



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102015000041820
Data Deposito	04/08/2015
Data Pubblicazione	04/02/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C	235	06

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	16

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	25	32

Titolo

Selezionata amide dell'acido 2-idrossibutirrico e suoi usi nel trattamento dell'abuso da alcool

TITOLO

Selezionata ammide dell'acido γ-idrossibutirrico e suoi usi nel trattamento dell'abuso da alcool.

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad una selezionata ammide dell'acido γ-idrossibutirrico, al suo processo di produzione ed ai suoi usi.

La presente invenzione nasce nel campo dei farmaci anti-dipendenza, in particolare nel campo dei farmaci per trattare i disturbi da consumo di alcool (AUD).

TECNICA NOTA

L'acido gamma-idrossibutirrico o GHB è un costituente endogeno del cervello dei mammiferi, in cui esso esercita un ruolo come neurotrasmettore e neuromodulatore.

Il GHB è attualmente usato nel trattamento della dipendenza da alcool, in particolare per ridurre o prevenire i sintomi di astinenza da alcool e l'incidenza di ricaduta.

Tipicamente, per uso farmacologico, il GHB viene somministrato sotto forma del suo sale sodico, noto come sodio oxibato.

Il profilo farmacocinetico del sodio oxibato è caratterizzato da alcuni aspetti insoddisfacenti, che includono bassa biodisponibilità (circa il 30%) e rapida eliminazione. Infatti, sebbene il sodio oxibato venga rapidamente assorbito dopo la somministrazione orale, raggiungendo la concentrazione plasmatica di picco entro 30-45 minuti, esso viene anche eliminato rapidamente, con un'emivita brevissima (circa 30 minuti). Quest'ultima caratteristica farmacocinetica richiede una frequenza di somministrazione corrispondente a 3 volte al giorno per ottenere un esito terapeutico soddisfacente.

La breve emivita di questo farmaco rappresenta un grave inconveniente poiché riduce considerevolmente l'accettazione da parte del paziente e di conseguenza gli esiti terapeutici.

Pertanto, vi è una generale necessità di farmaci aggiuntivi indirizzati al trattamento degli AUD, e per quanto riguarda il sodio oxibato, di un farmaco con un profilo farmacocinetico più vantaggioso.

Uno degli scopi generali della presente invenzione è fornire un nuovo farmaco sicuro ed efficace per il trattamento degli AUD.

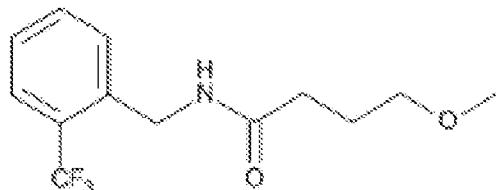
SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Gli inventori hanno ora scoperto che una selezionata ammide dell'acido γ -idrossibutirrico è inaspettatamente provvista di un'elevata efficacia nella prevenzione e nel trattamento della dipendenza da alcool e droghe.

È stato anche scoperto che il composto selezionato dell'invenzione ha una durata d'azione superiore rispetto al GHB e ai suoi sali.

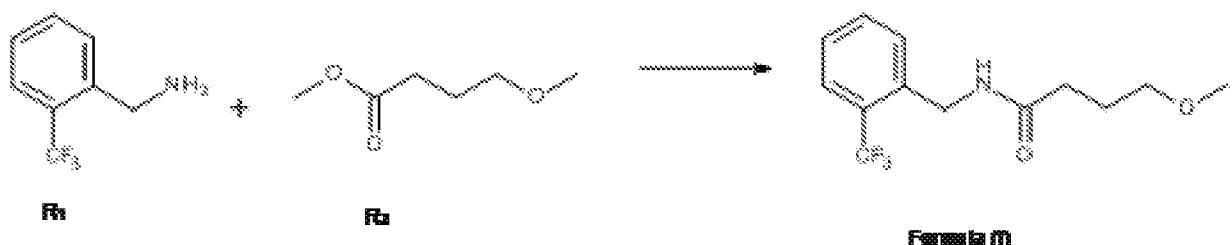
Il composto dell'invenzione trova applicazione nel campo medico, in particolare nel trattamento della dipendenza da sostanze psicotrope e/o nel trattamento dell'alcolismo e della sindrome da astinenza da alcool.

Secondo un primo aspetto, la presente invenzione fornisce un selezionato composto avente la seguente formula (I)



Formula (I)

Secondo un altro aspetto, la presente invenzione si riferisce a un processo per la preparazione del composto di formula (I) di cui sopra, detto processo comprendendo la fase di fare reagire un composto di formula R1 con il metil 4-metossibutirrato di formula R2 secondo il seguente schema di reazione



Secondo un ulteriore aspetto, la presente invenzione si riferisce all'uso del composto di formula (I) come illustrato sopra nel trattamento di disturbi del SNC e/o nella dipendenza da etanolo o, in generale, nel trattamento dell'alcolismo.

Secondo ancora un ulteriore aspetto, la presente invenzione si riferisce ad una composizione comprendente un composto di formula (I) come illustrato sopra e almeno un veicolo fisiologicamente accettabile.

Le caratteristiche e i vantaggi della presente invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dagli esempi forniti come un processo illustrativo e non limitante e dalle Figure 1-7 allegate, in cui:

- la Figura 1 mostra grafici a barre che illustrano gli effetti del composto di formula (I) identificato come ACGET61 sull'assunzione di alcool in ratti sP sottoposti ad un regime a libera scelta con due bottiglie;
- la Figura 2 mostra grafici a barre che illustrano gli effetti di ACGET61 sull'auto-somministrazione operante FR4 di alcool nei ratti sP.
- la Figura 3 mostra grafici a barre che illustrano gli effetti di ACGET61 sull'auto-somministrazione operante PR di alcool nei ratti sP.
- Le Figure 4 e 5 mostrano grafici a barre che illustrano il deflusso di glutammato evocato da K+ in sezioni di ippocampo;
- La Figura 6 mostra gli effetti di ACGET61 sulla vitalità cellulare in colture cellulari di ippocampo esposte a etanolo (EtOH); 75 mM, 4 giorni)
- La Figura 7 mostra gli effetti di ACGET61 sulla produzione di ROS in colture cellulari di ippocampo esposte a etanolo (EtOH); 75 mM, 4 giorni)

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Gli inventori hanno scoperto che un'ammide selezionata dell'acido γ -idrossibutirrico avente formula (I) come illustrato nella presente di seguito, agisce

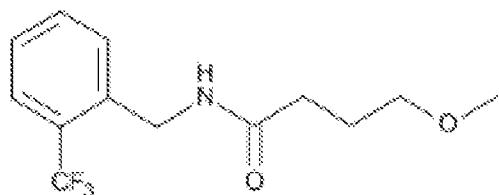
come modulatore negativo efficace del recettore metabotropico del glutammato di sottotipo 5 (mGluR5) ed è utile nello specifico nel trattamento dei disturbi da consumo di alcool.

In aggiunta, il composto di formula (I) dell'invenzione ha un profilo anti-alcool migliorato rispetto ai suoi isomeri posizionali, come GET 73.

Il meccanismo d'azione del composto di formula (I) dell'invenzione è basato su una modulazione complessa indirizzata al recettore metabotropico del glutammato del gruppo I, sottotipo 5 (mGluR5). Questa è una classe di recettori del SNC di rilevanza farmacologica. Evidenze sperimentali indicano che piccolissime modifiche strutturali di un dato composto potrebbero influenzare radicalmente sia la potenza, sia il tipo di modulazione dei recettori di cui sopra (Melancon et al., 2012).

Evidenze sperimentali mostrano che il composto di formula (I) dell'invenzione ha una specificità per il recettore del gruppo I, sottotipo 5 (mGluR5). Questa specificità è alla base delle sue proprietà neurofarmacologiche come la capacità di ridurre il consumo/assunzione di alcool in modelli preclinici differenti e la capacità di influenzare la neurotrasmissione del glutammato attraverso una modulazione di mGluR5. In aggiunta, il composto dell'invenzione esercita effetti neuroprotettivi.

Pertanto, secondo un primo aspetto, la presente invenzione fornisce un composto avente la seguente formula (I)



Formula (I)

Il composto di formula (I), quando comparato con la nota ammide dell'acido γ -idrossibutirrico GET 73, mostra un'attività più duratura nel ridurre il consumo di alcool (24 ore rispetto a 3 ore), un'efficacia in svariati modelli operanti di auto-

somministrazione di alcool (si veda la Tabella 1), e una potenza maggiore nell'inibire l'aumento indotto da CHPG del glutammato in sezioni di ippocampo (300 pM rispetto a 500 nM). In aggiunta, il composto dell'invenzione ha una potenza maggiore nel proteggere i neuroni dell'ippocampo dal danno indotto dall'esposizione cronica all'alcool (0,1 rispetto a 1 μ M) rispetto alle ammidi note dell'acido γ -idrossibutirrico.

Questi effetti e attività migliorati dei composti dell'invenzione sono basati sulla modulazione dei recettori metabotropici del glutammato indirizzati del gruppo I, sottotipo 5 (mGluRs5). Questi recettori appartengono alla famiglia C dei recettori accoppiati alla proteina G (GPCR). Essi sono caratterizzati da un dominio con sette α -eliche transmembrana (7^{TM}) collegato a un dominio amminoterminale extracellulare a due lobi di dimensioni cospicue. Il sito di legame ortosterico è contenuto nel dominio extracellulare, mentre i siti di legame allosterici attualmente noti risiedono nel dominio 7^{TM} .

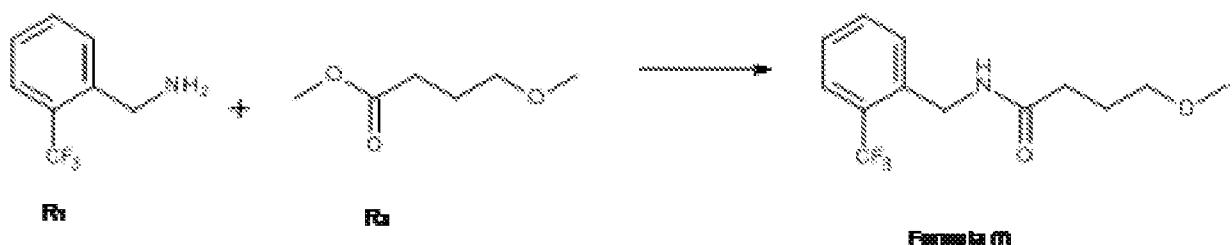
La famiglia mGluR include otto tipi di recettori, suddivisi in tre gruppi, (gruppo I, II e III) in base alla loro struttura, ai meccanismi di trasduzione del segnale preferiti, e alla farmacologia (Schoepp et al., 1999).

I recettori del gruppo I (mGluR1 e mGluR5) sono accoppiati a G_{aq}, portando alla stimolazione della fosfolipasi C e all'aumento nei livelli di calcio intracellulare e inositol fosfato. mGluR5 è stato implicato in un'ampia gamma di disturbi neurologici e/o psichiatrici, inclusa la dipendenza.

Nel SNC, è stato dimostrato che mGluR5 è espresso principalmente nella corteccia, nell'ippocampo, nel nucleo accumbens e nel caudato-putamen, regioni del cervello che sono notoriamente implicate nelle risposte emozionali e motivazionali, nella memoria e nella funzione cognitiva.

Riguardo la dipendenza da alcool, evidenze sperimentali indicano l'importanza dei recettori mGlu5 nelle proprietà di rinforzo e motivazionali dell'alcool e nel ripristino del comportamento di ricerca dell'alcool. Inoltre, modulatori allosterici negativi (NAM) del recettore mGlu5 come MPEP, e MTEP hanno dimostrato di essere efficaci nel ridurre i comportamenti di ricerca dell'alcool e simili a ricaduta. In base a queste scoperte, il recettore mGluR5 è ampiamente considerato un

target utilissimo per lo sviluppo di nuovi farmaci volti a trattare i disturbi da consumo di alcool (Olive, 2009). Infine, MPEP e MTEP, hanno dimostrato di essere neuroprotettivi, fornendo un supporto aggiuntivo allo sviluppo di un farmaco potenzialmente in grado di contrastare gli effetti dannosi esercitati dall'alcool sulla funzione e sull'integrità del SNC. Il profilo anti-alcool del composto di formula (I) è dimostrato dagli esperimenti riportati nell'Esempio 2 che sono stati condotti su modelli animali ben consolidati usati per la valutazione di aspetti differenti di assunzione di alcool, abuso di alcool e dipendenza da alcool. In un altro aspetto, la presente invenzione si riferisce a un processo per preparare il composto di formula (I), comprendente la fase di far reagire un composto di formula R1 con il metil 4-metossibutirrato di formula R2 secondo il seguente schema di reazione



In alcune forme di realizzazione, la reazione di cui sopra viene condotta in presenza di un catalizzatore, in particolare NH₄Cl, tipicamente in una quantità da 1:5 a 1:20 rispetto alla quantità di R1. Preferibilmente, il catalizzatore, in particolare NH₄Cl, viene aggiunto in una quantità dall'8 al 12% in peso rispetto al peso del reagente R1.

In alcune forme di realizzazione del processo, i reagenti R1 e R2 sono equimolari.

In determinate forme di realizzazione, la reazione viene condotta sotto riscaldamento, per esempio in un intervallo di temperatura da 120 a 170 °C, preferibilmente da 140° a 160 °C.

Secondo alcune forme di realizzazione, il metil 4-metossibutirrato R2 viene preparato facendo reagire il γ-butirrolattone R3 con il metil ortoformiato R4,

tipicamente in un ambiente acido, preferibilmente usando acido solforico e metanolo come solvente secondo il seguente schema di reazione:



In un ulteriore aspetto, la presente invenzione si riferisce a una composizione farmaceutica comprendente il composto di formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile o commestibile e carrier e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili o commestibili.

Come usato nella presente, il termine "sale" si riferisce a un qualsiasi sale di un composto secondo la presente invenzione preparato da un acido o da una base inorganico/a o organico/a e sali formati internamente. Tipicamente, tali sali hanno un anione o catione fisiologicamente accettabile.

Il composto di formula (I) può essere in forma cristallina. In determinate forme di realizzazione, le forme cristalline dei composti di formula (I) sono polimorfe.

Secondo un ulteriore aspetto, la presente invenzione si riferisce a una composizione comprendente il composto di formula (I) come illustrato sopra e almeno un carrier fisiologicamente accettabile.

Tipicamente, la composizione è una composizione farmaceutica in cui il composto di formula (I) è presente in una quantità terapeuticamente efficace.

Il composto di formula (I) può essere somministrato singolarmente o in combinazione a uno o più principi attivi come ammidi aggiuntive dell'acido γ-idrossibutirrico, in particolare nel trattamento della tossicodipendenza o dell'alcolismo o per l'uso nel ridurre il desiderio cronico di alcool e l'abitudine al consumo di bevande alcoliche o nella sindrome di astinenza.

Le composizioni farmaceutiche della presente invenzione racchiudono una qualsiasi composizione prodotta miscelando il composto della presente invenzione e un veicolo farmaceuticamente accettabile. Tali composizioni sono

idonee per l'uso farmaceutico in un animale o essere umano. Una composizione farmaceutica può facoltativamente contenere altri principi attivi. Il termine "veicolo" si riferisce a un veicolo, eccipiente, diluente, o adiuvente con cui viene somministrato l'agente terapeutico o il principio attivo. È contemplato un qualsiasi veicolo e/o eccipiente idoneo per la forma della preparazione desiderata per la somministrazione per l'uso con i composti illustrati nella presente.

Il veicolo può assumere un'ampia gamma di forme in base alla forma della preparazione desiderata per la somministrazione, per esempio orale o parenterale (inclusa quella endovenosa).

Nella preparazione delle composizioni per una forma di dosaggio, è possibile impiegare uno qualsiasi dei mezzi farmaceutici consueti, come, per esempio, acqua, glicoli, oli, alcoli, agenti aromatizzanti, conservanti, agenti coloranti e simili nel caso di preparazioni orali liquide, come, per esempio, sospensioni, elisir e soluzioni; o veicolo come amidi, zuccheri, cellulosa microcristallina, diluenti, agenti di granulazione, lubrificanti, leganti, agenti di disgregazione e simili nel caso di preparazioni solide orali come, per esempio, polveri, capsule dure o molli e compresse, le preparazioni orali solide essendo preferite rispetto alle preparazioni liquide.

In determinate forme di realizzazione, i composti della presente invenzione possono essere combinati come principio attivo in miscela intima con un carrier e/o eccipiente farmaceutico idoneo secondo tecniche di mescolatura farmaceutica convenzionali.

Le composizioni includono composizioni idonee per la somministrazione parenterale, inclusa sottocutanea, intramuscolare, e endovenosa, nasale, rettale, topica od orale.

La via di somministrazione idonea in un qualsiasi dato caso dipenderà in parte dalla natura e dalla gravità delle condizioni che vengono trattate e dalla natura del principio attivo. Una via di somministrazione esemplificativa è la via orale. Le composizioni possono essere opportunamente presentate in forma di dosaggio unitario e preparate mediante uno qualsiasi dei metodi ben noti nella tecnica

farmaceutica. Le composizioni preferite includono composizioni idonee per la somministrazione orale. Le composizioni orali possono essere preparate mediante uno qualsiasi dei metodi noti nella tecnica della farmacia. Le composizioni farmaceutiche in forma solida possono essere sotto forma di compresse, pillole, capsule, polveri, supposte e come formulazioni a rilascio prolungato.

Se desiderato, le compresse possono essere rivestite mediante tecniche acquose o non acquose standard. In determinate forme di realizzazione, tali composizioni e preparazioni possono contenere almeno lo 0,5 o l'1 per cento di principio attivo. Ovviamente, la percentuale di principio attivo in queste composizioni può essere variata e può opportunamente essere dall'1 al 60%, dal 5 al 50%, dal 10 al 30 per cento del peso dell'unità. La quantità di principio attivo in tali composizioni terapeuticamente utili è tale per cui sarà ottenuto un dosaggio terapeuticamente attivo. I composti attivi possono anche essere somministrati per via intranasale come, per esempio, gocce liquide o spray. Le compresse, pillole, capsule, e simili possono anche contenere un legante come gomma adragante, acacia, amido di mais o gelatina; eccipienti come fosfato dicalcico; un agente disintegrante come amido di mais, amido di patata, acido algínico; un lubrificante come stearato di magnesio; e un agente dolcificante come saccarosio, lattosio o saccarina. Quando una forma unitaria di dosaggio è una capsula, può contenere, in aggiunta ai materiali del tipo di cui sopra, un veicolo liquido come un olio grasso. Possono essere presenti vari altri materiali, come rivestimenti o per modificare la forma fisica del dosaggio unitario. Per esempio, le compresse possono essere rivestite con gommalacca, zucchero o entrambi. Uno sciroppo o elisir può contenere, in aggiunta al principio attivo, saccarosio come agente dolcificante, metil e propilparabeni come conservanti, un pigmento e un agente aromatizzante come aroma ciliegia o arancia. Per evitare la disgregazione durante il transito attraverso la porzione superiore del tratto gastrointestinale, la composizione può essere una formulazione rivestita in modo gastroresistente.

Le composizioni per la somministrazione topica includono, in via non limitativa,

pomate, creme, lozioni, soluzioni, paste, gel, bastoncini, liposomi, nanoparticelle, cerotti, fasciature e medicazioni. In determinate forme di realizzazione, la formulazione topica comprende un enhancer di penetrazione. La somministrazione delle composizioni viene effettuata sotto un protocollo e a un dosaggio sufficiente per ridurre la dipendenza da farmaci o l'assunzione di alcool.

In determinate forme di realizzazione, la composizione farmaceutica dell'invenzione contiene dal 5% al 50% in peso, preferibilmente dal 10 al 30% in peso del composto di formula (I) rispetto al peso totale della composizione. In alcune forme di realizzazione, nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione il principio attivo o i principi attivi generalmente sono formulati in dosaggi unitari. Il dosaggio unitario può contenere da 1 a 2000 mg, da 10 a 1000 mg, in particolare da 50 a 500 mg di un composto di formula (I) per dosaggio unitario per la somministrazione giornaliera.

Per quanto riguarda le formulazioni rispetto a una qualsiasi varietà di vie di somministrazione, metodi e formulazioni per la somministrazione di farmaci sono illustrati un Remington's Pharmaceutical Sciences, 17° edizione, Gennaro et al. Eds., Mack Publishing Co., 1985, e Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR ed. 20° edizione, 2000, Williams & Wilkins PA, USA, e Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21° edizione, Lippincott Williams & Wilkins Eds. , 2005; e in Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8° edizione, Lippincott Williams & Wilkins Eds., 2005, che sono incorporati nella presente come riferimento. Quando usato in combinazione a uno o più altri principi attivi, il composto della presente invenzione e l'altro principio attivo possono essere usati in dosi inferiori rispetto a quando ciascuno viene usato singolarmente. Una composizione farmaceutica preferita è una formulazione nella forma per la somministrazione orale del principio attivo secondo l'invenzione in miscela con carrier farmaceutici accettabili, da somministrare tipicamente una volta al giorno, o in determinate condizioni due volte o più al giorno. Secondo un altro relativo aspetto, la presente invenzione fornisce il composto di

formula (I) per l'uso come medicinale.

Secondo alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce i composti di Formula (I) per l'uso nel trattamento di malattie o disturbi associati alla dipendenza da farmaci o alcool.

Secondo alcune forme di realizzazione, il composto di formula (I) viene usato nel trattamento di una malattia del SNC e/o nel trattamento di dipendenze da farmaci e alcool.

In alcune forme di realizzazione, il composto di formula (I) viene usato nel trattamento di una o più malattie o disturbi del SNC selezionati tra catalessi, narcolessia, insonnia, sindrome da apnea ostruttiva del sonno, depressione, ansia, insonnia associata a schizofrenia, sedazione eccessiva, tremore essenziale, sindrome da affaticamento cronico, insonnia cronica e neuroprotezione da sostanze dannose.

Secondo una forma di realizzazione preferita, il composto di formula (I) o una composizione farmaceutica contenente tale composto (I) come principio attivo è destinata all'uso nella prevenzione o nel trattamento di alcolismo, forme di dipendenza da alcool, uso improprio di alcool, abuso da alcool, astinenza.

Tipicamente, il composto di formula (I) o una composizione farmaceutica contenente una quantità efficace di tale composto (I) come principio attivo può essere usato per prevenire la ricaduta nei soggetti dipendenti da alcool, per superare i periodi di astinenza da assunzione di alcool, per limitare la quantità di alcool ingerito da un soggetto, o per motivare un soggetto a cambiare il suo comportamento nei confronti dell'assunzione di alcool.

È assodato che tutti gli aspetti identificati come preferiti e vantaggiosi per il derivato dell'invenzione devono essere considerati come analogamente preferiti e vantaggiosi anche per il processo di produzione, le composizioni farmaceutiche e gli usi pertinenti.

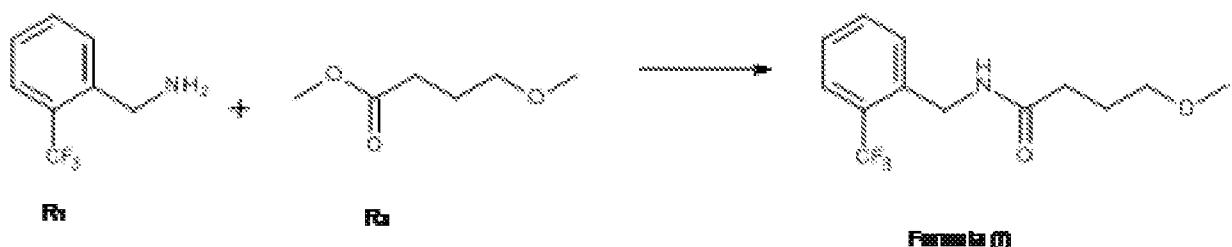
In conformità a un aspetto aggiuntivo, l'invenzione fornisce un metodo per la prevenzione o trattamento di tossicodipendenza, uso improprio di alcool e disturbi da uso di alcool, come descritto in precedenza, detto metodo comprendendo la somministrazione di una quantità efficace di un composto di

formula (I) o di una composizione farmaceutica contenente tale composto (I). In un aspetto aggiuntivo, la presente invenzione riguarda anche terapie o trattamenti di combinazione con un composto di formula (I) o una composizione farmaceutica che lo contiene. In alcune forme di realizzazione, i composti di Formula (I), e le loro composizioni farmaceutiche e metodi per somministrarli, sono utili nel trattamento di tossicodipendenza o alcolismo quando somministrati in combinazione ad altri agenti farmacologici o principi attivi. I seguenti esempi vengono forniti a scopo illustrativo e non limitativo.

ESEMPI

Esempio 1

Preparazione del composto di formula (I) (indicato come ACGT61)



In un pallone a fondo tondo dotato di un condensatore efficiente e di un agitatore magnetico, R₁ (PM: 175,088; 4,43 g) e R₂ (PM: 132,16; 3,347g) vengono aggiunti in un rapporto molare 1:1. Successivamente, viene aggiunto NH₄Cl (443 mg) come catalizzatore (10% in peso rispetto a R₁). La miscela viene riscaldata a 150 °C per 45 ore ed assume una colorazione verde inteso/viola scuro. La scomparsa del reagente viene monitorata mediante TLC (AcOEt: esano 1:2) usando ninidrina come agente di rilevazione (preparata disciogliendo 200 mg di ninidrina in 150 ml di EtOH).

Quando il reagente è completamente scomparso, la miscela di reazione viene raffreddata e il residuo viene disciolto in DCM, lavato tre volte con HCl 3 N e successivamente con acqua fino pH neutro.

Il prodotto grezzo ottenuto in questo modo viene purificato mediante

cromatografia su colonna eluendo con un gradiente di AcOEt: esano (da 1:10 a 1:1).

Il prodotto puro (ACGET61, PM 275,11) viene ottenuto come solido bianco/rosa chiaro con una resa del 64%.

Sintesi del metil 4-metossibutirrato (reagente R₂)



In un pallone a fondo tondo dotato di un condensatore efficiente e di un agitatore magnetico, **γ -butirrolattone R₃** (PM: 86,06; 1 eq; d = 1,12), **trimetilortoformiato R₄** (PM: 106,12; 1,9 eq; d = 097) e **acido solforico concentrato** (1 ml per 10 ml di γ -butirrolattone R₃) vengono miscelati in **MeOH** (4 ml per g di γ -butirrolattone R₃). La miscela viene riscaldata a 60°C per 26 ore sotto agitazione. La scomparsa del reagente viene monitorata mediante TLC (AcOEt: esano 1:1) usando una soluzione di Pancaldi come agente di rilevazione (preparata disciogliendo 25 g di molibdato di ammonio e 5 g di solfato di cerio in 450 ml di H₂O e 50 ml di acido solforico concentrato).

Al termine della reazione, il solvente viene fatto evaporare sotto pressione ridotta. Il residuo viene disciolto in AcOEt e lavato con una soluzione satura di NaHCO₃ fino a pH=8.

L'olio grezzo di colore giallo chiaro viene distillato sotto vuoto (PE: 163-164 °C, p: 760 Torr).

Il prodotto puro (P, PM: 132,16) viene ottenuto come olio incolore con una resa dell'80%.

Esempio 2.

Profilo anti-alcool del composto di formula (I) (indicato con ACGET 61) in

ratti sardi alcool-preferenti (sP).

Profilo anti-alcool di ACGET61 in ratti sardi alcool-preferenti (sP)

I ratti sardi alcool-preferenti (sP) rappresentano una delle poche linee di ratti riprodotte selettivamente nel mondo per un'elevata preferenza e consumo di etanolo (Colombo et al., 2006) e vengono utilizzati in molteplici procedure sperimentali convalidate per la valutazione di aspetti differenti del consumo di alcool. Queste procedure sperimentali includono il mantenimento dell'assunzione di alcool, e l'auto-somministrazione operante di alcool.

Mantenimento dell'assunzione di alcool

In questa procedura, i ratti sP sono stati esposti a un regime a libera scelta con 2 bottiglie tra alcool (10% v/v) e acqua. In questa condizione, gli animali possono scegliere tra una bottiglia contenente la soluzione di alcool e una bottiglia contenente acqua, e consumano volontariamente circa 6 g/kg/giorno di alcool, con una preferenza per l'alcool circa del 90%. Questa procedura costituisce un modello sperimentale utilissimo della *fase di consumo attivo* dell'alcolismo umano; è stato scoperto che l'assunzione di alcool dei ratti sP esposti a questo modello viene ridotta da farmaci, come GHB, naltrexone, e baclofene, che riducono il desiderio impulsivo e il consumo di alcool negli alcolisti umani, dimostrando la validità predittiva di questo modello.

Nel complesso, i risultati sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione orale acuta di ACGET61 a dosi che variano da 25 a 100 mg/kg esercitava una riduzione duratura nel consumo di alcool senza influenzare l'assunzione di acqua e cibo. In particolare, la riduzione indotta da ACGET61 persisteva addirittura per 24 ore, come ripetutamente osservato in almeno tre esperimenti indipendenti. I risultati di uno di questi esperimenti, espressi come consumo cumulativo di alcool, acqua, e cibo, sono riportati nella Figura 1. In conclusione, il principale miglioramento nell'attività anti-alcool di ACGET61 rispetto al suo isomero posizionale GET 73, consisteva nella durata dell'attività: GET 73 mostrava pressoché la stessa potenza nel ridurre il consumo di alcool

(10, 25, 50 mg/kg), tuttavia il suo effetto durava soltanto per tre ore (si veda la Tabella 1 per il confronto; Loche et al., 2012).

Auto-somministrazione operante di alcool

In queste procedure, i ratti sP sono stati addestrati ad auto-somministrarsi alcool o saccarosio premendo una leva, e la quantità di lavoro (pressione della leva) richiesto per ottenere l'alcool variava secondo l'intenzione del singolo programma di rinforzo, rapporto fisso (FR) o rapporto progressivo (PR). Una soluzione di saccarosio (3% p/v) è stata impiegata sistematicamente in questi esperimenti come rinforzo alternativo, al fine di valutare se i composti di prova esercitassero un effetto selettivo sull'auto-somministrazione della soluzione di alcool (15% v/v).

Nel FR i ratti ottengono alcool o saccarosio in risposta a quattro pressioni consecutive della leva (FR4), mentre nel PR il numero di pressioni della leva necessarie per ottenere alcool o saccarosio aumentava progressivamente fino a che i ratti non smettevano di premere la leva (punto di interruzione; PB). Ciascuna sessione FR4 o PR/PB durava 30 minuti. In queste condizioni sperimentali, i ratti sP presentano un vigoroso comportamento di pressione della leva, dimostrando che in questa linea di ratti l'alcool possiede forti proprietà di rinforzo e motivazionali (Colombo et al., 2006).

FR4

ACGET61 100 mg/kg esercitava un effetto di riduzione selettivo sulle proprietà di rinforzo dell'alcool nei ratti sP esposti al programma di rinforzo FR4, come mostrato nella Figura 2, in cui vengono riportati il numero totale di risposte della leva e la quantità di assunzione di alcool (g/kg) e di assunzione di saccarosio (ml/kg) nella sessione da 30 minuti. Nello specifico, **la Figura 2 mostra gli effetti di ACGET61 sull'auto-somministrazione operante FR4 di alcool nei ratti sP.** Sono stati riportati il numero di pressioni della leva e la quantità di assunzione di alcool o saccarosio. * p< 0,05 rispetto al gruppo trattato con veicolo.

PR/PB

ACGET61 50 e 100 mg/kg riduceva sia il numero di pressioni della leva, sia il punto di interruzione per l'alcool, nei ratti sP esposti a PR, anche se l'effetto non era specifico per l'alcool, essendo il composto in grado di ridurre anche la risposta per il saccarosio, come evidenziato nella Figura 3. **Nello specifico, la Figura 3 mostra gli effetti di ACGET61 sull'auto-somministrazione operante PR di alcool nei ratti sP.** Sono stati riportati il numero di pressioni della leva e il punto di interruzione per alcool o saccarosio. * p< 0,05 e ** p<0,01 rispetto al gruppo trattato con veicolo.

In particolare, GET73 non dimostrava alcun effetto negli stessi modelli, eccetto una riduzione significativa di assunzione di saccarosio nei ratti sP esposti a PR e a cui venivano somministrati 50 mg/kg (si veda la Tabella 1 qui di seguito per il confronto).

Tabella 1 – Profilo anti-alcool di GET 73 e ACGET61 nei ratti sP.

	GET 73		ACGET61	
MODELLO SPERIMENTALE	Dosi efficaci mg/kg	Durata dell'effetto	Dosi efficaci mg/kg	Durata dell'effetto
Mantenimento	10 - 25 - 50	3 ore	25 - 50 - 100	24 ore
FR4	Nessun effetto (fino a 50)	nd	100	nd
PR/PB	50 #	nd	50 – 100 *	nd

nd: non determinato; # limitato al saccarosio; * per alcool e saccarosio.

Profilo neurochimico *in vitro* di ACGET61

In base ai precedenti risultati ottenuti per GET 73, che influenza la neurotrasmissione aminoacidergica nell'ippocampo di ratto, probabilmente attraverso una modulazione complessa dei recettori metabotropici del

glutammato di sottotipo 5 (mGluR5) (Beggiato et al., 2013; Ferraro et al., 2011, 2013) l'isomero positionale ACGET61 è stato valutato *in vitro* in sezioni di ippocampo, misurando i livelli di GABA e glutammato in condizioni sperimentali differenti.

Effetti di ACGET61 sul deflusso basale di GABA e glutammato

Non è stato esercitato alcun effetto da ACGET61 (10 e 100 µM) sul rilascio basale di GABA e glutammato.

Effetti di ACGET61 sul deflusso di GABA e glutammato evocato da K⁺

Sono stati condotti studi aggiuntivi volti a esplorare l'effetto di ACGET61 (10 pM - 10 µM) in sezioni di ippocampo stimolate da KCl.

ACGET61 a concentrazioni tra 10 nM e 10 µM non esercitava effetti esplicativi, eccetto la diminuzione significativa in GABA indotta dalla concentrazione massima (dati non mostrati). Concentrazioni di ACGET61 inferiori a 10 nM, nello specifico 100, 300, e 500 pM inducevano una modesta riduzione non significativa nel deflusso di glutammato evocato da K⁺ illustrato nella Figura 4. Nello specifico, la Figura 4 mostra le sezioni di ippocampo stimolate da KCl. Effetto di ACGET61 a concentrazioni pM sul deflusso di glutammato evocato da K⁺.

Effetti di ACGET61 sull'aumento nel deflusso di glutammato evocato da K⁺ indotto dall'agonista del recettore mGluR5 CHPG

È stata esplorata l'interazione di ACGET61 con l'agonista di mGluR5 CHPG in sezioni di ippocampo stimolate da KCl. L'aggiunta al terreno di perfusione di ACGET61 300 pM (una concentrazione di per sé inefficace) era in grado di contrastare, almeno in parte, l'aumento nel deflusso di glutammato evocato da K⁺ esercitato da CHPG, come mostrato nella Figura 5. Nello specifico, **Figura 5 - sezioni di ippocampo stimolate da KCl - deflusso di glutammato evocato da K⁺. L'effetto di ACGET61 300 pM sull'aumento nel deflusso di glutammato indotto da CHPG 100 µm.** ** p<0,01 rispetto al controllo; ° p<0,05 rispetto a ACGET61+CHPG.

Questo risultato preliminare indicava che ACGET61 possiede un profilo neurochimico indicativo di una modulazione negativa in corrispondenza di mGluR5. In particolare, sebbene debbano essere effettuati studi aggiuntivi volti a esplorare concentrazioni pM differenti, la potenza di ACGET61 sembrava maggiore rispetto a quella esercitata da GET 73 a 500 nM nello stesso modello.

Profilo neuroprotettivo *in vitro* di ACGET61

Gli effetti neurotossici dell'alcool sono stati ben documentati, sia negli animali sia negli esseri umani, e l'ippocampo rappresenta un'area del cervello particolarmente sensibile agli effetti dannosi dell'alcool. Sono stati impiegati modelli preclinici differenti per studiare gli effetti neurotossici dell'alcool. Uno di questi modelli consiste nell'esporre colture organotipiche di ippocampo all'alcool, che esercita vari effetti, inclusi una riduzione nella vitalità cellulare, e un aumento nelle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In base ai precedenti risultati ottenuti per GET 73, che hanno dimostrato un profilo neuroprotettivo interessante in colture di ippocampo esposte all'alcool, ACGET61 è stato valutato nello stesso modello. In breve, colture primarie di neuroni di ippocampo di ratto sono state esposte in modo cronico a etanolo (75 mM; 4 giorni) e gli effetti neuroprotettivi di ACGET61 sono stati valutati valutando la vitalità cellulare (saggio MTT), e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (fluorescenza della rodamina 123). ACGET61 è stato valutato a concentrazioni differenti che variano tra 0,01 e 10 µM ed esercitava effetti positivi su entrambi i parametri sperimentali, aumentando la vitalità cellulare, e diminuendo la produzione di ROS nelle colture di ippocampo esposte a etanolo.

Saggio MTT

L'esposizione all'etanolo induceva una diminuzione nella vitalità cellulare come indicato dalla diminuzione significativa ($p < 0,01$) dei valori di assorbanza rispetto ai valori delle colture cellulari di controllo. ACGET61 0,1, 1, e 10 µM aggiunto 1 ora prima e durante l'esposizione cronica all'etanolo impediva il danno indotto

dall'etanolo, essendo la vitalità cellulare non significativamente differente rispetto al gruppo di controllo, ma significativamente differente rispetto al gruppo etanolo ($p<0,05$). ACGET61 (0,01-10 μM) di per sé non influenzava la vitalità cellulare nelle colture cellulari di ippocampo non esposte a etanolo. I risultati, espressi come percentuale di vitalità neuronale misurata nelle colture di controllo, sono mostrati nella Figura 6. Nello specifico, la Figura 6 mostra gli effetti di ACGET61 sulla vitalità cellulare in colture cellulari di ippocampo esposte a etanolo (EtOH; 75 mM, 4 giorni) ** $p<0,01$ rispetto al controllo; ° $p<0,05$ rispetto a EtOH 75 mM.

Produzione di ROS

L'esposizione all'etanolo induceva un aumento significativo nella produzione di ROS ($p<0,001$), misurato mediante l'emissione di fluorescenza della rodamina 123.

L'aggiunta di ACGET61 0,1, 1, e 10 μM 1 ora prima e durante l'esposizione cronica all'etanolo impediva l'aumento della produzione di ROS indotto da etanolo, essendo la produzione di ROS non significativamente differente rispetto al gruppo di controllo, ma significativamente differente rispetto al gruppo etanolo ($p<0,01$; $p<0,001$).

ACGET61 (0,01-10 μM) di per sé non influenzava la produzione di ROS nelle colture cellulari di ippocampo non esposte a etanolo. I risultati, espressi come percentuale di produzione di ROS misurata nelle colture di controllo, sono mostrati nella Figura 7. Nello specifico, la Figura 7 mostra gli effetti di ACGET61 sulla produzione di ROS nelle colture cellulari di ippocampo esposte a etanolo (EtOH; 75 mM, 4 giorni). ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ rispetto al controllo; ° $p<0,01$, °° $p<0,001$ rispetto a EtOH 75 mM.

In particolare, questi effetti neuroprotettivi erano esercitati da ACGET61 a 0,1, 1, e 10 μM , suggerendo una potenza maggiore rispetto al suo isomero posizionale GET 73: infatti, la concentrazione minima efficace per ACGET61 era 0,1 μM rispetto a 1 μM per GET 73.

Esempio 3Composizione farmaceutica

N-[(2-trifluorometil)benzil]-4-metossibutirammide (ACGET61)	50 mg
Cellulosa microcristallina (come disgregante appropriato)	60 mg
Talco (come lubrificante)	10 mg
Sodio laurilsolfato (come tensioattivo)	5 mg
Fosfato di calcio (come aggregante-diluente)	200 mg
Carbonato di magnesio (come diluente-legante)	100 mg

Esempio 4Composizione farmaceutica

N-[(2-trifluorometil)benzil]-4-metossibutirammide (ACGET61)	150 mg
Amido di mais (come disgregante appropriato)	100 mg
Gliceril behenato (come lubrificante)	10 mg
Polisorbato (come tensioattivo)	10 mg
Carbonato di magnesio (come diluente-legante)	150 mg
Lattosio (come diluente)	150 mg

Esempio 5Composizione farmaceutica con rivestimento in pellicola/a rilascio modificato

N-[(2-trifluorometil)benzil]-4-metossibutirammide (ACGET61)	500 mg
Cellulosa microcristallina (come disgregante appropriato)	200 mg
Crospovidone (come agente anti-aggregante)	50 mg

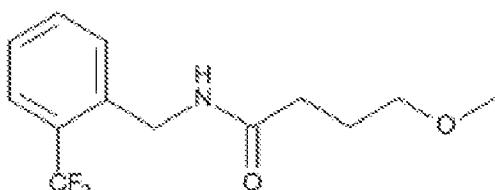
13744PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Amido (come diluente-disgregante)	50 mg
Silice colloidale (come agente essiccante)	10 mg
Stearato di magnesio (come lubrificante)	10 mg
Ipromellosio (come agente di rivestimento)	50 mg
Macrogol (come agente plastificante)	10 mg
Diossido di titanio (come colorante)	10 mg

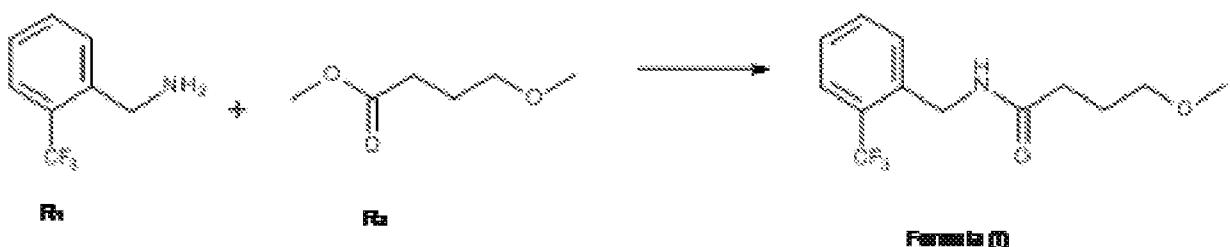
RIVENDICAZIONI

1. Composto di formula (I):

**Formula (I)**

o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

2. Processo per la preparazione di un composto di formula (I), comprendente le fasi di far reagire un composto di formula R₁ con il metil 4-metossibutirrato di formula R₂ secondo il seguente schema di reazione



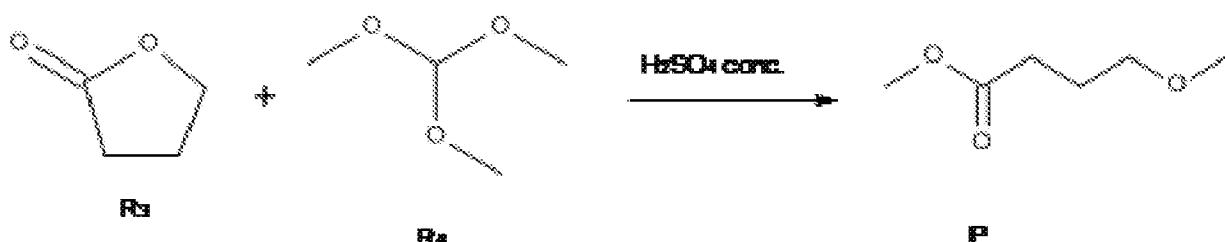
3. Processo secondo la rivendicazione 2, in cui la reazione viene condotta in presenza di un catalizzatore a base di NH₄Cl.

4. Processo secondo la rivendicazione 3, in cui NH₄Cl viene aggiunto in una quantità dall'8 al 12% in peso rispetto al peso di reagente R₁.

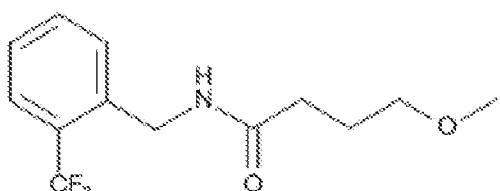
5. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 4, in cui i reagenti R₁ e R₂ sono equimolari.

6. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 5, in cui la reazione viene condotta a una temperatura da 120 a 170 °C.

7. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 6, in cui il reagente metil 4-metossibutirrato R₂ viene preparato facendo reagire il γ-butyrolattone R₃ con il metil ortoformiato R₄ in un ambiente acido, preferibilmente usando acido solforico e metanolo come solvente secondo il seguente schema di reazione:



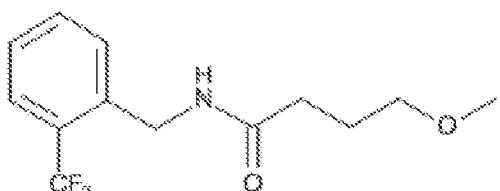
8. Composto avente la seguente formula o un suo sale farmaceuticamente accettabile



Formula (I)

per l'uso come medicinale.

9. Composto avente la formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile



Formula (II)

per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento della tossicodipendenza.

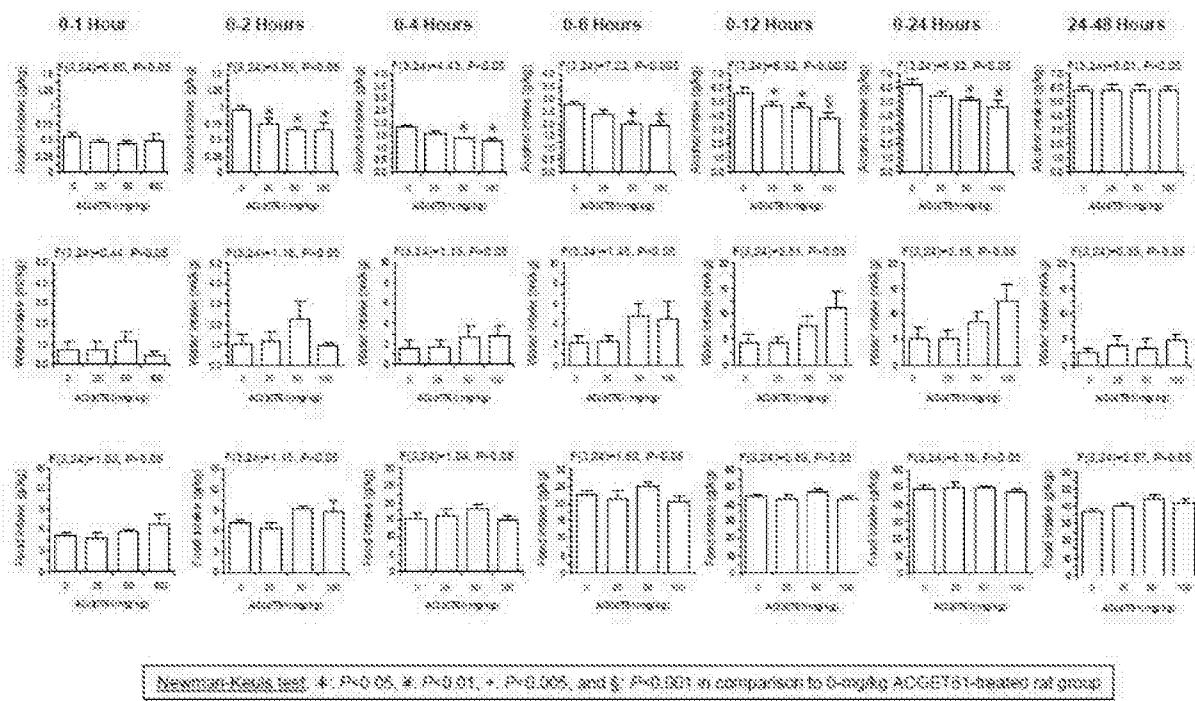
10. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 9 nella prevenzione o nel trattamento di un disturbo selezionato tra catalessi, narcolessia, insonnia, sindrome da apnea ostruttiva del sonno, depressione, ansia, insonnia associata a schizofrenia, sedazione eccessiva, tremore essenziale, sindrome da affaticamento cronico, insonnia cronica o neuroprotezione da sostanze dannose.

11. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 9 nella prevenzione o nel

trattamento di uso improprio di alcool, alcolismo, disturbo da assunzione di alcool.

12. Composizione farmaceutica comprendente il composto di formula (I) secondo la rivendicazione 1, preferibilmente in una quantità da 50 a 500 mg, e un veicolo farmaceuticamente accettabile.

FIG. 1



Mann-Whitney test: *, $P < 0.05$; +, $P < 0.01$; +, $P < 0.005$, and -, $P > 0.101$ in comparison to 0-mg/kg ACGET61-treated rat group

FIG. 2

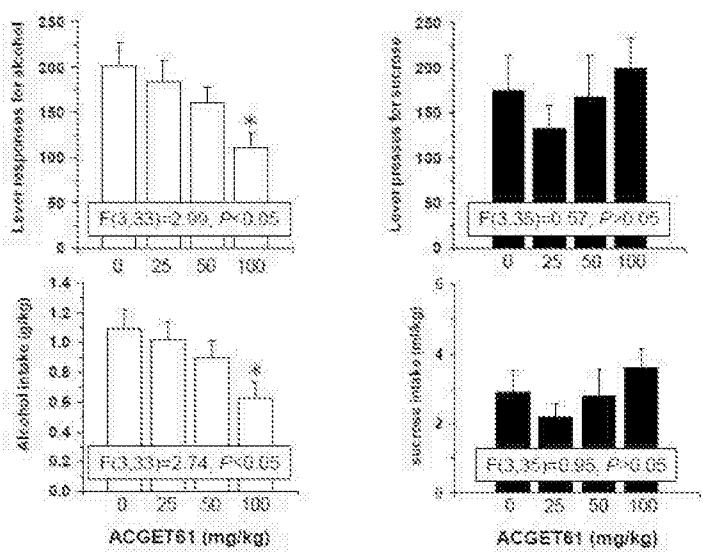


FIG. 3

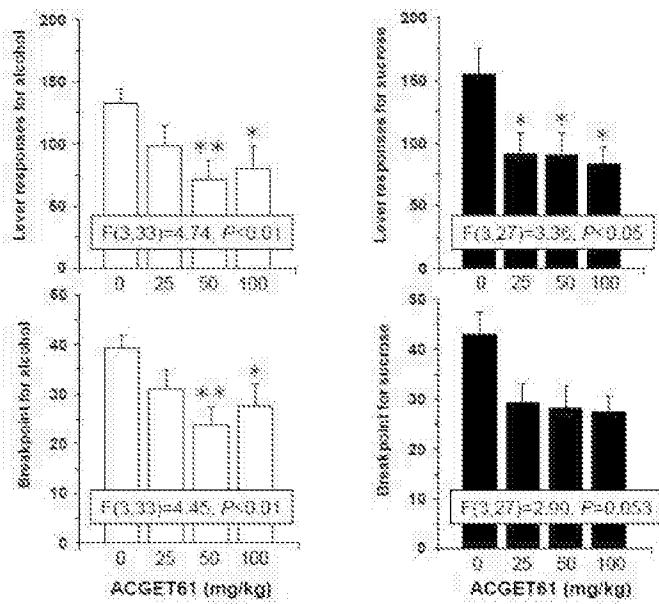


FIG. 4

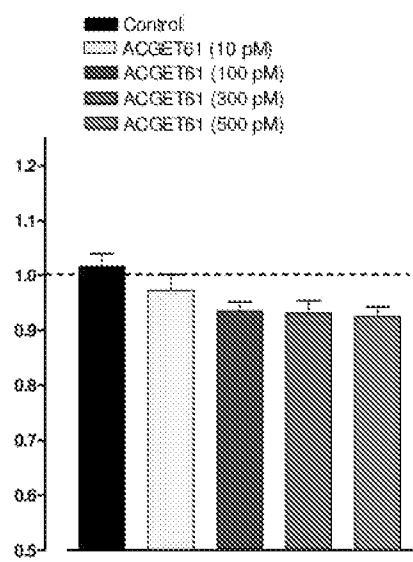


FIG. 5

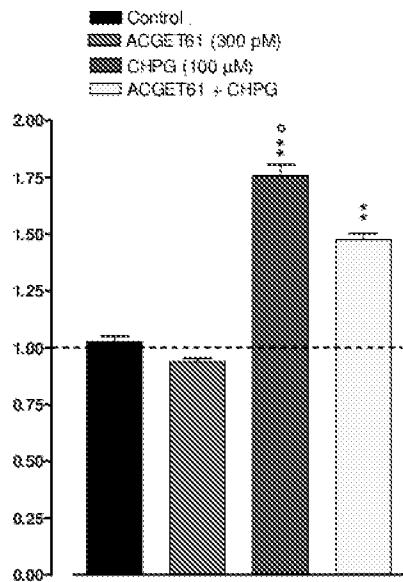


Fig. 6

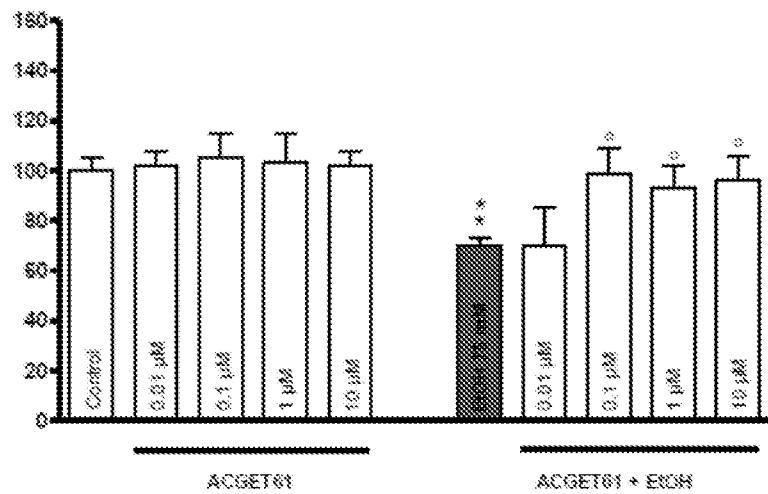


Fig. 7

