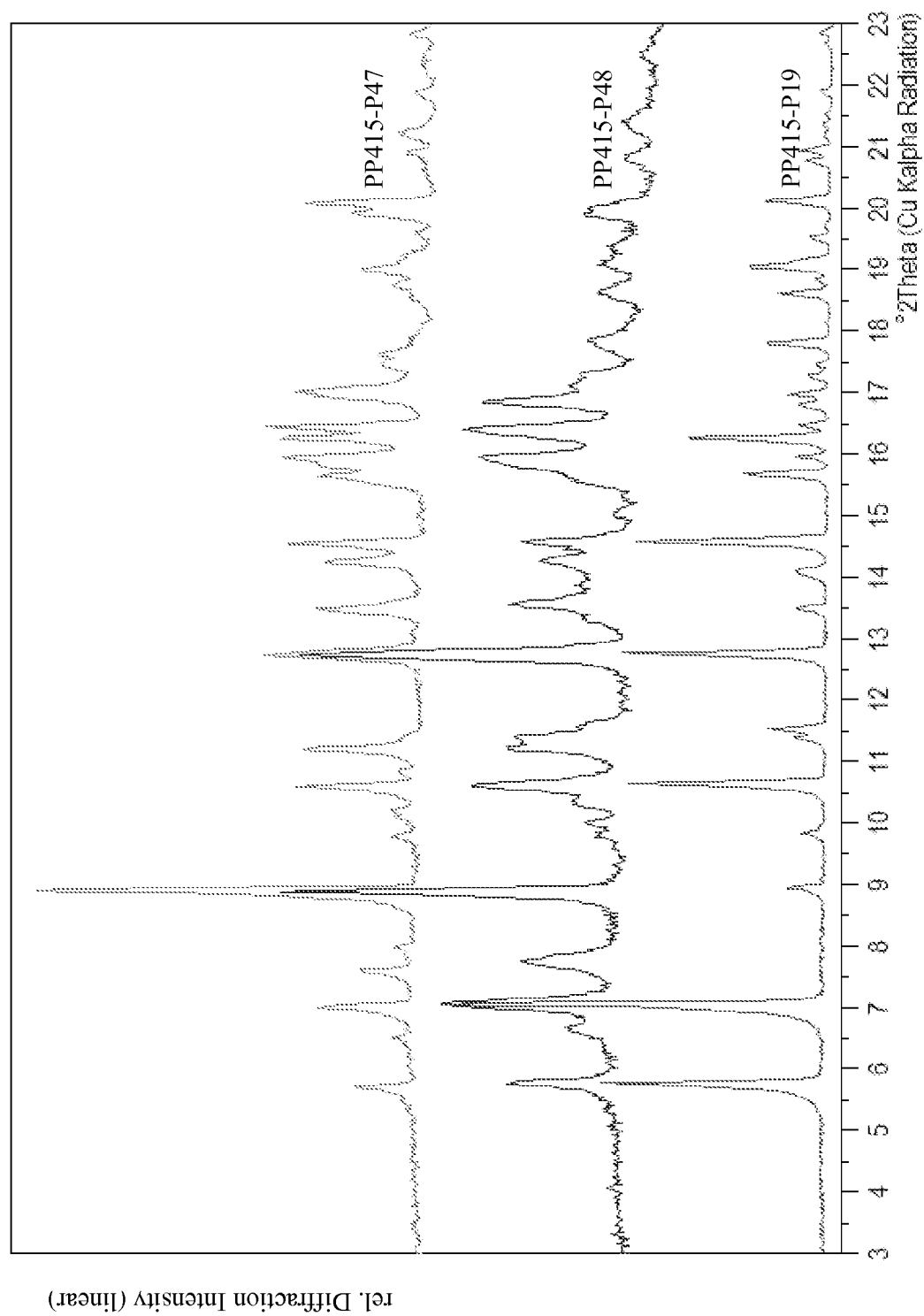


FIG. 131

Ally Montel

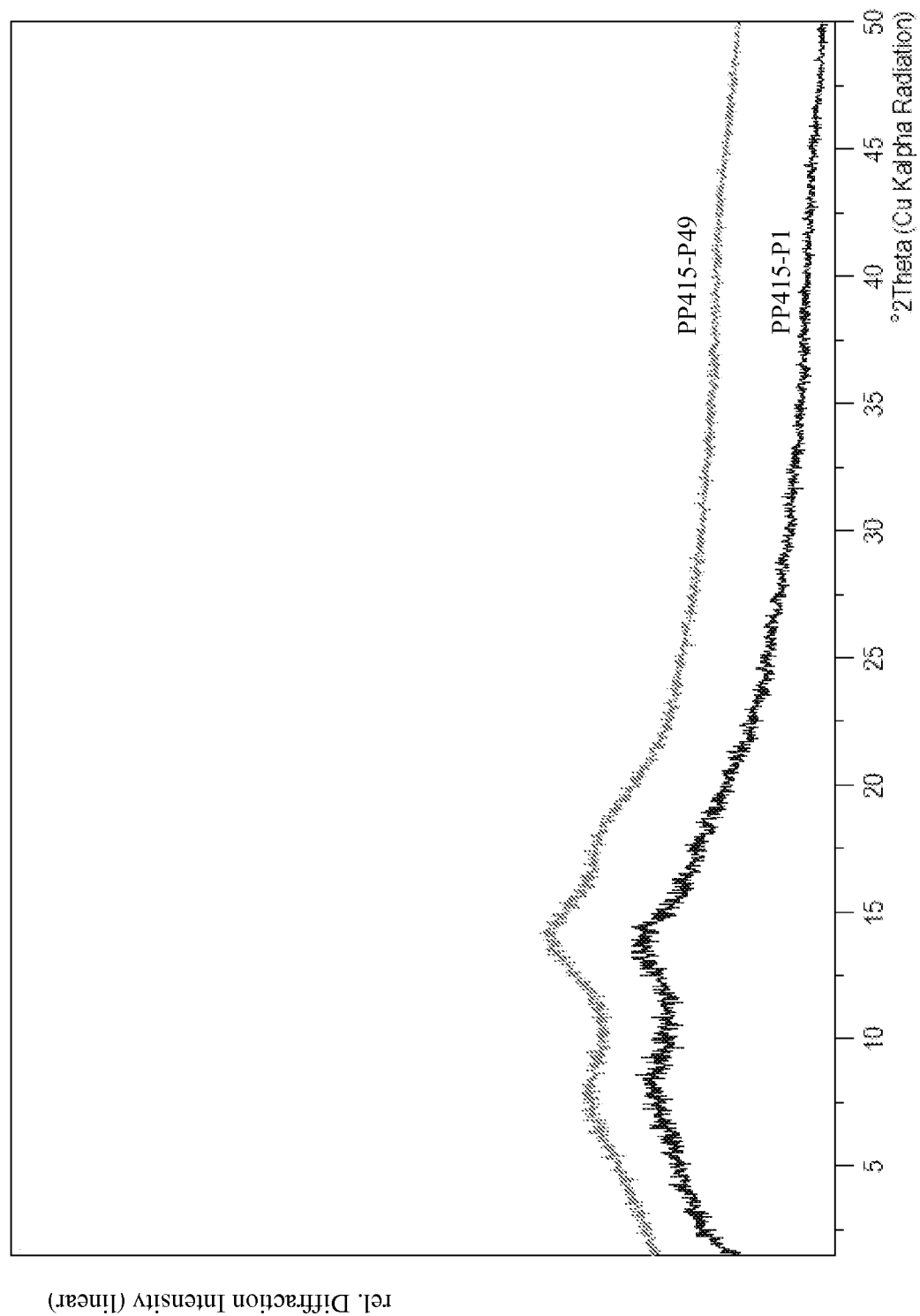


FIG. 132

Prilypa Montech

TRADUZIONE DELLE FIGURE

FIGURE 2(a) e (b)

Luciferase Activity = Attività di luciferasi

FIGURE 3(a) / (f)

5 Relative ARE Fold = Cambiamento relativo di ARE

Percent Viability = Percento Vitalità

FIGURE 4 a-d e 5 a-d

Fold Induction = Fattore moltiplicativo di induzione

FIGURE 6(a) e (b)

10 Cells = Cellule

β -actin = β -actina

FIGURA 7

Relative fold-change = Cambiamento relativo

FIGURA 8

15 Fold Induction of Total Glutathione = Fattore moltiplicativo di glutathione totale

FIGURA 9

Normalized WST1 Values = Valori di WST1 normalizzati

Expt. = Esperimento

FIGURE 10(a) - (d), 11(a) e (b), 13(a) e (b), 15(a) - (d)

20 Relative Fold Change = Cambiamento relativo

FIGURA 12

Percent of TNF α -Induced Activity = Percento di attività TNF α -indotta

FIGURA 16

Intracellular Pyruvate = Piruvato intracellulare

25 FIGURA 17

Philippe Monteleone

PRL078ESM

% Change in Pro-inflammatory Cytokines Relative to LPS Treatment = % di variazione nelle citochine pro-infiammatorie rispetto al trattamento LPS

FIGURE 18(a) e (b)

Protein Expression (Fold PBS-Vehicle Control) = Espressione delle proteine (Fattore moltiplicativo PBS-Veicolo di controllo)

Vehicle Control = Controllo del veicolo

FIGURA 18(a)

Inflammatory Cytokines = Citochine infiammatorie

FIGURA 18(b)

10 Nrf2 Targets = Bersagli Nrf2

Activity = Attività

FIGURA 19(a)

Bal fluid cell count = Conteggio delle cellule fluide BAL

Vehicle = Veicolo

15 Cell Count = Conteggio cellulare

White Blood Cells = Leucociti

FIGURA 19(b)

Body Weight = Peso corporeo

Vehicle = Veicolo

20 Day = Giorno

FIGURE 20(a) e (b)

Saline = Soluzione salina

Bleomycin = Bleomicina

FIGURA 20(b)

25 Hydroxyproline = Idrossiprolina

Polypio Montebello

PRL078ESM

($\mu\text{g/ml}$ lung tissue)

($\mu\text{g/ml}$ di tessuto di polmone)

FIGURA 21

Saline Control = Controllo con soluzione salina

5 Bleomycin = Bleomicina

Fold Saline Control = Numero dei controlli con soluzione salina

FIGURE 22(a)-(e)

Air Control = Controllo dell'aria

Low Dose = Dose bassa

10 Mild Dose = Dose media

High Dose = Dose elevata

FIGURA 23

Fold Vehicle-Air Control = Volte di controllo veicolo-aria

Vehicle-Air = Veicolo-Aria

15 Vehicle = Veicolo

FIGURE 24(a)-(b)

Systemic LPS = LPS sistemico

Body Weight = Peso corporeo

Vehicle = Veicolo

20 FIGURE 24(c)-(d)

Sysemic LPS = LPS sistemico

Survival = Sopravvivenza

Percent survival = Percentuale di sopravvivenza

Vehicle = Veicolo

25 Day = Giorno

Philip Montebello

PRL078ESM

FIGURA 25

% Reduction of Days with Scores ≥ 3 Relative to Vehicle = % di riduzione dei giorni con punteggi ≥ 3 rispetto al veicolo

FIGURE 26, 27(a) e (b), 28(a) e (b)

5 Fold Vehicle Control = Volte di controllo del veicolo

Vehicle = Veicolo

FIGURE 27(a)

Target Genes = Geni in bersaglio

FIGURA 27(b)

10 Negative Regulators = Regolatori negativi

Batch = Lotto

FIGURA 28(a)

Liver = Fegato

FIGURA 28(b)

15 Lung = Polmone

FIGURE 29(a) e (b), 30(a) e (b),

Fold Vehicle Control = Volte di controllo del veicolo

Activity = Attività

Vehicle = Veicolo

20 FIGURE 31(a) e (b)

Fold Vehicle Control = Volte di controllo del veicolo

Activity = Attività

Vehicle = Veicolo

Liver = Fegato

25 Lung = Polmone

Philippe Montch

PRL078ESM

Brain = Cervello

FIGURA 32(a)

RTA 408 Content = Contenuto di RTA 408

(ng/G Tissue) = (ng/g di tessuto)

5 Liver = Fegato

Lung = Polmone

Brain = Cervello

FIGURA 32(b)

Nqo1 Enzyme Activity (Fold Control) = Attività enzimatica Nqo1 (Volte del controllo)

10 Vehicle = Veicolo

RTA 408 Liver content = Contenuto di RTA 408 nel fegato

(ng/g Liver) = (ng/g di fegato)

FIGURA 33(a)

RTA 408 Content = Contenuto di RTA 408

15 (ng/g Tissue) = (ng/g di tessuto)

Liver = Fegato

Lung = Polmone

Brain = Cervello

FIGURA 33(b)

20 Nqo1 Enzyme Activity (Fold Control) = Attività enzimatica Nqo1 (Volte del controllo)

Vehicle = Veicolo

RTA 408 Liver content = Contenuto di RTA 408 nel fegato

(ng/g Liver) = (ng/g di fegato)

FIGURA 34(a)

25 NQO1 mRNA Expression (Fold Control) = Espressione di mRNA di NQO1 (Volte del control-

Stefano Montebelli

PRL078ESM

lo)

PMBC NQ01 vs Plasma Concentration = PMBC NQ01 rispetto alla concentrazione plasmatica

Plasma conc. = Conc. plasmatica

5 FIGURA 34(b)

Lung NQ01 Enzyme Activity (Fold Control) = Attività enzimatica NQ01 nel polmone (Volte del controllo)

Lung NQ01 vs PMBC NQ01 = NQ01 vs PMBC NQ01 nel polmone

PMBC NQ01 mRNA Expression (Fold Control) = Espressione di mRNA di NQ01 PBMC

10 (Volte del controllo)

FIGURA 35

Control = Controllo

Day = Giorno

Body Weight = Peso corporeo

15 FIGURA 36

RTA 408 concentration = Concentrazione di RTA 408

Rat Oral = Ratto orale

Rabbi Ocular = Coniglio oculare

Time (hr) = Tempo (h)

20 FIGURA 37(a)

NQ01 mRNA Expression (Fold Vehicle Control) = Espressione di mRNA di NQ01 (Volte di controllo del veicolo)

Vehicle = Veicolo

Plasma RTA 408 Conc. = Concentrazione di RTA 408 nel plasma

25 FIGURA 37(b)

Prilgo Monteb

PRL078ESM

SRXN1 mRNA Expression (Fold Control) = Espressione di mRNA di SRXN1 (Volte di controllo)

Vehicle = Veicolo

Plasma RTA 408 Conc. = Concentrazione di RTA 408 nel plasma

5 FIGURA 38

Concentration = Concentrazione

Choroid = Corioide

Ciliary Body = Corpo ciliare

Vitreous Humor = Umore vitreo

10 Aqueous Humor = Umore acquoso

Time (hrs) = Tempo (ore)

FIGURA 39

Effect of RTA 408 on the Incidence of Grade 3 Dermatitis = Effetto di RTA 408 sull'incidenza della dermatite di grado 3

15 % of Animal/Days = % di Animale/Giorni

None = Nessuno

Vehicle = Veicolo

FIGURA 40

Effect of RTA 408 on the Incidence of Grade 2 Dermatitis through Day 30 = Effetto di RTA 408 sull'incidenza della dermatite di grado 2 al giorno 30

20

% of Animal/Days = % di Animale/Giorni

IR Only = Solo IR

IR + Veh = IR + veicolo

FIGURA 41

25 Effect of RTA 408 on the Incidence of Grade 3 Dermatitis up to Day 28 = Effetto di RTA 408

Philip Monteleone

PRL078ESM

sull'incidenza della dermatite di grado 3 al giorno 28

% of Animal/Days = % di Animale/Giorni

IR Only = Solo IR

IR + Veh = IR + veicolo

5 FIGURA 42(a)

$AUC_{0-30Days} (Days * Dermatitis\ Score) = AUC_{0-30giorni} (Punteggio\ Giorni * Dermatite)$

No Radiation = Assenza di radiazioni

Untreated = Non trattato

Irradiated = Irradiato

10 Sesame Oil = Olio di sesamo

FIGURA 42(b)

$AUC_{0-30Days} (Days * Dermatitis\ Score) = AUC_{0-300giorni} (Punteggio\ Giorni * Dermatite)$

Non-Irradiated = Non irradiato

Irradiated = Irradiato

15 No Treatment = Nessun trattamento

Sesame Oil = Olio di sesamo

FIGURA 43

Mean Dermatitis Score = Punteggio medio della dermatite

Dermatitis Severity Scores-1 blind score = Punteggi della gravità della dermatite - punteggio

20 1 cieco

Day = Giorno

Untreated = Non trattato

No radiation = (assenza di radiazioni)

Vehicle control = Controllo del veicolo

25 FIGURA 44

Stefano Montebelli

PRL078ESM

Oral Acute Radiation Dermatitis Scores = Punteggi della dermatite orale da radiazione acuta

Untreated = Non trattato

No radiation = (assenza di radiazioni)

Day = Giorno

5 FIGURA 45

Topical Acute Radiation Dermatitis Scores = Punteggi della dermatite topica da radiazione acuta

Mean Dermatitis Score = Punteggio medio della dermatite

Untreated = Non trattato

10 No radiation = (assenza di radiazioni)

Radiation = Radiazione

Vehicle Control = Controllo del veicolo

Day = giorno

FIGURA 46

15 Group = Gruppo

No Rad Control = Controllo Assenza di radiazione

Untreated = Non trattato

Day = Giorno

FIGURA 47

20 AUC Dermatitis Score (Severity*Days) = Punteggio dermatite AUC (Gravità*Giorni)

No Radiation = Assenza di radiazione

Untreated = Non trattato

Sesame Oil = Olio di sesamo

FIGURE 48a/b

25 Vehicle = Veicolo

Polyo Monteb

PRL078ESM

FIGURA 49

Red = Rosso

green = Verde

Blue = Blu

5 Control = Controllo

week after IR = una settimana dopo IR

weeks after IR = settimane dopo IR

*Single dose IR administered to the pelvic area of tumor-bearing animals = *Singola dose IR somministrata nell'area pelvica di animali affetti da tumore

10 FIGURA 50

Percent Reduction in Aqueous Humor Protein = Percento di riduzione nelle proteine dell'umor acqueo

FIGURA 51

NOx Levels (% vs LPS Control) = Livelli NOx (% rispetto al controllo LPS)

15 FIGURA 52

Concentration = Concentrazione

Whole Blood = Sangue intero

Brain = Cervello

Liver = Fegato

20 Lung = Polmone

Kidney = Reni

FIGURE 53

NQO1 Activity (change in absorbance/mg protein) = Attività NQO1 (variazione nell'assorbanza/mg di proteina)

25 Liver = Fegato

Ellyo Monteb

PRL078ESM

Lung = Polmone

Kidney = Reni

FIGURA 54

Weight = Peso

5 Control = Controllo

Day = Giorno

FIGURE 55, 56, 57

Content = Contenuto

(ng/tissue) = (ng/tessuto)

10 Brain = Cervello

Lung = Polmone

Liver = Fegato

FIGURE 58, 64, 70, 71, 72, 82, 85, 88, 92, 96, 97, 104, 107, 110, 120

Raman Intensity = Intensità Raman

15 Wavenumber = Numero d'onda

FIGURA 59

Rel. Diffraction Intensity (linear) = Intensità della diffrazione relativa (lineare)

Sample ID: ID del campione

Time/step = Tempo/stadio

20 Step size = Dimensione dello stadio

$^{\circ}2\theta$ (Cu K α Radiation) = $^{\circ}2\theta$ (Radiazione Cu K α)

FIGURA 60

trace = traccia

decomposition = decomposizione

25 Temperatur = Temperatura

Philippe Montel

PRL078ESM

FIGURA 62

Temp. korr = Temperatura corretta

T_g Half C_p Extrapolated = C_p estrapolata metà T_g

Heat Flow Endo Up = Flusso di calore Endo Up

5 FIGURA 63

Relative Mass = Massa relativa

Sample = Campione

time = tempo

FIGURE 64, 107

10 Raman Intensity = Intensità Raman

Wavenumber = Numero d'onda

after = dopo

FIGURE 65, 66, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 83, 86, 89, 93, 98, 99, 105, 108, 111, 115, 121, 123, 124, 125, 127, 129, 130, 131, 132

15 Rel. Diffraction Intensity (linear) = Intensità di diffrazione relativa (lineare)

$^{\circ}2\theta$ (Cu Kalpha Radiation) = $^{\circ}2\theta$ (Radiazione CuKalfa)

FIGURE 71, 72

Rel. Diffraction Intensity (linear) = Intensità di diffrazione relativa (lineare)

$^{\circ}2\theta$ (Cu Kalpha Radiation) = $^{\circ}2\theta$ (Radiazione CuKalfa)

20 Class = Classe

FIGURA 76

ethyl acetate, heptane = etile acetato, eptano

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

25 FIGURA 77

polyo Monteb

PRL078ESM

cyclohexane = cicloesano

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

FIGURA 18

5 1-butanol = 1-butanolo

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

FIGURA 79

ethyl acetate, triethylamine = etile acetato, trietilammina

10 decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

FIGURA 80

ethyl acetate = etile acetato

decomposition = decomposizione

15 Temperatur = Temperatura

FIGURA 81

ethyl formate, water = etile formiato, acqua

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

20 FIGURA 84

n-heptane = n-eptano

some ethyl acetate = una certa quantità di etile acetato

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

25 FIGURA 87

Philippe Monteb

PRL078ESM

isopropyl ether = etere isopropilico

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

FIGURE 90, 91

5 n-heptane = n-eptano

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

FIGURE 94, 95

cyclohexane = cicloesano

10 decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

FIGURE 100, 102, 103

2-propanol = 2-propanolo

decomposition = decomposizione

15 Temperatur = Temperatura

FIGURE 101, 106

trace H₂O = tracce H₂O

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

20 FIGURE 109, 112, 113, 119, 122

decomposition = decomposizione

Temperatur = Temperatura

FIGURA 114

sample = campione

25 relative mass = massa relativa

Philippe Monteb

PRL078ESM

time = tempo

FIGURE 116, 117

Heat Flow Endo Up (mW) = Flusso termico Endo Up (mW)

Temp. korr = Temp. corrente

5 Peak = Picco

Peak Height = Altezza del picco

Temperature = Temperatura

Heat from -50.00°C a 270.00°C a 10.00 °C/min = Riscaldamento da -50,00°C a 270,00°C a 10,00 °C/min

10 FIGURA 118

Sample ID = ID del campione

Heat Flow Endo Up (mW) = Flusso termico Endo Up (mW)

Temp. korr = Temp. corrente

Peak = Picco

15 Peak Height = Altezza del picco

Temperature = Temperatura

1) Heat from -50.00°C to 173.00°C at 10.00°C/min

2) Hold for 30.0 min at 173.00°C

3) Heat from 173.00°C to 270.00°C at 10.00°C/min

20 1) Riscaldamento da -50,00°C a 173,00°C a 10,00°C/min

2) Mantenimento per 30,0 min a 173,00°C

3) Riscaldamento da 173,00°C a 270,00°C a 10,00°C/min

FIGURA 126

trace water = tracce di acqua

25 decomposition = decomposizione

Polipo Monteb

PRL078ESM

Temperatur = Temperatura

FIGURA 128

water = acqua

decomposition = decomposizione

5 Temperatur = Temperatura

Mylo Monteb