

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 303 275**

(51) Int. Cl.:

C07C 335/12 (2006.01)**C07C 335/16** (2006.01)**C07C 311/21** (2006.01)**C07C 311/37** (2006.01)**A61K 31/17** (2006.01)**A61K 31/18** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05796943 .8**(86) Fecha de presentación : **18.10.2005**(87) Número de publicación de la solicitud: **1805138**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**(54) Título: **Compuestos sulfonamido que antagonizan con el receptor vaniloide TRPV1.**(30) Prioridad: **26.10.2004 IT MI04A2042**(73) Titular/es: **Pharmeste S.R.L.**
Via Fossato di Mortara 17/19
44100 Ferrara, IT(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008(72) Inventor/es: **Baraldi, Pier Giovanni;**
Borea, Pier Andrea y
Geppetti, Pierangelo(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008(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

Compuestos sulfonamido que antagonizan con el receptor vaniloide TRPV1.

5 Campo de la invención

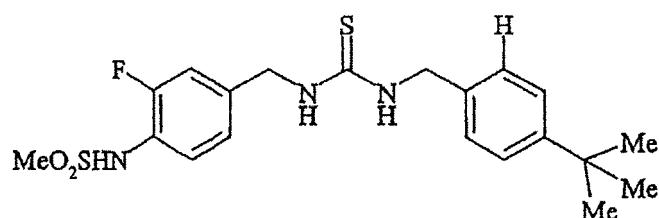
La presente invención se refiere a antagonistas del receptor vaniloide, en particular a derivados sulfonamido que antagonizan con el receptor TRPV1.

10 Antecedentes de la invención

Las evidencias experimentales recientes han demostrado que la expresión del receptor vaniloide TRPV1 (canal receptor de potencial transitorio) aumenta en las afecciones inflamatorias. Esto permite plantear la hipótesis de que los antagonistas de TRPV1 podrían ser útiles para el tratamiento de los procesos inflamatorios, por ejemplo, del dolor crónico y de la hiperalgesia inflamatoria.

Se conocen distintos antagonistas del receptor vaniloide; algunos de ellos derivan de la capsaicina y se denominan antagonistas capsaicinoides. En particular, Wrigglesworth, R. *et al.* (J. Med. Chem. 1996, 39, 4941-4951) revelan la tiourea de fórmula (II):

20

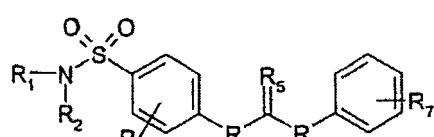


(III)

35 Revelación de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I)

40



45

(I)

50

en la que:

R₁ es hidrógeno;

55 R₂ es bencilo o 2-feniletilo, en los que el anillo aromático está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados entre halógeno, hidroxi y metoxi;

R₃ es hidrógeno, halógeno o un grupo alcoxi;

60 R₄ es un grupo -(CH₂)_nNH, en el que n oscila entre 0 y 3;

R₅ es S u O;

65 R₆ es -NHCH₂-;

R₇ es *t*-butilo o trifluorometilo.

ES 2 303 275 T3

Para los propósitos de la presente invención, halógeno significa flúor, cloro, bromo o yodo.

Los compuestos de fórmula (I) preferidos son aquellos en los que R₅ es S y R₆ es un grupo -NHCH₂-; en particular, aquellos en los que R₃ es hidrógeno y R₇ se selecciona entre 4-*t*-butilo o 4-trifluorometilo.

5 Entre ellos, un primer grupo de compuestos preferidos es aquel en el que n de R₄ es 0.

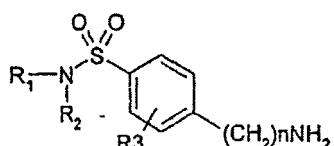
Un segundo grupo de compuestos preferidos es aquel en el que n del grupo R₄ es 2: entre ellos, son particularmente preferidos los compuestos en los que R₁ es hidrógeno y R₂ es bencilo o 2-feniletilo, sustituido opcionalmente como se indicó anteriormente.

10 En los compuestos de fórmula (I) en los que R₂ es bencilo o 2-feniletilo, en los que el anillo aromático está sustituido, se prefieren aquellos en los que R₂ es 2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencilo.

15 Los compuestos de fórmula (I) con actividad probada como inhibidores del receptor vaniloide TRPV1 y que, por tanto, se pueden usar en la preparación de composiciones farmacéuticas para la terapia de estados de inflamación, por ejemplo, dolor crónico e hiperalgesia inflamatoria. Estas formulaciones se prepararán mediante procedimientos y excipientes convencionales, tales como los descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII Ed. Mack Pub., N.Y., USA.

20 Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar, convenientemente, según técnicas convencionales conocidas, por ejemplo, por reacción de una sulfonamida de fórmula (III):

25



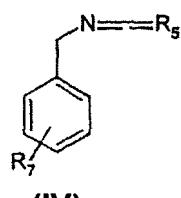
(III)

35

en la que R₁, R₂, R₃ y n son como se definió anteriormente;

con un isocianato o un isotiocianato de fórmula (IV)

40



(IV)

45

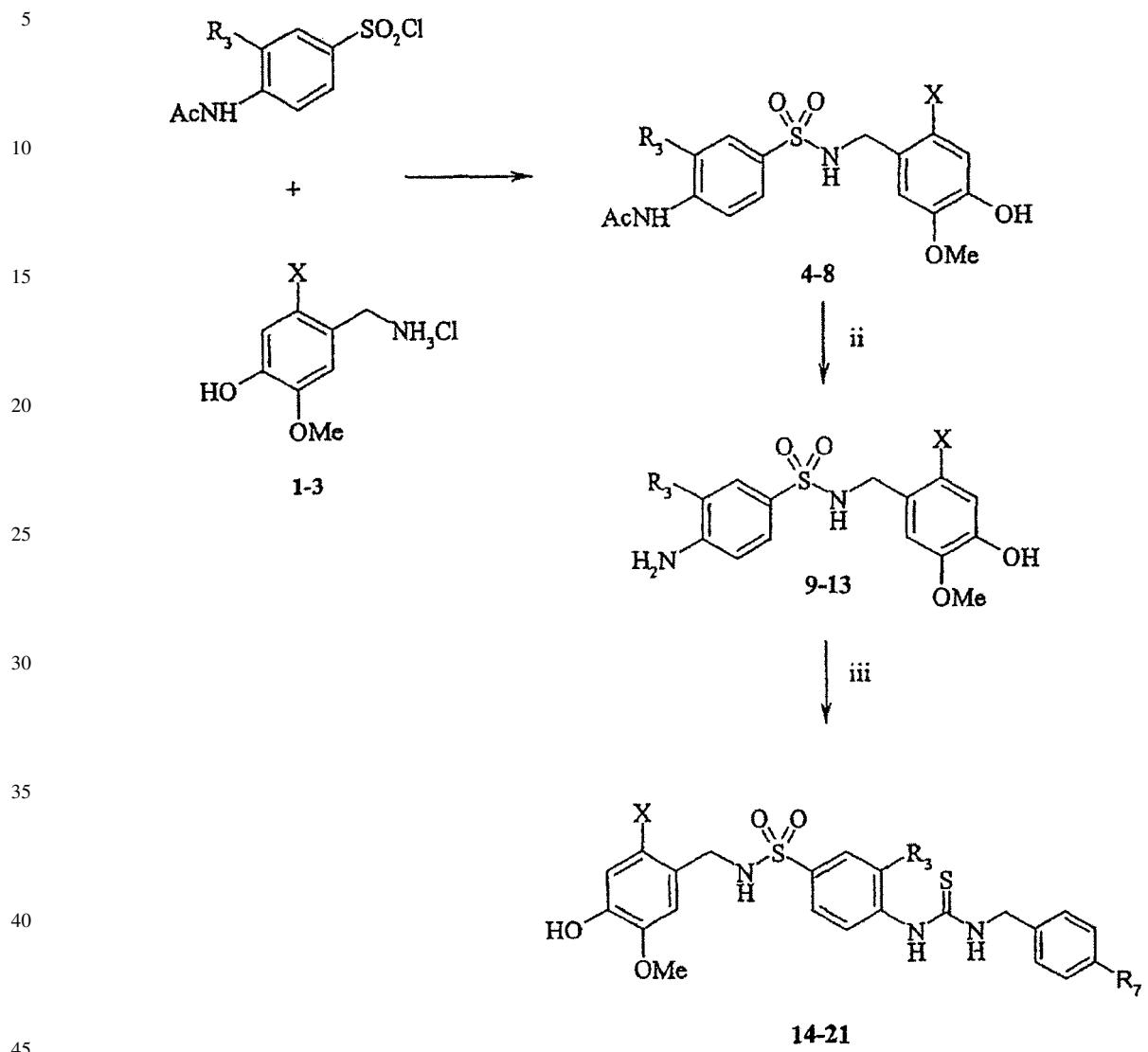
La síntesis de algunos compuestos de fórmula (I) se ilustra en los Esquemas 1-3 y se explica con mayor detalle en los ejemplos siguientes.

55

60

65

Esquema 1

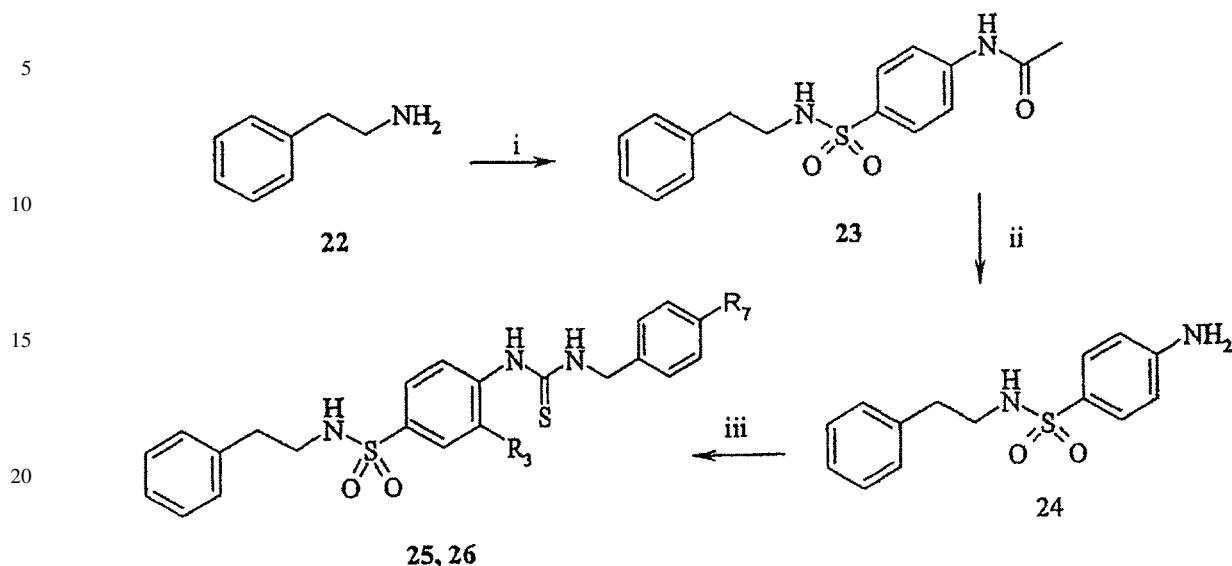


Reactivos: (i) Dioxano; TEA, 80°C; (ii) disolución acuosa del 20% de HCl, dioxano; (iii) isotiocianato de 4-tert-butilbencilo o isotiocianato de 4-trifluorometilbencilo, etanol, rfx.

$R_3 = H, F, OCH_3$; $X = I, Cl, Br$; $R_7 = t\text{-butilo o trifluorometilo}$.

ES 2 303 275 T3

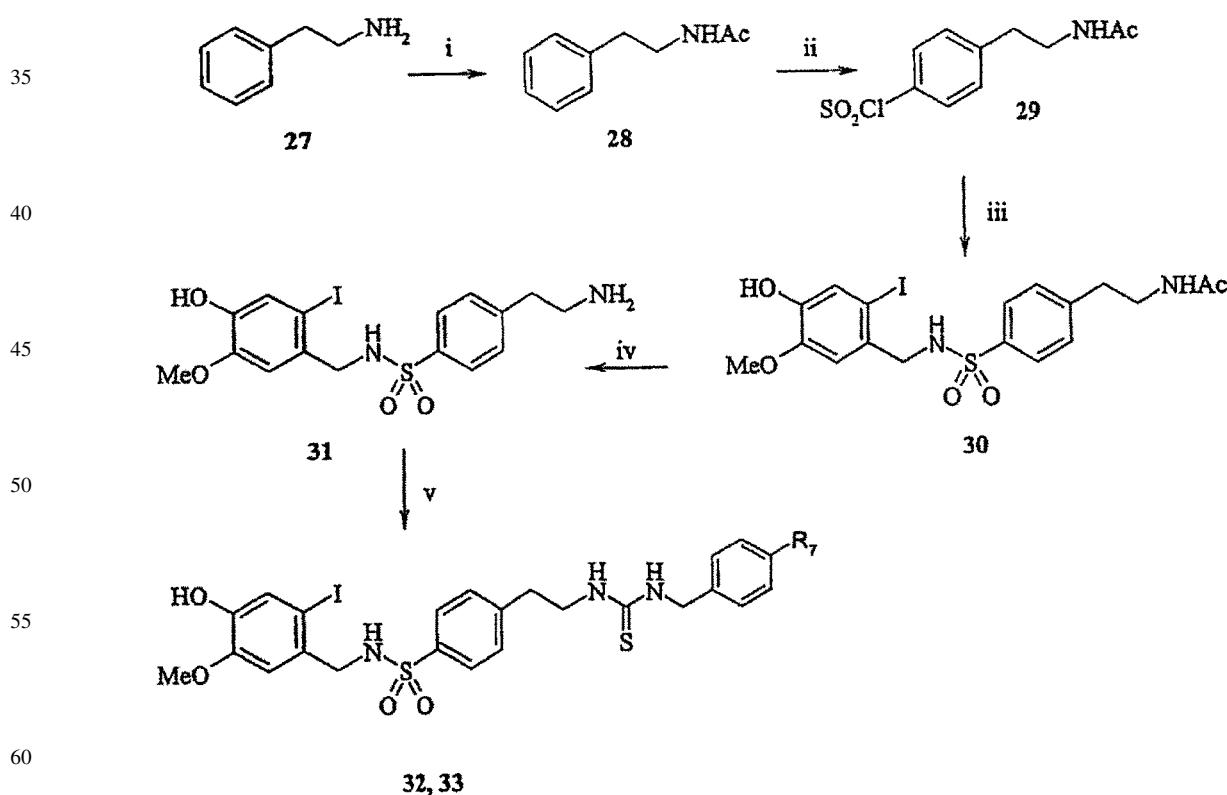
Esquema 2



25 Reactivos: (i) sulfonil cloruro de 4-acetamidobenceno, dioxano; (ii) disolución acuosa del 20% de NaOH; (iii) isiocianato de 4-tert-butilbencilo o isiocianato de 4-trifluorometilbencilo

R₇ = *t*-butilo o trifluorometilo.

Esquema 3



65 Reactivos: (i) Anhídrido acético, (ii) ácido clorosulfónico, 0°C; (iii) clorhidrato de 2-yodo (cloro, bromo)-5-metoxi-4-hidroxi bencilamina, dioxano; (iv) disolución acuosa del 20% de NaOH; (v) isotiocianato de 4-tert-butilbencilo o isotiocianato de 4-trifluorometilbencilo, etanol, rfx.

$R_7 = t$ -butilo o trifluorometilo.

1. Ejemplos

Las reacciones se monitorizaron de forma rutinaria mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre gel de sílice (placas revestidas previamente F₂₄₅ de Merck) y los productos se visualizaron con una disolución de yodo o de perman-ganato potásico. Los espectros de ¹H RMN se registraron en CDCl₃, CF₃COOD o DMSO-d₆ con un espectrofotómetro Varian VXR 200. Las posiciones de los picos se expresan en partes por millón (δ) respecto al tetrametilsilano como patrón interno, y los valores J se expresan en Hz. El espectro IR se registró en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 300 utilizando una técnica KBr Wafer. La espectrometría de masas se obtuvo con un espectrofotómetro Shimadzu QP5050 DI 50. La expresión “éter de petróleo ligero” se refiere a la fracción de petróleo en ebullición a 40-60°C. Los puntos de fusión (Pf) se determinaron en un equipo Buchi-Tottoli y están sin corregir. Las cromatografías se llevaron a cabo utilizando una malla de gel de sílice Merck 60-200. Los compuestos sintetizados mostraron espectros ¹H RMN de acuerdo con las estructuras asignadas. Los análisis elementales estuvieron dentro del ± 0,4% de los valores teóricos para C, H y N.

15 1. Preparación de los clorhidratos de 2(sustituido)-4-hidroxi-5-metoxi-bencilamina 1-3

1.1 Síntesis de 4-acetiloxi-4-metoxi-N-acetyl-bencilamina

Se añadió anhídrido acético (1 ml, 10,5 mmoles) a una disolución de clorhidrato de 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina (0,5 g, 2,63 mmoles) en piridina (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se resuspendió en agua (100 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml) y las fases orgánicas combinadas se deshidrataron (Na₂SO₄) y se evaporaron bajo presión reducida para generar el compuesto del título como un sólido blanco (0,45 g, rendimiento del 75%).

25 ¹H-RMN (CDCl₃) δ 2,01 (s, 3H, CH₃), 2,31 (s, 3H, CH₃), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 4,38 (d, 2H, J = 6, CH₂), 5,90 (bs, 1H, NH), 6,90 (m, 3H, aromático).

MS: *m/z* 238,1 (M⁺ C₁₂H₁₅NO₄).

30 1.2 Síntesis de 2-yodo-4-acetiloxi-5-metoxi-N-acetyl bencilamina

El derivado diacetilo del ejemplo 1.1 y una cantidad catalítica de ácido trifluorometano sulfónico (5-6 gotas) se añadieron a una disolución de IPy₂BF₄^{1,2} (0,69 g, 6,9 mmoles) en CH₂Cl₂ (40 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y, posteriormente, se le añadió una disolución acuosa del 10% de tiosulfato sódico hasta que se aclaró completamente. La capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 25 ml) y las fases orgánicas se deshidrataron (Na₂SO₄) y se evaporaron mediante vacío. El residuo se recristalizó a partir de una mezcla de CH₂Cl₂/Et₂O para generar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0,38 g, rendimiento del 65%).

40 H-RMN (CDCl₃) δ 2,06 (s, 3H, CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 4,41 (d, 2H, J = 5,6, CH₂), 6,0 (t, 1H, NH), 7,04 (s, 1H, aromático), 7,44 (s, 1H, aromático).

Bidimensional NOESY (CDCl₃): el acoplamiento entre el singlete a 7,44 ppm y el singlete a 2,33 ppm confirma que el yodo está en la posición 2 del anillo aromático.

45 MS: *m/z* 364 (M⁺ C₁₂H₁₄INO₄).

1.3 Síntesis de 2-cloro-4-acetiloxi-5-metoxi-N-acetyl bencilamina

Se añadió N-clorosuccinimida (3,15 mmoles, 0,42 g) a la disolución de 4-acetiloxi-3-metoxi-N-acetyl-bencilamina del Ejemplo 1.1 (0,5 g, 2,1 mmoles) en DMF seco (6 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a 0°C y, posteriormente, durante 16 horas a temperatura ambiente.

Se observó un precipitado blanco cuando se añadió agua (40 ml) a la reacción.

55 El sólido se filtró y se lavó dos veces con agua fría (2 x 20 ml) y, posteriormente, se secó sobre P₂O₅ para generar el compuesto del título como un sólido blanco (0,45 g, rendimiento del 83%).

60 ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 1,89 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 4,27 (d, 2H, CH₂, J = 8), 7,09 (s, 1H, aromático), 7,25 (s, 1H, aromático), 8,35 (t, 1H, NH).

Bidimensional NOESY (DMSO-d₆): el acoplamiento entre el singlete a 2,24 ppm y el singlete a 7,25 ppm confirma que el cloro está en la posición 2 del anillo aromático.

65 MS: *m/z* 272,1 (M⁺ C₁₂H₁₄ClNO₄).

ES 2 303 275 T3

1.4 Síntesis de 2-bromo-4-acetiloxi-5-metoxi-N-acetyl bencilamina

Se añadió N-bromosuccinimida (3,15 mmoles, 0,42 g) a la disolución de 4-acetiloxi-3-metoxi-N-acetyl-bencilamina del Ejemplo 1.1 (0,5 g, 2,1 mmoles) en DMF seco (6 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a 0°C y, 5 posteriormente, durante 16 horas a temperatura ambiente.

Se observó un precipitado blanco cuando se añadió agua (40 ml) a la reacción.

El sólido se filtró y se lavó dos veces con agua fría (2 x 20 ml) y, posteriormente, se secó sobre P₂O₅ para generar 10 el compuesto del título como un sólido blanco (0,46 g, rendimiento del 81%).

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 1,90 (s, 3H), 2,49 (s, 3H), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 4,26 (d, 2H, CH₂, J = 8), 7,093 (s, 1H, aromático), 7,39 (s, 1H, aromático), 8,36 (t, 1H, NH).

15 Bidimensional NOESY (DMSO-d₆): el acoplamiento entre el singlete a 2,49 ppm y el singlete a 7,39 ppm confirma que el bromo está en la posición 2 del anillo aromático.

MS: *m/z* 315,1 (M⁺ C₁₂H₁₄BrNO₄).

20 1.5 Síntesis de los clorhidratos de 2-yodo (cloro, bromo)-4-hidroxi-5-metoxi-bencilamina 1-3

Se añadió ácido clorhídrico al 37% (0,2 ml) a una disolución de 2-yodo (cloro, bromo)-4-acetiloxi-5-metoxi-N-acetyl-bencilamina (0,1 g, 0,27 mmoles) en etanol absoluto (5 ml) y la mezcla se sometió a refluo durante 12 horas. 25 Después de su enfriamiento, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se recristalizó a partir de acetona seca para generar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido en un rendimiento cuantitativo.

2. Preparación de las acetamidas *N*-[(2-sustituido-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]aminosulfonil benceno-3-R₃-4-8

30 A una disolución de cloruro de 3-(sustituido)-sulfonilo (2,1 mmoles) en dioxano (50 ml) se le añadió TEA (2 equivalentes molares) y los clorhidratos de 2 sustitutido-4-hidroxi-5-metoxi bencilamina (2 equivalentes molares). La mezcla se calentó a refluo durante 3 horas, el disolvente se eliminó a presión reducida y se añadió agua (50 ml) al residuo. El sólido formado se filtró, se secó y se recristalizó a partir de etanol para dar lugar a los productos deseados 35 como sólidos blancos.

2.1 *N*-[(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]aminosulfonilbenceno-4-acetamida 4

40 Rendimiento del 80%; pf.; 123°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 3,11 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,88 (s, 2H, J = 8), 6,61 (d, 2H, J = 4), 6,80 (s, 1H), 7,11 (t, 1H), 7,15 (s, 1H), 7,23 (bs, 1H), 7,53 (d, 2H, J = 4), 8,80 (bs, 1H).

45 2.2 *N*-[(2-cloro-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]aminosulfonilbenceno-4-acetamida 5

Rendimiento del 68%; pf.; 132°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 2,08 (s, 3H), 3,37 (s, 3H), 4,04 (d, 2H, J = 8), 6,72 (s, 1H), 6,83 (s, 1H), 7,72 (s, 4H), 7,92 (t, 1H), 9,47 (bs, 1H), 10,30 (s, 1H).

50 2.3 *N*-[(2-bromo-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]aminosulfonilbenceno-4-acetamida 6

Rendimiento del 72%; pf.; 129°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 2,07 (s, 3H), 3,69 (s, 3H), 3,99 (d, 2H, J = 8), 6,76 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,95 (t, 1H), 7,66 (s, 4H), 8,44 (bs, 1H), 9,71 (bs, 1H).

55 2.4 *N*-[(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]aminosulfonilbenceno-3-fluoro-4-acetamida 7

Rendimiento del 96%; pf.; 211°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 3,57 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,98 (d, 2H, J = 7,8), 7,06 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,51 (m, 1H), 7,82 (m, 2H), 8,35 (bs, 2H), 10,08 (bs, 1H).

60 2.5 *N*-[(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]aminosulfonilbenceno-3-metoxi-4-acetamida 8

Rendimiento del 81%; pf.; 208°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 3,42 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 4,01 (d, 2H, J = 7,8), 7,16 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,80 (m, 2H), 8,44 (bs, 2H), 9,98 (bs, 1H).

ES 2 303 275 T3

3. Procedimiento general para la hidrólisis de las funcionalidades N-acetilo del ejemplo 2

A una disolución de derivados acetilo del ejemplo 2 (1 g) en dioxano (15 ml) se le añadió una disolución acuosa del 20% de HCl (20 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 horas. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y se añadió agua al residuo. La disolución obtenida se neutralizó con una disolución acuosa del 20% de NaOH y el sólido formado se filtró y se lavó con agua fría (30 ml). El precipitado se secó y se recristalizó a partir de etanol absoluto para generar los compuestos amino libres como sólidos, en un rendimiento cuantitativo.

3.1 N-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxibencil)-4-aminobenceno sulfonamida 9

Sólido amarillo pálido, pf.: 111°C: $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 3,74 (s, 3H), 3,90 (d, 2H), 5,10 (bs, 2H), 6,61 (d, 2H, $J = 4$), 6,83 (s, 1H), 7,00 (t, 1H), 7,16 (s, 1H), 7,50 (d, 2H, $J = 5$), 8,80 (s, 1H).

3.2 N-(2-cloro-4-hidroxi-5-metoxibencil)-4-aminobenceno sulfonamida 10

Sólido amarillo pálido, pf.: 111°C: $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 3,69 (s, 3H), 3,87 (d, 2H), 5,93 (bs, 2H), 6,56 (d, 2H, $J = 4$), 6,73 (s, 1H), 6,85 (t, 1H), 7,41 (d, 2H), 7,56 (t, 1H), 9,22 (s, 1H).

3.3 N-(2-bromo-4-hidroxi-5-metoxibencil)-4-aminobenceno sulfonamida 11

Sólido amarillo pálido, pf.: 115°C: $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 3,69 (s, 3H), 3,90 (d, 2H), 5,41 (bs, 2H), 6,63 (d, 2H, $J = 6$), 6,87 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 7,46 (d, 2H, $J = 7$), 7,64 (bt, 1H), 8,90 (bs, 1H).

3.4 N-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxibencil)-3-fluoro-4-aminobenceno sulfonamida 12

Sólido amarillo pálido, pf.: 113°C: $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 3,72 (s, 3H), 3,88 (d, 2H), 5,88 (bs, 2H), 6,63 (d, 1H, $J = 4$), 6,91 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 7,81 (m, 2H), 7,69 (t, 1H), 9,05 (bs, 1H).

3.5 N-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxibencil)-3-metoxi-4-aminobenceno sulfonamida 13

Sólido amarillo, pf.: 120°C: $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 3,44 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,94 (d, 2H), 6,01 (bs, 2H), 6,72 (d, 1H, $J = 4$), 6,72 (d, 1H, $J = 4$), 6,92 (s, 1H), 7,01 (s, 1H), 7,83 (m, 2H), 7,72 (t, 1H), 9,02 (bs, 1H).

4. Procedimiento general para la síntesis de los derivados de N-(4-R₇-bencil)-N'-[4-(2-sustituido)-4-hidroxi-5-metoxibencil)-3-R₃-aminosulfonil]fenil tiourea 14-21

A una disolución de los compuestos 9-13 (0,23 mmoles) en etanol absoluto (10 ml) se le añadió isotiocianato de 4-t-butilbencilo o isotiocianato de 4-trifluorometilbencilo (1,2 equivalente molares, Wrigglesworth, R *et al.*, J. Med. Chem. 1996, 39, 4942-4951) y la mezcla se sometió a reflujo durante 16 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc: éter de petróleo 1:1) para dar lugar a los derivados 14-21 como sólidos.

4.1 N-(4-t-butil-bencil)-N'-[4-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil]fenil tiourrea 14

Sólido amarillo pálido, rendimiento del 42%, pf.: 95°C: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 1,31 (s, 9H), 3,79 (s, 3H), 4,14 (d, 2H, $J = 4$), 4,85 (d, 2H, $J = 4,2$), 5,11 (t, 1H), 5,52 (bs, 1H), 6,75 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 7,27 (m, 4H), 7,41 (d, 2H), 7,74 (d, 2H), 7,86 (bs, 1H), 8,36 (bs, 1H).

MS: m/z 640,6 ($\text{M}^+ \text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{IN}_3\text{O}_4\text{S}_2$).

IR (KBr) cm^{-1} : 1548 (C=S)

Analizado C, H, N ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{IN}_3\text{O}_4\text{S}_2$): calculado C, 48,83; H, 4,73; N, 6,57. Hallado C, 48,80; H, 4,69; N, 6,55.

4.2 N-(4-trifluorometil-bencil)-N'-[4-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)amino sulfonil]fenil tiourrea 15

Sólido amarillo pálido, rendimiento del 38%, pf.: 102°C: $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 3,69 (s, 3H), 3,88 (d, 2H, $J = 4$), 4,76 (d, 2H, $J = 4$), 6,51 (t, 1H), 6,69 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 7,36 (d, 2H), 7,44 (d, 2H), 7,55 (d, 2H), 7,63 (m, 3H), 7,81 (t, 1H), 9,37 (bs, 1H).

MS: m/z 651,4 ($\text{M}^+ \text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{IN}_3\text{O}_4\text{S}_2$).

IR (KBr) cm^{-1} : 1550 (C=S)

ES 2 303 275 T3

Analizado C, H, N, F ($C_{23}H_{21}F_3IN_3O_4S_2$): calculado C, 42,40; H, 3,25; N, 6,45; F, 8,75. Hallado C, 42,35; H, 3,22; N, 6,43; F 8,76.

5 4.3 *N-(4-t-butil-bencil)-N'-[4-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)-3-fluoro-aminosulfonil]fenil tiorurea 16*

Sólido blanco, rendimiento del 41%, pf.: 105°C: 1H -RMN ($DMSO_{d6}$) δ: 1,29 (s, 9H), 3,62 (s, 3H), 3,83 (d, 2H, J = 4), 4,13 (d, 2H, J = 4,1), 6,44 (bt, 1H), 6,83 (s, 1H), 7,25 (m, 3H), 7,39 (m, 5H), 7,6 (bs, 1H), 7,80 (bs, 1H), 8,21 (bs, 1H).

10 MS: m/z 658,5 ($M^+ C_{26}H_{29}FIN_3O_4S$).

Analizado C, H, N, F ($C_{26}H_{29}FIN_3O_4S$): calculado C, 47,49; H, 4,45; N, 6,39. Hallado C, 47,41; H, 4,44; N, 6,36.

15 4.4 *N-(4-t-butil-bencil)-N'-[4-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)-3-metoxi-aminosulfonil]fenil tiorurea 17*

Sólido amarillo pálido, rendimiento del 31%, pf.: 103°C: 1H -RMN ($DMSO_{d6}$) δ: 1,27 (s, 9H), 3,82 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 4,07(d, 2H), 4,81 (m, 2H), 6,41 (bs, 1H), 6,85 (m, 2H), 7,16 (s, 1H), 7,26 (m, 6H), 7,52 (m, 2H), 8,05 (bs, 1H).

20 MS: m/z 670,4 ($M^+ C_{27}H_{32}IN_3O_5S_2$).

Analizado C, H, N, F ($C_{27}H_{32}IN_3O_5S_2$): calculado C, 48,43; H, 4,82; N, 6,28. Hallado C, 48,40; H, 4,84; N, 6,25.

25 4.5 *N-(4-t-butil-bencil)-N'-[4-(2-cloro-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil]fenil tiorurea 18*

Sólido amarillo pálido, rendimiento del 48%, pf.: 124°C: 1H -RMN ($DMSO_{d6}$) δ: 1,27 (s, 9H), 3,67 (s, 3H), 3,96 (m, 2H), 4,18 (d, 2H, J = 6), 6,31 (t, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,86 (s, 1H), 7,18 (d, 2H), 7,31 (m, 4H), 7,65 (s, 2H), 8,40 (t, 1H), 9,46 (s, 1H), 9,85 (bs, 1H).

30 MS: m/z 549,4 ($M^+ C_{26}H_{30}CIN_3O_4S_2$).

Analizado C, H, N, F ($C_{26}H_{30}CIN_3O_4S_2$): calculado C, 56,97; H, 5,52; N, 7,67. Hallado C, 56,92; H, 5,50; N, 7,62.

35 4.6 *N-(4-trifluorometil-bencil)-N'-[4-(2-cloro-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil]fenil tiorurea 19*

Sólido amarillo, rendimiento del 45%, pf.: 122°C: 1H -RMN ($DMSO_{d6}$) δ: 3,69 (s, 3H), 3,95 (d, 2H, J = 4), 4,27 (d, 2H, J = 6,1), 6,60(t, 1H), 6,74 (s, 1H), 6,92 (m, 3H), 7,48 (d, 2H), 7,68 (m, 4H), 7,85 (t, 1H), 8,22 (bs, 1H), 9,41 (bs, 1H).

40 MS: m/z 561,4 ($M^+ C_{23}H_{21}ClF_3N_3O_4S_2$).

Analizado C, H, N, F ($C_{23}H_{21}ClF_3N_3O_4S_2$): calculado C, 49,33; H, 3,78; N, 7,50; F, 10,18. Hallado C, 49,30; H, 3,74; N, 7,45; F 1011.

4.7 *N-(4-t-butil-bencil)-N'-[4-(2-bromo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil]fenil tiorurea 20*

Sólido amarillo pálido, rendimiento del 51%, pf.: 118°C: 1H -RMN ($DMSO_{d6}$) δ: 1,29 (s, 9H), 3,58 (s, 3H), 3,81 (m, 2H), 4,19 (d, 2H, J = 6), 6,22 (t, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 7,23 (d, 2H), 7,40 (m, 4H), 7,69 (s, 2H), 8,43 (t, 1H), 9,49 (s, 1H), 10,01 (bs, 1H).

55 MS: m/z 598,3 ($M^+ C_{26}H_{30}BrN_3O_4S_2$).

Analizado C, H, N, F ($C_{26}H_{30}BrN_3O_4S_2$): calculado C, 52,70; H, 5,10; N, 7,09. Hallado C, 52,66; H, 5,08; N, 7,12.

4.8 *N-(4-trifluorometil-bencil)-N'-[4-(2-bromo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil]fenil tiorurea 21*

Sólido amarillo pálido, rendimiento del 49%, pf.: 120°C: 1H -RMN ($DMSO_{d6}$) δ: 3,62 (s, 3H), 4,01 (d, 2H, J = 6), 4,35 (d, 2H, J = 6,1), 6,63 (t, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,90 (m, 3H), 7,55 (d, 2H), 7,72 (m, 4H), 8,01 (t, 1H), 8,42 (bs, 1H), 9,81 (bs, 1H).

65 MS: m/z 605,3 ($M^+ C_{23}H_{21}BrF_3N_3O_4S_2$).

Analizado C, H, N, F ($C_{23}H_{21}BrF_3N_3O_4S_2$): calculado C, 45,70; H, 3,50; N, 6,95; F, 9,43. Hallado C, 45,63; H, 3,52; N, 6,92; F 9,46.

ES 2 303 275 T3

5. Síntesis de *N*-(2-feniletil)-4-acetamidobenceno sulfonamida 23

A una disolución de cloruro de sulfonilo (0,5 g) en dioxano anhidro (30 ml) se le añade 2-feniletil-amina (1,6 eq., 0,43 ml) y la mezcla se somete a reflujo durante aproximadamente 1 hora. El disolvente se elimina bajo presión reducida y el residuo se recupera con agua (35 ml). El sólido resultante se filtra bajo presión reducida, se seca y se cristaliza a partir de etanol para dar lugar al compuesto 23, un sólido blanco (0,61 g, rendimiento del 84%).

Pf.: 98°C

10 $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 2,88 (s, 3H), 3,01 (t, 2H, J = 8), 3,22 (q, 2H, J = 8), 6,25 (t, 1H), 6,42 (d, 2H, J = 6), 6,80 (m, 5H), 6,91 (bs, 1H), 7,01 (d, 2H, J = 6).

6. Síntesis de *N*-(2-feniletil)-4-aminobenceno sulfonamida 24

15 A una disolución de 23 (0,6 g, 1,7 mmoles) en dioxano (8 ml) se le añade 20% NaOH (13 ml) y la mezcla se somete a reflujo durante 1,5 horas. El disolvente se concentra bajo presión reducida y a la fase acuosa se le añade un 20% de NaOH a pH = 7. El sólido resultante se filtra bajo presión reducida, se lava con agua y se seca para dar lugar al compuesto 24 como un sólido blanco (0,43 g, rendimiento del 83%).

20 Pf.: 114°C.

10 $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) δ : 2,2; 75 (t, 2H, J = 8), 3,3; 20 (q, 2H, J = 8), 4,4; 18 (bs, 2H), 6,6; 68 (d, 2H, J = 6), 7,7; 09 (d, 2H, J = 5), 7,7; 24 (m, 4H), 7,7; 59 (d, 2H, J = 6).

25 7. Procedimiento general para la síntesis de las *N*-(4-*R*₇-bencil)-*N'*-[4-(2-feniletil-amino)sulfonil]fenil tioureas 25 y 26

30 A una disolución del compuesto 24 (150 mg) en etanol absoluto (12 ml) se le añade isotiocianato de t-butil-bencilo (Wrigglesworth, R *et al.*, J. Med. Chem. 1996, 39, 4942-4951) o isotiocianato de 4-trifluorometilbencilo (1,2 eq.) y la disolución se somete a reflujo durante 16 horas. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía ultrarrápida (AcOEt: éter de petróleo 1:1) para dar lugar a los derivados 25 y 26 como sólidos.

7.1 *N*-(4-*t*-butil-bencil)-*N'*-[4-(2-feniletil-amino)-sulfonil]fenil tiorurea 25

35 Sólido blanco, rendimiento del 40%, pf.: 97°C:

10 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 1,30 (s, 9H), 2,77 (t, 2H, J = 8), 3,22 (q, 2H, J = 8), 4,61 (bs, 2H), 4,82 (d, 2H), 6,20 (bs, 1H), 7,08 (d, 2H), 7,25 (m, 5H), 7,37 (d, 2H), 7,77 (d, 2H), 7,82 (bs, 1H), 8,40 (bs, 1H).

40 MS: *m/z* 481,1; 1 (M^+ $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$).

Analizado C, H, N, S ($\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$): calculado C, 64,83; H, 6,49; N, 8,72; S, 13,31. Hallado C, 64,80; H, 6,42; N, 8,69; S, 13,29.

7.2 *N*-(4-trifluorometil-bencil)-*N'*-[4-(2-feniletil-amino)-sulfosulfonil]fenil tiorurea 25

Sólido blanco, rendimiento del 70%, pf.: 102°C.

50 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 2,77 (t, 2H, J = 6), 3,21 (q, 2H, J = 6), 4,51 (t, 1H), 4,90 (d, 2H), 6,63 (d, 2H), 7,09 (d, 2H), 7,20 (m, 5H), 7,35 (d, 2H), 7,58 (d, 2H), 7,92 (bs, 1H), 8,32 (bs, 1H).

MS: *m/z* 494,4 ; 3 (M^+ $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$).

55 Analizado C, H, N, S ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$): calculado C, 55,97; H, 4,49; N, 8,51; S, 11,55. Hallado C, 55,94; H, 4,47; N, 8,48; F, 11,52.

8. Síntesis de *N*-acetil-2-feniletilamina 28

60 A una disolución, disponible comercialmente, de 2-feniletilamina (2 ml, 15,8 mmoles) en piridina (5 ml) se le añade anhídrido acético (2 eq., 3 ml) y la disolución se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente se evapora bajo presión reducida, el residuo se recupera con agua (40 ml) y la fase acuosa se extrae con EtOAc (4 x 25 ml). Los extractos orgánicos se juntaron, se deshidrataron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se cristalizó a partir de éter de petróleo para dar lugar al compuesto 28 como un sólido blanco (2,56 g, rendimiento cuantitativo).

65 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : 1,93 (s, 3H), 2,81 (t, 2H, J = 8), 3,51 (t, 2H, J = 8), 5,61 (bs, 1H), 7,18 (m, 5H).

ES 2 303 275 T3

9. Síntesis de sulfonil cloruro de 4-acetamidoetilbenceno 29

El compuesto 28 (0,5 g, 3 mmoles) se añade con HSO₃Cl (1,1 ml), gota a gota, manteniendo la temperatura a 0°C. Al finalizar la adición, la mezcla de reacción se calienta a 100°C durante aproximadamente 1 hora y, posteriormente, se enfriá y se vierte sobre hielo triturado. El precipitado resultante se filtra y se lava con agua para dar lugar al compuesto 29 como un sólido blanco (0,51 g, rendimiento del 65%).

¹H-RMN (DMSO_{d6}) δ: 1,94 (s, 3H), 2,79 (t, 2H), 3,40 (m, 2H), 7,19 (d, 2H, J = 4), 7,72 (d, 2H, J = 4), 8,08 (bs, 1H).

10. Síntesis de N-[(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]aminosulfonil-benceno-N-etil-4-acetamida 30

Una disolución de 29 (250 mg, 0,9 mmoles) en dioxano anhidro (20 ml) se añade con clorhidrato de 2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi bencilamina (1,6 eq, 480 mg) y TEA (1,8 eq, 0,24 ml) y la mezcla se somete a refljo durante 1 hora. Al finalizar la adición, se evapora el disolvente bajo presión reducida y el residuo se recupera con agua (40 ml). El precipitado resultante se filtra por succión, se lava con agua y se seca para dar lugar al compuesto 30 como un sólido amarillo pálido (380 mg, rendimiento del 84%). El compuesto crudo se usa para la reacción de desprotección siguiente.

20. 11. Síntesis de N-[(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi)-bencil]-4-(2-etilamino)benceno sulfonamida 31

A una disolución de 30 (110 mg, 0,22 mmoles) en dioxano (5 ml) se le añade una disolución del 20% de NaOH (6 ml) y la mezcla se calienta a 80°C durante aproximadamente 3 horas. Al finalizar la adición, el disolvente se elimina bajo presión reducida y el pH del residuo se ajusta a 7 con una disolución del 20% de HCl. El precipitado resultante se filtra bajo presión reducida, se seca y se cristaliza a partir de éter etílico para dar lugar al compuesto 31 como un sólido amarillo pálido (90 mg, rendimiento del 88%).

Pf.: 291°C.

¹H-RMN (DMSO_{d6}) δ: 2,48 (s, 3H), 2,67 (m, 2H), 3,52 (t, 2H), 3,67 (bs, 3H), 3,87 (s, 2H), 6,78 (s, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,36 (d, 2H, J = 8), 7,66 (d, 2H, J = 8).

35. 12. Procedimiento general para la síntesis de los derivados de N-(4-R₇-bencil)-N'-[4-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil-2-feniletil]tiourea 32 y 33

A una disolución del compuesto 31 (100 mg, 0,2 mmoles) en etanol absoluto (12 ml) se le añade isotiocianato de 4-t-butilbencilo (Wrigglesworth, R *et al.*, J. Med. Chem. 1996, 39, 4942-4951) o isotiocianato de 4-trifluorometilbencilo (1,2 eq.) y la disolución se somete a refljo durante 16 horas. Posteriormente, el disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía (EtOAc: éter de petróleo 1:1) para dar lugar a los compuestos 32 y 33 como sólidos.

12.1 N-(4-t-butyl-bencil)-N'-[4-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil-2-feniletil]tiourea 32

Sólido blanco, rendimiento del 41%, pf.: 195°C.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1,31 (s, 9H), 2,85 (t, 2H), 4,71 (m, 2H), 3,79 (s, 3H), 4,14 (d, 2H, J = 6), 4,49 (bs, 2H), 5,18 (t, 1H), 5,74 (bs, 1H), 5,91 (bs, 1H), 6,18 (bs, 1H), 6,70 (s, 1H), 7,2 (m, 5H), 7,37 (d, 2H), 7,66 (d, 2H).

MS: *m/z* 668,5 (M⁺ C₂₈H₃₄IN₃O₄S₂).

Analizado C, H, N (C₂₈H₃₄IN₃O₄S₂): calculado C, 50,37; H, 5,13; N, 6,29. Hallado C, 50,19; H, 5,11; N, 6,21.

12.2 N-(4-trifluorometil-bencil)-N'-[4-(2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencil)aminosulfonil-2-feniletil]tiourea 33

Sólido amarillo pálido, rendimiento del 52%, pf.: 186°C.

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 2,93 (t, 2H), 3,75 (m, 2H), 3,79 (s, 3H), 4,14 (d, 2H, J = 8), 4,76 (d, 2H), 5,20 (t, 1H), 5,81 (bs, 1H), 5,92 (bs, 1H), 6,20 (t, 1H), 6,70 (s, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,16 (d, 2H, J = 6), 7,42 (d, 2H), 7,63 (m, 4H).

MS: *m/z* 680,3 (M⁺ C₂₅H₂₅F₃IN₃O₄S₂).

Analizado C, H, N (C₂₅H₂₅F₃IN₃O₄S₂): calculado C, 44,19; H, 3,71; N, 6,18. Hallado C, 44,15; H, 3,52; N, 5,99.

2. Farmacología

Materiales y métodos

5 *Animales y Tejidos*

Se usaron ratas Sprague Dawley recién nacidas y adultas (~250 g) (Harlam, Italia). Todos los experimentos cumplían las regulaciones nacionales y fueron aprobados por el comité de ética regional.

10 *Ensayos de unión de ligando radiactivo*

Se usaron ratas macho Sprague Dawley con un peso corporal de 250 a 350 g en el momento del análisis. Para los ensayos de unión las ratas se sacrificaron por decapitación, bajo anestesia, y se les extrajo la médula espinal que se disgregó con un homogeneizador de tejidos Polytron, en tampón 5 mM KCl, 5,8 mM NaCl, 0,75 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 320 mM sacarosa, 10 mM Hepes, pH 8,6, enfriado en hielo (Szallasi y Blunberg, 1992; 1993). El tejido homogeneizado se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 35000 x g durante 30 minutos a 4°C (Beckman Avanti J25). El precipitado se resuspendió en el mismo tampón descrito anteriormente y se uso en los experimentos de unión. En los experimentos de saturación, se incubaron 150 µg de proteína/muestra de las suspensiones de membranas con ([³H]-Resiniferatoxin, Perkin Elmer, Boston, MA) [³H]-RTX (0,003-3 nM) en el tampón de ensayo que contenía 0,25 mg/ml de albumina de suero bovino libre de ácidos grasos, a 37°C durante 60 minutos. En experimentos de competición, las membranas se incubaron a 37°C durante 60 minutos con [³H]-RTX (0,4 nM) y concentraciones crecientes de los compuestos examinados, en el intervalo de 0,1 nM a 3 µM. La unión no específica se definió en presencia de 1 µM de RTX. Después de la incubación, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se incubó con α 1-glicoproteína ácida (200 µg por tubo) durante 15 minutos para reducir la unión no específica de RTX. El RTX unido a la membrana se separó del libre mediante la centrifugación de las muestras a 18500 x g durante 15 minutos. La base del tubo de microfuga, que contenía el precipitado, se cortó y la radiactividad se determinó en un contador de centelleo (Packard 2500 TR). La concentración de proteína se determinó según el procedimiento de Bio-Rad con albumina de suero bovino como un patrón de referencia (Bradford, 1976). Los estudios de saturación y competición se analizaron con el programa Ligand (Munson y Rodbard, 1980).

30 *Medidas de fluorescencia de Ca²⁺ en neuronas de los ganglios trigéminos de rata cultivadas*

Ratas recién nacidas (2 días de edad) se anestesiaron terminalmente y se decapitaron. Los ganglios trigéminos se extrajeron y, rápidamente, se colocaron en una disolución salina tamponada con fosfato (PBS) fría, antes de transferirse a una disolución de colagenasa/dispsasa (1 mg/ml disuelta en PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺) durante 35 minutos a 37°C (Rigoni *et al.*, 2003). Después del tratamiento enzimático, los ganglios se aclararon tres veces con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺, y, posteriormente, se colocaron en 2 ml de DMEM frío suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, inactivado por el calor), 2 mM de L-glutamina, 100 u/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Posteriormente, los ganglios se disociaron en células aisladas mediante varios pasos a través de una serie de agujas de jeringa (de 23G a 25G). Finalmente, el complejo de medio y células de los ganglios se pasó a través de un filtro de 40 mm para eliminar los restos celulares, se le añadieron 8 ml de medio DMEM y se centrifugó (200 x g durante 5 minutos). El precipitado celular final se resuspendió en medio DMEM (suplementado con 100 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (ratón-NGF-7S) y de 2,5 mM de la base libre citosina-b-D-arabino-furanósido (ARA-C)). Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm recubiertos con poli-L-lisina (8,3 mM) y laminina (5 mM) y se mantuvieron de 2 a 5 días a 37°C en un incubador humidificado con una atmósfera del 5% de CO₂ y aire. Las neuronas sembradas se trataron con una disolución de fura-2-AM-éster (3 µM) en una disolución del tampón, con Ca²⁺, de la siguiente composición (mM): CaCl₂ 1,4; KCl 5,4; MgSO₄ 0,4, NaCl 135, D-glucosa 5, HEPES 10, con BSA 0,1%, a pH 7,4, durante 40 minutos a 37°C, se lavaron dos veces con una disolución del tampón con Ca²⁺ y se trasladaron a un cámara sobre la platina de un microscopio Nikon eclipse TE300. El colorante se excitó a 340 y 380 nm para indicar los cambios relativos en [Ca²⁺] mediante la relación F₃₄₀/F₃₈₀, registrada con un sistema de análisis de imagen dinámico (Laboratory Automation 2,0, RCS, Florencia, Italia). Se añadieron Capsaicina (0,1 µM) e ionomicina (5 µM) a la cámara. Se utilizó una curva de calibración usando un tampón que contenía Fura-2-AM-éster y concentraciones determinadas de Ca²⁺ libre (Kudo *et al.*, 1986), para convertir los datos obtenidos a partir de la relación F₃₄₀/F₃₈₀ en [Ca²⁺]_i (nM).

55 Se analizaron los efectos de todos los compuestos frente a la movilización de calcio inducida por capsaicina. Los compuestos antagonistas se incubaron durante 10 minutos, antes del tratamiento con capsaicina. También, se analizó el efecto inhibidor del antagonista capsacepina.

60 *Análisis de frotamiento en ratas*

El efecto irritante (inducción de movimientos de frotamiento) de la capsaicina se analizó aplicando 3 µg/ovo (10 µl) de capsaicina en la conjuntiva de la rata y registrando el número de movimientos de frotamiento durante el periodo de los 60 segundos posteriores a la aplicación. En otro grupo de experimentos, las ratas se trataron intraperitonealmente con distintas dosis del compuesto 14, analizándose el frotamiento inducido por capsaicina.

ES 2 303 275 T3

Fármacos y solubilidad

Los fármacos y los reactivos se obtuvieron de las compañías indicadas: capsaicina, ionomicina, laminina, poli-L-lisina y capsacepina (Sigma, Italia); NGF-7S de ratón y colagenasa/dispsasa (Roche Diagnostics, Italia); Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), suero fetal bovino (SFB) inactivado por el calor, L-glutamina (200 mM), penicilina/estreptomicina (10.000 IU/ml ± 10.000 UG/ml), disolución salina tamponada con fosfato (PBS) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Gibco, Italia); Fura-2-AM-éster (Societa' Italiana Chimici, Italia). Las concentraciones madres de capsaicina (10 mM) se prepararon en 100% de etanol. Las disoluciones madre de todos los compuestos PharmEste (100 mM), Fura-2-AM-éster (100 mM) e ionomicina (100 mM) se prepararon en DMSO. Las diluciones apropiadas se realizaron en una disolución tamponada de Krebs.

Resultados

15 Resumen general

Los compuestos 14, 19 y 20 presentaron la capacidad de unirse y activar al receptor TRPV1.

Ensayo de unión

20 Los experimentos de competición de la unión de [^3H]-RTX mostraron que 3 compuestos tenían una mayor afinidad frente al receptor TRPV1, expresado en la médula espinal de rata (tabla 1). En particular, el compuesto 14 reveló valores de afinidad inferiores a 100 nM. El orden de potencia de estos compuestos fue: 14>20>19.

25 Fluorescencia de Ca^{2+}

30 La capsaicina (0,1 μM) provocó un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la gran mayoría (87%) de las células neuronales trigeminales de rata que, por tanto, se identificaron como neuronas que expresaban TRPV1. Para los valores IC_{50} de todos los compuestos se debe observar la tabla 1. Los datos se expresan como la media y tiene unos límites de confianza del 95%.

TABLA 1

35 Valores de afinidad (K_i , nM) y potencia (IC_{50} , nM) de los antagonistas de TRPV1

Código del compuesto	K_i (nM) (Límites de confianza)	IC_{50} (nM) (Límites de confianza)
Capsacepina	NA	2168 (1528-3080)
14	90 (73-110)	60 (43-85)
20	493 (340-716)	212 (90-590)
19	756 (515-1109)	270 (127-574)

50 Los valores de afinidad (K_i) y de potencia (IC_{50}) se obtuvieron mediante ensayos de competición de la unión de [^3H]-RTX y por el ensayo de calcio intracelular, en neuronas trigeminales de rata cultivadas. NA: no analizado.

Análisis de frotamiento en ratas

55 La aplicación intraperitoneal del compuesto 14, 60 minutos antes del tratamiento con capsaicina, provocó una reducción dependiente de la dosis del comportamiento de frotamiento inducido por capsaicina en ratas (la dosis de 1 mg/kg produjo un 24% de inhibición).

60 Conclusiones

En los estudios *in vitro* e *in vivo*, el compuesto 14 fue capaz de inhibir las respuestas dependientes de TRPV1 con una afinidad que fue significativamente superior a la del antagonista clásico del receptor TRPV1, capsacepina. Además, los compuestos 19 y 20 mostraron alta afinidad por el receptor TRPV1 *in vitro*. Todos los compuestos mencionados anteriormente podrían constituir una herramienta importante para estudios futuros en modelos de dolor y de inflamación neurogénica.

ES 2 303 275 T3

Referencias

- **Bradford MM**, *Anal Biochem* (1976) 72: 248-254.
- 5 • **Kudo Y.** et al., *Japanese Journal of Pharmacology* (1986) 41, 345-151.
- **Munson PJ** et al., *Anal. Biochem* (1980) 107: 220-239
- 10 • **Rigoni M.** et al., *British Journal of Pharmacology* (2003) 138; 977-985.
- **Szallasi A.** and **Blumberg PM**. ed. P.M. Conn (*Academic Press*, Orlando, FL) (1992) vol 8, p. 368.
- **Szallasi A.** and **Blumberg PM**. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* (1993) 347: 84-91.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

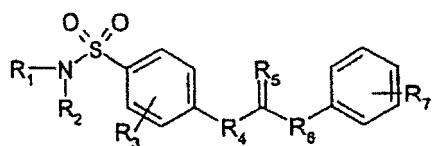
65

REIVINDICACIONES

1. Los compuestos de fórmula (I):

5

10



(I)

15

en la que:

R₁ es hidrógeno;

20

R₂ es bencilo o 2-feniletilo, en los que el anillo aromático está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados entre halógeno, hidroxi y metoxi;

R₃ es hidrógeno, halógeno o un grupo alcoxi;

25

R₄ es un grupo -(CH₂)_nNH-, en el que n oscila entre 0 y 3;

R₅ es S u O;

R₆ es -NHCH₂-;

30

R₇ es *t*-butilo o trifluorometilo.

2. Los compuestos según la reivindicación 1, en los que R₅ representa S y R₆ representa un grupo -NHCH₂-.

35

3. Los compuestos según la reivindicación 2, en los que R₃ es hidrógeno y R₇ se selecciona entre 4-*t*-butilo o 4-trifluorometilo.

4. Los compuestos según la reivindicación 3, en los que n en el grupo R₄ es 0.

40

5. Los compuestos según la reivindicación 3, en los que n en el grupo R₄ es 2.

6. Los compuestos según la reivindicación 5, en los que R₁ es hidrógeno y R₂ es bencilo o 2-feniletilo, en los que el anillo aromático está sustituido opcionalmente con uno o más grupos, seleccionados entre halógeno, hidroxi y metoxi.

45

7. Los compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en los que R₁ es hidrógeno y R₂ es 2-yodo-4-hidroxi-5-metoxi-bencilo.

8. Los compuestos de fórmula (I), como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como un medicamento.

50

9. El uso de los compuestos de fórmula (I), como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de composiciones farmacéuticas para la terapia de estados inflamatorios.

10. El uso según la reivindicación 9, en el que el estado inflamatorio es dolor crónico e hiperalgesia inflamatoria.

55

11. Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de fórmula (I), como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en mezcla con excipientes y/o vehículos adecuados.

60

65