

UNIVERSITÀ DI PISA



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di laurea:

“CGRP Nuovo bersaglio farmacologico per il trattamento dell’emicrania”

Relatore

Prof.ssa Maria Cristina Breschi

Candidata

Rachele Andaloro

Anno accademico 2015-2016

A mio nonno Stefano

INDICE

1 INTRODUZIONE	5
1.1 Classificazione	5
1.2 Fasi dell'emicrania	7
2 FISIOPATOLOGIA DELL'EMICRANIA	8
3 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO	10
3.1 Farmaci antidolorifici	10
3.2 Terapie preventive	14
4 NUOVI FARMACI	16
5 PEPTIDE CGRP	16
5.1 Peptide correlato al gene della Calcitonina (CGRP, <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)	16
5.2 Struttura del peptide α -CGRP	17
5.3 Recettore CGRP	18
5.4 Meccanismo con cui CGRP si lega al proprio recettore	19
6 CGRP ED EMICRANIA	22
6.1 Antagonisti del recettore CGRP	22
6.1.2 Indagini cliniche	23
6.2 Anticorpi monoclonali	25
6.2.1 Cos'è un anticorpo	25
6.2.2 Cos'è un anticorpo monoclonale	25
6.2.3 Anticorpi monoclonali e emicrania	27
7 CONCLUSIONI	33
8 BIBLIOGRAFIA	35

1 INTRODUZIONE

L'emicrania è una cefalea primitiva e comprende varie forme cliniche.

Secondo la classificazione della International Headache Society distinguiamo:

- **cefalee primarie** (emicrania, cefalea muscolo-tensiva, cefalea a grappolo),
- **cefalee secondarie** (secondarie a patologie cerebrali, craniali)
- **nevralgie craniali**, tra cui la nevralgia del trigemino.

L'emicrania è un disturbo neurologico che si manifesta come un debilitante dolore alla testa associato ad anoressia, nausea, vomito, fotofobia, fonofobia e/o diarrea. Il dolore pulsante solitamente aumenta con le normali attività di routine. E' una condizione invalidante, con sintomi caratteristici che può durare da poche ore a diversi giorni. (*Goadsby et al.2002*). Secondo una stima ne è afflitto l'11% della popolazione adulta mondiale. L'incidenza varia da 6 a 9% tra gli uomini e da 15 a 17% tra le donne. Il secondo maggior fattore associato alle cause di emicrania dopo il genere è l'età. L'emicrania aumenta con l'età, con un picco negli anni centrali (40-50 anni) per poi diminuire (*Lipton et al.2001*) L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ha elencato l'emicrania cronica come 4° in una tabella di condizioni invalidanti. E' stata, quindi, classificata nella stessa classe di disabilità della tetraplegia, delle psicosi acute e della demenza, e più invalidante di cecità, paraplegia, angina o artrite reumatoide (*Menken et al.2000*).

1.1 Classificazione

Nel 2004 l'International Classification of Headache Society ha pubblicato la seconda edizione dell'International Classification of Headache Disorder (ICHD-II). (*Headache et al.2004*).

<p>1 EMICRANIA</p> <p>1.1 Emicrania senza aura</p>
<p>1.2 Emicrania con aura</p> <p>1.2.1 Aura tipica con cefalea emicranica</p> <p>1.2.2 Aura tipica con cefalea non emicranica</p> <p>1.2.3 Aura tipica senza cefalea</p> <p>1.2.4 Emicrania emiplegica familiare (Familial hemiplegic migraine, FHG)</p> <p>1.2.5 Emicrania emiplegica sporadica</p> <p>1.2.6 Emicrania di tipo basilare</p>
<p>1.3 Sindromi periodiche dell'infanzia possibili precursori comuni dell'emicrania</p> <p>1.3.1 Vomito ciclico</p> <p>1.3.2 Emicrania addominale</p> <p>1.3.3 Vertigine parossistica benigna dell'infanzia</p>
<p>1.4 Emicrania retinica</p>
<p>1.5 Complicanze dell'emicrania</p> <p>1.5.1 Emicrania cronica</p> <p>1.5.2 Stato emicranico</p> <p>1.5.3 Aura persistente senza infarto</p> <p>1.5.4 Infarto emicranico</p> <p>1.5.5 Epilessia indotta dall'emicrania</p>
<p>1.6 Probabile emicrania</p> <p>1.6.1 Probabile emicrania senza aura</p> <p>1.6.2 Probabile emicrania con aura</p> <p>1.6.3 Probabile emicrania cronica</p>

1.2 Fasi dell'emicrania

Nell'evoluzione dell'attacco emicranico si possono solitamente distinguere quattro fasi, non necessariamente però presenti in tutti i soggetti:

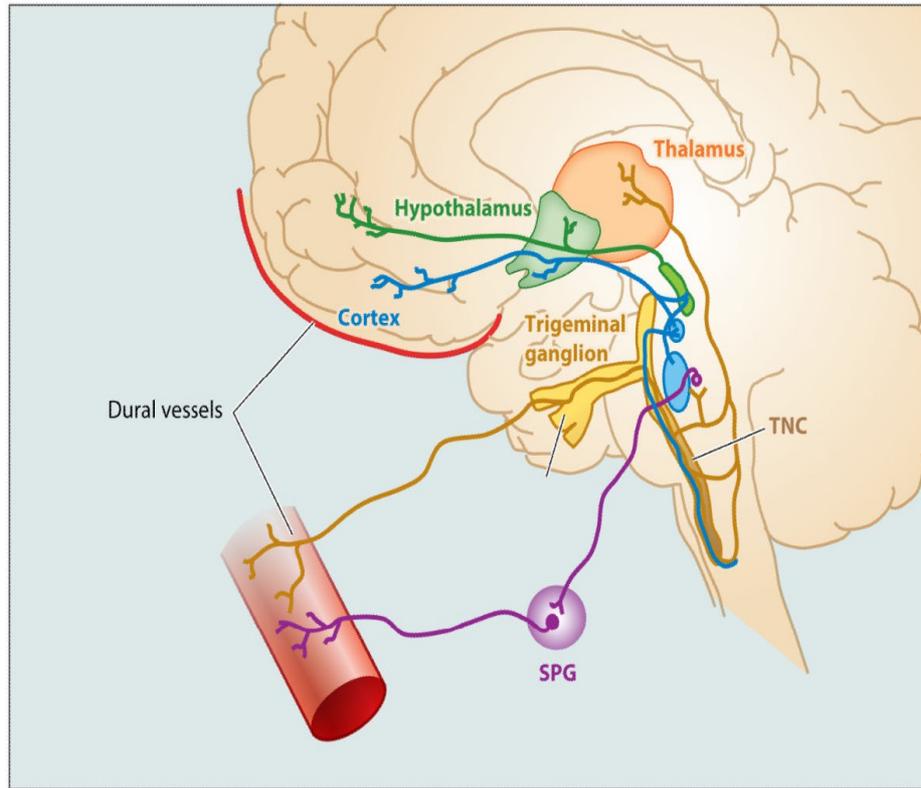
- La fase dei prodromi, presente nel 50% dei casi, è caratterizzata da sintomi quali irritabilità, depressione, sonnolenza, stanchezza, sbadigli, difficoltà a concentrarsi, spiccato desiderio di specifici alimenti (dolci, in particolare), che possono precedere la fase dolorosa anche di varie ore.
- La fase dell'aura, presente nella cosiddetta emicrania con aura, è caratterizzata da sintomi neurologici focali che precedono la fase dolorosa di 5-60 minuti. I sintomi più comuni dell'aura sono di tipo visivo: punti luminosi che rapidamente si allargano, luci lampeggianti, linee parallele luminose a zig zag, o parziale scomparsa del campo visivo. Meno frequentemente compaiono sensazione di intorpidimento o debolezza a metà del volto o del corpo (in particolare all'arto superiore) o difficoltà ad esprimersi verbalmente.
- La fase del dolore vero e proprio, essa insorge in modo graduale sotto forma di un lieve dolore che aumenta progressivamente fino a raggiungere una intensità moderata/severa, con durata variabile da poche ore a qualche giorno. Il dolore, abitualmente pulsante, insorge più spesso unilateralmente, specie in prossimità della tempia e dell'occhio per poi eventualmente diffondersi. È associata a nausea e, meno frequentemente, a vomito; è presente ipersensibilità alle luci, ai suoni ed agli odori. Il dolore peggiora con l'esercizio fisico e per questo il paziente tende ad isolarsi in ambiente buio e silenzioso durante l'attacco.
- La fase della remissione è caratterizzata da sensazione di prostrazione fisica e mentale o, al contrario, da euforia. Talvolta non è facile distinguere i sintomi di questa fase dagli effetti collaterali della terapia sintomatica dell'attacco. La completa ripresa delle performances psicofisiche è comunque lenta. La sensazione di spossatezza può durare anche vari giorni (*Villalon et al.2009.*)

2 FISIOPATOLOGIA DELL'EMICRANIA

Anche se le teorie dell'emicrania hanno di solito individuato nei vasi sanguigni cerebrali l'origine degli attacchi, ipotesi più recenti localizzano la sede di disfunzione primaria nei centri del tronco encefalico che regolano il tono vascolare e la sensazione del dolore. Strutture sensibili al dolore come i vasi sanguigni intracranici e le meningi, in particolare la dura madre, sono dotati di fibre nervose sensoriali del ramo oftalmico della prima branca del nervo trigemino. In particolare, per i centri attivi dell'emicrania ci si riferisce all'interazione tra la parte oftalmica del nervo trigemino con la dura madre e i vasi craniali. Essi originano da neuroni pseudounipolari situati nel ganglio trigeminale, che si proiettano verso neuroni sensori di secondo ordine nel nucleo caudale trigeminale del tronco encefalico e le sue estensioni a valle fino al livello C2 chiamato "complesso trigemino-cervicale (*Pietrobon et al.2003*)

Da questa regione, un segnale viene trasmesso al talamo ventro-posteriore con attivazione di aree corticali, tra cui la corteccia frontale, l'insula e la corteccia cingolata, che si traduce nell'esperienza del dolore. Così, il sistema trigemino-cerebrovascolare sembra essere coinvolto sia a livello del tronco encefalico sia a livello delle terminazioni nervose perivascolari. CGRP è abbondante sia nelle fibre perivascolari che nel nucleo spinale del nervo trigemino (*Goadsby et al.2009*)

Le terminazioni presinaptiche del nervo trigemino contengono dei neuropeptidi, come la sostanza P e il peptide correlato al gene della calcitonina, che al rilascio provocano uno stato infiammatorio che interessa i vasi sanguigni. Questo implica dilatazione dei vasi, formazione di essudato, attivazione dei mastociti e degranulazione (*Olesen et al.2009*)



Sistema trigeminovascolare

Afferenze primarie di neuroni nel ganglio trigeminale si estendono dal sistema vascolare meningeo ai terminali centrali del TNC (nucleo trigeminale caudale). Neuroni di secondo ordine di TNC, a sua volta, proiettano per il talamo posteriore e ciò si traduce nell'esperienza del dolore

3 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

Esistono diversi farmaci per la cura dell'emicrania, inoltre possono essere usati farmaci che di solito vengono impiegati per curare altre patologie. I farmaci che combattono l'emicrania possono essere classificati in due categorie:

- Antidolorifici.** Anche noti come terapia acuta o abortiva, i farmaci di questo tipo vengono assunti durante l'attacco di mal di testa e sono stati progettati per interrompere i sintomi che già hanno avuto inizio.
- Terapie preventive.** I farmaci di questo tipo devono essere assunti regolarmente, in molti casi una volta al giorno, per ridurre la gravità o la frequenza degli episodi di mal di testa.

3.1 Farmaci antidolorifici

Antinfiammatori non steroidei (FANS). Questi farmaci possono contribuire ad alleviare il mal di testa di lieve intensità. Se assunti con troppa frequenza o per lunghi periodi, i FANS possono provocare l'ulcera, il sanguinamento gastrointestinale e la cefalea da rebound.

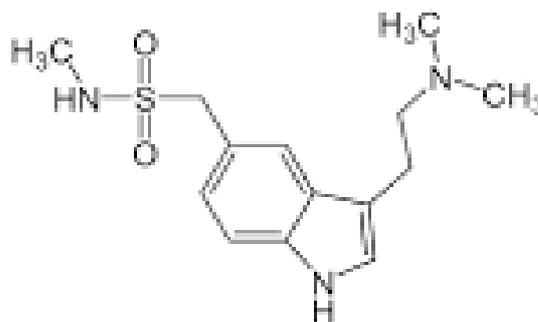
Ergotamina. Sembra più efficace in tutti coloro che soffrono di mal di testa che dura per più di 48 ore. La diidroergotamina è un derivato dell'ergotamina che è più efficace e ha meno effetti collaterali rispetto all'ergotamina.

Farmaci antinausea. Gli attacchi di emicrania spesso sono accompagnati dalla nausea, con o senza vomito, quindi i farmaci antinausea sono una scelta corretta e spesso vengono affiancati da altri farmaci. I farmaci prescritti più di frequente sono la metoclopramide (Plasil®, per uso orale o nasale) o la proclorperazina (per uso orale o rettale).

Oppiacei. I farmaci contenenti sostanze narcotiche, in particolar modo la codeina, vengono usati in alcuni casi per curare il mal di testa se i pazienti non possono assumere i triptani o l'ergotamina. I narcotici creano dipendenza e di solito vengono usati se tutti gli altri rimedi si sono dimostrati inefficaci.

Triptani. Il sumatriptan è stato il primo agonista selettivo della serotonina resi disponibile per il trattamento dell'attacco acuto di emicrania. La stimolazione dei recettori 5HT₁ a livello dei vasi intracranici e delle terminazioni sensitive periferiche del sistema vascolare

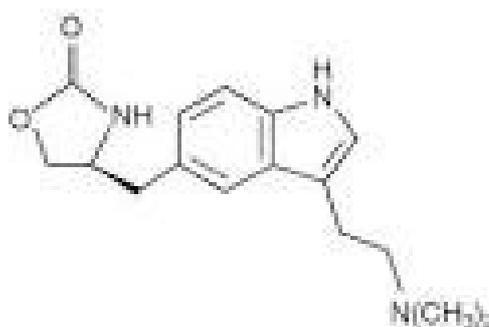
controllato dal trigemino porta ad una vasocostrizione cranica e ad una ridotta liberazione di neuropeptidi infiammatori cui fa seguito una attenuazione del dolore cefalalgico. Dopo somministrazione endonasale, l'assorbimento del sumatriptan risulta piuttosto scarso. La biodisponibilità è infatti solo di poco superiore a quella per via orale: 16% contro 14%. Gli altri parametri farmacocinetici si dimostrano anch'essi poco differenti: l'effetto terapeutico compare generalmente entro 60 minuti (contro i 10-60 minuti della via sottocutanea) e raggiunge il massimo dopo 2 ore (contro i 30-60 minuti della via sottocutanea). Il farmaco, dopo metabolizzazione epatica, viene eliminato per via renale. L'emivita è di 2 ore (*Ryan et al.1997*). Due studi randomizzati, in doppio-cieco, condotti su un totale di 845 pazienti, hanno valutato l'efficacia dello spray nasale di sumatriptan nel trattamento della cefalea emicranica. Entro 2 ore dalla somministrazione, la percentuale di pazienti in cui il mal di testa è migliorato è stata del 62-63% con sumatriptan 20 mg, del 43-54% con sumatriptan 10 mg e del 29-35% con placebo. Per le compresse le percentuali sono del 58% (100 mg) e del 55% (50 mg) contro 26% del placebo, mentre per l'iniezione sottocutanea risultano del 75-83% contro 30% del placebo. Nella maggior parte dei pazienti si è ottenuta anche una riduzione significativa della nausea, della fono- e fotofobia. Così come avviene con le altre formulazioni di sumatriptan, nel volgere delle successive 24 ore la cefalea si è ripresentata nel 32% (20 mg) e nel 43-46% (10 mg) dei pazienti. Le ragioni sono probabilmente da imputare alla breve emivita del farmaco. (*Tfelt-Hansen et al.2000*).



Sumatriptan

Zolmitriptan è un agonista selettivo dei recettori D1 della serotonina che trova indicazione nel trattamento della crisi emicranica. Oltre al blocco periferico sul sistema vascolare controllato dal trigemino già descritto per il sumatriptan, il capostipite di questa classe di farmaci, lo zolmitriptan, in virtù di una maggiore capacità di superamento della barriera ematoencefalica, eserciterebbe anche un effetto inibitorio centrale sul nucleo caudale del trigemino (*Martin GR et al.1966*). Tale azione farmacologica si traduce in una riduzione della vasodilatazione del distretto cranico. Dopo somministrazione orale, il farmaco viene

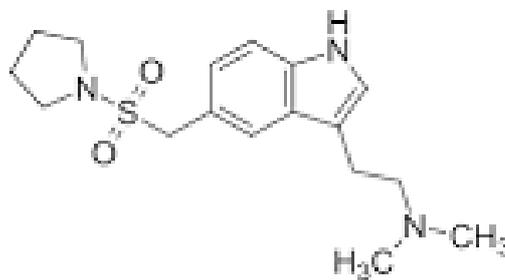
ben assorbito con una biodisponibilità del 46% circa (*Thomsen et al.1996*), superiore a quella del sumatriptan, con picchi plasmatici entro 2,5 ore. La biodisponibilità in caso di assunzione durante un attacco di emicrania non è nota. In uno studio, l'assorbimento dello zolmitriptan somministrato in corso di cefalea emicranica è risultato relativamente lento e i livelli plasmatici massimi sono stati raggiunti dopo 4 ore (*Tfelt-Hansen et al.2000*). Tuttavia, anche in caso di rallentato assorbimento imputabile alla stasi gastrica, nella maggior parte dei pazienti si osserva una attenuazione del dolore entro 2 ore dalla assunzione (*Ferrari et al.1997*). Il farmaco viene metabolizzato a livello epatico a metaboliti attivi e inattivi, ed eliminato prevalentemente per via renale (60%), con una emivita di circa 3 ore. Uno studio di confronto tra zolmitriptan (2,5 e 5 mg) e sumatriptan (25 e 50 mg), condotto su 1.445 pazienti con emicrania (*Gallagher et al.2000*) ha rilevato, a 24 ore, una differenza significativa in termini di sollievo dal dolore tra i 2 trattamenti a favore dello zolmitriptan ma tale riscontro non è confermato dai risultati degli altri studi. In generale, infatti, gli studi randomizzati di confronto con sumatriptan hanno rilevato una sostanziale equivalenza tra i due agonisti serotoninergici sia in termini di risposta completa (miglioramento o riduzione completa del dolore, senza recidive nelle 24 ore) che di risposta parziale (attenuazione o assenza di dolore dopo 2 ore dall'assunzione). Nessuna differenza è emersa anche nel profilo degli effetti indesiderati; i farmaci sono risultati nel complesso ben tollerati.



Zolmitriptan

L'almotriptan e l'eletriptan sono due nuovi agonisti selettivi dei recettori della serotonina 5HT_{1B/1D}, che vanno ad aggiungersi ai già disponibili sumatriptan, zolmitriptan. Entrambi sono commercializzati solo per via orale. Il loro meccanismo d'azione è simile a quello del capostipite, il sumatriptan. La ricerca di nuovi composti è tesa a migliorare alcune delle caratteristiche del sumatriptan: accelerare la comparsa d'azione, allungare l'emivita (per ridurre il numero di recidive), accrescere la lipofilia (per potenziare l'effetto sulle aree

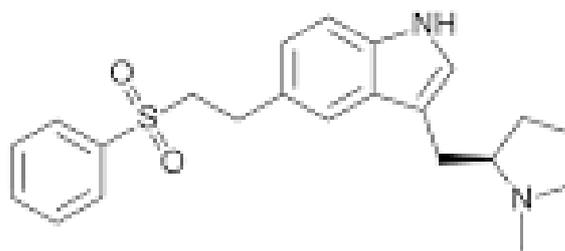
centrali del sistema trigeminovascolare), aumentare la selettività recettoriale (per diminuire l'azione vasocostrittrice sulle arterie coronariche e su altri vasi al di fuori del cervello). L'almotriptan, ben assorbito dopo somministrazione orale, raggiunge le concentrazioni plasmatiche massime da 1 a 3 ore dopo l'assunzione, indipendentemente dalla presenza di cibo nello stomaco; la biodisponibilità, del 70-80%, è la più alta fra tutti i triptani (quella del sumatriptan è del 14%). L'emivita media è di 3 a 4 ore. L'almotriptan viene metabolizzato a livello epatico sia dalla monoaminossidasi di tipo A che dal citocromo P-450 (CYP) isoenzima 3A ed i metaboliti sono eliminati sia con le feci che con le urine; per via renale viene eliminata anche la quota di farmaco non modificata (40-50%).



Almotriptan

L'eletriptan ha un assorbimento orale rapido e raggiunge i livelli ematici di picco dopo 1,5 ore (nel corso di un attacco emicranico, l'assorbimento è rallentato e la quantità di farmaco assorbita si riduce). La biodisponibilità è del 50%. L'emivita è di 4-6 ore. Viene metabolizzato principalmente a livello epatico dal citocromo P450 CYP3A4 e solo il 9% della dose somministrata si trova immutato nelle urine. Va sottolineato come la velocità di assorbimento valutata in studi su volontari sani possa non riflettere le condizioni che si verificano durante un attacco emicranico e come una migliore biodisponibilità possa non essere clinicamente significativa laddove si utilizzino dosi appropriate (*Keam et al.2003*). L'almotriptan è stato confrontato col sumatriptan in due studi. Nel primo condotto su 668 pazienti, l'almotriptan (al dosaggio di 12,5 mg) dopo 2 ore è risultato efficace nel 57% dei pazienti con una incidenza di recidive del 18%, contro una efficacia nel 64% dei pazienti e un'incidenza di recidive del 25% del sumatriptan (100 mg) (*Cabarrocas et al.1998*). Nel secondo studio, realizzato su 1.173 pazienti, le percentuali di risposta e di recidive sono state rispettivamente pari al 58% e al 27% con almotriptan (12,5 mg) e pari al 57,3% e al 24% con sumatriptan (50mg) (*Spierings et al.2001*). Dopo due ore, tuttavia, una percentuale più alta di pazienti trattati con sumatriptan era senza dolore rispetto a quanti avevano assunto l'almotriptan (25% vs 18%). Nel 36,7% dei pazienti trattati con

almotriptan e nel 33,2% di quelli trattati con sumatriptan si è resa necessaria l'assunzione di altri analgesici. In questo studio i due farmaci sono risultati comparabili anche nell'alleviare altri sintomi associati all'emicrania.



Eletriptan

L'eletriptan è stato confrontato col sumatriptan e col placebo in uno studio condotto su 857 pazienti (*Goadsby et al 2000*). A due ore dalla somministrazione, le percentuali di risposta sono state 24% per il placebo, 55% per il sumatriptan, 54% per l'eletriptan 20 mg, 65% per l'eletriptan 40 mg e 77% per l'eletriptan 80 mg. I pazienti liberi da dolore a due ore sono stati il 37% con 80 mg, il 29% con 40 mg e il 23% con sumatriptan 100 mg. Complessivamente si tratta di farmaci ben tollerati. Il profilo degli effetti indesiderati è simile a quello degli altri triptani: vertigini, parestesie, nausea e/o vomito, sonnolenza e senso di affaticamento, bocca secca, sensazione di calore e arrossamento al volto, sensazione di pesantezza o di pressione al torace (ma anche alla gola, al collo) sono quelli che emergono con maggiore frequenza dagli studi clinici; l'incidenza è dose-correlata (*Jamieson et al. 2002.*) Col protrarsi delle assunzioni, l'incidenza degli effetti indesiderati sembra diminuire. In uno studio comparativo, l'almotriptan è stato associato ad una minore incidenza di eventi correlati al sistema cardiovascolare (vasodilatazione, palpitazioni, anormalità del ritmo cardiaco) e di dolore e oppressione toracica rispetto al sumatriptan. L'incidenza di sintomi toracici per l'eletriptan è risultata simile a quella del sumatriptan in un studio comparativo fra i due farmaci.

3.2 Terapie preventive

Le terapie preventive sono in grado di diminuire la frequenza, la gravità e la lunghezza degli attacchi di emicrania e possono aumentare l'efficacia dei farmaci assunti durante gli attacchi.

- Farmaci per i disturbi cardiovascolari. I betabloccanti, usati solitamente per curare l'ipertensione e le coronaropatie, sono in grado di diminuire la frequenza e la gravità degli attacchi di emicrania. Questi farmaci sono considerati tra quelli

d'elezione per la terapia dell'emicrania. I calcio-antagonisti, un altro tipo di farmaci per i disturbi cardiovascolari, sono efficaci per ridurre la durata e la gravità dell'emicrania. Le ricerche non hanno ancora scoperto il modo esatto con cui questi farmaci riescono a prevenire l'emicrania. Tra gli effetti collaterali ricordiamo le vertigini e la sonnolenza.

- Antidepressivi. I più efficaci sono gli antidepressivi triciclici, come l'amitriptilina, la nortriptilina e la protriptilina. Questi farmaci sono considerati tra quelli d'elezione per il trattamento dell'emicrania e sono in grado di diminuire l'intensità del disturbo perché agiscono sul livello di serotonina e di altri neurotrasmettitori. Per ottenere benefici da queste terapie non è necessario essere depressi. Per altri tipi di antidepressivi, come gli inibitori selettivi dell'assorbimento della serotonina (SSRI) e gli inibitori dell'assorbimento della serotonina e della norepinefrina (SNRI), non è ancora stata dimostrata l'efficacia per il trattamento dell'emicrania.
- Anticonvulsivanti. Alcuni farmaci anticonvulsivanti, sembrano in grado di diminuire la frequenza degli attacchi di emicrania. Ad alti dosaggi, tuttavia, gli anticonvulsivanti potrebbero causare effetti collaterali, come nausea, vomito, diarrea, crampi, caduta dei capelli e vertigini.
- Ciproheptadina. Questo farmaco antistaminico agisce sull'attività della serotonina. I medici spesso lo somministrano ai bambini come terapia preventiva.
- Tossina botulinica A . La tossina botulinica A viene usata in alcuni casi per curare l'emicrania cronica. Le ricerche finora compiute, però, danno pareri discordi sull'efficacia: diversi specialisti, tuttavia, ritengono che possa essere utile per alcuni pazienti. Le iniezioni vengono effettuate nei muscoli della fronte e del collo. Se si dimostra efficace, la terapia deve essere ripetuta ogni tre mesi.

4 NUOVI FARMACI

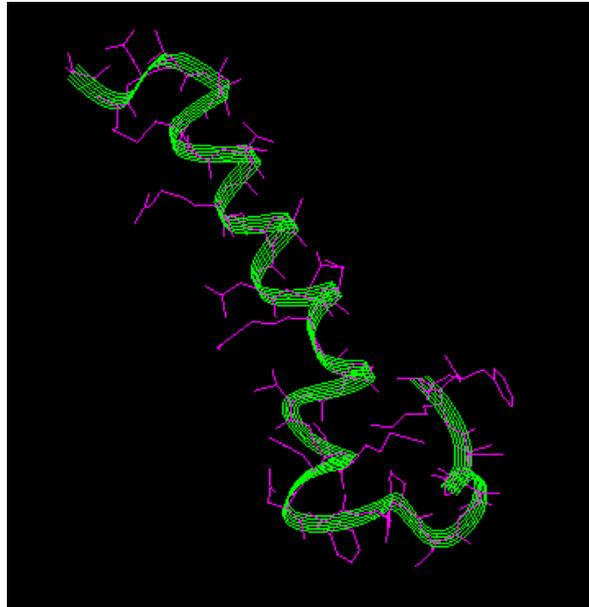
Tutte le sostanze capaci di indurre un attacco di emicrania sono vasodilatatori. Alcune di queste sostanze, come NO e CGRP, sono attive in tutto l'attacco di emicrania, perché il blocco della loro produzione o dei recettori è efficace nel trattamento di attacchi di emicrania spontanei. Coerentemente con questi risultati, studi più recenti hanno mostrato che l'attivazione dei recettori CGRP può aumentare l'espressione della forma di NO sintasi inducibile (iNOS) e stimolare rilascio di NO dalle cellule gliali del ganglio trigeminale (*Ho et al.2014*) Quindi, CGRP rilasciato dai corpi cellulari dei neuroni del trigemino potrebbe promuovere e mantenere un ciclo infiammatorio all'interno del ganglio che media la sensibilizzazione periferica; questo meccanismo può offrire un'altra spiegazione plausibile di come NO e CGRP siano coinvolti nel causare un attacco di emicrania in alcuni individui. CGRP dato per infusione endovenosa può indurre un attacco di emicrania, ma CGRP non attraversa la barriera emato-encefalica (*Goadsby et al.1990*)

5 PEPTIDE CGRP

5.1 Peptide correlato al gene della Calcitonina (CGRP, *Calcitonin Gene-Related Peptide*)

Scoperto nel 1983 nel ratto, il CGRP è un neuropeptide vasoattivo largamente espresso nei neuroni. E' composto da 37 amminoacidi ed esiste in due isoforme α e β che differiscono l'una dall'altra per un solo amminoacido nel ratto e per tre amminoacidi nell'uomo. Questi tre amminoacidi sono localizzati a livello dei residui 3, 22, 25 e sono, rispettivamente: Asn, Met e Ser nella forma β , Asp, Val e Asn nella forma α . Le isoforme α e β hanno attività biologica molto simile; α -CGRP è quella più abbondante ed è maggiormente espressa nei neuroni sensoriali primari in concentrazione da 3 a 6 volte più alta di quella di β -CGRP. α -CGRP esibisce un ampio range di effetti biologici sui tessuti, il più marcato dei quali è quello della vasodilatazione (*Breeze et al.1991*) I vasi cerebrali

sono densamente innervati dalle terminazioni del nervo trigemino che esprimono CGRP e gli effetti vasoattivi del CGRP sono dimostrati in una varietà di vasi sanguigni, compresi quelli della vascolarizzazione cerebrale (*Rosenfeld et al.1983*)



Peptide CGRP

5.2 Struttura del peptide α -CGRP

Tutte le specie di CGRP sono costituite da una singola catena polipeptidica di 37 a.a.

In generale la struttura comprende 4 domini:

- 1) Una porzione N-terminale composta dai primi 7 residui che assumono una struttura simile a quella di un anello tenuto insieme da un ponte disolfuro tra i residui 2 e 7 (Cys2-Cys7);
- 2) un' α -elica "anfipatica" che si trova tra i residui 8-18 (Val-Arg);
- 3) un dominio costituito dai residui 19-27 che consiste in ripiegamenti β o γ ;
- 4) un dominio C-terminale che si trova presso i residui 28-37.

Per la completa attività biologica è richiesto il peptide intatto.

Relazioni struttura-attività:

- I residui 1-7 (Ala-Cys) sono richiesti per l'attivazione del recettore; l'anello N-terminale è richiesto per attivare il recettore e quindi la trasduzione del segnale e la rimozione dei primi 7 residui determina la formazione dell'antagonista, CGRP(8-37);

- I residui 8-18 (Val-Arg) determinano l'affinità per il recettore e una delezione di questa porzione causa una perdita di affinità di ben 100 volte; in particolare Arg11 e Arg18, localizzati sulla faccia idrofobica dell' α -elica, giocano un ruolo importante nella formazione di un legame ad alta affinità con il recettore;
- Il dominio costituito dai residui 19-27 ha la funzione di regione cerniera e di spaziatore;
- La porzione C-terminale 28-37 è il requisito necessario per far sì che il peptide assuma la giusta conformazione nell'interazione con il recettore. La regione 28-37 contiene due avvolgimenti che possono considerarsi un possibile epitopo per il legame (*Villalón et al. 2009*).

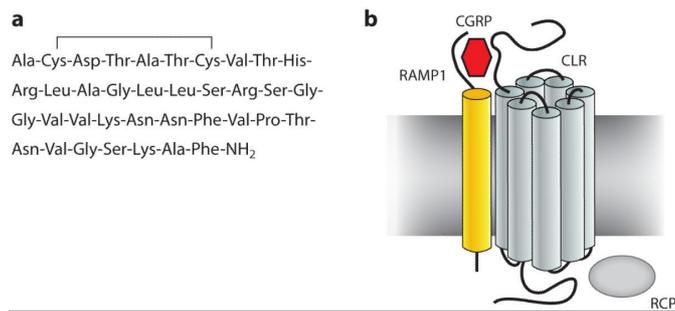
5.3 Recettore CGRP

I recettori accoppiati a proteine G (*G-Protein Coupled Receptors*, GPCR) sono costituiti da una singola catena polipeptidica formata anche da 1100 residui. Strutturalmente presentano 7 eliche transmembrana (domini TM-7), un dominio extracellulare N-terminale di lunghezza variabile e un dominio intracellulare C-terminale. Appartengono a questa famiglia i recettori per le ammine biogene, serotonina compresa, acetilcolina (muscarinici ma non nicotinici) molti ormoni polipeptidici ecc... Esistono come dimeri o come complessi più grandi. I GPCR sono divisi in tre distinte famiglie che condividono la stessa struttura a sette eliche ma differiscono per vari aspetti, principalmente per la lunghezza della sequenza N-terminale e la localizzazione del sito di legame per l'agonista.

Il recettore per CGRP appartiene ai recettori accoppiati a proteine G ed è costituito da un complesso multimerico che consiste in:

- Recettore a sette domini transmembrana, denominato *Calcitonine Receptor-Like Receptor*, CRL;
- una singola proteina transmembrana, *Receptor Activity Modifying Protein*, RAMP1;
- un terzo componente, *Receptor Component Protein*, RCP, una proteina accessoria richiesta per particolari funzioni (*Poyner et al. 2002*)

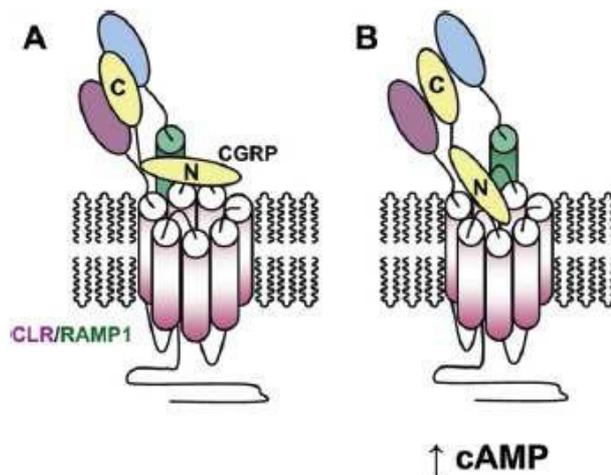
La co-espressione di RAMP1 con CLR forma un etero dimero che determina il recettore per CGRP.



CGRP and its receptor. (a) Human α -CGRP sequence with an amidated C terminus and N-terminal disulfide bond, indicated by the bracket. (b) The CGRP receptor complex

5.4 Meccanismo con cui CGRP si lega al proprio recettore

Si pensa che il meccanismo con cui CGRP si lega al recettore possa essere interpretato secondo il modello generale dei due domini indicato da *Hoare (2005)*. In questo modello, il C-terminale del ligando peptidico prima si lega con alta affinità alla porzione extracellulare N-terminale del recettore formando una cosiddetta trappola di affinità (*Hoare, 2005*). Per il recettore CGRP, il peptide agonista interagirebbe prima con le regioni N-terminali di entrambe le proteine, CLR e RAMP1. Questo evento iniziale di legame ad alta affinità aumenta notevolmente la concentrazione del peptide in loco che consente a questo punto interazioni a minore affinità del N-terminale del peptide con la regione juxtamembrana del recettore, per procedere infine all'attivazione del recettore. Questo fenomeno è ben dimostrato dal fatto che il peptide CGRP8-37 in cui mancano i primi sette aminoacidi è in grado di legarsi al recettore, ma non di attivare la produzione di cAMP; infatti si comporta come un antagonista funzionale.



Modello di legame dei due domini applicato al recettore CGRP (Moore e Salvatore, 2012)

Similmente agli altri recettori accoppiati a proteine G, il legame di CGRP con i suoi recettori facilita i cambiamenti conformazionali necessari per portare il segnale a valle (Walker *et al.*, 2010). L'attivazione dei recettori CGRP è generalmente descritta con l'interazione del CGRP con il suo recettore che porta all'attivazione di una proteina G, di solito G α s (proteina G stimolatoria). Mediante l'attivazione dall'adenilato ciclasi viene a crearsi un aumento del cAMP e quindi attivazione delle proteine chinasi A o cAMP dipendenti. Come molti recettori accoppiati a proteine G, il recettore CGRP è in grado di accoppiarsi anche con altri tipi di proteine e non solo quelle stimolatorie (G α s).

In generale l'attivazione dei recettori CGRP aumenta i livelli di cAMP e cGMP in numerose cellule del nostro organismo e questi sono i secondi messaggeri associati alla vasodilatazione. Per quanto riguarda il meccanismo di trasduzione del segnale vascolare (che è quello di interesse relativamente ai farmaci antiemicrania) il CGRP, quando si lega al suo recettore, induce una vasodilatazione attraverso un meccanismo endotelio-dipendente e uno endotelio-indipendente (Villalón *et al.* 2009).

Percorso endotelio dipendente

In vasi come aorta toracica, arterie polmonari e renali dei ratti o nelle arterie brachiali umane, CGRP quando si lega al suo recettore attiva l'adenilato ciclasi nell'endotelio e in tal modo aumenta i livelli di AMP ciclico (cAMP). Questo, di conseguenza, attiva l'enzima NO sintetasi (NOS) che a sua volta aumenta i livelli di ossido d'azoto NO. NO agisce sulle

cellule muscolari lisce attivando guanililciclastasi, con conseguente produzione di GMP ciclico (cGMP) che porta a rilassamento vascolare. (Villalón et al, 2009).

Percorso endotelio indipendente

Nelle arterie craniche di ratto e di uomo CGRP “by-passa” l’endotelio e si lega direttamente ai recettori per CGRP sia per diffusione nelle arterie senza barriera ematoencefalica che per rilascio diretto dalle terminazioni nervose sul lato abluminale dell’arteria: in questo modo, si lega direttamente ai recettori per CGRP sulle cellule muscolari lisce attivando adenilato ciclastasi, che a sua volta aumenta i livelli di cAMP che porta a rilassamento vascolare. L’aumento di cAMP indotto da CGRP attiva proteine chinasi A che si fosforilano e quindi aprono i canali del potassio KATP nella muscolatura liscia delle arterie di coniglio. E’ stato osservato che nelle arterie durali di ratto l’effetto del CGRP è significativamente inibito dall’inibitore dei canali KATP, glibenclamide. Evidentemente, le risposte di vasodilatazione indotte da CGRP coinvolgono altri secondi messaggeri, compresi cAMP, NO, cGMP, canali del K⁺. Inoltre, in colture cellulari di gangli del trigemino, l’attivazione dei recettori per CGRP aumenta i livelli di cAMP, che a loro volta vanno ad aumentare l’attività promotrice di CGRP e i livelli di CGRP mRNA. Questi risultati indicano un’auto-attivazione dell’espressione di CGRP e il fatto che un elevato rilascio di CGRP nel sistema trigemino possa creare un ciclo a *feedback* autosufficiente (Villalón et al, 2009).

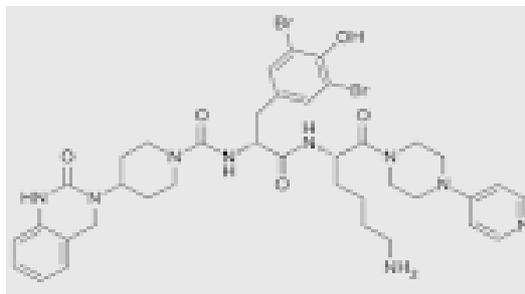
6 CGRP ED EMICRANIA

6.1 Antagonisti del recettore CGRP

L'ipotesi che il CGRP possa avere un ruolo chiave nella fisiopatologia dell'emicrania ha avuto un notevole sostegno negli ultimi anni. Ciò si basa non solo sul fatto che il CGRP provoca una vasodilatazione cerebrale, ma anche sulle recenti scoperte che il CGRP possa avere un importante ruolo sulle attività neuronali. In generale l'attivazione dei recettori CGRP aumenta i livelli di cAMP e cGMP in numerose cellule del nostro organismo e questi sono i secondi messaggeri associati alla vasodilatazione (*Walker et al.2010*). Ricercatori hanno dimostrato che durante un attacco di emicrania la concentrazione plasmatica di CGRP è elevata nel sangue venoso della giugulare esterna (cioè il sangue drenato dai tessuti extracerebrali, compresa la dura madre). L'azienda farmaceutica Boehringer Ingelheim ha sviluppato un antagonista non peptidico del recettore CGRP, BIBN4096BS, in seguito chiamato **Olcegepant**, che è stato considerato potenzialmente efficace nel trattamento dell'emicrania. Sebbene questo composto sia estremamente potente e selettivo per il recettore CGRP, occorre precisare che è una molecola relativamente grande (peso molecolare = 870) con bassa biodisponibilità, che le impone di essere somministrata per via endovenosa in clinica. (*Doods et al.2007*). Purtroppo, una somministrazione endovenosa del farmaco non è pratica per il trattamento acuto di emicrania in quanto ciò richiederebbe un trasporto in clinica dopo l'inizio dell'attacco. L'emicrania è principalmente gestita in regime ambulatoriale: pertanto, per essere pratico e commercialmente valido, un farmaco deve essere biodisponibile per via orale, permettendo al paziente di assumerlo quando i sintomi di un attacco cominciano. In seguito, i laboratori Merck Research hanno sviluppato un agente biodisponibile per via orale, **Telcagepant**, sotto forma di compresse. Telcagepant è stato il primo antagonista del recettore CGRP biodisponibile per via orale da testare in clinica e ha mostrato un'efficacia per il trattamento dell'emicrania simile a quella di un triptano. Merck in seguito ha sviluppato un altro antagonista del recettore CGRP più potente, MK-3207 che ha mostrato efficacia per il trattamento acuto dell'emicrania in uno studio di fase IIb (*Ho et al.2008*).

6.1.2 Indagini cliniche

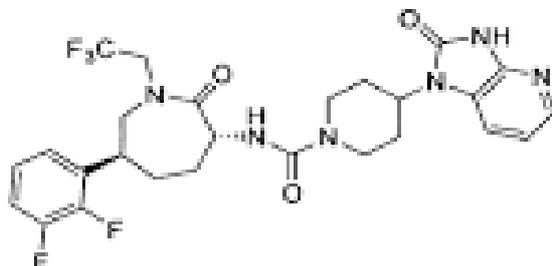
OLCEGEPANT (BIBN4096)



Su questo prodotto furono condotti degli studi per valutarne la sicurezza, la tollerabilità e il profilo farmacocinetico. In un primo studio i ricercatori stabilirono che la somministrazione endovenosa di Olcegepant presentava un favorevole profilo di sicurezza. Non furono osservati cambiamenti clinicamente rilevanti, indotti dal farmaco, della pressione sanguigna, del ritmo del polso, della frequenza respiratoria, dell'elettrocardiogramma, degli esami di laboratorio, o del flusso sanguigno dell'avambraccio anche alla dose più alta sperimentata (10 mg). In un secondo studio fu esaminato se Olcegepant potesse causare vasocostrizione a livello cerebrale. I ricercatori osservarono che questo composto non causava variazioni sulla velocità del flusso sanguigno dei vasi cerebrali e quindi non causava rischi per l'attività cerebrovascolare. In seguito gli stessi ricercatori hanno condotto delle ricerche per capire se Olcegepant era in grado di inibire il mal di testa, quando indotto da CGRP, in volontari sani. L'esito fu che era in grado di inibire l'attacco di emicrania, ma fu anche notato che questo composto aveva scarse capacità di oltrepassare la barriera ematoencefalica.

Uno studio clinico di fase II placebo-controllato, doppio-cieco, randomizzato, multicentrico condotto su 126 pazienti, fornì la prima prova del fatto che gli antagonisti del recettore CGRP sono realmente efficaci nel trattamento acuto dell'emicrania. Ai volontari fu somministrato Olcegepant per via endovenosa. I pazienti dopo 30 minuti notarono un'attenuazione del dolore che migliorava con il passare del tempo e non furono osservati importanti effetti collaterali indotti dal farmaco. (Olesen et al. 2004)

TELCAGEPANT (MK-9074)



Telcagepant fu il primo antagonista del recettore CGRP biodisponibile per via orale ad essere testato clinicamente. In uno studio randomizzato, in doppio cieco, con placebo e con controllo attivo (rizatriptan) di fase II b, 420 pazienti furono trattati con dosi di Telcagepant che andavano da 25 a 600mg. Dosi di Telcagepant di 300-600 mg si dimostrarono più efficaci del placebo nel trattamento di attacchi di emicrania moderata o grave. Le misurazioni venivano fatte dall'inizio fino al primo punto di sollievo dal dolore e a 2h. Altri punti finali rispecchiarono la prima conclusione, tra cui la libertà dal dolore e il miglioramento dei sintomi associati. L'efficacia di Telcagepant (150-300 mg) fu successivamente studiata in una prova di fase III. Fu uno studio randomizzato, doppio cieco, placebo e controllo attivo (zolmitriptan 5mg) che fu eseguito per valutare l'efficacia e la tollerabilità di Telcagepant in pazienti che presentavano un attacco acuto di emicrania. Telcagepant a dosi di 300 mg si dimostrò molto più efficace del placebo nell'eliminare dolore, fonofobia, fotofobia e nausea. L'efficacia di Telcagepant 300 mg e zolmitriptan 5mg fu molto simile, ed entrambi risultarono molto più efficaci di Telcagepant 150 mg (*Ho et al.2008*). Telcagepant fu generalmente ben tollerato con un indice di eventi avversi paragonabile a quelli del placebo. In seguito fu condotta una seconda sperimentazione clinica di fase III per confermare l'efficacia di Telcagepant. In questo studio, Telcagepant 300 mg e 150 mg furono più efficaci del placebo nel fornire libertà dal dolore, sollievo dalla pena, assenza di fono- e fotofobia e nausea, dopo due ore dall'assunzione. In uno studio per valutare la sicurezza a lungo termine e la tollerabilità nel trattamento intermittente per attacchi acuti di emicrania, Telcagepant fu somministrato a 640 pazienti che lo assunsero per trattare fino a 8 attacchi di emicrania al mese per 18 mesi. In questo studio, Telcagepant fu generalmente ben tollerato e ci furono meno eventi avversi rispetto a quelli che avvengono comunemente con l'utilizzo dei triptani, i quali possono provocare astenia, dolore al petto, tensione al torace e parestesia. Questo ha dimostrato che il profilo degli

effetti collaterali con somministrazione intermittente, come richiesto nel trattamento acuto dell'emicrania, è eccellente. Tuttavia, Merck & Co. hanno riscontrato, in prove di fase II che prevedevano la somministrazione di Telcagepant a scopo profilattico, un aumento dei livelli delle transaminasi, in un piccolo numero dei soggetti trattati. Questi individui avevano assunto due dosi giornaliere di Telcagepant 140 o 280 mg per 3 mesi. La dose giornaliera in regime di profilassi era però ben diversa dalla dose usata negli studi di fase III in cui Telcagepant era somministrato ad intermittenza, cioè solo ed esclusivamente durante un attacco acuto di emicrania (*Connor et al.2011*).

6.2 Anticorpi monoclonali

6.2.1 Cos'è un anticorpo

Gli anticorpi, che si possono raggruppare in cinque classi distinte (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), hanno una stessa struttura di base: sono costituiti da due coppie di molecole proteiche, disposte a Y e legate fra loro mediante ponti disolfuro, ossia mediante l'interazione di atomi di zolfo. Due catene proteiche hanno un elevato peso molecolare e sono perciò dette "pesanti"; le altre due hanno un peso inferiore e sono dette "leggere". Sia nelle catene leggere, sia in quelle pesanti vi sono regioni definite costanti, che hanno struttura simile negli anticorpi di una stessa classe; le regioni variabili sono invece estremamente differenziate (cioè formate da amminoacidi diversi) e permettono agli anticorpi il riconoscimento di una enorme quantità di molecole estranee (antigeni). Il riconoscimento tra un anticorpo e un antigene avviene secondo un principio di complementarità dei rispettivi siti di legame.

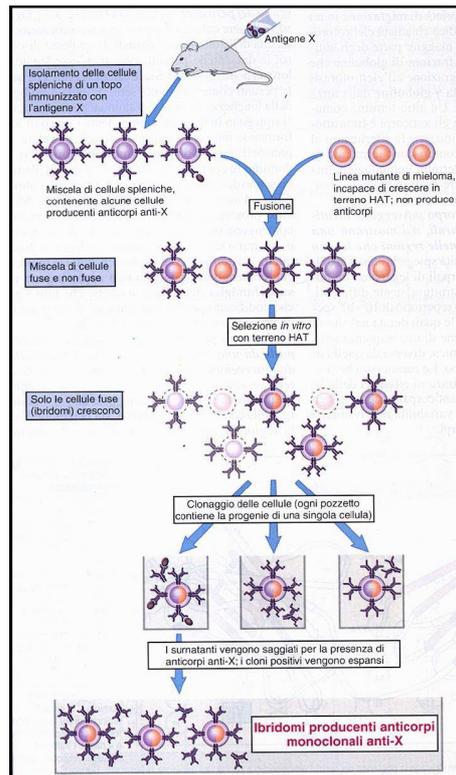
6.2.2 Cos'è un anticorpo monoclonale

Sono anticorpi a specificità nota derivanti da singoli cloni produttori, ossia molecole anticorpali identiche tra loro e specifiche per un certo determinante antigenico. Ogni specifico anticorpo, che riconosce uno specifico epitopo (determinante antigenico), è prodotto da uno specifico linfocita B. Tuttavia i linfociti B coltivati in vitro, muoiono dopo

brevissimo tempo. La scoperta degli anticorpi monoclonali (mAb) risale al 1975, quando 2 ricercatori Cesar Milstein e Georges Kohler (che nel 1984 vinsero il premio Nobel per la medicina) misero a punto la tecnica per la sintesi degli anticorpi monoclonali.

Ripercorrendo le tappe di sviluppo degli mAb, si è passati da strutture derivate da roditori (murini) a proteine ibride (chimeriche o umanizzate) ed infine umane. L'evoluzione è stata guidata dalla necessità di superare un problema di sicurezza dei primi mAb. Si trattava del rischio di immunogenicità derivato dall'utilizzo di proteine non umane e ad altri effetti collaterali.

Per produrre un anticorpo monoclonale specifico per un certo antigene è necessario immunizzare un topo con tale antigene, i linfociti B vengono poi isolati dalla milza o dai linfonodi dell'animale. Si procede poi alla fusione dei linfociti B con la linea immortalizzata adatta. Gli ibridi generati vengono selezionati in terreni di coltura selettivi contenenti ipoxantina, aminopterina e timidina (HAT), in queste condizioni le cellule di mieloma non fuse muoiono, mentre i linfociti B che non si sono fusi non possono sopravvivere per più di due settimane, cresceranno e sopravvivranno così solo gli ibridi. Le cellule fuse vengono poi seminate in diluizione limite, ossia in maniera tale che ogni pozzetto di coltura contenga solo una cellula di ibridoma; i sovrinatanti di ciascun pozzetto vengono quindi saggiati per la presenza di anticorpi in grado di reagire con l'antigene impiegato per l'immunizzazione. Una volta identificati i pozzetti positivi (ossia i pozzetti contenenti l'anticorpo della specificità voluta), le cellule vengono clonate e i cloni produttori l'anticorpo vengono identificati con uno screening simile al primo. Per ottenere grandi quantità di anticorpi è possibile far crescere i cloni di ibridoma che producono anticorpi della specificità voluta in colture su larga scala (*Abbas 2002*).



Nella pratica clinica, gli mAb vengono utilizzati in numerose applicazioni diagnostiche e terapeutiche (sia in quanto tali, sia come agenti veicolatori di farmaci su bersagli specifici).

In ambito terapeutico essi vengono impiegati fondamentalmente come agenti:

- Immunosoppressori
- Antineoplastici
- Inibitori dell'angiogenesi
- Altri (es antiaggreganti)

6.2.3 Anticorpi monoclonali e emicrania

La nuova speranza per i pazienti affetti da emicrania arriva dal 66th Annual Meeting dell'American Academy of Neurology. Peter Goasby dell'Università della California di San Francisco e David Dodick della Mayo Clinic in Arizona hanno presentato i risultati di due studi clinici sull'efficacia e la tollerabilità di due nuovi farmaci anti-emicranici (chiamati ALD403 e LY2951742) e hanno dimostrato che con questi, i pazienti avevano attacchi di emicranie meno frequenti e meno severi. La novità di questi composti è che agiscono bloccando l'azione di un peptide vasodilatatore specificamente associato all'insorgenza

dell'emicrania e quindi prevengono gli attacchi di mal di testa ancor prima che inizino. In altre parole, una terapia profilattica e preventiva. ALD403, prodotto dall'Alder Biopharmaceuticals, e LY2951742, prodotto da Arteaus Therapeutics, sono anticorpi monoclonali che bloccano l'attività del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP). Interferendo con la sua attività, si dovrebbe bloccare l'emicrania prima che insorga. Il primo studio ha coinvolto 163 persone che soffrivano di emicrania con una frequenza di 5-14 giorni al mese. I pazienti erano divisi in due gruppi; il gruppo di controllo che riceveva un placebo e quello sperimentale a cui era somministrata una singola dose di ALD403 per via endovenosa. La frequenza di emicranie e i giorni per mese senza mal di testa erano monitorati per 24 settimane e paragonati prima e dopo il trattamento e con i valori riportati dai soggetti di controllo. I risultati hanno dimostrato che **ALD403** non aveva effetti collaterali dannosi e riduceva in maniera significativa il numero di emicranie. Più precisamente, dopo circa due mesi, gli individui che avevano preso il nuovo farmaco riportavano una diminuzione del 66% del numero di giorni in cui soffrivano di mal di testa, ossia trascorrevano in media 5.6 giorni al mese in più senza emicrania rispetto a 4.6 giorni nei controlli, corrispondente a una riduzione del 52%. Inoltre, dopo 12 settimane, il 16% dei pazienti nel gruppo sperimentale non aveva più nessun attacco di emicrania, mentre nessuno dei controlli era "curato". Gli eventi avversi più frequenti sono state infezioni del tratto respiratorio superiore (sei [7%] pazienti di placebo vs ALD403 sette [9%] pazienti), infezione delle vie urinarie (quattro [5%] contro uno [1%]), affaticamento (tre [4%] vs tre [4%]), mal di schiena (quattro [5%] vs tre [4%]), artralgia (quattro [5%] contro uno [1%]) e nausea e vomito (due [2%] vs tre [4%]).

Risultati simili sono stati ottenuti nel secondo studio clinico, in cui sono state coinvolte 217 persone che soffrivano di emicrania per 4-14 giorni al mese. Il gruppo sperimentale era trattato con **LY2951742**, somministrato per via endovenosa ogni due settimane per 12 settimane. Il nuovo farmaco riduceva il numero di giorni in cui i pazienti erano affetti del 63% rispetto alla situazione iniziale con 4.2 giorni in meno di dolore, mentre nei controlli erano solo 3 i giorni senza mal di testa. LY2951742 è stato segnalato per essere ben tollerato e ha mostrato PK lineare con un t_{1/2} che va da 25 – 30 giorni e una t_{max} da 7 – 14 giorni per la formulazione s.c. Di conseguenza, l'emivita di questo composto è in un range inferiore rispetto agli anticorpi CGRP in sviluppo.

Gli eventi avversi sono stati segnalati in simile misura in entrambi i gruppi: 77 (72%) di 107 pazienti nel gruppo LY2951742 e 74 (67%) di 110 pazienti nel gruppo placebo. I più

comuni eventi avversi sia per il gruppo LY2951742 che placebo sono stati infezioni delle vie respiratorie superiori e infezioni virali.

Nonostante alcuni effetti collaterali indesiderati tra cui dolore nel punto di iniezione, infezioni respiratorie e dolore addominale, LY2951742 è considerato un farmaco efficace e abbastanza tollerato.

Un altro anticorpo monoclonale in studio è **AMG 334**. Questo farmaco si differenzia dai precedenti in quanto è diretto, anziché al peptide stesso, al recettore di CGRP presente a livello del sistema nervoso. In questo modo, la sua azione farmacologica consisterebbe nel blocco totale dei meccanismi fisiologici responsabili dell'insorgenza degli attacchi, rappresentando così un'alternativa più potente e selettiva rispetto alle due precedenti. È stato condotto uno studio multicentrico di fase 2, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, che ha arruolato pazienti di età 18-60 anni, con 4-14 giorni di emicrania al mese, in 59 centri cefalee e di ricerca clinica, nel Nord America e in Europa e li ha assegnati in modo casuale (in un rapporto 3: 2) a placebo o AMG 334 (da 7, 21 o 70 mg). Lo studio è stato registrato su ClinicalTrials.gov col numero NCT01952574. E' in corso una fase di estensione in aperto, per una durata massima di 256 settimane, che valuterà la sicurezza a lungo termine di AMG 334. Dal 6 agosto 2013 al 30 giugno 2014, 483 pazienti sono stati assegnati in modo casuale a placebo (n = 160), AMG 334 7 mg (n = 108), AMG 334 21 mg (n = 108) o AMG 334 70 mg (n = 107). La variazione media nei giorni di emicrania al mese alla 12° settimana è stata -3.4 giorni con AMG 334 70 mg e -2.3 giorni col placebo. Le riduzioni medie dei giorni di emicrania al mese con le dosi di 7 mg (-2.2) e 21 mg (-2.4) non differivano in maniera significativa da quelle del placebo. Sono stati registrati eventi avversi in 82 pazienti (54%), che hanno ricevuto placebo, 54 pazienti (50%) del gruppo AMG 334 7 mg, 54 (51%) del gruppo AMG 334 21 mg e 57 (54%) nel gruppo AMG 334 70 mg. Gli eventi avversi più frequentemente riportati sono stati nasofaringite, spossatezza e mal di testa. Sono stati segnalati eventi avversi gravi in una paziente del gruppo AMG 334 7 mg (rottura cisti ovarica) e in un paziente del gruppo AMG 334 70 mg (emicrania e vertigini), ma sono stati giudicati non correlati al trattamento con AMG 334. Nove pazienti su 317 (3%) hanno avuto anticorpi neutralizzanti. Non è risultata alcuna associazione tra la positività agli anticorpi anti-AMG 334 e gli eventi avversi. Non sono state registrate variazioni di rilievo nei valori delle analisi di laboratorio, negli elettrocardiogrammi, nei parametri vitali. Questi risultati suggeriscono che AMG 334 70 mg potrebbe essere una potenziale terapia per la prevenzione dell'emicrania nei

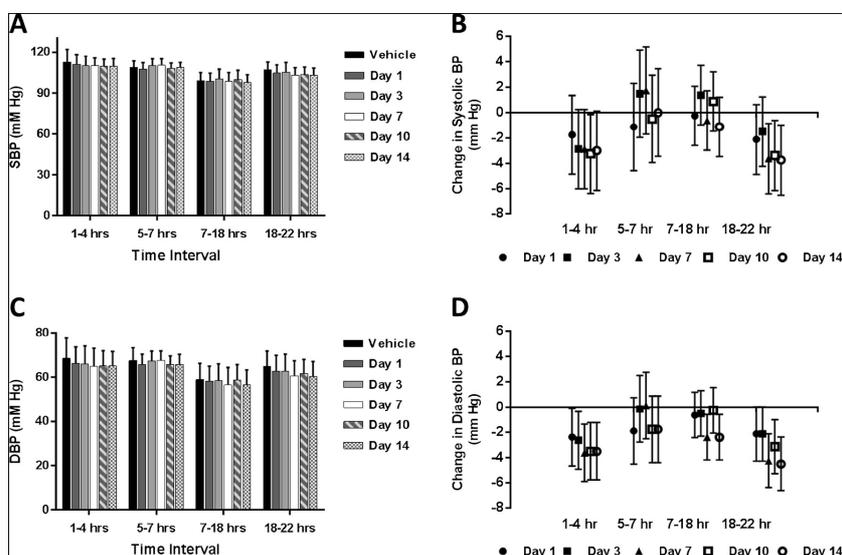
pazienti con emicrania episodica, ma evidenziano anche la necessità di ulteriori indagini su AMG 334 con studi clinici più vasti di fase 3. (H Su *net al.*)

Nuove conferme di efficacia per il farmaco anti-emicrania di **TEV-48125**, i dati derivano dagli studi di fase 2b, relativi ad efficacia e sicurezza sia sull'emicrania episodica che su quella cronica presentati al Meeting annuale dell'American Headache Society (AHS).

TEV-48125 è il primo trattamento sperimentale che ha soddisfatto tutti gli endpoint di efficacia negli studi sia sull' emicrania cronica che episodica e in più dosi. Una singola somministrazione di tutti i dosaggi testati di questa molecola ha determinato un distacco statisticamente significativa rispetto al placebo.

Per esaminare la sicurezza cardiovascolare del TEV-48125, sono stati intrapresi studi nella scimmia cynomolgus. Gli animali sono stati impiantati chirurgicamente con telemetri. Gli animali hanno ricevuto una singola dose di TEV-48125 ; sono stati controllati per 2 settimane, con campionamento dati intensivo 24-h fatto periodicamente nei giorni 1, 3, 7, 10 e 14 post-trattamento. A priori, si potrebbero prevedere aumenti della pressione sanguigna con la somministrazione di un inibitore di CGRP (un potente vasodilatatore). Tuttavia, non c'era nessun aumento osservato in pressione o frequenza cardiaca durante questo studio. Invece, c'erano sporadici diminuzioni nella pressione sanguigna che sono stati giudicati non clinicamente rilevanti.

Concludendo frequenza cardiaca media e la pressione arteriosa (sistolica e diastolica) non sono stati colpiti dal trattamento del TEV-48125, né c'erano eventuali modifiche significative in qualsiasi parametro cardiovascolare dopo il trattamento con SC TEV-48125 (Bigal *et a.* 2014)



Questo farmaco è il primo sulla prevenzione dell'emicrania cronica che dimostra un miglioramento significativo a pochi giorni dall'inizio della terapia con un profilo di sicurezza simile a placebo.

Un totale di 297 persone, con una media di 11,4 giorni di emicrania al mese e una media di 12,5 giorni di cefalea sono stati randomizzati a ricevere placebo o TEV-48125 (225 mg o 675 mg) somministrato mensilmente. I pazienti sono stati autorizzati a continuare a utilizzare altri farmaci contro l'emicrania preventiva se in dosi stabili.

Lo studio è stato uno studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, a gruppi paralleli, studio di confronto su efficacia e la sicurezza di due dosi di TEV-48125 sottocutaneo rispetto al placebo per il trattamento preventivo dell'emicrania episodica ad alta frequenza.

Il trattamento è stato somministrato una volta ogni 28 giorni (cioè, una volta al mese) per un periodo di 3 mesi. I pazienti sono stati arruolati e randomizzati ad uno dei tre bracci di trattamento e hanno ricevuto alte dosi di TEV-48125, basse dosi o placebo, somministrati per via sottocutanea una volta al mese.

Entrambe le dosi di TEV-48125 erano superiori al placebo e hanno soddisfatto l'endpoint primario definito come riduzione dei giorni di emicrania al 3° mese rispetto al basale (placebo=-3,46, 225mg=-6,27, 675 mg=-6,09) così come l'endpoint secondario, definito come diminuzione nei giorni di cefalea mensili rispetto al basale (225 mg).

Inoltre, dopo tre mesi di trattamento, è stata osservata nel campione globale una diminuzione di almeno il 75% nei giorni di emicrania episodica per la durata dello studio nell' 11%, 34% e 31% dei soggetti trattati rispettivamente con placebo, 225mg e 675mg analisi. Il sottogruppo di persone che non avevano utilizzato altri medicinali preventivi dell'emicrania hanno mostrato una riduzione dell'8%, 48% e 36% trattati rispettivamente con placebo, 225mg e 675mg .

I risultati hanno dimostrato che una singola somministrazione di entrambi i dosaggi considerati di TEV-48125 ha determinato un distacco statisticamente significativo rispetto al placebo. Inoltre, sono stati osservati una diminuzione di almeno il 50% dei giorni di emicrania per la durata dello studio nel 28% dei soggetti trattati con placebo rispetto al 53% e 59% degli individui che avevano assunto 225mg e 675mg di farmaco.

Questi risultati sono stati ancora più pronunciati nel sottogruppo di pazienti che non avevano usato altri farmaci preventivi in parallelo ; una diminuzione di almeno il 50% dei

giorni di emicrania episodica è stata osservata nel 22% degli individui trattati con placebo, rispetto al 66% e 67% delle persone che avevano assunto 225mg e 675mg corrispondentemente.

Lo scopo di questa valutazione è stato quello di esaminare l'efficacia e la sicurezza di TEV-48125 al primo mese di terapia nelle persone con emicrania cronica, caratterizzata da mal di testa su almeno 15 giorni al mese.

Lo studio è stato uno studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, controllato con placebo, studio multidose confrontando TEV-48125 con placebo. Dopo 28 giorni di periodo di rodaggio, 264 pazienti sono stati randomizzati a uno dei tre gruppi di trattamento e hanno ricevuto alte dosi di TEV-48125 (900 mg), basse dosi di TEV-48125 (675/225 mg) o placebo, per via sottocutanea una volta al mese per tre mesi.

I risultati hanno dimostrato una diminuzione significativa del numero medio di ore con cefalea, rispetto al placebo, dopo una sola settimana di terapia per entrambe le dosi di TEV-48125, un beneficio che si è esteso nella seconda e terza settimana di terapia. La dose di 900 mg ha evidenziato differenze significative col placebo già dopo 3 giorni di terapia e la dose 675/225mg dopo il giorno 7.

In entrambi gli studi non sono stati riportati eventi avversi gravi correlati al trattamento con l'uso di TEV-48125. Non sono state osservate altre differenze rilevanti nel tasso di eventi avversi emergenti dal trattamento con TEV-48125 rispetto al placebo.

Lo studio è stato condotto in circa 60 centri negli Stati Uniti.

In conclusione, TEV-48125 ha mostrato anche in studi di fase IIb di essere efficace e sicuro contro l'emicrania episodica e cronica. Si aspetta adesso la partenza degli studi di fase III.

7 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state discusse varie classi di farmaci per il trattamento dell'emicrania, dai primi utilizzati fino agli studi più recenti.

Per la terapia dell'attacco acuto sono disponibili vari farmaci: analgesici e antinfiammatori classici, che bloccano la percezione del dolore come acido acetilsalicilico (Aspirina), paracetamolo, ibuprofene, diclofenac; ergotaminici, che causano il restringimento dei vasi cerebrali dilatati: ergotamina, diidroergotamina; triptani, che agiscono sui recettori della serotonina.

Oltre alla farmacoterapia dell'attacco acuto è importante la prevenzione dell'emicrania. Esistono vari farmaci con dimostrata attività profilattica, la cui efficacia deve essere provata a dosaggi idonei e per periodi sufficientemente lunghi prima che uno di essi venga sostituito con un altro. Nella farmacoprofilassi si usano i beta-bloccanti, che bloccano i recettori dell'adrenalina che intermedia le reazioni di stress; calcio-antagonisti, che influenzano l'attività della muscolatura vascolare; sostanze che stabilizzano le proprietà elettriche delle membrane delle cellule nervose come gli anticonvulsivi; antidepressivi triciclici che modificano l'attività di vari neurotrasmettitori come l'amitriptilina. L'obiettivo di una buona profilassi è ridurre o eliminare gli attacchi di emicrania con un dosaggio basso e ben tollerato possibilmente di un singolo farmaco.

Tra i nuovi farmaci mi sono soffermata sugli antagonisti del recettore CGRP e sugli anticorpi monoclonali che agiscono sul peptide CGRP. In questo lavoro ho spiegato le funzioni, i siti in cui si trova il CGRP e il perché esso abbia un ruolo fondamentale nella fisiopatologia dell'emicrania.

Questi nuovi farmaci, antagonisti del recettore CGRP, rappresentano un risultato importante per chi soffre di emicrania. L'efficacia dei nuovi antagonisti è simile a quella dei triptani senza però provocare gli stessi effetti collaterali vasocostrittori o vascolari: in questo modo ne è permesso l'uso anche a quei soggetti che presentano fattori di rischio cardiovascolari. Essi inoltre non hanno effetti collaterali centrali, come sedazione o vertigini, che spesso rappresentano un problema per chi fa uso dei triptani.

Per quanto riguarda gli anticorpi monoclonali la novità di questi composti è che agiscono bloccando l'azione del CGRP specificamente associato all'insorgenza dell'emicrania e quindi prevengono gli attacchi di mal di testa ancor prima che inizino. L'azione

farmacologica consisterebbe nel blocco totale dei meccanismi fisiologici responsabili dell'insorgenza degli attacchi, rappresentando così un'alternativa più potente e selettiva.

Chiaramente, sono necessarie ulteriori indagini che aiutino a capire meglio la fisiopatologia dell'emicrania e la struttura del recettore per essere così in grado di sviluppare nuovi e migliori trattamenti.

8 BIBLIOGRAFIA

Abbas Immunologia cellulare e molecolare IV ediz. Italiana Piccin 2002

Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*. 1985; 229:1094–97. [PubMed: 2994212]

Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*. 1982; 298:240–44. [PubMed: 6283379]

Archbold JK, Flanagan JU, Watkins HA, Gingell JJ, Hay DL. Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends Pharmacol. Sci*. 2011; 32:591–600. [PubMed: 21722971]

Asghar MS, Hansen AE, Amin FM, van der Geest RJ, Koning P, et al. Evidence for a vascular factor in migraine. *Ann. Neurol*. 2011; 69:635–45. [PubMed: 21416486]

Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Olesen J. Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain*. 2000; 86:133–38. [PubMed: 10779670]

Ashina M. Vascular changes have a primary role in migraine. *Cephalalgia*. 2012; 32:428–30. [PubMed: 22523234]

Benarroch EE. CGRP: sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology*. 2011; 77:281–87. [PubMed: 21768598]

Benschop RJ, Collins EC, Darling RJ, Allan BW, Leung D, et al. Development of a novel antibody to calcitonin gene-related peptide for the treatment of osteoarthritis-related pain. *Osteoarthr. Cartil*. 2014; 22:578–85. [PubMed: 24508775]

Bigal ME, Walter S, Rapoport AM. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and migraine: current understanding and state of development. *Headache*. 2013; 53:1230–44. [PubMed: 23848260]

Bigal ME, Walter S, Rapoport AM. The vasodilatory activity of CGRP: a response. *Headache*. 2014;54:748–9.

Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* 2002; 8:136–42. [PubMed: 11821897]

Breeze AL, Harvey TS, Bazzo R, Campbell ID. Solution structure of human calcitonin gene-related peptide by ¹H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. *Biochemistry.* 1991; 30:575–82. [PubMed: 1988044]

Brennan KC, Charles A. An update on the blood vessel in migraine. *Curr. Opin. Neurol.* 2010; 23:266–74. [PubMed: 20216215]

Bullock CM, Kelly S. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonists: beyond migraine pain---a possible analgesic strategy for osteoarthritis? *Curr. Pain Headache Rep.* 2013; 17:375.

Cabarrocas X et al. Equivalent efficacy of oral almotriptan, a new 5HT_{1B/1D} agonist, compared with sumatriptan 100 mg (abstr.) *Headache* 1998; 38: 377.

Cernuda-Morollón E, Larrosa D, Ramón C, Vega J, Martínez-Camblor P, Pascual J. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. *Neurology.* 2013; 81:1191–96. [PubMed: 23975872]

Charles A. Migraine is not primarily a vascular disorder. *Cephalalgia.* 2012; 32:431–32. [PubMed: 22523235]

Charles A. The evolution of a migraine attack -- a review of recent evidence. *Headache.* 2013; 53:413–19. [PubMed: 23278169]

Connor KM, Aurora SK, Loeys T, Ashina M, Jones C, et al. Long-term tolerability of telcagepant for acute treatment of migraine in a randomized trial. *Headache.* 2011; 51:73–84. [PubMed: 21070230]

Connor KM, Shapiro RE, Diener HC, Lucas S, Kost J, et al. Randomized, controlled trial of telcagepant for the acute treatment of migraine. *Neurology.* 2009; 73:970–77. [PubMed: 19770473]

Cui XP, Ye JX, Lin H, Mu JS, Lin M. Efficacy, safety, and tolerability of telcagepant in the treatment of acute migraine: a meta-analysis. *Pain Pract.* 2013 doi: 10.1111/papr.12158.

De Tommaso M, Ambrosini A, Brighina F, Coppola G, Perrotta A, et al. Altered processing of sensory stimuli in patients with migraine. *Nat. Rev. Neurol.* 2014; 10:144–55. [PubMed: 24535465]

Diener HC, Barbanti P, Dahlöf C, Reuter U, Habeck J, Podhorna J. BI 44370 TA, an oral CGRP antagonist for the treatment of acute migraine attacks: results from a phase II study. *Cephalalgia*. 2011; 31:573–84. [PubMed: 21172952]

Diener HC, Dodick DW, Aurora SK, Turkel CC, DeGryse RE, et al. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 2 trial. *Cephalalgia*. 2010; 30:804–14. [PubMed: 20647171]

Diener HC, Lampl C, Reimnitz P, Voelker M. Aspirin in the treatment of acute migraine attacks. *Expert Rev. Neurother*. 2006; 6:563–73. [PubMed: 16623655]

Dodick DW, Goadsby PJ, Spierings EL, Scherer JC, Sweeney SP, Grayzel DS. Safety and efficacy of LY2951742, a monoclonal antibody to calcitonin gene-related peptide, for the prevention of migraine: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol*. 2014; 13:885–92. [PubMed: 25127173]

Doods H, Arndt K, Rudolf K, Just S. CGRP antagonists: unravelling the role of CGRP in migraine. *Trends Pharmacol. Sci*. 2007; 28:580–87. [PubMed: 17963849]

Edvinsson L. CGRP blockers in migraine therapy: Where do they act? *Br. J. Pharmacol*. 2008; 155:967–69.

Eftekhari S, Salvatore CA, Calamari A, Kane SA, Tajti J, Edvinsson L. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience*. 2010; 169:683–96. [PubMed: 20472035]

Ferrari MD. 311C90: increasing the options for therapy with effective acute antimigraine 5HT_{1B/1D} receptor agonists. *Neurology* 1997; 48(suppl 3): S21.

Fischer MJM, Koulchitsky S, Messlinger K. The nonpeptide calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096BS lowers the activity of neurons with meningeal input in the rat spinal trigeminal nucleus. *J. Neurosci*. 2005; 25:5877–83. [PubMed: 15976076]

Gallagher RM, Dennish G, et al. A comparative trial of zolmitriptan and sumatriptan for the acute oral treatment of migraine. *Headache* 2000; 40(2): 119-28.

Goadsby PJ et al. Eletriptan in acute migraine: a double-blind placebo controlled comparison to sumatriptan. *Neurology* 2000; 54:156.

Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann. Neurol.* 1990; 28:183–87. [PubMed: 1699472]

Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine --- current understanding and treatment. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346:257–70. [PubMed: 11807151]

Goadsby PJ. The vascular theory of migraine---a great story wrecked by the facts. *Brain.* 2009; 132:6–7. [PubMed: 19098031]

H Sun, DW Dodick, S Silberstein, PJ Goadsby, U Reuter, M Ashina, J Saper, R Cady, Y Chon, J Dietrich, R Lenz,

Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M. Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia.* 2010; 30:1179–86. [PubMed: 20855363]

Hawkins K, Wang S, Rupnow M. Direct cost burden among insured US employees with migraine. *Headache.* 2008; 48:553–63. [PubMed: 18070057]

Hay DL, Poyner DR, Quirion R. International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the calcitonin gene-related peptide subtype 2 receptor. *Pharmacol. Rev.* 2008; 60:143-45. [PubMed: 18552275]

Headache Classif. Subcomm. Intl. Headache Society. The International Classification of Headache Disorders. 2nd. Vol. 24. *Cephalalgia*; 2004. p. 9-160.

Héroux M, Hogue M, Lemieux S, Bouvier M. Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:31610–20. [PubMed: 17785463]

Hewitt DJ, Aurora SK, Dodick DW, Goadsby PJ, Ge YJ, et al. Randomized controlled trial of the CGRP receptor antagonist MK-3207 in the acute treatment of migraine. *Cephalalgia.* 2011; 31:712–22. [PubMed: 21383045]

Ho TW, Connor KM, Zhang Y, Pearlman E, Koppenhaver J, Fan X, Lines C, Edvinsson L, Goadsby PJ, Michelson D. Randomized controlled trial of the CGRP receptor antagonist telcagepant for migraine prevention. *Neurology.* 2014; 83:958–966. [PubMed: 25107879]

Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6:573–82. [PubMed: 20820195]

Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, et al. Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *Lancet*. 2008; 372:2115–23. [PubMed: 19036425]

Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, et al. Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology*. 2008; 70:1304–12. [PubMed: 17914062]

Hoare SRJ “Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to class B G-protein-coupled receptors” *Drug Discov Today* (2005) 10: 417–427.

Jamieson DJ. The safety of triptans in the treatment of patients with migraine. *Am J Med* 2002; 112: 135.

Joshi P, Anderson C, Binch H, Hadida S, Yoo S, et al. Identification of potent CNS-penetrant thiazolidinones as novel CGRP receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2014; 24:845–49. [PubMed: 24405707]

Kaiser EA, Russo AF. CGRP and migraine: could PACAP play a role too? *Neuropeptides*. 2013; 47:451–61. [PubMed: 24210136]

Kam-Hansen S, Jakubowski M, Kelley JM, Kirsch I, Hoaglin DC, et al. Altered placebo and drug labeling changes the outcome of episodic migraine attacks. *Sci. Translational Med*. 2014; 6:218ra5.

Keam SJ. Almotriptan: a review of its use in migraine. *Drugs* 2002; 62:387.

Lambert GA. The lack of peripheral pathology in migraine headache. *Headache*. 2010; 50:895–908. [PubMed: 20546324]

Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*. 2002; 22:54–61. [PubMed: 11993614]

Levy D, Burstein R. The vascular theory of migraine: leave it or love it? *Ann. Neurol*. 2011; 69:600–1. [PubMed: 21520229]

Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II. *Headache*. 2001; 41:646–57. [PubMed: 11554952]

Loder E. Triptan therapy in migraine. *N. Engl. J. Med*. 2010; 363:63–70. [PubMed: 20592298]

Marcus R, Goadsby PJ, Dodick D, Stock D, Manos G, Fischer TZ. BMS-927711 for the acute treatment of migraine: a double-blind, randomized, placebo controlled, dose-ranging trial. *Cephalalgia*. 2014; 34:114–25. [PubMed: 23965396]

Martin GR. Inhibition of the trigemino-vascular system with 5-HT(1D) agonist drugs: selectively targeting additional sites of action. *Eur Neurol* 1966; 36(suppl 2): 13.

Menken M, Munsat TL, Toole JF. The Global Burden of Disease Study: implications for neurology. *Arch. Neurol*. 2000; 57:418–20. [PubMed: 10714674]

Messlinger K. Migraine: Where and how does the pain originate? *Exp. Brain Res*. 2009; 196:179–93. [PubMed: 19288089]

Miranda LP, Shi L, Holder JR, Wright M, Gegg CV, et al. Peptide antagonists of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biopolymers*. 2013; 100:422–30. [PubMed: 23868210]

Moore Eric L. , Salvatore Cristopher A. “ Targeting a Family B GPCR/RAMP Receptor Complex:CGRP Receptor Antagonists and Migraine ” *British Journal of Pharmacology* (2012) 166: 66-78.

Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, et al. Differential expression of α -CGRP and β -CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience*. 1988; 25:195–205. [PubMed: 2839796]

Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, et al. Calcitonin gene--related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N. Engl. J. Med*. 2004; 350:1104–10. [PubMed: 15014183]

Peroutka SJ. Calcitonin gene-related peptide targeted immunotherapy for migraine: Progress and challenges in treating headache. *BioDrugs*. 2014; 28:237–44. [PubMed: 24452707]

Petersen KA, Birk S, Kitamura K, Olesen J. Effect of adrenomedullin on the cerebral circulation: relevance to primary headache disorders. *Cephalalgia*. 2009; 29:23–30. [PubMed: 19126117]

Petersen KA, Lassen LH, Birk S, Lesko L, Olesen J. BIBN4096BS antagonizes human α -calcitonin gene related peptide--induced headache and extracerebral artery dilatation. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2005; 77:202–13. [PubMed: 15735614]

Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4:386–98. [PubMed: 12728266]

Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, et al. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54:233–46. [PubMed: 12037140]

Raddant AC, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation. *Expert Rev. Mol. Med.* 2011; 13:e36. [PubMed: 22123247]

Recober A, Kuburas A, Zhang Z, Wemmie JA, Anderson MG, Russo AF. Role of calcitonin gene-related peptide in light-aversive behavior: implications for migraine. *J. Neurosci.* 2009; 29:8798–804. [PubMed: 19587287]

Recober A, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide: an update on the biology. *Curr. Opin. Neurol.* 2009; 22:241–46. [PubMed: 19434786]

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature.* 1983; 304:129–35. [PubMed: 6346105]

Russo AF, Kuburas A, Kaiser EA, Raddant AC, Recober A. A potential preclinical migraine model: CGRP-sensitized mice. *Mol. Cell Pharmacol.* 2009; 1:264–70. [PubMed: 20336186]

Russo AF, Nelson C, Roos BA, Rosenfeld MG. Differential regulation of the coexpressed calcitonin/ α -CGRP and β -CGRP neuroendocrine genes. *J. Biol. Chem.* 1988; 263:5–8. [PubMed: 3257211]

Russo, AF.; Dickerson, IM. CGRP: a multifunctional neuropeptide. In: Lajtha, A.; Lim, R., editors. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer; New York: 2006. p. 391-426.

Ryan R et al. Sumatriptan nasal spray for the acute treatment of migraine. Results of two clinical studies. *Neurology* 1997; 49:1225-30.

Schytz HW, Schoonman GG, Ashina M. What have we learnt from triggering migraine? *Curr. Opin. Neurol.* 2010; 23:259–65. [PubMed: 20173638]

Sexton PM, Christopoulos G, Christopoulos A, Nylen ES, Snider RH Jr, Becker KL. Procalcitonin has bioactivity at calcitonin receptor family complexes: potential mediator implications in sepsis. *Crit. Care Med.* 2008; 36:1637–40. [PubMed: 18434892]

Smillie SJ, King R, Kodji X, Outzen E, Pozsgai G, et al. An ongoing role of α -calcitonin gene-related peptide as part of a protective network against hypertension, vascular hypertrophy, and oxidative stress. *Hypertension*. 2014; 63:1056–62. [PubMed: 24516108]

Spierings EL et al. Oral almotriptan vs. oral sumatriptan in the abortive treatment of migraine: a double-blind, randomized, parallel-group, optimum-dose comparison. *Arch Neurol* 2001; 58:944-50.

Stewart WF, Wood C, Reed ML, Roy J, Lipton RB, AMPP Advis. Group. Cumulative lifetime migraine incidence in women and men. *Cephalalgia*. 2008; 28:1170–78. [PubMed: 18644028]

ter Haar E, Koth CM, Abdul-Manan N, Swenson L, Coll JT, et al. Crystal structure of the ectodomain complex of the CGRP receptor, a class-B GPCR, reveals the site of drug antagonism. *Structure*. 2010; 18:1083–93. [PubMed: 20826335]

Tfelt-Hansen P, De Vries P, Saxena P. Triptans in migraine. A comparative review of pharmacology, pharmacokinetics and efficacy. *Drugs* 2000; 60(6): 1259-87.

Tfelt-Hansen P, Le H. Calcitonin gene-related peptide in blood: Is it increased in the external jugular vein during migraine and cluster headache? A review. *J. Headache Pain*. 2009; 10:137–43. [PubMed: 19330286]

Tfelt-Hansen P, Olesen J. Possible site of action of CGRP antagonists in migraine. *Cephalalgia*. 2011; 31:748–50. [PubMed: 21383046]

Tfelt-Hansen P, Olesen J. Taking the negative view of current migraine treatments: the unmet needs. *CNS Drugs*. 2012; 26:375–82. [PubMed: 22519921]

Thomsen LL et al. 311C90 (zolmitriptan), a novel centrally and peripheral acting oral 5-hydroxytryptamine-1D agonist: a comparison of its absorption during a migraine attack and in a migraine-free period. *Cephalalgia* 1996; 16: 270.

Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, Iversen HK, Schifter S, Olesen J. No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine. *Ann. Neurol*. 2005; 58:561–68. [PubMed: 16178016]

van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 1997; 21:649–78. [PubMed: 9353797]

- Villalón CM, Olesen J. The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs. *Pharmacol. Ther.* 2009; 124:309–23. [PubMed: 19796656]
- Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL. Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2010; 31:476–83. [PubMed: 20633935]
- Walker CS, Hay DL. CGRP in the trigeminovascular system: a role for CGRP, adrenomedullin and amylin receptors? *Br. J. Pharmacol.* 2013; 170:1293–307.
- Woods IG, Schoppik D, Shi VJ, Zimmerman S, Coleman HA, et al. Neuropeptidergic signaling partitions arousal behaviors in zebrafish. *J. Neurosci.* 2014; 34:3142–60. [PubMed: 24573274]
- Zhang Z, Dickerson IM, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide receptor activation by receptor activity-modifying protein-1 gene transfer to vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 2006; 147:1932–40. [PubMed: 16373421]
- Zhang Z, Winborn CS, Marquez de Prado B, Russo AF. Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion. *J. Neurosci.* 2007; 27:2693–703. [PubMed: 17344407]

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto grazie alla mia relatrice, la professoressa Maria Cristina Breschi, per il suo prezioso aiuto nel mio lavoro di tesi e per la disponibilità e la cortesia avuta nei miei confronti.

Grazie di cuore ai miei genitori che mi hanno permesso di terminare gli studi, incoraggiandomi e sostenendomi nei momenti difficili credendo sempre in me e non dubitando mai che avrei raggiunto questo traguardo.

Grazie anche alle mie fantastiche sorelle Giusi e Alessia che in tutti questi anni mi sono state vicine in tutti i modi, aiutandomi a studiare (anche se non capivano quasi nulla di ciò che ripetevo, soprattutto quando si trattava delle varie strutture e sintesi dei composti chimici), incoraggiandomi e spronandomi.

Un grazie particolare alla mia migliore amica Illyria che, anche se lontana, mi ha fatto sempre sentire il suo appoggio e sostegno.

Nel 2010 mi sono trasferita qui in Toscana a completare gli studi e in questi anni ho conosciuto persone stupende; sto parlando delle mie colleghe Eva, Virginia, Donatella, Rebecca, Elisa e Maria. Grazie a loro ho potuto affrontare al meglio questo trasferimento perché, non solo sono state preziose per lo studio, ma posso davvero affermare di aver trovato delle vere e sincere amiche che mi sono state vicine nei brutti momenti dandomi sostegno e soprattutto nei momenti belli come il mio matrimonio.

A proposito del mio matrimonio, un grazie speciale a mio marito Daniele. Grazie amore per tutto ciò che hai fatto, hai sempre creduto in me e non puoi immaginare quanto è stato importante il tuo sostegno, la tua forza, la tua fiducia, il tuo amore. Hai sempre messo me e i miei bisogni prima di tutto, prima di te. Grazie mi sembra poco ma è la parola più giusta, semplice, diretta e sincera che mi viene da dentro.

Grazie ai miei suoceri Ivo e Franca che hanno sempre creduto in me e mi sono stati vicini dandomi il sostegno di un padre e una madre perché è ciò che sono per me, altri due genitori.

Sono tante le persone da ringraziare perché ho la fortuna di avere accanto molti amici; grazie a tutti.

Infine voglio ringraziare una persona che non è più con noi, mio nonno Stefano; sarebbe stato tanto felice e orgoglioso, lui che mi chiamava dottoressa già dal giorno di iscrizione

all'università e lo diceva a tutti di avere una nipote "dottoressa". Ce l'ho fatta nonno, adesso lo puoi dire davvero, questo giorno è arrivato e lo dedico a te.