



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 278 391**

(51) Int. Cl.:

C07D 207/46 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

C07C 239/22 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97927958 .5**

(86) Fecha de presentación : **30.05.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1021406**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2000**

(54) Título: **Nuevos inhibidores de anandamida amidasa como agentes analgésicos.**

(30) Prioridad: **31.05.1996 US 658949**

(73) Titular/es: **The University of Connecticut
The Graduate Center
438 Whitney Road Extension
Storrs, Connecticut 06269-1133, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

(72) Inventor/es: **Makriyannis, Alexandros;
Lin, Sonyan y
Hill, William, Adam**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos inhibidores de anandamida amidasa como agentes analgésicos.

5 Antecedentes

Δ^9 -Tetrahidrocannabinol, el cannabinoido psicoactivo derivado de la marihuana, se une al receptor CB1 en el cerebro y al receptor CB2 en el bazo. Se ha demostrado que los compuestos que estimulan el receptor CB1 inducen analgesia y sedación, provocan un aumento del estado de ánimo, controlan las náuseas y el apetito y disminuyen la presión intraocular (Mechoulam, *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL (1986), Fride and Mechoulam, *Eur. J. Pharmacol.* 231/313 (1993), Crawley *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46:967 (1993) y Smith *et al.*, *J. Pharm. Exp. Therap.* 270:219 (1994)). Se ha demostrado también que los cannabinoides suprimen el sistema inmune (Mechoulam, *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL (1986)). De esta manera, los compuestos que estimulan el receptor CB1 o CB2, directamente o indirectamente, son potencialmente útiles en el tratamiento de glaucoma, evitando el rechazo de tejidos en pacientes con transplante de órganos, controlando las náuseas en pacientes sometidos a quimioterapia, controlando el dolor y potenciando el apetito y controlando el dolor en individuos con Síndrome Debilitante por SIDA.

La araquidonil etanolamida (anandamida) es un constituyente del cerebro de origen natural que actúa como agonista de CB1 y CB2 y presenta actividad farmacológica en ratones comparable a los cannabinoides (Fride y Mechoulam (1993), Crawley *et al.* (1993) y Smith *et al.* (1994)). La anandamida se escinde *in vivo* por anandamida amidasa. De esta manera, los inhibidores de anandamida amidasa tienen el efecto de estimular indirectamente los receptores de CB1 y CB2 aumentando *in vivo* los niveles de anandamida.

Además de actuar en los receptores CB1 y CB2, los cannabinoides afectan también a las membranas celulares, produciendo de esta manera efectos secundarios indeseables tales como somnolencia, deterioro de la función de monoamina oxidasa y deterioro de la función cerebral no mediada por receptor. Las propiedades adictivas y psicotrópicas de los cannabinoides limitan también su valor terapéutico. No se espera que los inhibidores de anandamida amidasa tengan los efectos secundarios indeseados relacionados con membrana producidos por los cannabinoides. Proporcionando un mecanismo alternativo para estimular los receptores CB1 y CB2, los inhibidores de anandamida pueden no tener las propiedades adictivas y psicotrópicas de los cannabinoides. Sin embargo, los presentes inhibidores de anandamida amidasa tienen desventajas. Por ejemplo, fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF) es tóxico para las células. De esta manera, hay una necesidad de inhibidores de anandamida amidasa nuevos y más potentes que tengan una toxicidad reducida hacia las células y que no interaccionen significativamente con el receptor CB1 o CB2 a concentraciones inhibidoras.

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto que los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos aromáticos análogos de los ácidos grasos de cadena larga con grupos de cabecera que pueden unirse irreversiblemente a un grupo nucleófilo en un sitio activo de la enzima son potentes inhibidores de anandamida amidasa. Por ejemplo, se descubrió que el fluoruro de palmitilsulfonilo aumentaba el nivel de anandamida no degradada 55 veces a 10 nM en células intactas de neuroblastoma (Ejemplo 1) y, por lo tanto, es más de 100 veces más potente que fluoruro de fenilmetsulfonilo para inhibir anandamida amidasa. Al mismo tiempo, los inhibidores descritos en este documento tienen una baja afinidad por el receptor CB1 (Ejemplo 3). Por ejemplo, la afinidad de unión de fluoruro de palmitilsulfonilo por el receptor CB1 es de aproximadamente 10 veces menor que por anandamida. Además, se ha descubierto que el fluoruro de palmitilsulfonilo provoca algunos de los mismos efectos farmacológicos en ratas que los compuestos que estimulan el receptor CB1 directamente, tales como Δ^9 -tetrahidrocannabinol. Por ejemplo, en este documento se demuestra que el fluoruro de palmitilsulfonilo induce analgesia en ratas (Ejemplo 4). Basándose en estos resultados, se describen procedimientos de inhibición de anandamida amidasa, que estimulan también los receptores CB1 y CB2, en un individuo o animal. Se describen también nuevos compuestos que inhiben anandamida amidasa.

La presente solicitud describe un procedimiento de inhibición de anandamida amidasa en un individuo o un animal. El procedimiento comprende administrar al individuo o al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la Fórmula Estructural I:



y sales fisiológicamente aceptables del mismo.

R se selecciona entre el grupo constituido por un grupo metilo, un grupo arilo, un grupo arilo sustituido, un grupo heteroarilo, que tiene de 5 a 6 átomos en el anillo, un grupo heteroarilo sustituido, un grupo heterocíclico y un grupo heterocíclico sustituido.

X es un grupo hidrocarbilo de cadena lineal o un grupo hidrocarbilo sustituido de cadena lineal que contiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 18 átomos de carbono si R es un grupo arilo, un grupo arilo sustituido, un grupo heteroarilo, un grupo heteroarilo sustituido, un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido.

ES 2 278 391 T3

X es un grupo hidrocarbilo o un grupo hidrocarbilo sustituido que contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 24 átomos de carbono si R es un grupo metilo.

Y es un resto como se describirá posteriormente en la página 7 que puede unirse irreversiblemente con un grupo nucleófilo en el sitio activo de una enzima amidasa.

Los compuestos descritos en este documento tienen usos terapéuticos. Por ejemplo, los compuestos de Fórmula I de la presente invención, tales como cannabinoides, pueden aliviar el dolor provocado por el cáncer y las náuseas resultantes de la quimioterapia del cáncer. No se espera que tengan los efectos secundarios indeseables relacionados con membranas asociados con los cannabinoides. Además, se espera que los compuestos de formula I sean inmunosupresores y, por lo tanto, pueden usarse para evitar el rechazo de órganos en un individuo que está sometido a un transplante de un órgano. Como los compuestos de Fórmula 1 de la presente invención potencian el apetito de un individuo, pueden usarse en la fabricación de un medicamento que se usa para tratar pacientes con Síndrome Debilitante por SIDA, que a menudo padecen malnutrición como resultado de la pérdida de apetito.

Los nuevos inhibidores de anandamida amidasa descritos en este documento tienen también usos en investigación. Por ejemplo, pueden usarse para mantener el nivel de anandamida *in vitro* para estudiar el efecto de anandamida sobre las células y para mantener el nivel de anandamida *in vivo* para estudiar el efecto de anandamida sobre individuos y animales. Pueden usarse para caracterizar células, por ejemplo para determinar si un tipo celular tiene actividad cannabimética o amidasa. Por ejemplo, los inhibidores pueden usarse para determinar si una población celular expresa anandamida amidasa poniendo en contacto las células con un inhibidor y determinando después si hay un aumento en la concentración de anandamida. Los inhibidores de anandamida descritos en este documento pueden usarse también como adyuvantes en el diseño de fármaco, por ejemplo como control en ensayos para ensayar otros compuestos para su capacidad para inhibir anandamida amidasa y para determinar los requisitos de actividad de la estructura de los inhibidores de anandamida amidasa.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un gráfico que muestra el efecto de fluoruro de palmitilsulfonilo y fluoruro de fenilmetilsulfonilo sobre los niveles de anandamida en células de neuroblastoma (N18TG2).

Las Figs. 2A-2E son gráficos que muestran los valores de IC_{50} para la inhibición de anandamida amidasa por (A) fluoruro de laurilsulfonilo; (B) fluoruro de miristilsulfonilo; (C) fluoruro de palmitilsulfonilo; (D) fluoruro de estearilsulfonilo; y (E) fluoruro de araquidilsulfonilo.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra las curvas logarítmicas dosis-respuesta para fluoruro de palmitilsulfonilo (K_i es 350,4), araquidonil trifluorometilo (K_i es 1325) cetona y araquidonil etanolamida (K_i es 70,03) en competición con $[H^3]CP-55940$ que se une a CB1.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el efecto en ratas de la coadministración de fluoruro de palmitilsulfonilo con anandamida, fluoruro de palmitilsulfonilo y anandamida sobre el tiempo que tarda un ratón ligeramente reprimido en dar un coletazo lejos de un estímulo de calor radiante (ensayo de “coletazo de rata”), medido por el porcentaje máximo de posible efecto.

Descripción detallada de la invención

La inhibición de anandamida amidasa da como resultado un aumento de los niveles de anandamida en el individuo o animal, provocando de esta manera un aumento de la estimulación de los receptores de cannabinoide en el individuo o animal, por ejemplo, el receptor CB1 en el cerebro y el receptor CB2 en el bazo. De esta manera, los compuestos de Fórmula I de acuerdo con la presente invención pueden estimular los receptores de cannabinoide en un individuo o animal.

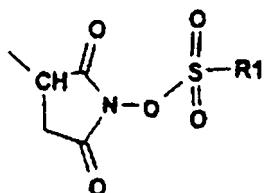
“Y” en la Fórmula Estructural I es un resto como se describirá posteriormente a continuación que puede unirse irreversiblemente con un grupo nucleófilo en el sitio activo de una enzima amidasa. De esta manera, Y puede formar un enlace covalente estable con el grupo nucleófilo en el sitio activo de una enzima amidasa. Las estructuras para Y, por lo tanto, no abarcan restos, tales como trifluorometil cetonas, que pueden actuar como un estado de transición análogo de una enzima amidasa y que se unen reversiblemente a estas enzimas. Como se usa en este documento, una “amidasa” es una enzima implicada en la hidrólisis de un enlace amida.

Un grupo nucleófilo en el sitio activo de una enzima amidasa es un grupo funcional que contiene un heteroátomo en la cadena lateral de un aminoácido encontrado en el sitio activo de la enzima e incluye el grupo hidroxilo de serina o treonina, el grupo tiol de cisteína, el grupo fenol de tirosina y el grupo amino de lisina, ornitina o arginina o el grupo imidazol de histidina.

ES 2 278 391 T3

Las estructuras para Y son:

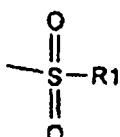
5



10

15 y

20



;

25

R1 se selecciona entre el grupo constituido por -F y -O (grupo alquilo C₁ a C₄ de cadena lineal o ramificada).

Como se usa en este documento, “un grupo hidrocarbilo de cadena lineal” incluye un polialquileno, es decir, -(CH₂)_n- . “n” es un número entero positivo de aproximadamente 10 a aproximadamente 24, cuando R es metilo, y de aproximadamente 4 a aproximadamente 18, cuando R es arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclico o heterociclico sustituido. Un grupo hidrocarbilo de cadena lineal incluye también dos o más grupo polialquilenos conectados mediante uno o más uniones éter, tioéter éter, *cis*-alquenilo, *trans*-alquenilo o alquinilo de manera que el número total de átomos de carbono del metileno es de aproximadamente 10 a aproximadamente 24 cuando R es metilo y de aproximadamente 4 a 18 cuando R es arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclico o heterociclico sustituido. Los ejemplos incluyen -(CH₂)_m-O-(CH₂)_o- , -(CH₂)_m-S-(CH₂)_o- , -(CH₂)_m-CH=CH-(CH₂)_o- , -(CH₂)_m-C=C-(CH₂)_o- , en las que cada uno de m y o es un número entero positivo de manera que la suma de m y o es igual a n. Los ejemplos específicos incluyen cuando X es -(CH₂)₄-(*cis*-CH=CHCH₂)₄-CH₂CH₂- , -(CH₂)₄-(*cis*-CH=CHCH₂)₃-(CH₂)₅- y cuando R-X- es un resto docosatetraenilo o un homo- γ -linolenilo.

En un aspecto de la presente invención, R en el compuesto que se está administrando para inhibir anandamida amidasa es metilo e Y es un fluoruro de sulfonilo o un sulfonil éster C₁ a C₄ de cadena lineal o ramificada. Preferiblemente, Y es un fluoruro de sulfonilo. Los ejemplos específicos de fluoruros de sulfonilo y sulfonil ésteres incluyen cuando R-X- es araquidilo, $\Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ -eicosatrienilo, docosatetraenilo, homo- γ -linolenilo y CH₃-(CH₂)_n- , en la que n es 10 (laurilo), 11,12 (miristilo), 13, 14 (palmitilo), 15 o 16 (estearilo).

45

Como se usa en este documento, un grupo “arilo” es un sistema de anillo aromático carbocíclico tal como fenilo, 1-naftilo o 2-naftilo. Un grupo “heteroarilo” es un sistema de anillo aromático que contiene uno o más heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen 2-furanilo, 3-furanilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridinilo, 3-piridinilo, 4-piridinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo, 5-pirazolilo, 2-pirazinilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo y 5-tiazolilo. Los grupos “heteroarilo” incluyen también sistemas policíclicos condensados en los que uno o más grupo arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico se condensan a otro grupo heteroarilo. Los ejemplos incluyen 2-benzotienilo, 3-benzotienilo, 2-benzofuranilo, 3-benzofuranilo, 2-indolilo, 2-quinolinilo y 3-quinolinilo.

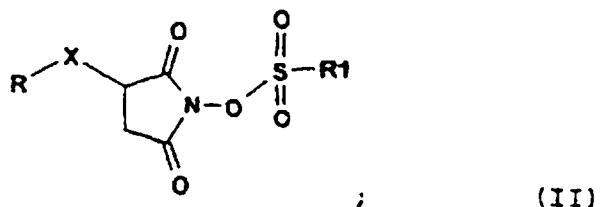
55

Como se usa en este documento, un grupo “heterocíclico” es un sistema de anillo no aromático que contiene uno o más heteroátomos tales como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los ejemplos incluyen 2-tetrahidrofuranilo, 3-tetrahidrofuranilo, 2-tetrahidrotiofenilo, 3-tetrahidrotiofenilo, 2-morfolino, 3-morfolino, 4-morfolino, 2-tiomorfolino, 3-tiomorfolino, 4-tiomorfolino, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo y 4-tiazolidinilo.

Los sustituyentes adecuados en un grupo hidrocarbilo de cadena lineal incluyen metilo, etilo, hidroxi, hidroximetilo, tiol, metoxi, etoxi y hidroxi. Los sustituyentes adecuados en un grupo arilo, heteroarilo o heterociclico incluyen grupos tales como alquilo inferior, arilo, heteroarilo, (alquilo inferior)-O-, (arilo o arilo sustituido)-O-, halo, -CO-O(alquilo inferior), -CHO, -CO-(alquilo inferior), -CO-NH(alquilo inferior), -CO-N(alquilo inferior)₂, -NO₂, -CF₃, -CN, y (alquilo inferior)-S-. Un grupo alquilo inferior es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada de C₁ a aproximadamente C₅.

ES 2 278 391 T3

La presente invención se refiere también a nuevos compuestos que pueden usarse para inhibir anandamida amidasa. En una realización, el compuesto tiene una estructura representada por la Fórmula Estructural (II):



15 y sales fisiológicamente aceptables del mismo. R1 es -F o (alquilo C₁ a C₄)O-. R y X son como se han definido anteriormente para la Fórmula Estructural (I).

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto, como se usa en este documento; es la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un individuo o animal, da como resultado un nivel suficientemente alto de anandamida en el individuo o animal para provocar un aumento o disminución distinguible en una actividad celular afectada o controlada por los receptores de cannabinoide. Por ejemplo, la anandamida puede estimular la transducción de señal mediada por el receptor que conduce a la inhibición de adenilato ciclase estimulada por forscolina (Vogel *et al.*, *J. Neurochem.* 61: 352 (1993)). La anandamida provoca también la inhibición parcial de las corrientes de calcio de tipo N por una ruta de la proteína G sensible a la toxina pertussis, independientemente del metabolismo de AMPc (Mackie *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 47:711 (1993)).

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un inhibidor de anandamida puede ser también una cantidad que da como resultado un nivel suficientemente alto de anandamida en un individuo o animal para provocar un efecto fisiológico resultante de la estimulación de los receptores de cannabinoide. Los efectos fisiológicos que resultan de la estimulación del receptor de cannabinoide incluyen analgesia, disminución de las náuseas resultantes de quimioterapia, sedación y aumento del apetito. Otras funciones fisiológicas incluyen aliviar la presión intraocular en pacientes con glaucoma y supresión del sistema inmune. Típicamente, una “cantidad terapéuticamente eficaz” del compuesto varía de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 1000 mg/día.

³⁵ Como se usa en este documento, un “individuo” se refiere a un ser humano. Un “animal” se refiere a animales veterinarios, tales como perros, gatos, caballos, y similares, y animales de granja, tales como vacas, cerdos, cobayas y similares.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse mediante diversos procedimientos conocidos, incluyendo por vía oral, rectal, o parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa, subcutánea, nasal o tópica). La forma en la que se administran los compuestos se determinará según la vía de administración. Dichas formas incluyen, aunque sin limitación a formulaciones capsulares y comprimidos (para administración oral y rectal), formulaciones líquidas (para administración oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea) y microvehículos de liberación lenta (para administración rectal, intramuscular o intravenosa). Las formulaciones pueden contener también un vehículo fisiológicamente aceptable y adyuvantes, aromatizantes, colorantes y conservantes opcionales. Los vehículos fisiológicamente aceptable adecuados pueden incluir solución salina, agua estéril, solución de Ringer, y soluciones isotónicas de cloruro sódico. El nivel de dosificación específico del ingrediente activo dependerá de numerosos factores, incluyendo, por ejemplo, la actividad biológica de la preparación particular, la edad, peso corporal, sexo y salud general del individuo a tratar.

50 Los procedimientos generales de preparación de fluoruros de sulfonilo, las N-[(alquil-sulfonil)oxi]succinimidas de la presente invención y las N-O-diacilhidroxilaminas de referencia se proporcionan en el Ejemplo 5, Ejemplo 6 y Ejemplo 7, respectivamente.

La invención se describirá ahora adicional y específicamente mediante los siguientes ejemplos.

55 Ejemplos

Ejemplo 1

60 *Aumento de los Niveles de [³H] Anandamida en Células de Neuroblastoma en Presencia de Fluoruro de Palmitil Sulfonilo*

El ensayo de la anandamida amidasa en células intactas de neuroblastoma se realizó como se ha descrito anteriormente (Deutsch, D. G. y S.A. Chin, *Biochem. Pharmacol.* 46:791-796 (1993)). Los experimentos se realizaron con 4 x 10⁶ células de neuroblastoma (N18TG2)/6-cm platillo. Las células experimentales se incubaron en 2 ml de medios, compuestos por F-12 de Hams/medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Inc.) con penicilina, estreptomicina, y gentamicina más suero de ternero bovino al 10% (HyClone, Logan, UT), más la concentración indicada de inhibidor durante 20 minutos. Todas las células se desarrollaron a 37°C en una atmósfera humidificada que

5 contenía CO₂ al 5% en aire. Se añadió [³H]Anandamida (0,2 µCi de 221 Ci/mmol de [³H] anandamida) y la incubación continuó durante 1 hora. Las células de control no contenían inhibidor. Al final de la incubación, las células se lavaron una vez con los medios de cultivo celular y se retiraron de las placas, después de una breve incubación con 2 ml de tripsina al 0,05% en solución 0,53 mM de EDTA a 37°C. Las cantidades de [³H] anandamida, [³H] fosfolípidos, y [³H] araquidonato en las células y medios se cuantificaron por recuento mediante centelleo líquido de la sílice fragmentada de las áreas apropiadas de la placa después de interrumpir la reacción con cloroformo metanol (1:1), extracción de la muestra en la fase orgánica, y análisis por TLC sobre placas con canales recubiertos con gel de sílice, con un sistema de disolventes cuya fase orgánica estaba compuesta por una mezcla acetato de etilo:hexano:ácido acético:agua (100:50:20:100).

10 El nivel de [³H] anandamida encontrado en las células de neuroblastoma incubadas con fluoruro de palmitilsulfonilo, con fluoruro de fenilmetilsulfonilo y en las células de control se muestra en la Figura 1. Fueron suficientes cantidades nanomolares de fluoruro de palmitilsulfonilo de manera que se encontró sobre el 50% de la radioactividad en anandamida, en lugar de en productos de escisión de anandamida tales como araquidonato. Este resultado indica
15 que el fluoruro de palmitilsulfonilo es muy eficaz para inhibir anandamida amidasa. Fueron necesarias concentraciones mayores de 10 micromolar de fluoruro de fenilmetilsulfonilo para conseguir niveles comparables de inhibición de anandamida amidasa. Se observó la degradación casi completa de [³H] anandamida en células de control.

Ejemplo 2

Determinación de los Valores de CI₅₀ para Inhibidores de Fluoruro de Sulfonilo de Anandamida Amidasa

20 El ensayo de la anandamida amidasa *in vitro* se realizó como se ha descrito anteriormente (Deutsch, D. G. y S.A. Chin, *Biochem. Pharmacol.* 46:791-796 (1993)). La cantidad indicada de cada compuesto se preincubó en un tampón compuesto por 300 µg de homogenato proteico bruto de cerebro de rata, 500 µg/ml de albúmina de suero bovina sin ácido graso, en solución salina tamponada con fosfato en un volumen final de 1,0 ml, durante 10 minutos a 37°C. El homogenato bruto de cerebro de rata se obtuvo decapitando ratas hembra adulto Sprague-Dawley, diseccionando el tejido deseado y homogeneizando en cinco volúmenes de TE enfriado con hielo (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6). El sustrato (anandamida 27,7 µM + 0,2 µCi de 221 Ci/mmol de [³H] anandamida ([araquidonil-5,6,8,9,11,12,14,15-³H] etanolamida)) (obtenida del National Institute on Drug Abuse) se añadió después y las muestras se incubaron durante 10 minutos. La reacción se interrumpió mediante la adición de cloroformo:metanol (1:1) y la actividad enzimática se analizó por TLC como se ha descrito en el Ejemplo 1.

25 Los resultados para fluoruro de laurilsulfonilo, fluoruro de miristilsulfonilo, fluoruro de palmitilsulfonilo, fluoruro de estearilsulfonilo y fluoruro de araquidilsulfonilo se muestran en la Figura 2. Todos los compuestos eran inhibidores eficaces de anandamida amidasa. Todos los compuestos excepto fluoruro de araquidilsulfonilo tenían una CI₅₀ de menos de 10 nM. El fluoruro de araquidilsulfonilo era un inhibidor eficaz de anandamida amidasa a concentraciones menores de 100 nM.

Ejemplo 3

Fluoruro de Palmitilsulfonilo se Une Menos Eficazmente al Receptor CB1 que Anandamida

30 Para las determinaciones de unión al ligando CBR1, se prepararon membranas de cerebro a partir de cerebros de rata congelados de acuerdo con el procedimiento publicado por Devane *et al.* (Devane, W.A., *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 34:605-613 (1988)). La cuantificación de la unión de los análogos de ácido graso a CB1 se realizó incubando los análogos a la concentración indicada con 30 µg de proteína de membrana en un tampón que contenía 500 pm del análogo cannabinoide bicíclico [³H]CP-55940, Tris-Cl 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 3 mM, Tris-EDTA 1 mM, y 0,135 mg/ml de albúmina de suero bovina deficiente en ácido graso en un volumen final de 200 µl en tubos de vidrio tratados con Regisil. La unión específica se definió como aquella a la que podría mostrarse mediante desacetillevonantradol 100 nM. Después de 60 minutos a 30°C, la incubación se terminó por adición de 250 µl de 50 mg/ml de albúmina de suero bovina y la filtración inmediata sobre filtros GF/B y lavado con tampón enfriado con hielo (Tris-Cl 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 2 mM). Los filtros se trataron con dodecil sulfato sódico al 0,1% antes de la adición de la mezcla de centelleo y el recuento en un contador de centelleo líquido.

35 La curva logarítmica de dosis-respuesta para fluoruro de palmitilsulfonilo, araquidonil trifluorometil cetona y araquidonil etanolamida en competición con [³H]CP-55940 por la unión a CB1 se muestra en la Figura 3. Esta figura muestra que el fluoruro de palmitilsulfonilo se une al receptor CB1 con menos del 10% la eficacia de la araquidonil etanolamida.

Ejemplo 4

El Fluoruro de Palmitilsulfonilo Induce Analgesia en Ratas

40 Se prepararon mezclas de fármacos mezclando con dos partes de Tween 80 en peso y dispersando en una solución acuosa de NaCl al 0,9% p/v (solución salina) como se ha descrito anteriormente para Δ⁹-THC (Pertwee *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 105:980 (1992)).

ES 2 278 391 T3

Las mezclas de fármacos se inyectaron por vía intravenosa a ratones MF1 macho que pesaban 23-29 gramos. La analgesia se midió mediante un "ensayo de coletazo de rata" en el que se observó el tiempo que tardaba un ratón ligeramente reprimido para dar un coletazo y alejarse de un estímulo de calor radiante. Los procedimientos se basan en el ensayo descrito por D'Amour y Smith (D'Amour, F.E., Smith, D. L, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 72:74-79 (1941)).

- 5 Los ratones se sometieron al coletazo a los -30 minutos (latencia de control) y a los 12 minutos (latencia de ensayo). La latencia máxima de coletazo fue de 10 s retirando del aparato los ratones que no respondieron dentro de este tiempo para evitar la lesión de los tejidos. La analgesia se calculó como porcentaje máximo del posible efecto expresando la proporción (latencia de ensayo - latencia de control)/(latencia de control 10-s) como porcentaje (Compton, D. R., *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260: 201-209 (1992)). La temperatura ambiente se mantuvo entre 20 y 22°C. Los valores
10 se han expresado como medias y los límites de error como errores típicos. Se ha usado el ensayo de Dunnett para calcular la significancia de las diferencias entre el efecto medio de cada tratamiento con fármaco y el efecto medio del vehículo, Tween 80.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Palmitilfluoruro de sulfonilo y anandamida co-administrados con fluoruro de palmitilsulfonilo fueron aproximadamente 3 veces más eficaces para producir analgesia en los ratones que la anandamida sola aproximadamente 13 veces más eficaces que el vehículo.
15

Ejemplo 5

20 *Fluoruros de Alquilsulfonilo*

Se añadió bromuro de alquilmagnesio en éter seco a una solución agitada de cloruro de sulfurilo (un exceso de 2 veces) en hexano a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0°C y después el baño de hielo se retiró y se continuó agitando durante una noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó al vacío y el producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice dando el cloruro de alquilsulfonilo correspondiente en forma de un sólido blanco.
25

El cloruro de alquilsulfonilo se disolvió en acetona y se añadió fluoruro de amonio con un exceso de 10 veces mientras se agitaba a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas. Después se filtró para retirar la sal insoluble, el disolvente se evaporó y el producto se secó al vacío. Se añadió agua para hidrolizar cualquier cloruro de alquilsulfonilo no reaccionado y la mezcla acuosa se extrajo con éter. Los extractos etéreos se combinaron, se secaron, se filtraron y el disolvente se retiró al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice dando el fluoruro de alquilsulfonilo correspondiente.
30

35 Ejemplo 6

Alquil-N-[alquil-sulfonil]oxi]Succinimidas

La condensación de Stobbe de aldehídos con succinato de dietilo da los correspondientes monoetil ésteres del ácido 40 alquenilsuccínico que se hidrogenan catalíticamente y posteriormente se hidrolizan dando los ácidos alquilsuccínicos correspondientes. Los ácidos se mezclan con un exceso de anhídrido acético y se calientan a reflujo durante 1 hora. El exceso de anhídrido acético se retira al vacío. La destilación al vacío da los anhídridos alquilsuccínicos puros.

Los productos puros se disuelven en tolueno seco y se llevan a reflujo. Se añade una cantidad equimolar de (benziloxi)amina en tolueno y las mezclas se calientan a reflujo durante 30 minutos. Las soluciones calientes se filtran a través de sulfato sódico anhidro y el disolvente se retira en un evaporador rotatorio. Los residuos se disuelven en acetato de etilo y se lavan con bicarbonato sódico al 10% dos veces y después se purifican por cromatografía en columna sobre gel de sílice.
45

50 Las 3-alquenil-N-(benziloxi)succinimidas resultantes se hidrogenolizan con Pd al 10%-C durante 3 horas. Las mezclas de reacción se filtran después a través de un lecho de Celite y el disolvente se retiró al vacío. Las 3-alquil-N-hidroxisuccinimidas producidas se disuelven después en tolueno seco y se tratan con piridina seca y diversos cloruros de alquilsulfonilo. Las reacciones se agitan durante una noche a temperatura ambiente en anticuerpo de nitrógeno y después se interrumpen con la adición de HCl 2 N. Los productos se extraen con acetato de etilo (dos veces), se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se purificaron por cromatografía en columna.
55

Ejemplo de Referencia - 7

N-O-diacilhidroxilaminas

60 Los ésteres de metilo de diversos ácidos carboxílicos se tratan con un exceso de hidroxilamina en metanol. Cantidadas equimolares de KOH y diversos cloruros de ácido disueltos en THF se añaden a las soluciones acuosas de los ácido hidroxámicos a 0-5°C para dar las *N,O*-diacilhidroxilaminas correspondientes.

65 *Equivalentes*

Los especialistas en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas específicamente en este documento.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para usar como analgésico, para reducir las náuseas, como sedante, para estimular el apetito, para reducir la presión intraocular, o para suprimir el sistema inmune en un individuo o animal, estado representado el compuesto por la siguiente fórmula estructural:



10 y sales fisiológicamente aceptables del mismo, en la que:

R se selecciona entre el grupo constituido por un grupo metilo, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 6 átomos en el anillo o un sistema policíclico condensado que contiene dicho grupo heteroarilo, y un grupo heterociclico sustituido o no sustituido, en la que los sustituyentes en el grupo arilo, el grupo heteroarilo o el grupo heterociclico se seleccionan entre alquilo inferior, arilo, heteroarilo, (alquilo inferior)-O-, (arilo o arilo sustituido)-O-, halo, -CO-O(alquilo inferior), -CHO, -CO-(alquilo inferior), -CO-NH(alquilo inferior), -CO-N(alquilo inferior)₂, -NO₂, -CF₃, -CN, y (alquilo inferior)-S-; X es un grupo hidrocarbilo sustituido o no sustituido de cadena lineal que

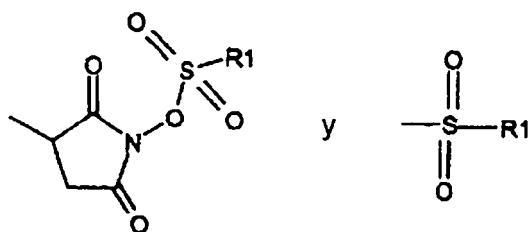
20 a) es un grupo polialquileno que contiene de 10 a 24 átomos de carbono del metileno si R es un grupo metilo o de 4 a 18 átomos de carbono del metileno si R es un grupo arilo, un grupo arilo sustituido, un grupo heteroarilo, un grupo heteroarilo sustituido, un grupo heterociclico o un grupo heterociclico sustituido; o

25 b) incluye dos o más grupo polialquilenos conectados mediante una o más uniones éter, tioéter éter, cis-alquenilo, trans-alquenilo o alquinilo de manera que el número total de átomos de carbono del metileno es de 10 a 24 si R es un grupo metilo o de 4 a 18 si R es un grupo arilo, un grupo arilo sustituido, un grupo heteroarilo, un grupo heteroarilo sustituido, un grupo heterociclico o un grupo heterociclico sustituido, y

30 en la que los sustituyentes en el grupo hidrocarbilo se seleccionan entre metilo, etilo, hidroxi, hidroximetilo, tiol, metoxi y etoxi; y

Y es un resto que puede unirse irreversiblemente a un grupo nucleófilo en el sitio activo de una enzima amidasa y se selecciona entre el grupo constituido por:

35



45

en las que:

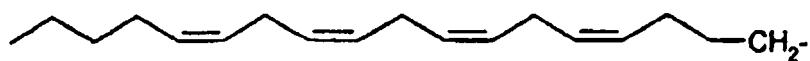
R1 se selecciona entre el grupo constituido por -F y -O(grupo alquilo C₁ a C₄ de cadena lineal o ramificada).

50 2. El uso de la reivindicación 1 en el que Y es -SO₂O(grupo alquilo C₁ a C₄ de cadena lineal o ramificada).

3. El uso de la reivindicación 1 en el que Y es -SO₂OCH₃.

4. El uso de la reivindicación 3 en el que R-X- es:

55

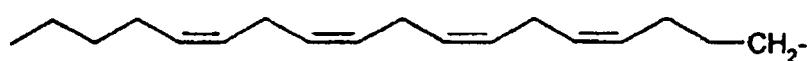


60 5. El uso de la reivindicación 1 en el que R-X- es CH₃-(CH₂)_n-, en la que n es un número entero de 10 a 24.

6. El uso de la reivindicación 1 en el que Y es -SO₂F.

7. El uso de la reivindicación 6 en el que R-X- es:

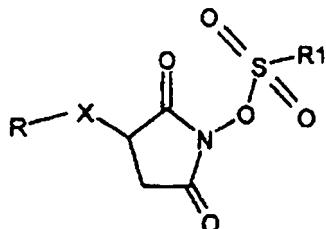
65



ES 2 278 391 T3

8. El uso de la reivindicación 6 en el que R-X- es $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, en la que n es un número entero de 10 a 24.
9. El uso de la reivindicación 8 en el que n es 14.
- 5 10. Un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:

10



15

y sales fisiológicamente aceptables del mismo, en la que R1, R y X son como se han definido en la reivindicación 1.

20 11. El compuesto de la reivindicación 10 en el que R-X- es $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, en la que n es un número entero de 10 a 24.

12. El compuesto de la reivindicación 11 en el que R1 es -F.

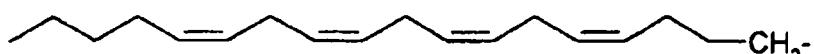
25 13. El compuesto de la reivindicación 10 en el que:

R se selecciona entre el grupo constituido por un grupo arilo, un grupo arilo sustituido, un grupo heteroarilo, un grupo heteroarilo sustituido, un grupo heterociclico y un grupo heterociclico sustituido; y X es $-(\text{CH}_2)_m-$, en la que m es un número entero de 4 a 18.

30 14. El compuesto de la reivindicación 13 en el que R1 es -F.

15. El compuesto de la reivindicación 10 en el que R-X- está representado por la siguiente fórmula estructural:

35



50

16. Un compuesto para usar en terapia, estando el compuesto

40 (a) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15; o

(b) como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

45 17. Un compuesto de la reivindicación 16 en el que la terapia comprende analgesia, reducción de las náuseas, sedación, estimulación del apetito, reducción de la presión intraocular, o supresión del sistema inmune.

55

60

65

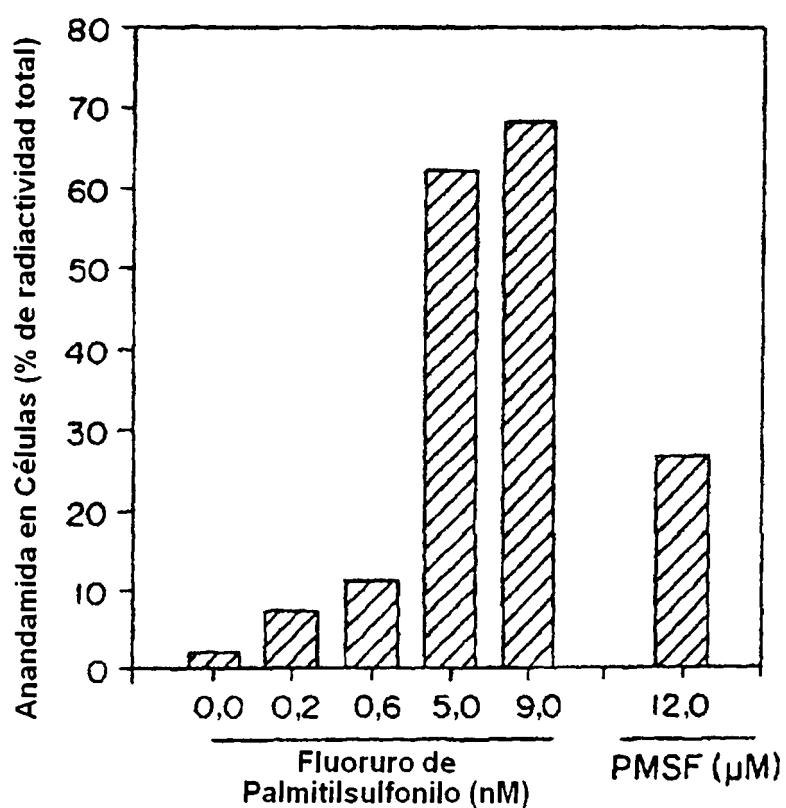


FIG. I

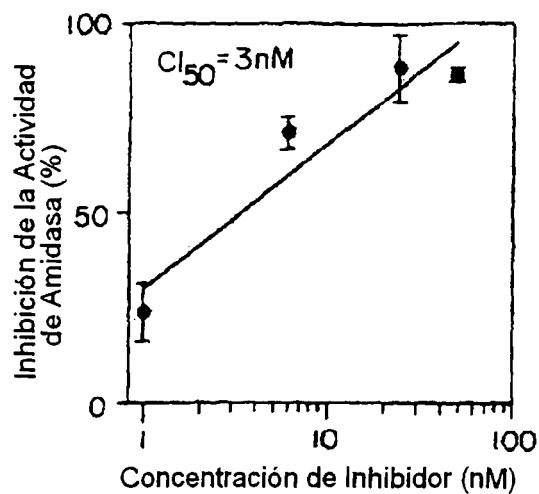


FIG. 2A

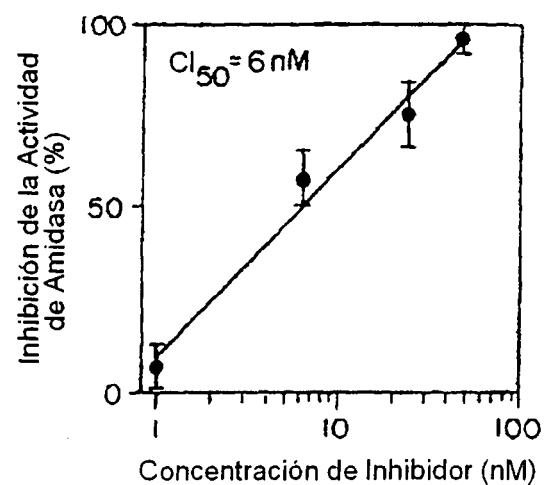


FIG. 2B

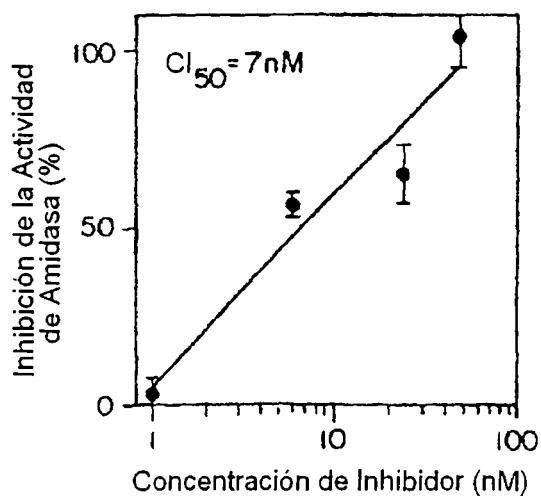


FIG. 2C

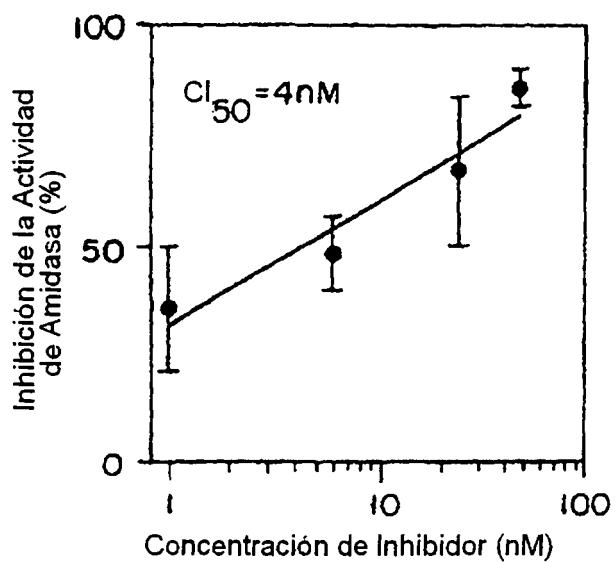


FIG. 2D

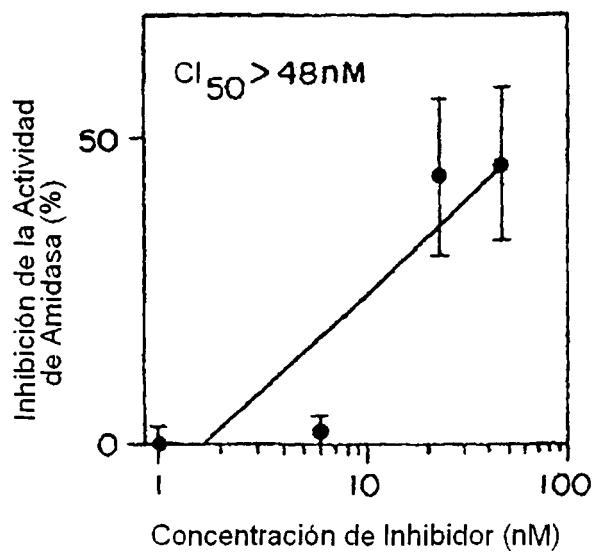


FIG. 2E

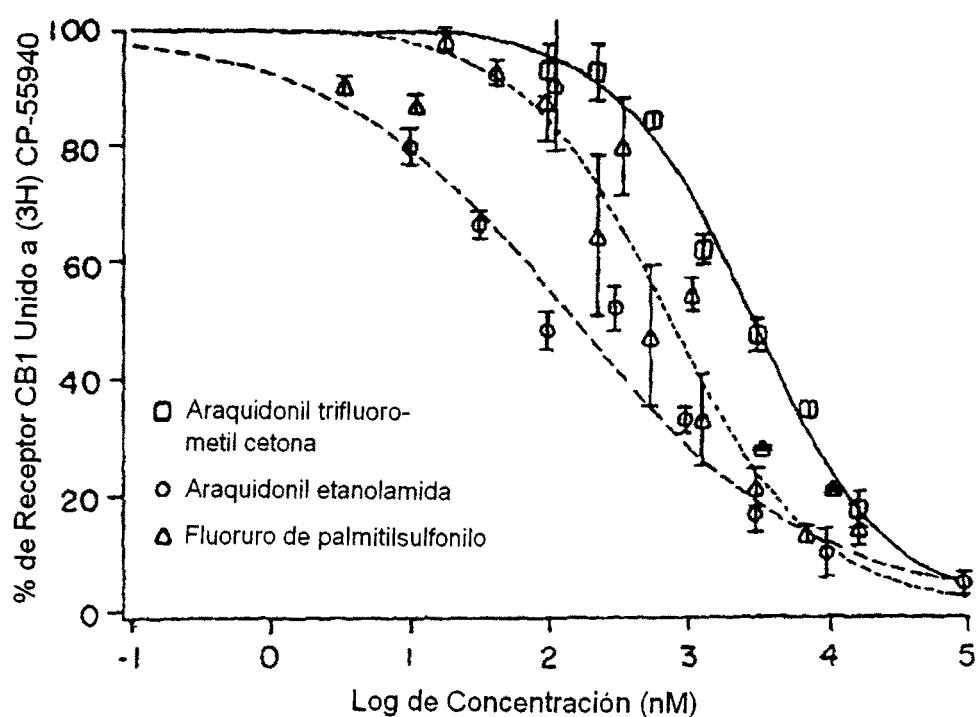


FIG. 3

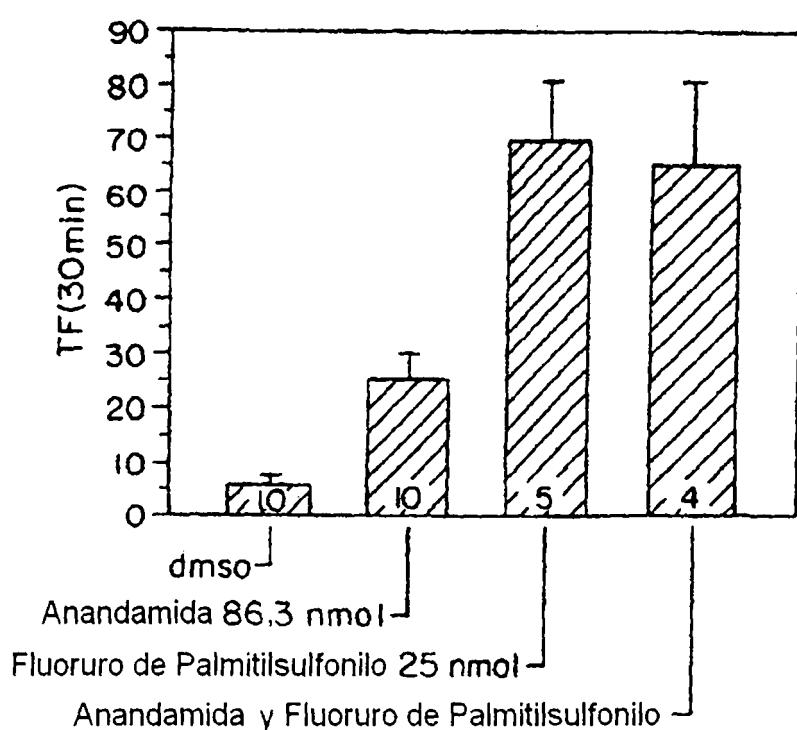


FIG. 4