



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 362 769**

② Número de solicitud: 200931269

⑤ Int. Cl.:  
**C07C 233/11** (2006.01)  
**A61K 31/165** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **24.12.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**13.07.2011**

⑦ Solicitante/s: **Fundación IMIM** (Titular al 50%)  
**c/ Dr. Aiguader, 88**  
**08003 Barcelona, ES**  
**Fundación IMABIS-Instituto Mediterráneo para el**  
**Avance de la Biotecnología y la Investigación**  
**Sanitaria** (Titular al 40%) **y**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
**(CSIC)** (Titular al 10%)

⑦ Inventor/es: **Joglar Tamargo, Jesús;**  
**Almeida Cotrim, Bruno;**  
**Rodríguez de Foseca, Fernando;**  
**Decara del Olmo, Juan Manuel;**  
**Farre Albadalejo, Magín;**  
**Fito Colomert, Montserrat;**  
**Torre Fornell, Rafael de la;**  
**Macías González, Manuel;**  
**Clapes Saborit, Pedro;**  
**Romero Cuevas, Miguel y**  
**Covas Planells, María Isabel**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Derivados de amida de ácidos grasos con anfetaminas para el tratamiento de desórdenes alimenticios.**

⑤ Resumen:

Derivados de amida de ácidos grasos con anfetaminas para el tratamiento de desórdenes alimenticios.

La presente invención se refiere a nuevos derivados amidas de ácidos grasos conjugados con anfetaminas, que se comportan como ligandos duales de los receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y del subtipo alfa de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR-alfa), y como potentes agentes inhibidores de la oxidación de la Lipoproteína de Baja Densidad (LDL), así como a su procedimiento de preparación, y su utilización como herramienta farmacológica y como fármacos para modular las acciones reguladas por los citados receptores, como la inducción de la saciedad y control de ingesta, la disminución de la grasa corporal y la regulación del metabolismo lipídico.

ES 2 362 769 A1

## DESCRIPCIÓN

Derivados de amida de ácidos grasos con anfetaminas para el tratamiento de desordenes alimenticios.

5 La presente invención se refiere a una nueva serie de derivados de amida de ácidos grasos con anfetaminas y sus sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, que muestran una afinidad por receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y del subtipo alfa de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR-alfa), y como potentes agentes antioxidantes en la oxidación de la Lipoproteína de Baja Densidad (LDL). Los compuestos pueden modular las acciones reguladas por los citados receptores, como la inducción de la saciedad y control de ingesta, la disminución de la grasa corporal y la regulación del metabolismo lipídico.

## Estado de la técnica anterior

15 El sistema endocannabinoide está compuesto por los receptores cannabinoides, ligandos endógenos (endocannabinoides) y los sistemas enzimáticos necesarios para su biosíntesis y degradación (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **2006** 46:101). Hasta el momento han sido identificados dos tipos de receptores cannabinoides: CB1 y CB2. Los dos receptores cannabinoides se encuentran acoplados a la proteína G a través de la cual modulan la actividad de las adenilato ciclasas (AC) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), y eventos intracelulares que llevan a la regulación en la expresión de diversos genes. La activación de los receptores CB1 también regula los canales de  $Ca^{+2}$  voltaje dependientes y los canales de potasio. Los receptores CB1 se encuentran distribuidos en el sistema nervioso central y en otros órganos como tejido adiposo, páncreas endocrino, músculo, pulmones, hígado y riñones, mientras que los receptores CB2 se expresan principalmente en el sistema inmunológico y células hematopoyéticas (Nature Reviews Drug Discovery **2004** 3:771).

25 El sistema endocannabinoide parece estar relacionado con un gran número de condiciones fisiológicas y patológicas a nivel neurológico, psiquiátrico, cardiovascular, desarrollo del cáncer, trastornos reproductivos y alimentarios.

30 Un mejor conocimiento de las vías de biosíntesis de los endocannabinoides y los mecanismos de regulación a nivel celular de dichas vías se consideran las principales prioridades en la investigación de los cannabinoides (Nature Reviews Drug Discovery **2004** 3:771).

35 El receptor CB1 fue, dentro del sistema endocannabinoide, la diana terapéutica que inicialmente recibió mayor atención en las investigaciones para el tratamiento de la obesidad. Es bien conocido que sustancias agonistas cannabinoides aumentan el apetito y por tanto se postuló que bloqueando este receptor se podría disminuir la ingesta de comida llevando a una pérdida de peso. El Rimonabant, también conocido como SR141716 o Acomplia<sup>®</sup>, fue el primer antagonista CB1 en ser descrito y uno de los primeros en ser estudiado clínicamente para el tratamiento de obesidad (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **2006** 46:101, Nat Rev Drug Disc. **2004** 3:771). Los ensayos clínicos llamados RIO (Rimonabant In Obesity) (Lancet **2005** 365:1389; JAMA 2006 295:761; Lancet **2006**) 368:1160 mostraron la eficacia de Rimonabant como agente anti-obesidad. Desafortunadamente algunos datos de los estudios clínicos han asociado el uso crónico del Rimonabant con un aumento de la depresión, ansiedad y un aumento de tendencias suicidas (Lancet **2007** 370:1706; Lancet **2008** 371:556; Lancet **2008** 371:555). Por lo que, en octubre de **2008**, la Agencia Europea del Medicamento decide la suspensión temporal del mismo.

45 Por otro lado, los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR) son una superfamilia perteneciente a los receptores nucleares hormonales (NHR), que son factores de transcripción activados por ligando que juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo de lípidos y de glúcidos. Tres subtipos de receptores PPAR han sido descritos: PPAR-alfa, PPAR-gamma y PPAR-delta (Pharmacol. Res. **2005** 51:85)

50 La activación del subtipo PPAR-alfa por sus ligandos naturales está relacionada con el control de las concentraciones de lípidos circulantes. Se han descrito ácidos grasos de cadena media, larga y eicosanoides (PNAS **1997** 94:4312) que producen una reducción sustancial de los triglicéridos del plasma, una reducción moderada del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y un efecto de saciedad. Por ello, el subtipo alfa de esta familia de receptores se presenta como una diana terapéutica muy interesante para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con alteraciones metabólicas como las dislipemias, enfermedad cardiovascular, diabetes y obesidad (Nature Medicine **2004** 10:355).

60 Las dislipemias son alteraciones del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos (ej. colesterol y triglicéridos) y lipoproteínas en la sangre: lipoproteínas de baja densidad (LDL), de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermediaria (IDL). Normalmente, la molécula de colesterol es transportada ligada a las lipoproteínas LDL. Un incremento en las concentraciones LDL-colesterol está directamente relacionada con el riesgo de enfermedad coronaria. Un porcentaje más pequeño de las moléculas de colesterol es transportado a través de las lipoproteínas de alta densidad, las HDL, cuya función principal es extraer el colesterol depositado en las paredes arteriales y transportarlo hasta el hígado para su eliminación vía intestinal. Se ha descrito que un nivel elevado de HDL-colesterol está asociado con la disminución del riesgo de enfermedad coronaria. Por tanto, en el tratamiento de las dislipemias es igualmente importante reducir las concentraciones de LDL-colesterol como aumentar las de HDL-colesterol (Am. J. Med. **1977** 62:707; N. England J. Med. **1991** 325:373;

Ann. Internal. Med. **1979** 90:85) En la actualidad se están utilizando clínicamente los derivados del fibrato para el control de las dislipemias (Am J Med. **2009** 122: 962), dando lugar a distintos métodos con derivados como el clofibrato y el fenofibrato (WO2007047880 **2007**; WO2007047724 **2007**), que se unen al receptor PPAR-alfa y regulan distintos factores de transcripción implicados en algunos de los procesos anteriormente descritos (Curr. Atheroscler Rep **2000** 2: 327). Además del tratamiento de las dislipemias, se están describiendo agentes agonistas duales de PPAR-alfa/gamma con potencial uso para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (J Med Chem **2004** 47:4118).

La enfermedad coronaria es la principal causa de mortalidad en los países industrializados. La oxidación de los lípidos presentes en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un marcador del desarrollo de arteriosclerosis y enfermedad coronaria (Cell **2001** 104:503). Se postula que la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) está implicada en la patogénesis de la arterioesclerosis y la hipertensión (Physiol. Rev. **2002** 82:47), la oxidación del LDL por las ROS es uno de los primeros eventos en el desarrollo de la enfermedad. La arterioesclerosis puede ser considerada como una forma de inflamación crónica resultado de la interacción entre lipoproteínas modificadas, macrófagos, células T y elementos celulares naturales de la pared arterial. El proceso inflamatorio puede conducir al desarrollo de lesiones complejas o placas. La ruptura de las placas y la trombosis resulta en el infarto de miocardio (Cell **2001** 104:503).

Se ha descrito que algunos de los endocannabinoides conocidos presentan además de afinidad por el receptor CB1 también por el receptor PPAR-alfa como por ejemplo el noladin éter y virodhamida (Br. J Pharmacol **2007** 152:576; Biochem Soc Trans **2006** 34:1095). Algunos cannabinoides sintéticos también han demostrado afinidad por el receptor PPAR-alfa como el WIN55212-2. (Biochem Soc Trans **2006** 34:1095).

Los endocannabinoides tienen menor afinidad por el receptor PPAR-alfa que los ligandos sintéticos actualmente disponibles como las tiazolidindionas (Anal. Biochem. **2005** 344:8). Es importante saber que la Food and Drug Administration de Estados Unidos dictó que, antes de empezar estudios clínicos con agonistas PPAR, debería ser hecho un estudio de 2 años en roedores (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071624.pdf>).

Ligandos duales que presentaran actividad inhibidora del receptor CB1 y que, al mismo tiempo tengan una afinidad moderada por el receptor PPAR-alfa, pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades como la obesidad, pues la acción simultánea en los dos receptores puede llevar a una acción sinérgica para la modulación negativa del apetito (Neuropharmacology. **2008** 54: 226-34). También se cree que el hecho de que la afinidad por el receptor PPAR sea menor disminuye el riesgo de efectos colaterales observados (Toxicology **2007** 346:2).

El hecho de que estos compuestos, además de regular la saciedad tengan un efecto protector sobre la oxidación de la LDL puede ser interesante ya que esta actividad se relaciona con una reducción del riesgo de problemas cardiovasculares que, muchas veces, están asociados a la obesidad.

## Descripción de la invención

La invención se refiere a una nueva clase de moléculas, concretamente derivados amida de ácidos grasos conjugados con anfetaminas derivadas de la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) como ligandos duales de los receptores PPAR-alfa y CB1, e inhibidores de la oxidación de la LDL, así como su procedimiento de preparación y su utilización.

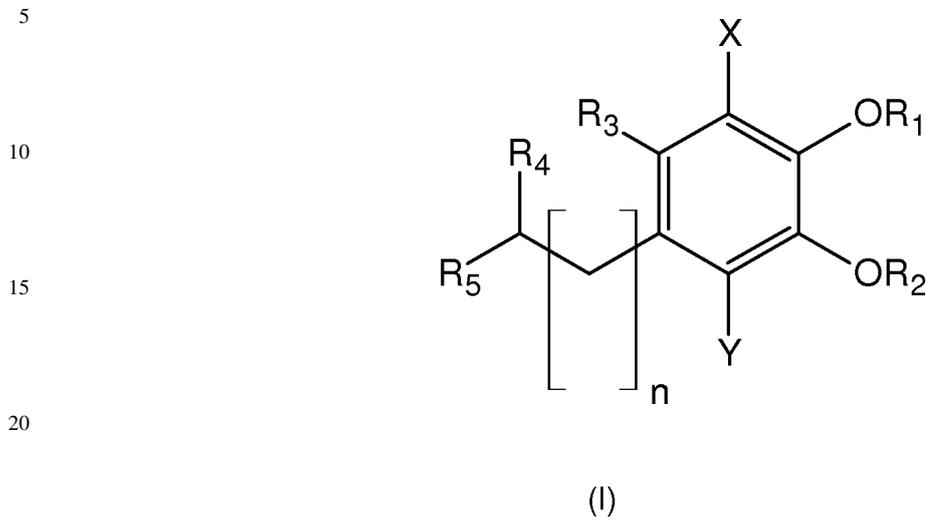
Estos compuestos pueden ser utilizados para la preparación de un medicamento para la inducción de saciedad y control de ingesta, modulación de la grasa corporal y regulación del metabolismo lipídico así como la preparación de un medicamento para el tratamiento diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares.

La presente invención describe derivados de ácidos grasos con anfetaminas para el tratamiento de desórdenes alimenticios.

Por lo tanto, la presente invención está referida a una nueva familia de compuestos derivados de ácidos grasos con anfetaminas de fórmula general (I). Estos compuestos han mostrado una clara actividad inhibitoria de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y del apetito y con afinidad por los receptores CB1 y PPAR-alfa. Es conocido el papel fundamental que tienen los receptores anteriores en enfermedades y condiciones de muy diversa naturaleza, especialmente alimenticia.

# ES 2 362 769 A1

Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un nuevo compuesto de fórmula general (I) (también referido como el compuesto de la invención):



25 donde

X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

30 n es un número entero desde 1 a 4;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo;

35 R<sub>3</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sub>4</sub> se selecciona entre H, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

40 R<sub>5</sub> es un compuesto de fórmula general (II):



55 donde:

60 R<sub>6</sub> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sub>7</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> y alquenilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>;

y sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, solvatos y prodrogas del mismo.

65 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula

## ES 2 362 769 A1

mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden tener opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

5 El término "alquenilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

10 Halógeno se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

En una realización preferida X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo.

15 En una realización preferida n es un número entero seleccionado entre 1 ó 3.

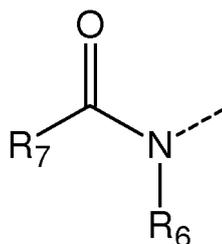
En una realización preferida R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo.

20 En una realización preferida R<sub>3</sub> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

En una realización preferida R<sub>4</sub> se selecciona entre H y CH<sub>3</sub>.

En una realización preferida R<sub>5</sub> es un compuesto de fórmula (II):

25



35

(II)

40

donde R<sub>6</sub> se selecciona entre H y CH<sub>3</sub> y R<sub>7</sub> es un grupo alquenilo C<sub>15</sub>-C<sub>25</sub>.

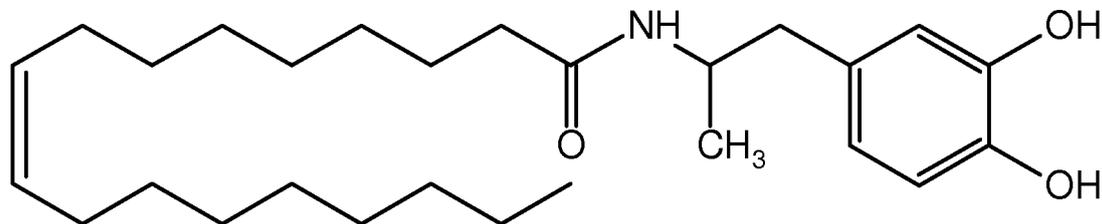
45

En una realización preferida R<sub>7</sub> tiene un número de insaturaciones entre 1 y 6.

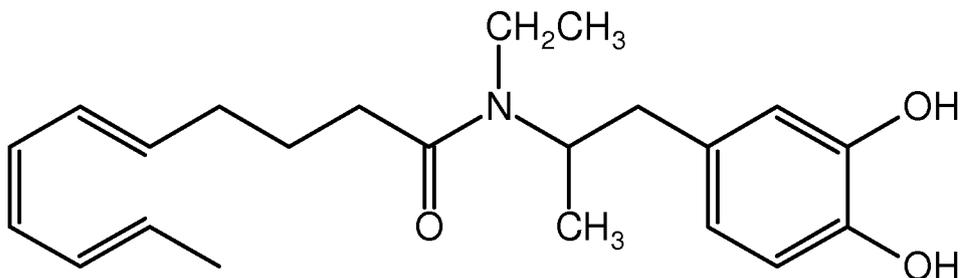
50

En otra realización preferida el compuesto de fórmula general (I) se refiere a un compuesto que se selecciona del siguiente grupo:

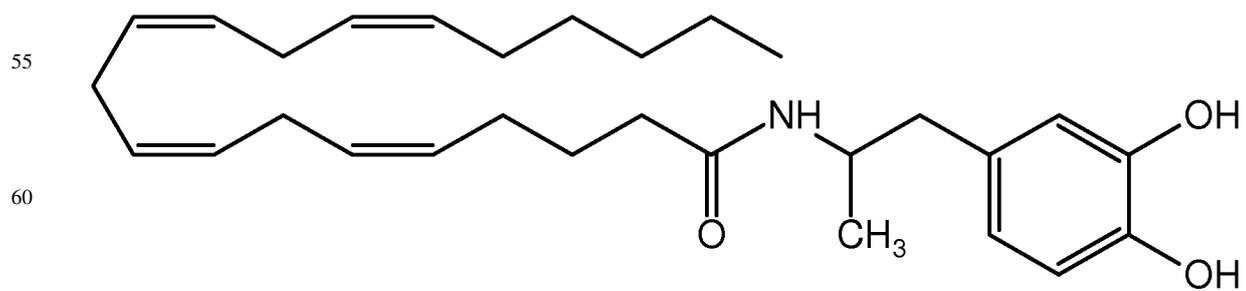
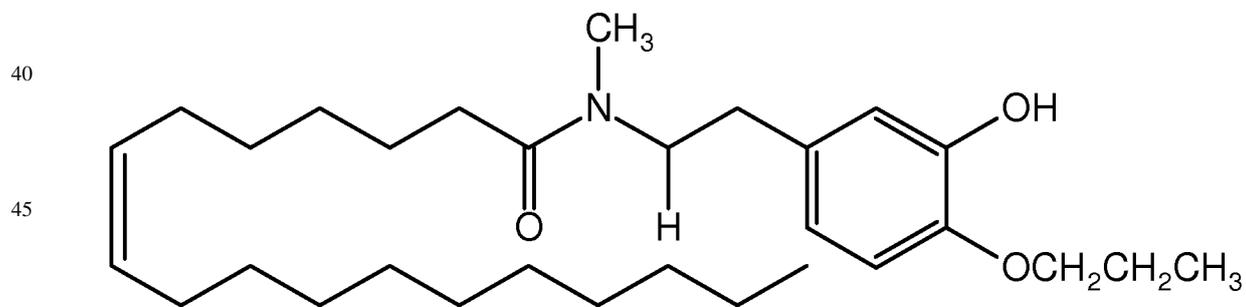
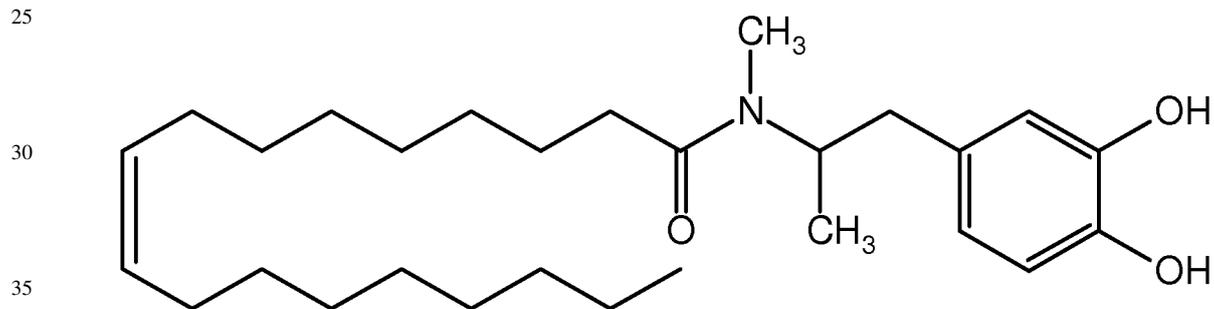
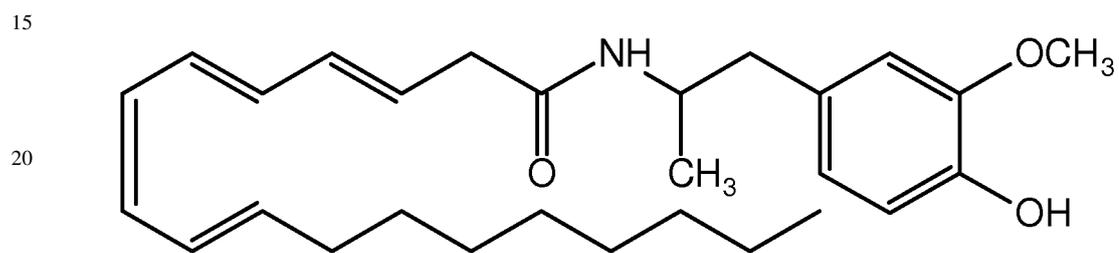
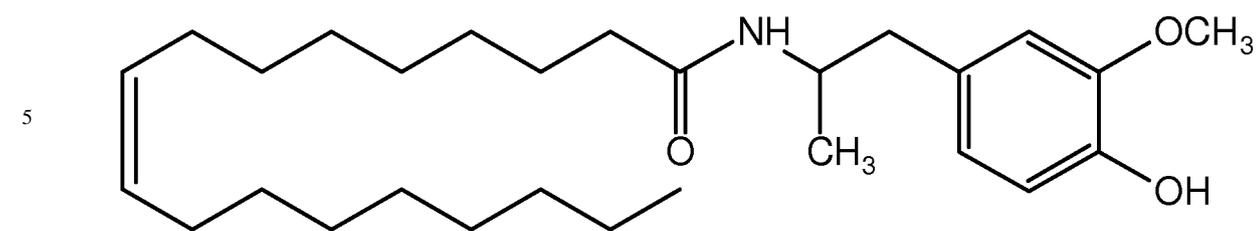
55

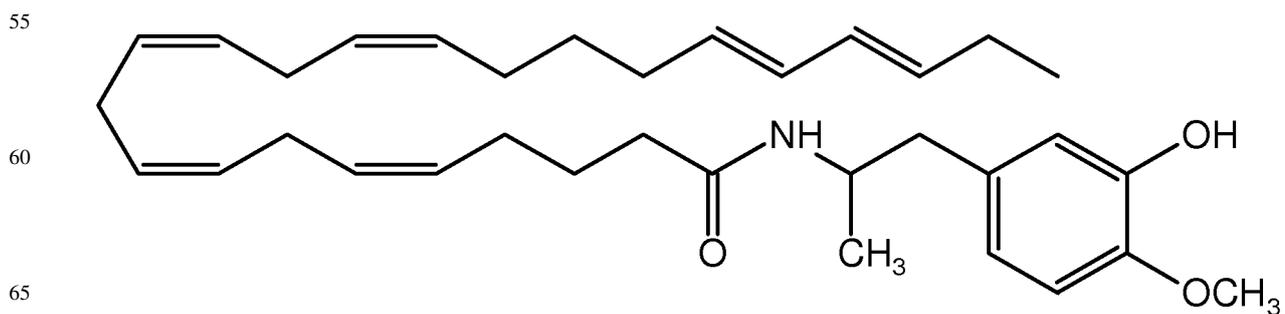
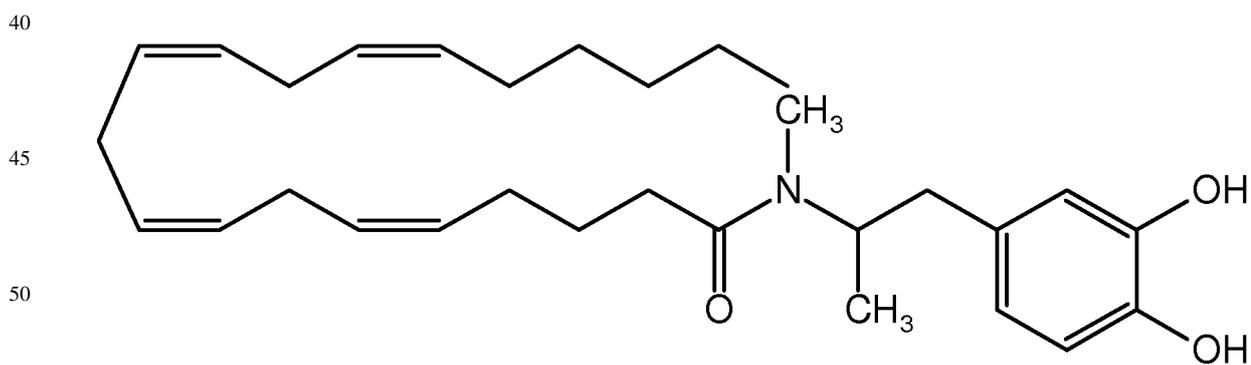
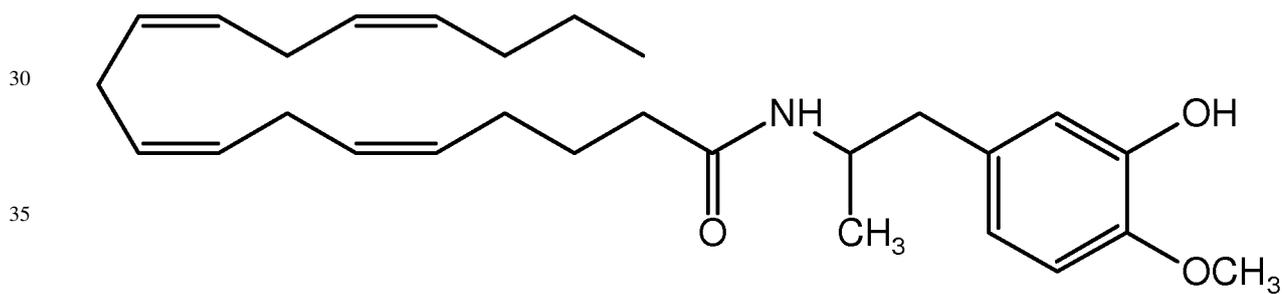
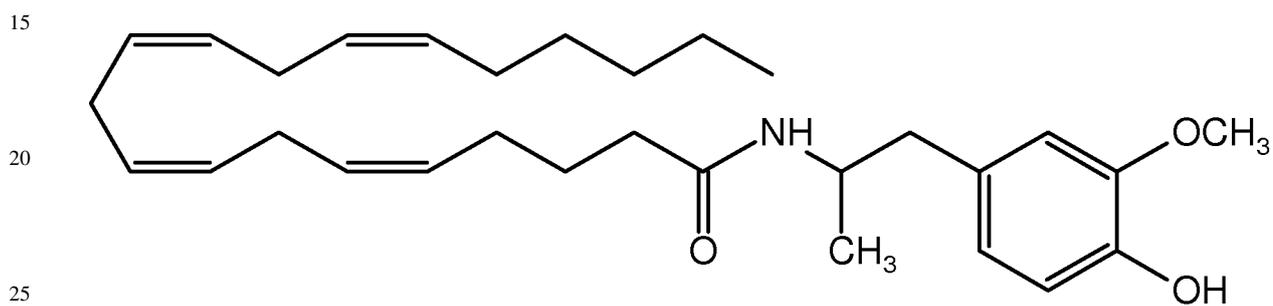
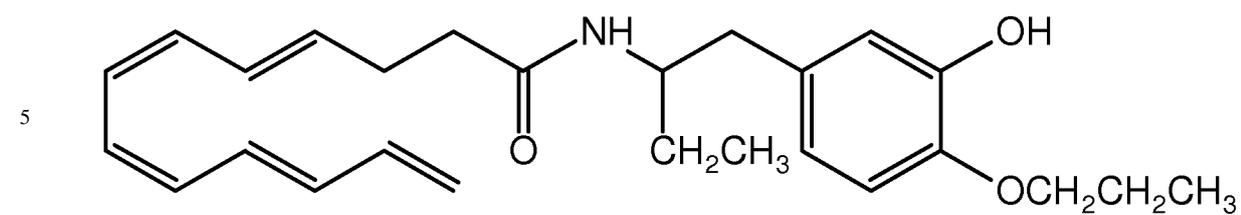


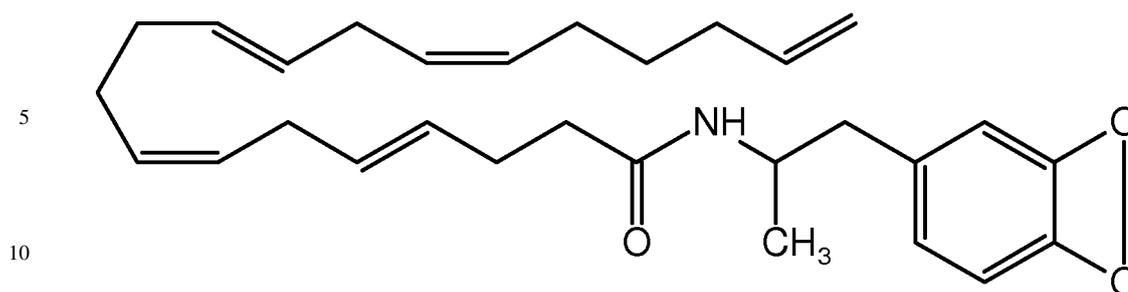
60



65







o un isómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un pro-fármaco o un solvato del mismo.

20 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

25 Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término "prodroga" o "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

40 Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

45 Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

En otra realización preferida el compuesto se fórmula general (I) se usa como medicamento.

55 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, junto con un transportador o carrier farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo, para la administración a un paciente.

60 En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además otro principio activo.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

65 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas,

calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

5 Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

En una realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes 15 agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear 25 excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

30 La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, intraperitoneal o intravenosa. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

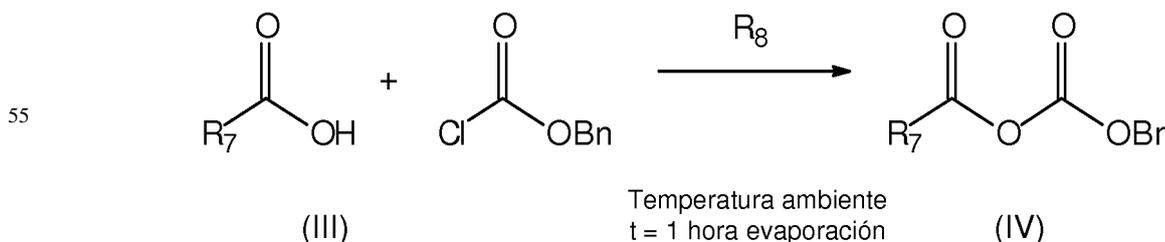
La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

40 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende las siguientes etapas:

- conjugación entre un compuesto de fórmula general (III) y cloroformiato de bencilo para dar lugar a un nuevo compuesto de fórmula general (IV), que comprende la siguiente reacción:

50



60

donde R<sub>7</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> y alqueno C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> y R<sub>8</sub> se selecciona entre NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, NH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y N-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>;

65



**Breve descripción de las figuras**

- Figura 1 - Experimento de ingesta aguda con OLHHA (*N*-oleil-3,4-dihidroxianfetamina).
- 5 Figura 2 - Experimento de ingesta aguda con OLHMA (*N*-oleil-3-metoxi-4-hidroxianfetamina).
- Figura 3 - Experimento de ingesta aguda con OLHHMA (*N*-oleil-*N*-metil-3,4-dihidroxianfetamina).
- Figura 4 - Experimento de ingesta aguda con AAHHA (*N*-araquidonil-3,4-dihidroxianfetamina).
- 10 Figura 5 - Experimento de ingesta aguda con AAHMA *N*-araquidonil-3-metoxi-4-hidroxianfetamina.
- Figura 6 - Experimento de ingesta aguda con AAHHMA (*N*-araquidonil-*N*-metil-3,4-dihidroxianfetamina).
- 15 Figura 7 - Experimento de ingesta aguda con (*N*-oleil-2-feniletilamina).
- Figura 8 - Ensayo de ligando receptor con OLHHA.
- Figura 9 - Ensayo ligando receptor con OLHMA.
- 20 Figura 10 - Ensayo ligando receptor con AAHHA.

**Ejemplos de realización**

25 A continuación se muestran una serie de ejemplos que en todo momento se exponen para ilustrar la síntesis de algunos compuestos particulares de la presente invención y para ejemplificar los procedimientos generales. De acuerdo con lo anterior, la siguiente sección de ejemplos no tiene la intención de ningún modo de limitar el alcance de la invención contemplada en la presente memoria descriptiva.

30 En esta memoria descriptiva los símbolos y convenciones usados en estos procedimientos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en el Sistema Internacional y la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Medicinal Chemistry. Salvo que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, se pueden usar las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva: g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos);  
 35  $\mu$ g (microgramos); L (litros); mL (mililitros);  $\mu$ L (microlitros); mmol (milimoles); mol (moles); °C (grados Celsius); Hz (hertzio); MHz (megahertzio);  $\delta$  (desplazamiento químico); s (singlete); d (doblete); t (triplete); q (cuartete); m (multiplete); RMN (resonancia magnética nuclear); M (molar); Et<sub>3</sub>N (trietilamina); DMF (dimetilformamida); DMSO (dimetilsulfóxido); ACN (acetonitrilo); PBS (búfer fosfato salino).

40 Las anfetaminas HHA, HMA y HHMA, metabolitos del MDMA, fueron obtenidas por síntesis orgánica de acuerdo con la metodología descrita en la literatura (Bioorg. Med. Chem. **2002** 10:1085). Todos los reactivos y disolventes usados, salvo cuando se ha indicado, se obtuvieron de proveedores comerciales y fueron utilizados sin ninguna purificación previa. Todos los análisis de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron realizadas con espectrómetros Varian Anova 500 y Varian Mercury 400. El progreso de todas las reacciones fue monitorizado por CCF (cromatografía de capa fina) en  
 45 hojas de aluminio con una capa de gel de sílice 60 (HF-254, Merck), con un grosor de 0,25 mm.

*Síntesis química**Preparación del oleato de 3,4-dihidroxianfetamina*

50 En un balón de reacción bajo atmósfera de nitrógeno y equipado con agitador magnético se adicionó ácido oleico (45 mmol), acetonitrilo (5 mL), trietilamina (62 mmol) y cloroformato de bencilo (54 mmol) y la mezcla fue agitada durante una hora a 4°C. El acetonitrilo fue eliminado bajo presión reducida y el residuo seco fue redisoluelto en dimetilformamida (DMF) (5 mL). Sobre la solución en DMF, bajo atmósfera de nitrógeno y a 4°C se adicionó al balón trietilamina (46 mmol) y 3,4-dihidroxianfetamina (HHA) (49 mmol). Se agitó la reacción durante 24 horas a 25°C.  
 55 La conversión de la reacción fue evaluada por CCF. La DMF fue eliminada bajo presión reducida y el producto fue purificado por columna cromatográfica flash usando como eluyente acetato de etilo/hexano 20%.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con un rendimiento del 43%: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0.86 (t, *J* = 6.95 Hz, 3H), 1.11 (d, *J* = 6.58 Hz, 3H), 1.19-1.34 (m, 20H), 1.50-1.60 (m, 2H), 1.96-2.03 (m, 4H), 2.12 (t, *J* = 7.78 Hz, 2H), 2.57 (A of an ABX syst., *J* = 7.08, 13.65 Hz, 1H), 2.66 (B of an ABX syst., *J* = 6.55, 13.70 Hz, 1H), 4.16-4.28 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.28-5.39 (m, 2H), 5.53 (d, *J* = 8.28 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 1.40, 8.00, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 14.34, 20.37, 22.92, 26.03, 27.41, 27.46, 29.34, 29.44, 29.56, 29.77, 29.95, 30.00, 32.14, 37.20, 42.26, 46.91, 114.97, 115.90, 121.34, 129.90, 129.96,  
 65 130.22, 143.51, 144.51, 174.11.

## ES 2 362 769 A1

### Preparación del oleato de 3-metoxi-4-hidroxianfetamina

El compuesto representado se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida y las mismas cantidades molares, substituyendo 3,4-dihidroxianfetamina por 3-metoxi-4-hidroxianfetamina.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con un rendimiento del 30%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0.87 (t, *J* = 6.58 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 6.61 Hz, 3H), 1.20-1.37 (m, 20H), 1.51-1.62 (m, 2H), 1.95-2.05 (m, 4H), 2.10 (t, *J* = 7.48, 7.48 Hz, 2H), 2.60 (A of an ABX syst., *J* = 7.34, 13.61 Hz, 1H), 2.76 (B of an ABX syst., *J* = 5.70, 13.59 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 4.18-4.29 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.24-5.41 (m, 3H), 6.63 (dd, *J* = 1.28, 7.95 Hz, 2H), 6.69 (d, *J* = 1.39 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.97 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 14.36, 20.24, 22.92, 26.02, 27.40, 27.45, 29.36, 29.45, 29.51, 29.55, 29.75, 29.95, 29.99, 32.13, 37.25, 42.44, 46.25, 56.12, 111.87, 114.32, 122.34, 129.97, 130.04, 130.21, 144.45, 146.71, 172.72.

### Preparación del oleato de 3,4-dihidroximetanfetamina

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida, utilizando las mismas cantidades molares y substituyendo 3,4-dihidroxianfetamina por 3,4-dihidroximetanfetamina.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 45%. El producto es una mezcla de dos rotámeros (cis y trans). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0.85 (t, *J* = 6.87 Hz, 3H), 0.95 (trans, d, *J* = 6.80 Hz, 3H), 1.12 (cis, d, *J* = 6.50 Hz, 3H), 1.19-1.42 (m, 20 H), 1.36-1.42 (trans, m, 2H), 1.80-1.87 (cis, m, 2H) 1.94-2.00 (m, 4H), 2.06-2.09 (cis, m, 2H), 2.11-2.19 (trans, m, 2H), 2.46-2.55 (m, 2H), 2.66 (cis, s, 3H), 2.74 (trans, s, 3H), 3.95-4.06 (cis, m, 1H), 4.64-4.75 (trans, s, 1H), 5.28-5.36 (m, 2H), 6.36-6.41 (m, 1H), 6.52-6.54 (m, 1H), 6.56-6.70 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 14.36, 14.41, 15.57, 19.50, 21.29, 22.92, 25.34, 25.52, 27.12, 27.45, 29.36, 29.40, 29.47, 29.55, 29.76, 29.96, 30.01, 32.14, 33.24, 34.32, 39.68, 40.00, 55.42, 60.69, 114.94, 115.62, 115.98, 120.66, 120.80, 130.01, 130.16, 143.43, 143.66, 143.65, 144.39, 144.76, 171.53, 174.76, 175.21.

### Preparación del araquidonato de 3,4-dihidroxianfetamina

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida, utilizando las mismas cantidades molares substituyendo ácido oleico por ácido araquidónico.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 39%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0.90 (t, *J* = 6.93 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.62 Hz, 3H), 1.24-1.42 (m, 6H), 1.59-1.74 (m, 2H), 2.03-2.11 (m, 4H), 2.17 (t, 7.73 Hz, 2H), 2.59 (A of na ABX syst., *J* = 7.26, 13.69 Hz, 1H), 2.70 (B of na ABX syst., *J* = 6.48, 13.68 Hz, 1H), 2.77-2.87 (m, 6H), 4.19-4.29 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.30-5.46 (m, 8H), 5.53 (d, *J* = 8.38 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 1.90, 8.02 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.78 (d, *J* = 10.89, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 14.30, 20.34, 22.80, 25.81, 25.85, 26.75, 27.44, 29.54, 31.74, 36.49, 42.26, 47.03, 115.04, 115.93, 121.39, 127.73, 128.05, 128.31, 128.52, 128.85, 129.04, 129.17, 129.94, 130.76, 143.47, 144.48, 173.82.

### Preparación del araquidonato de 3-metoxi-4-hidroxianfetamina

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando los mismos reactivos de partida, utilizando las mismas cantidades molares y substituyendo 3,4-dihidroxianfetamina por 3-metoxi-4-hidroxianfetamina y ácido oleico por ácido araquidónico.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 40%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0.87 (t, *J* = 6.60 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 6.63 Hz, 3H), 1.21-1.40 (m, 6H), 1.61-1.76 (m, 2H), 1.99-2.15 (m, 6H), 2.59 (A of an ABX syst., *J* = 7.48, 13.59 Hz, 1H) 2.73-2.86 (m, 7 H, B of an ABX syst. + 6H), 3.85 (s, 3H), 4.15-4.27 (X of an ABX syst., m, 1H), 5.27-5.43 (m, 9H), 6.62 (dd, *J* = 1.50, 7.95 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 1.40 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 7.98 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 14.32, 20.18, 22.81, 25.80, 25.85, 26.86, 27.44, 29.55, 31.74, 36.52, 42.44, 46.33, 56.11, 111.89, 114.36, 122.33, 127.72, 128.06, 128.37, 128.44, 128.81, 128.95, 129.31, 130.01, 130.74, 144.47, 146.73, 172.45.

### Preparación del araquidonato de 3,4-dihidroximetanfetamina

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando las mismas cantidades molares y substituyendo 3,4-dihidroxianfetamina por 3,4-dihidroximetanfetamina y ácido oleico por ácido araquidónico.

El producto fue obtenido como un aceite amarillo con rendimiento 42%. El producto es una mezcla de dos rotámeros (cis and trans). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0.87 (t, *J* = 6.60 Hz, 3H), 0.95 (trans, d, *J* = 7.00 Hz, 3H), 1.11 (cis, d, *J* = 6.5 Hz, 3H) 1.20-1.34 (m, 6H), 1.43-1.50 (trans, m, 2H), 1.83-1.94 (cis, m, 2H), 1.98-2.03 (m, 4H), 2.08-2.37 (m, 4H), 2.65 (cis, s, 3H), 2.73 (trans, s, 3H), 2.74-2.82 (m, 6H), 3.95-4.01 (cis, m, 1H), 4.65-4.72 (trans, m, 1H), 5.25-5.38 (m, 8H), 6.36-6.40 (m, 1H), 6.52-6.54 (m, 1H), 6.57-6.61 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 17.57, 19.53, 22.81, 25.06, 25.20, 25.85, 26.83, 26.87, 27.13, 27.45, 29.35, 29.56, 31.74, 32.56, 33.65, 39.68, 39.97, 49.95, 55.37, 60.70, 114.97, 115.57, 115.99, 120.69, 120.83, 127.74, 127.77, 128.07, 128.13, 128.34, 128.39, 128.42,

## ES 2 362 769 A1

128.52, 128.81, 129.81, 129.00, 129.32, 129.35, 130.05, 130.08, 130.73, 143.42, 143.67, 144.38, 144.67, 144.74, 174.42, 174.92.

### Preparación del oleato de 2-feniletilamina

5

El compuesto se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando las mismas cantidades molares de 2-feniletilamina y ácido oleico.

10 El producto fue obtenido como un sólido blanco con rendimiento del 95%.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_2$ )  $\delta$  ppm 0.87 (t,  $J = 6.93$  Hz, 3H), 1.21-1.37 (m, 20H), 1.53-1.63 (m, 2H), 1.96-2.05 (m, 4H), 2.11 (t,  $J = 7.60$  Hz, 2H), 2.81 (t,  $J = 6.94$  Hz, 2H), 3.49-3.53 (m, 2H), 5.30-5.37 (m, 2H), 5.53 (br s, 1H), 7.18-7.33 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_2$ )  $\delta$  ppm: 14.38, 22.93, 25.99, 27.41, 27.46, 29.38, 29.48, 29.51, 29.56, 29.77, 29.95, 30.01, 32.14, 35.93, 37.05, 40.75, 126.72, 128.84, 128.99, 129.97, 130.22, 139.15, 173.47.

### 15 Ensayo de ligando receptor

El ensayo ligando receptor para el receptor CB1, evalúa la capacidad de los compuestos sintetizados de desplazar [ $^3\text{H}$ ] SR141716 (conocido ligando con afinidad por receptor CB1) en un homogenado de cerebelo de ratas.

20 La prueba de ensayo ligando receptor fue realizada usando el antagonista CB1 marcado [ $^3\text{H}$ ] SR141716. En cada tubo fueron adicionados 450  $\mu\text{L}$  de solución reguladora de pH A (50 mM Tris pH=7.4 con 0.5% de albúmina de suero bovino (BSA)), 100-200  $\mu\text{g}$  de membranas de cerebelo de ratas, el producto diluido y el antagonista CB1 marcado [ $^3\text{H}$ ] SR141716. Después de 60 minutos de incubación a 37°C, la reacción fue paralizada con 1 mL del solución reguladora de pH A. La mezcla fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet lavado con 1 mL más de solución reguladora de pH A, centrifugado y una más vez el sobrenadante fue descartado. Se adicionó líquido de centelleo y las muestras fueron leídas en un contador de partículas beta (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2100 TR, PACKARD, a Packard Bioscience Company). Todos los productos fueron diluidos en solución reguladora de pH B (50 mM Tris pH=7.4 con 0.5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0.3% de DMSO) en las concentraciones de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$  M. Todas las concentraciones de cada producto fueron leídas por triplicado (Figuras 8 a 10).

### Ensayo del "reporter gene assay"

35 El ensayo "reporter gene assay" es un método *in vitro* utilizado para determinar y cuantificar la existencia de interacciones físicas entre proteínas, siendo útil para confirmar en nuestro caso la interacción del factor de transcripción PPAR-alfa y el coactivador SRC-1 en células MCF-7. La oleiletanolamida fue usada como un control positivo y la anandamida como control negativo.

40 Oleiletanolamida (OEA), GW7647, anandamida (AEA) y ácido oleico fueron suministrados por Tocris Bioscience (Cookson Ltd. Bristol, UK). Para los experimentos *in vitro*, con cultivo de células todos los compuestos fueron disueltos y diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich Spain).

45 Constructos de DNA: Como vehículo de expresión del ADNc para el receptor PPAR- $\alpha$  humano se utilizó el vector de expresión eucariota pSG5 (4100 pares de bases, *Stratagene Co.*). Esta construcción se utilizó para la sobreexpresión *in vivo* de la proteína en células mamíferas.

50 Cuatro copias del gen CPTI humano tipo DR1 RE (secuencia GTAGGGAAAAGGTCA) fueron individualmente fusionadas con el promotor de la timidina quinasa en el vector pGL-2 Basic (5598 pares de bases, *Promega Co.*) que carece de promotor eucariota y que contiene un gen indicador (traducción de *reporter gene*) luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Este vector es muy utilizado en el análisis cuantitativo de factores capaces de regular la expresión de genes en células mamíferas. Este vector pGL-2 Basic también presenta una región de resistencia a la ampicilina (gen para  $\beta$ -lactamasa).

55 Células humanas de cáncer de mama MCF-7 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos ( $10^5$  células/mL) y crecidas durante toda la noche para su estabilización en un medio de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) libre de rojo fenol suplementado con un 5% de suero bovino fetal o FBS tratado con carbón.

60 Liposomas conteniendo plásmidos de DNA fueron formados incubando 1  $\mu\text{g}$  de un vector de expresión para PPAR-alfa, RXR-alfa y SRC-1 salvaje y 1  $\mu\text{g}$  de plásmido indicador luciferasa con 10  $\mu\text{g}$  de *N*-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonio metilsulfato (DOTAP, Roche) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un volumen total de 100  $\mu\text{L}$ . Después de dilución con 900  $\mu\text{L}$  de DMEM libre de rojo fenol, los liposomas fueron añadidos a las células. El DMEM libre de rojo fenol suplementado con 500  $\mu\text{L}$  de FBS tratado con carbón al 15% fue añadido 4 h después de la transfección. En este momento, las células fueron tratadas 16 horas con diferentes concentraciones en DMSO ( $10^{-9}$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M) de OEA, GW7647, AEA, ácido oleico y los diferentes compuestos sobre evaluación como indicado.

Las células fueron lisadas 15 horas después de la estimulación usando la solución reguladora de pH de lisis del gen indicador siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics).

## ES 2 362 769 A1

El ensayo de quimioluminiscencia que permite una determinación cuantitativa de actividad luciferasa en células transfectadas se llevó a cabo siguiendo también las indicaciones del proveedor (*Luciferase Reporter Gene Assay, constant light signal de Roche Diagnostics GmbH*): La presencia de esta enzima es detectable en extractos de células transfectadas gracias a su bioluminiscencia: la reacción catalizada por la luciferasa transforma la luciferina en oxiluciferina en presencia de ATP, Mg<sup>2+</sup> y O<sub>2</sub>, y produce además fotones de luz visible.

La actividad luciferasa fue normalizada respecto a la concentración de proteína (obtenida previamente siguiendo el método de *Bradford* con el kit reactivo *Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1x* suministrado comercialmente por *Bio-Rad Laboratories Inc.* y empleando un lector de microplacas *VERSAmix*<sup>®</sup> de *Molecular Devices Corp.*), y los factores de inducción se calcularon como la ratio de actividad luciferasa de las células estimuladas por ligando respecto a los solventes como se muestra en la tabla 1 correspondiente a los resultados de experimentos de ensayo ligando receptor y de afinidad para PPAR-alfa.

TABLA 1

Compuesto	CB1 Ki (M)	CB1 pKi	PPAR-α EC50 (nM)
SR141716	3,64E-10	9,44	-
Anandamida	1,7E-07 <sup>a</sup>	6,77	> 10.000
WIN55212-2	1,11E-8 <sup>a</sup>	7,95	-
<b>OLHHA</b>	3,65E-07	6,44	698 ± 102
<b>OLHMA</b>	1,44E-06	5,84	1022 ± 206
<b>AAHHA</b>	2,02E-07	6,69	> 10.000
Oleato de 2-feniletilamina	-	-	1879 ± 384
Acido Oleico	-	-	218 ± 150
OEA	-	-	148 ± 29
GW7647	-	-	65 ± 1

<sup>a</sup> valores recogidos en la literatura (*British Journal Pharmacology* **1999** 128:684)

### Ensayo de inhibición de la hidrolasa de amidas de ácido graso (FAAH)

El ensayo de inhibición de la hidrolasa de amidas de ácido graso (FAAH) evalúa la capacidad de los compuestos descritos de inhibir la actividad de la enzima FAAH. Se utilizó córtex de cerebro de ratas como fuente de FAAH y anandamida tritiada como sustrato. La inhibición de la degradación de la anandamida tritiada por los compuestos descritos fue monitorizada con un contador de partículas beta.

En cada tubo se adicionaron 440 µL de solución reguladora de pH A (50 mM Tris pH=7.4 con 0.5% albúmina de suero bovino (BSA)) 100-200 µg de membranas de córtex de cerebros de ratas, los productos diluidos (concentraciones de 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup> y 10<sup>-11</sup> M), 0,025 µCi de [<sup>3</sup>H]anandamida y 10 µM de anandamida. Después de 60 minutos de incubación con agitación a 37°C, se adicionó cloroformo (1 mL). Los tubos fueron agitados en vortex y posteriormente centrifugados a 3000 RPM durante 5 minutos. Se transfirieron 0,25 mL de cada tubo a viales con líquido de centelleo y se analizaron en un contador de partículas beta (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 2100 TR, PACKARD A Packard Bioscience Company). Todos los productos fueron diluidos en solución reguladora de pH B (50 mM Tris pH=7.4 con 0.5% albúmina de suero bovino (BSA) y 0.3% DMSO). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Ninguno de los compuestos demostró actividad sobre el FAAH.

### Experimento de inhibición de la oxidación de la LDL

Para probar el poder antioxidante de los compuestos sintetizados se monitorizó la cinética de oxidación de la LDL inducida por CuSO<sub>4</sub> en presencia o ausencia de los compuestos sintetizados.

La LDL fue aislada de acuerdo con un procedimiento anteriormente descrito (*Med. Clin. (Barc.)* **2000** 115:166).

### Monitorizado de la oxidación de la LDL

Se utilizó una placa de ELISA de 96 pocillos y en cada pocillo se añadieron 140 µL de la LDL diluida (0,06 g/L) y 10 µL del producto diluido en metanol y, con la misma pipeta, se homogenizó el contenido de cada pocillo. Posteriormente se añadieron 10 µL de una solución 100 µM de CuSO<sub>4</sub> (la concentración final en cada pocillo fue: 0,1; 0,5;

## ES 2 362 769 A1

1,0  $\mu\text{M}$  de producto, 0,05 g/L de LDL y 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ ) y la placa fue puesta en el espectrofotómetro (Lector Infinite M200-TECAN IBERICA, Männedorf, Switzerland). Se monitorizó la absorbancia a 234 nm en intervalos de 15 minutos a 36,5°C. La variable utilizada para estudiar la resistencia de la LDL a la oxidación fue el “lag time” (minutos). El perfil de la curva de oxidación de los dienos presentes en la LDL puede dividirse en tres fases consecutivas: fase lenta, fase de propagación y fase de descomposición. El “lag time” es determinado por la intersección de la fase de propagación con la extrapolación de la fase lenta. El “lag time” fue calculado usando la absorbancia molar  $\epsilon_{234\text{ nm}}$  para dienos conjugados (29.500  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Para cada experimento se utilizaron 4 pocillos como control negativo sin añadir ninguno de los productos y un control positivo con hidroxitirosol. Todos estos resultados se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

Compuestos	Ratio “Lag time”		
	(95% CI)		
	0,1 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
HT	0,99 (0,91-1,07)	1,16 (1,01-1,31)	1,32 (0,49-2,15)
<b>OLHHA</b>	1,02 (0,94-1,09)	1,24 (1,12-1,37)	1,37 (1,15-1,59)
<b>OLHMA</b>	1,09 (0,94-1,24)	1,37 (1,16-1,58)	1,35 (1,11-1,59)
<b>OLHHMA</b>	1,03 (0,99-1,08)	1,32 (1,12-1,51)	1,56 (1,37-1,59)
<b>AAHHA</b>	1,07 (1,02-1,12)	1,12 (1,05-1,19)	1,15 (1,04-1,27)
<b>AAHMA</b>	1,04 (0,98-1,09)	1,25 (1,15-1,35)	1,38 (1,18-1,57)
<b>AAHHMA</b>	1,01 (0,97-1,06)	1,22 (1,10-1,34)	1,34 (0,92-1,76)
OLDA	1,01 (0,96-1,05)	1,13 (0,96-1,30)	1,43 (1,29-1,58)
NADA	1,01 (0,94-1,07)	1,25 (0,97-1,53)	1,33 (1,12-1,54)

### *Experimentos in vivo*

Todos los experimentos *in vivo* fueron hechos usando ratas Wistar macho con 200-450 g de peso. Los animales fueron alojados en jaulas individuales en una habitación con temperatura (23°C) y humedad (50%) controladas con ciclo de luz y oscuridad de 12/12. Los animales disponían de agua y comida *ad libitum* excepto en procedimientos experimentales específicos. Los animales fueron manipulados una vez al día durante los dos días anteriores a las sesiones experimentales. Todos los productos fueron disueltos en una mezcla de DMSO 5%, Tween 60 5%/salina 90% y administrados intraperitonealmente.

### *Experimento de ingesta*

El efecto agudo sobre la ingesta de todos los productos fue probado en animales en ayuno de 24 horas. La amida de 2-feniletilamina con ácido oleico (OLFEA) fue usada como teórico control negativo debido a la ausencia del grupo catecol.

Treinta minutos después de la inyección la comida previamente pesada fue repuesta en la jaula. La comida fue pesada a los 30, 60, 120 y 240 minutos después del inicio de la prueba. Todos los experimentos de ingesta fueron realizados con grupos de 8 animales (n=8) (Figuras 1 a 7).

### *Prueba de campo abierto*

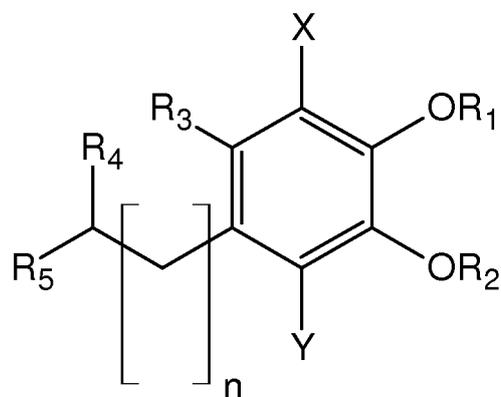
Para confirmar que la modulación negativa en el experimento de ingesta no era debido a un efecto anestésico de los productos se probó el compuesto OLHHA (unos de los compuestos más activos en el experimento de ingesta) en un experimento de campo abierto usando las mismas dosis.

La prueba de campo abierto mide el conflicto natural del animal entre la tendencia de explorar y la reacción de recelo de auto protección. Las ratas fueron aclimatadas a la habitación de la prueba durante 30 minutos antes de la prueba comportamental. El animal fue inyectado con el producto y puesto en el centro del tablero de dimensiones de 40 cm x 40 cm y paredes de 30 cm de altura. El desplazamiento total y el tiempo gasto por el animal en las esquinas o el centro del tablero fue registrado usando un sistema de seguimiento en video (Smart<sup>®</sup> Panlab, Barcelona, Spain).

El producto OLHHA no demostró modulación en el comportamiento del animal en la prueba de campo abierto.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

25  
donde

X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

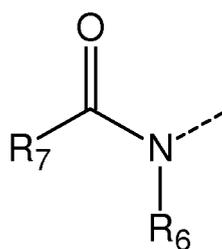
n es un número entero desde 1 a 4;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo;

R<sub>3</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sub>4</sub> se selecciona entre H, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sub>5</sub> es un compuesto de fórmula general (II):



(II)

55  
donde

R<sub>6</sub> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sub>7</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> y alquenilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>;

y sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, solvatos y prodrogas del mismo.

65 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde n es 1 ó 3.

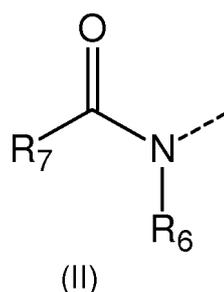
## ES 2 362 769 A1

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y metilo o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde  $R_3$  se selecciona entre H y alquilo  $C_1-C_3$ .

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde  $R_4$  se selecciona entre H y  $CH_3$ .

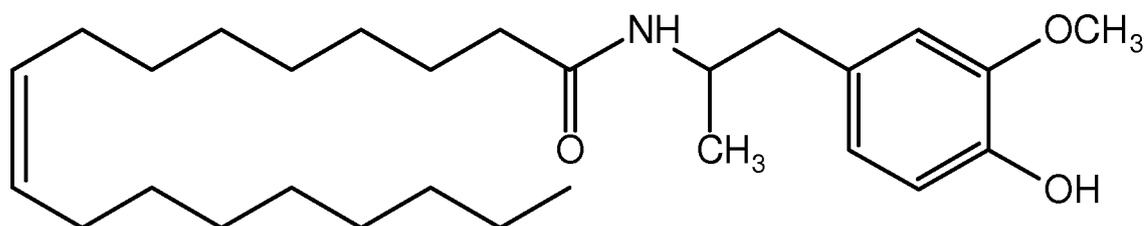
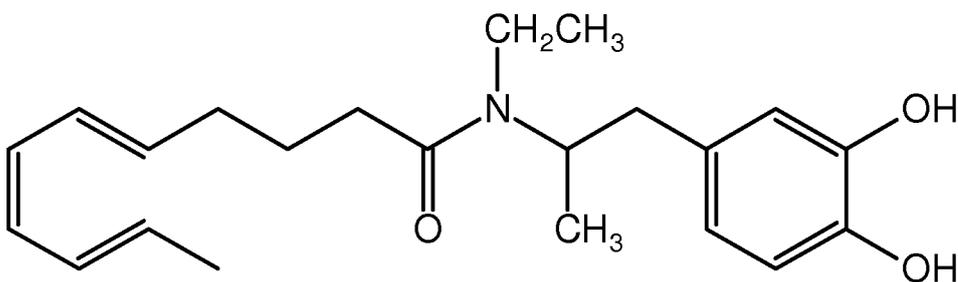
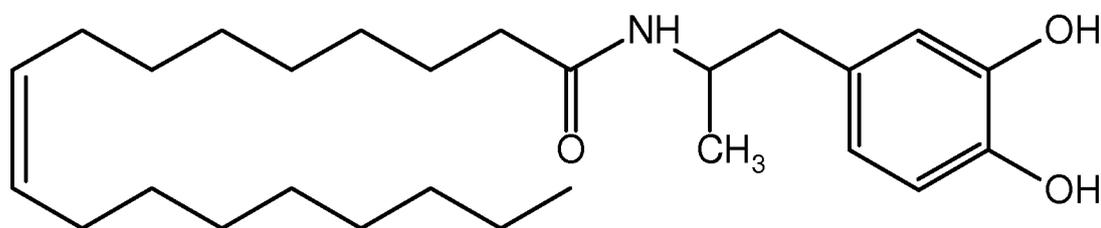
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde  $R_5$  es un compuesto de fórmula (II):

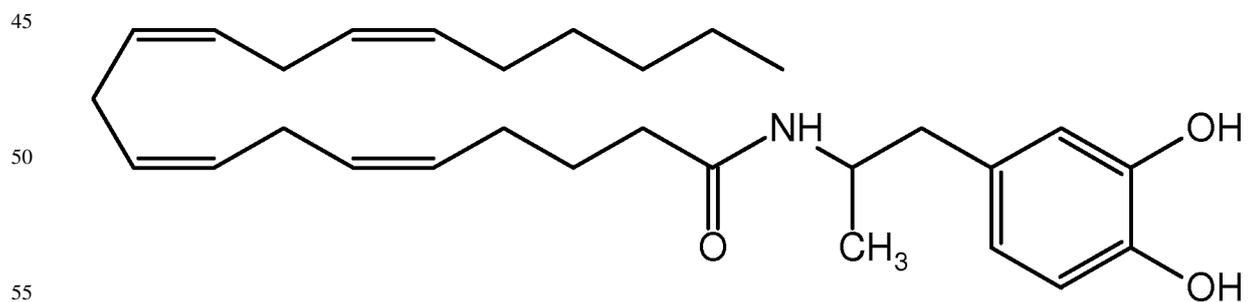
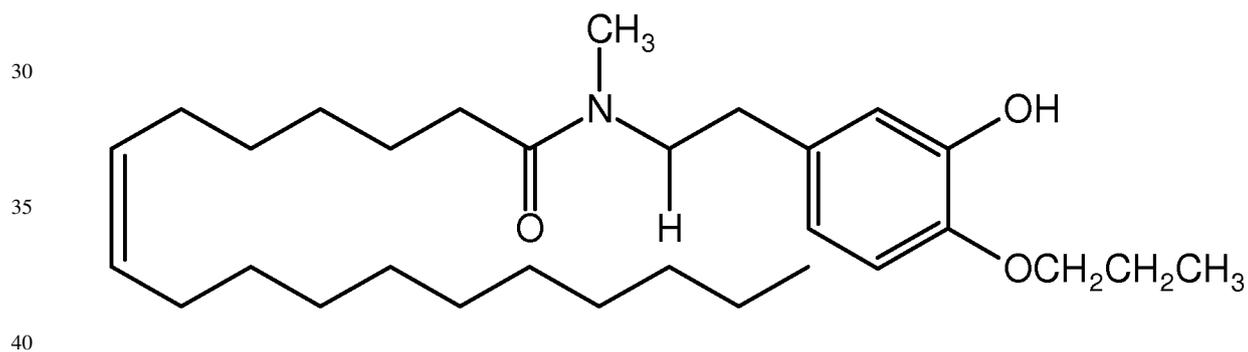
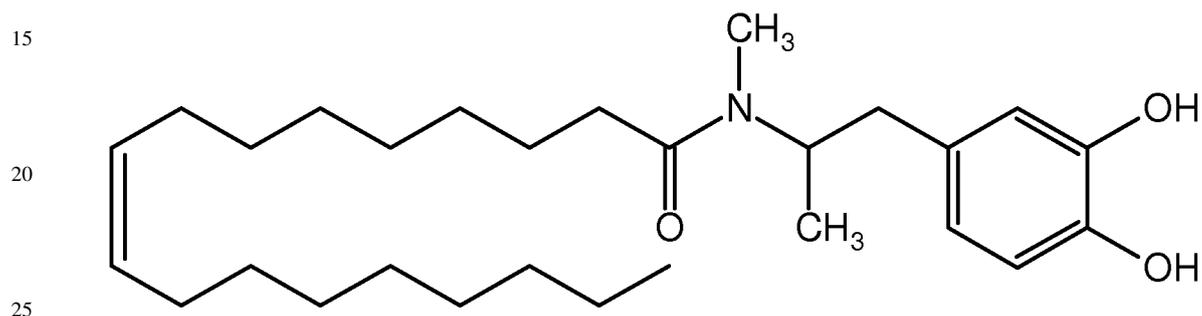
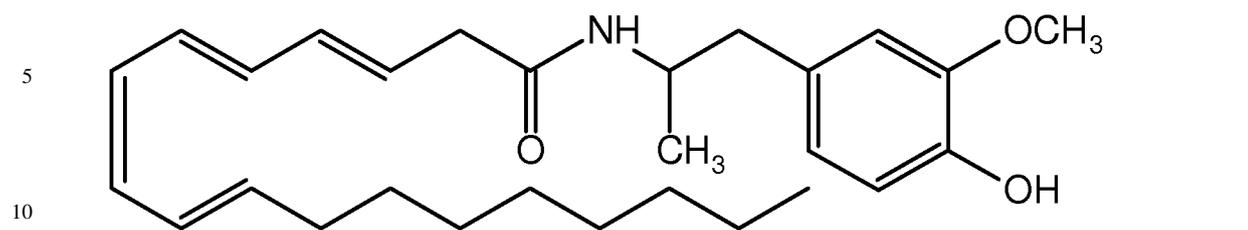


donde  $R_6$  se selecciona entre H y  $CH_3$  y  $R_7$  es un grupo alquenoilo  $C_{15}-C_{25}$ .

8. Compuesto según la reivindicación 7, donde  $R_7$  tiene un número de insaturaciones entre 1 y 6.

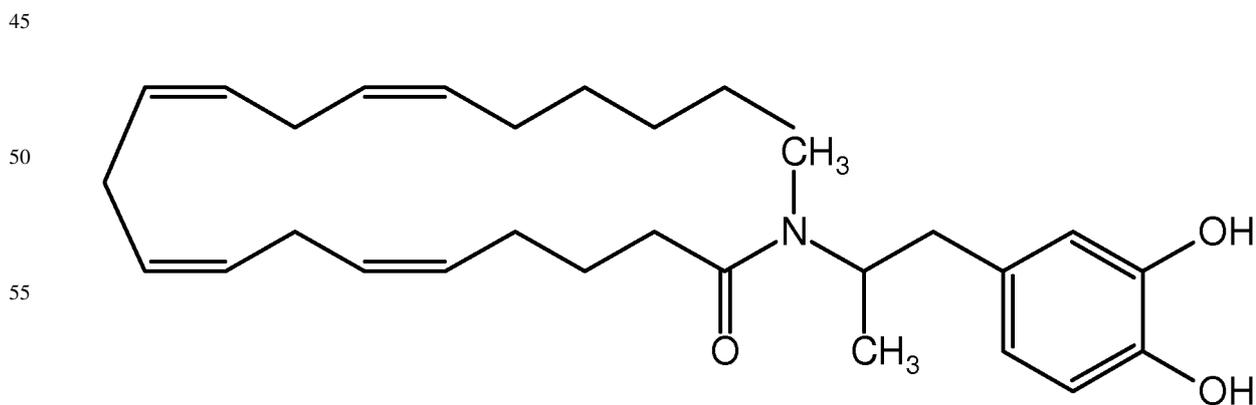
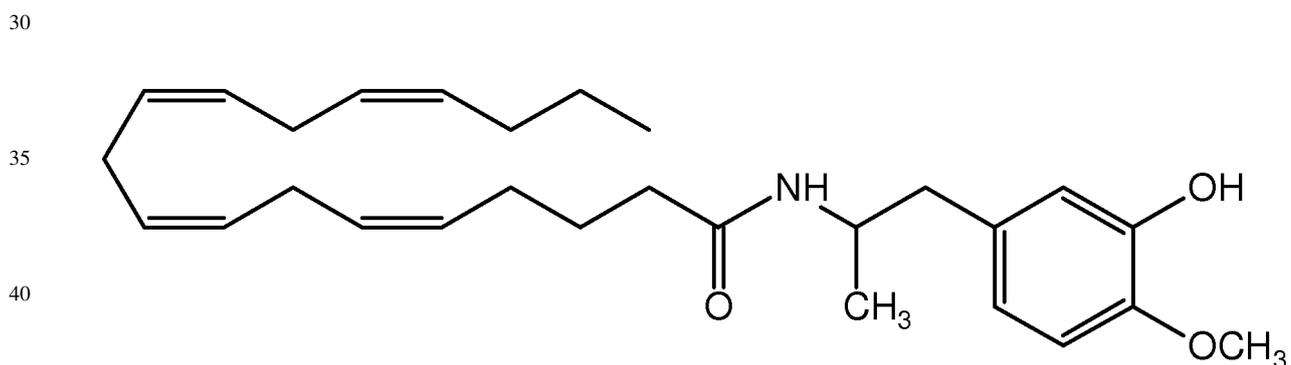
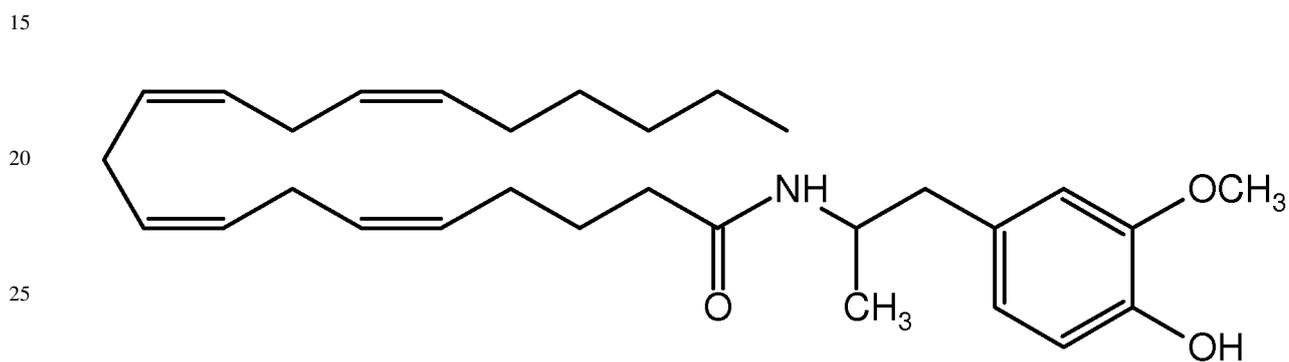
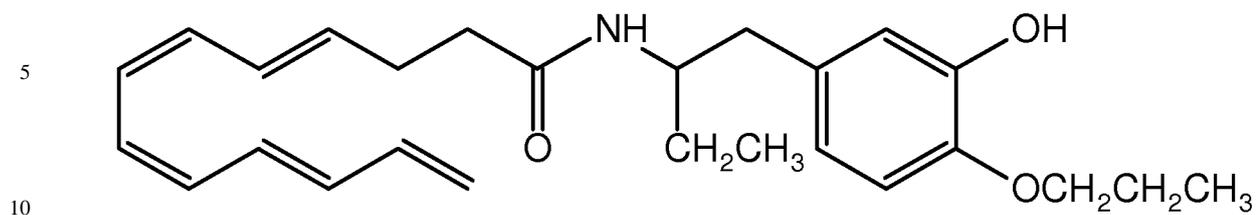
9. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado entre



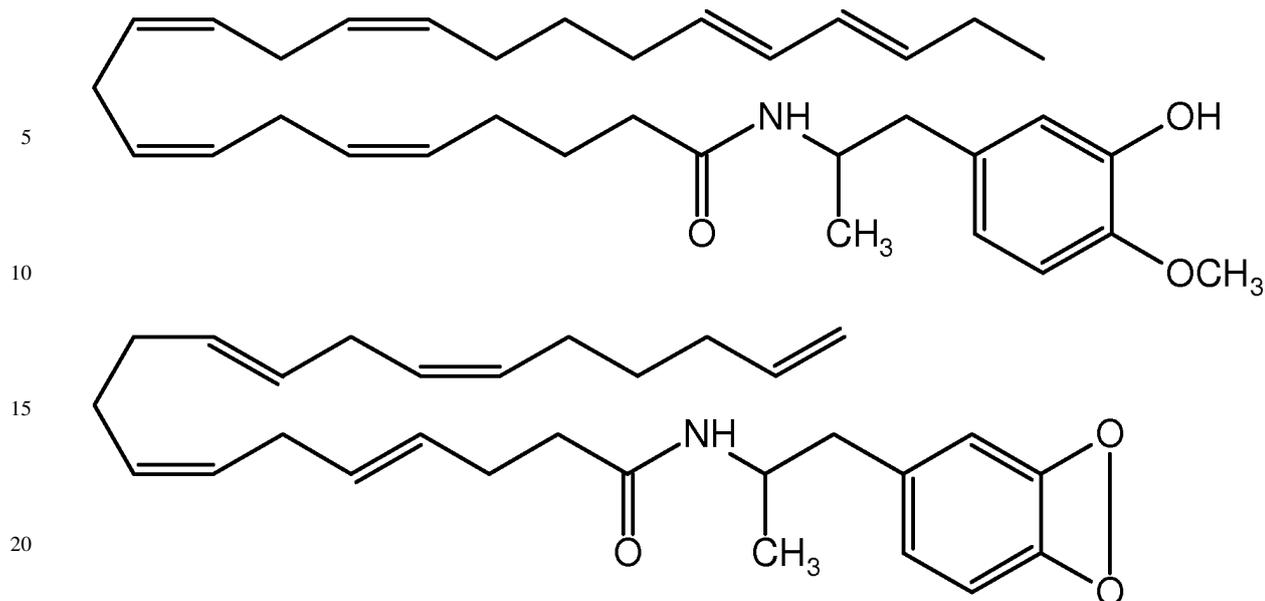


60

65

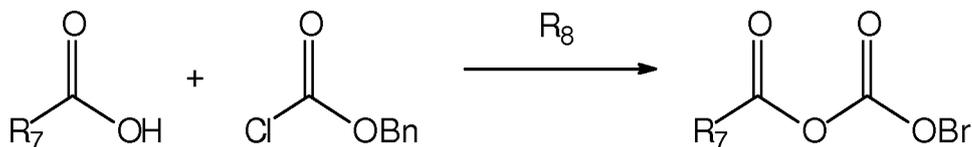


65



- 25 10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como medicamento.
- 30 11. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula (I) como se define en las reivindicaciones 1 a 10, o sus sales, solvatos o prodrogas del mismo, y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.
- 35 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, que comprende además otro principio activo.
- 40 13. Uso del compuesto de fórmula (I) según reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o trastorno de la alimentación.
- 45 14. Uso del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 13, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por el receptor cannabinoide CB1 y/o mediada por los receptores PPAR-alfa y/o para la inhibición de la oxidación de LDL
- 50 15. Uso del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 donde la enfermedad o trastorno de la alimentación se selecciona de la lista que comprende: obesidad, anorexia, disfunción lipídica, diabetes, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.
- 55 16. Uso del compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 13 para reducir la grasa subcutánea y/o para la inducción de saciedad y control de la ingesta.
- 60 17. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

- 50 a. conjugación entre un compuesto de fórmula general (III) y cloroformiato de bencilo para dar lugar a un nuevo compuesto de fórmula general (IV), que comprende la siguiente reacción:



60 Temperatura ambiente  
t = 1 hora evaporación

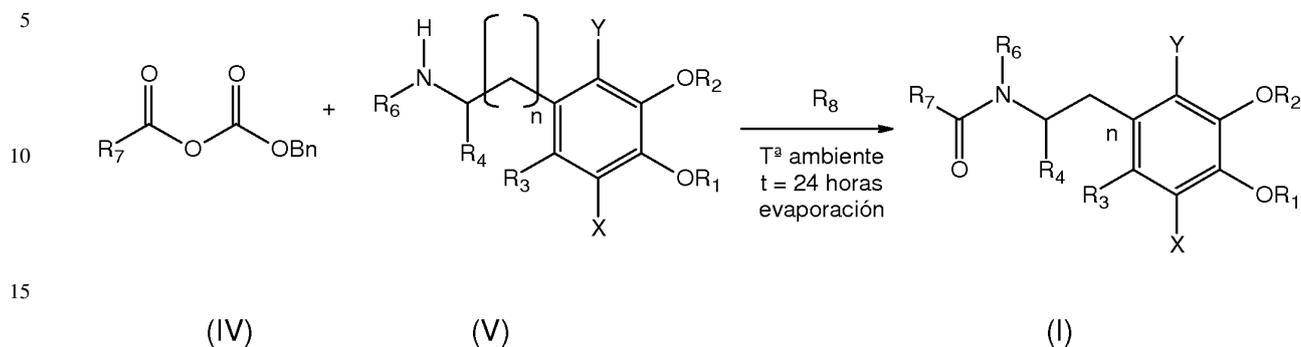
(III)

(IV)

65 donde R<sub>7</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> y alquenilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> y R<sub>8</sub> se selecciona entre NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, NH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y N-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>;

## ES 2 362 769 A1

- b. reacción del compuesto de fórmula general (IV) con un compuesto de fórmula general (V) para dar lugar al compuesto de fórmula general (I) usando como disolvente dimetilformamida:



donde

X e Y pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H, halógeno y metilo;

n es un numero entero desde 1 a 4;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes de forma independiente y se seleccionan entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o pueden estar unidos por un enlace simple entre los dos átomos de oxígeno, formando un nuevo ciclo;

R<sub>3</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

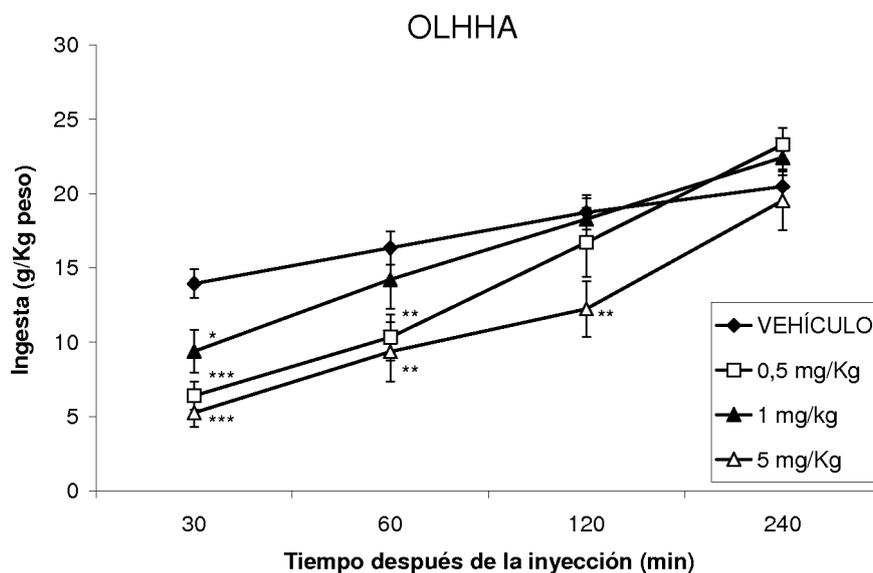
R<sub>4</sub> se selecciona entre H, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

R<sub>6</sub> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

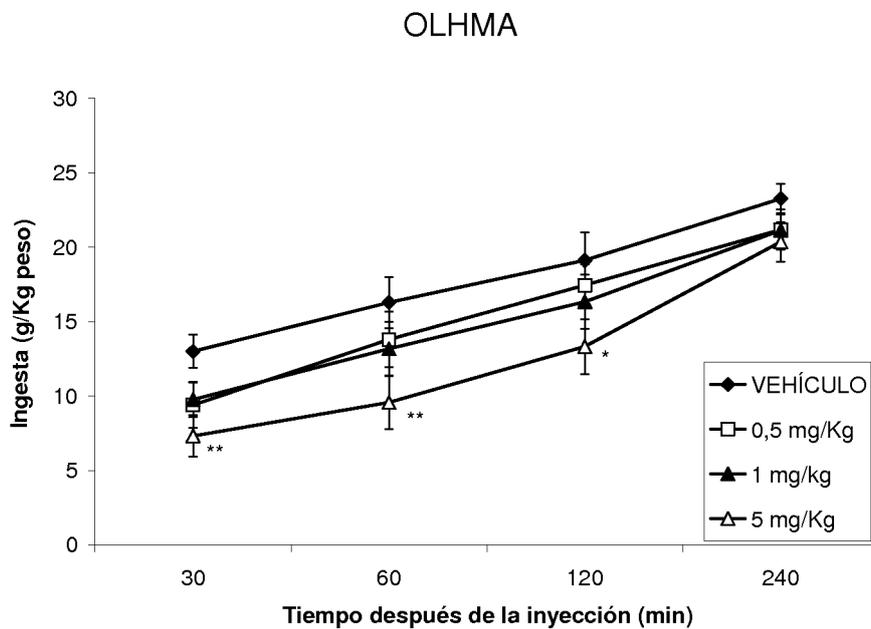
R<sub>7</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> y alqueno C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>;

R<sub>8</sub> se selecciona entre NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, NH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y N-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>;

- c. evaporación de la dimetilformamida y extracción con acetato de etilo y agua;
- d. tratamiento de la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y evaporación del disolvente;
- e. purificación del compuesto de fórmula (I) por cromatografía.



**Figura 1**



**Figura 2**

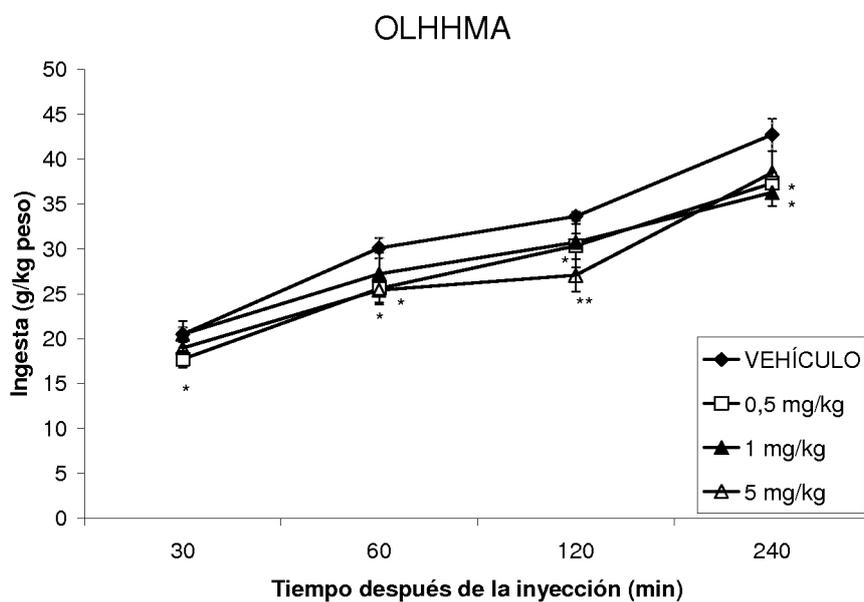


Figura 3

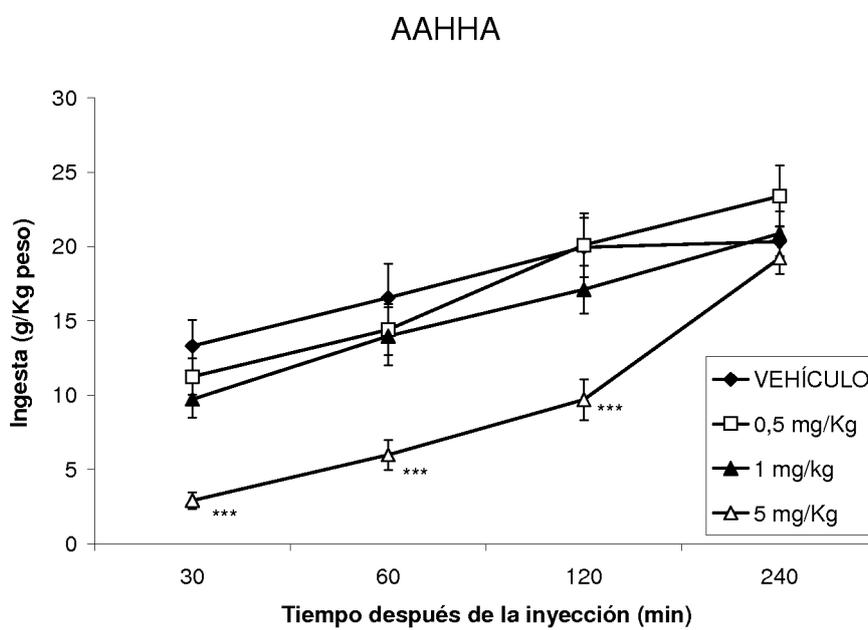
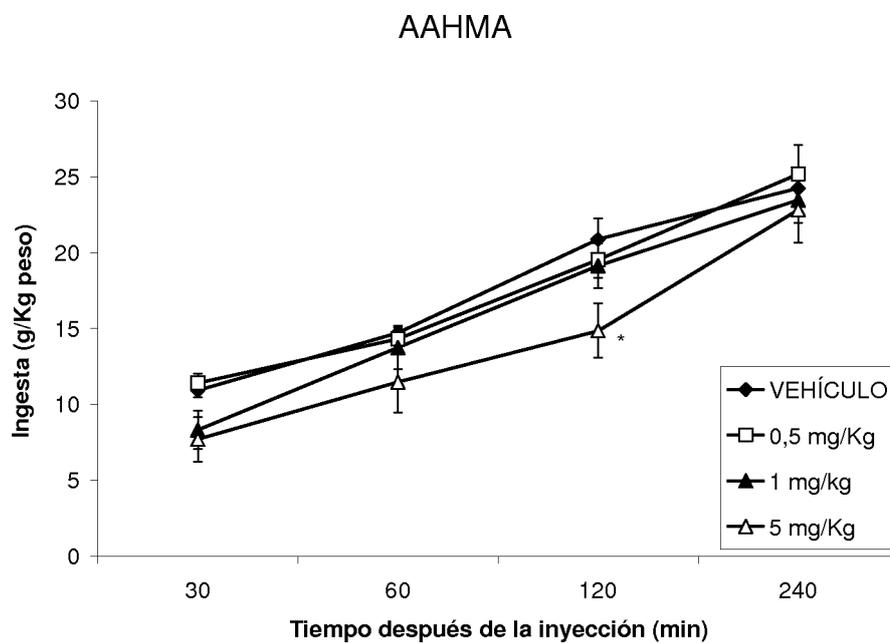
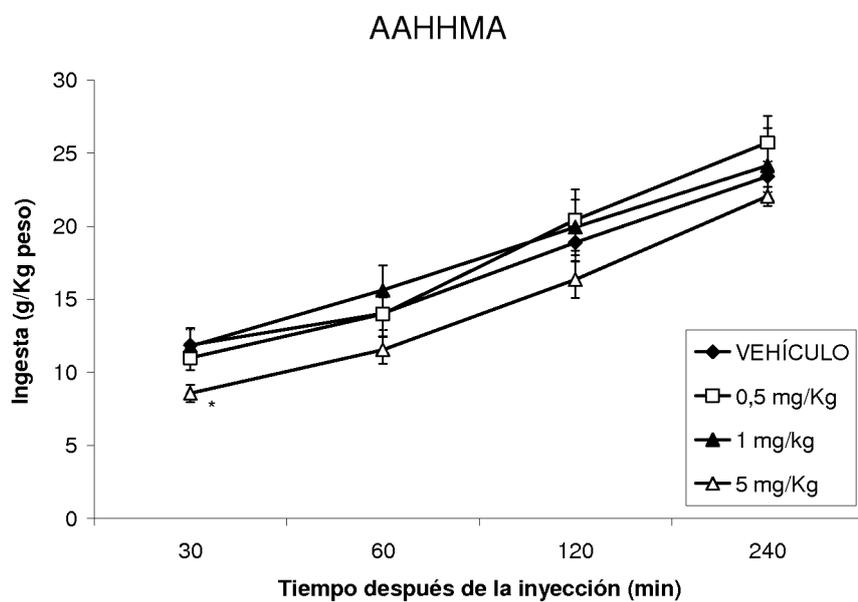


Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**

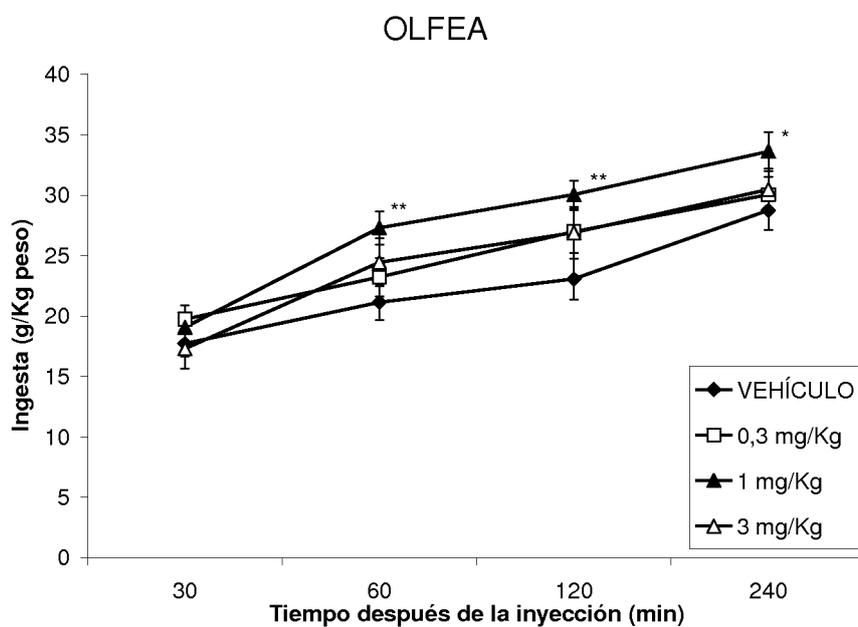


Figura 7

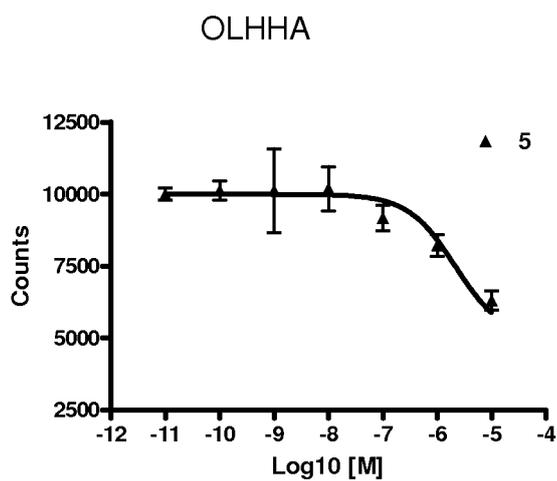


Figura 8

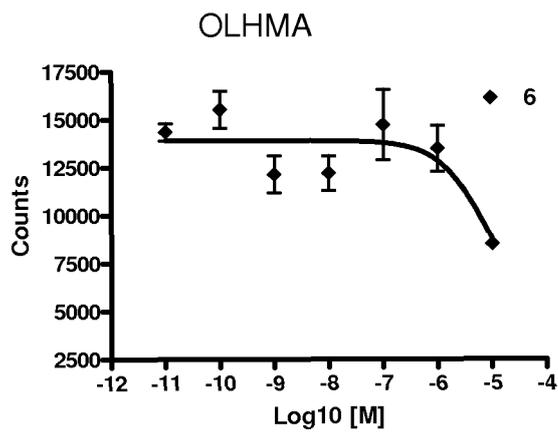


Figura 9

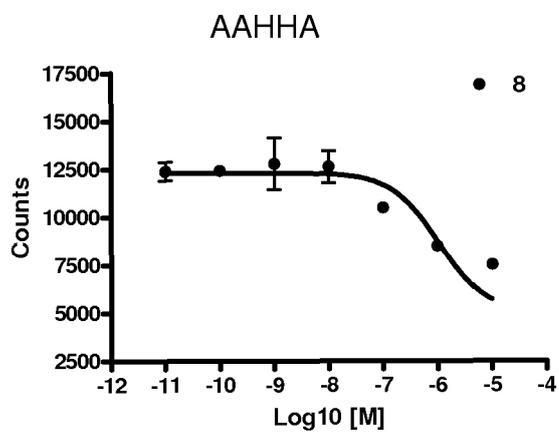


Figura 10



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931269

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07C233/11** (2006.01)  
**A61K31/165** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PILLARISETI, S. et al.: "Pain and beyond: fattyacid amides and fatty acid amide hydrolase inhibitors in cardiovascular and metabolic diseases". Drug Discovery Today, Diciembre 2009, vol. 14, números 23/24, tabla 1, página 1101, columna 2.	1-8,10,13-16
X	BURSTEIN, S. et al.: "Acylamido analogs of endocannabinoids selectively inhibit cancer cell proliferation". Bioorganic & MedicinalChemistry, 2008, vol. 16, páginas 9644-9651, página 9644, columna 1, página 9648, tabla 3.	1-8,10,14
X	CARR, T.P. et al.: "Endocannabinoids, metabolic regulation, and role of diet". Nutrition Research, 2008, vol. 28, páginas 641-650, página 642.	1-8,10,13-15
X	ALMASI, R. et al.: "Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoyldopamine on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo. Life Sciences, 2008, vol. 82, páginas 644-651, página 645, figura 1, página 650, conclusión.	1-8,10
X	LEE, S. et al.: "Regulation of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation by dopamine receptor-mediated signaling pathways". J aids journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2008, vol. 48, número 5, páginas 531-540, página 534, figura1.	1-8,10
A	US 2005065216 A1 (BISOGNO et al.) 24.03.2005, ejemplos.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.04.2011

Examinador  
H. Aylagas Cancio

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 9, 11, 12, 17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8, 10, 13-16	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 9, 11, 12, 17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8, 10, 13-16	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PILLARISETI, S. et al.: "Pain and beyond: fattyacid amides and fatty acid amide hydrolase inhibitors in cardiovascular and metabolic diseases". Drug Discovery Today, Diciembre 2009, vol. 14, números 23/24, tabla 1, página 1101, columna 2.	
D02	BURSTEIN, S. et al.: "Acylamido analogs of endocannabinoids selectively inhibit cancer cell proliferation". Bioorganic & MedicinalChemistry, 2008, vol. 16, páginas 9644-9651, página 9644, columna 1, página 9648, tabla 3.	
D03	CARR, T.P. et al.: "Endocannabinoids, metabolic regulation, and role of diet". Nutrition Research, 2008, vol. 28, páginas 641-650, página 642.	
D04	ALMASI, R. et al.: "Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoyldopamine on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo. Life Sciences, 2008, vol. 82, páginas 644-651, página 645, figura 1, página 650, conclusión.	
D05	LEE, S. et al.: "Regulation of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation by dopamine receptor-mediated signaling pathways". JaiDs journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2008, vol. 48, número 5, páginas 531-540, página 534, figura1.	
D06	US 2005065216 A1 (BISOGNO et al.)	24.03.2005

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud se refiere a un compuesto de fórmula general I, composición farmacéutica que lo contiene, procedimiento de obtención y su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por el receptor cannabinoide CB1 o receptores PPAR-alfa, tales como trastornos de la alimentación, disfunción lipídica, diabetes, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.

El documento D1 es una revisión sobre la utilización de diversos compuestos que son amidas de ácidos grasos en efectos tales como supresión del apetito, modulación del metabolismo de lípidos y de glucosa, vasodilatación, función cardíaca e inflamación. Entre estos compuestos citados se encuentra el N-araquidonoil dopamina (NADA) (ver tabla 1). Este compuesto entra dentro de los descritos en la reivindicación 1.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-8, 10, 13-16 carecen de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con dicho documento D1.

Los documentos D2 y D3 se refieren a derivados de acil amido de cadenas largas de ácidos grasos, análogos de endocannabinoides, entre los que se encuentran N-araquidonoil dopamina y eicopentanoil dopamina (ver tabla 3 documento D2 y figura 1 documento D3). Se describe su utilización en la inhibición de la proliferación del cáncer (documento D2) o en la regulación metabólica (documento D3). Por lo tanto a la vista de dichos documentos las reivindicaciones 1-8,10, 13-15 carecen de novedad y de actividad inventiva.

En los documentos D4 (ver figura 1) y D5 (ver figura 1) se describen diversos compuestos derivados de la dopamina así como su uso como medicamentos. En base a estos documentos las reivindicaciones 1-8 y 10 carecen de novedad y de actividad inventiva.

En consecuencia y a la vista de los documentos D1-D5, la materia a la que hace referencia las reivindicaciones 1-8, 10, 13-16 carece de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

Las reivindicaciones 9, 11, 12 y 17 se refieren a compuestos específicos de fórmula I, composiciones farmacéuticas y su procedimiento de obtención. Ninguno de los documentos citados, ni ninguna combinación relevante de ellos revela la existencia de dichos compuestos, ni sus composiciones farmacéuticas.

Por lo tanto, las reivindicaciones 9, 11, 12 y 17 tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.