

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 364**

51 Int. Cl.:
C07D 295/155 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05762524 .6**
96 Fecha de presentación: **27.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1781631**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Derivados de diarilmetil-piperazina, preparaciones y usos de los mismos**

30 Prioridad:
02.08.2004 SE 0401968
18.08.2004 US 602363 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2012

73 Titular/es:
AstraZeneca AB
151 85 Södertälje , SE

72 Inventor/es:
BROWN, William;
GRIFFIN, Andrew;
HUDZIK, Thomas;
MACIAG, Carla;
SMAGIN, Gennady y
WALPOLE, Christopher

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 379 364 T3

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

Derivados de diarilmetil-piperazina, preparaciones y usos de los mismos

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención está dirigida a nuevos compuestos, a un proceso para su preparación, a su uso y a composiciones farmacéuticas que comprenden los nuevos compuestos. Los compuestos nuevos son útiles en terapia, y en particular para el tratamiento de dolor, ansiedad y trastornos gastrointestinales funcionales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Se ha identificado que el receptor delta ("δ") tiene un papel en muchas funciones corporales tales como los sistemas circulatorio y del dolor. Por tanto, los ligandos para el receptor δ pueden tener utilidad como agentes analgésicos y/o antihipertensivos. También se ha demostrado que los ligandos para el receptor δ poseen actividad inmunomoduladora.

La identificación de al menos tres poblaciones diferentes de receptores opioides (μ, δ y κ) está bien establecida y los tres son aparentes en los sistemas nerviosos central y periférico de muchas especies, incluyendo al hombre. En varios modelos animales se ha observado analgesia cuando se activa uno o más de dichos receptores.

- 15 Con pocas excepciones, los ligandos opioides δ selectivos disponibles actualmente son de naturaleza peptídica y no son adecuados para la administración a través de rutas sistémicas. Un ejemplo de un agonista de δ no peptídico es SNC80 (Bilsky E.J. et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(1), págs. 359-366 (1995)).

- 20 Muchos compuestos agonistas de δ que se han identificado en la técnica anterior presentan muchas desventajas, ya que tienen farmacocinéticas pobres y no son analgésicos cuando se administran a través de rutas sistémicas. Además, se ha documentado que muchos de estos compuestos agonistas de δ muestran efectos convulsivos significativos cuando se administran de manera sistémica.

La publicación PCT WO02/094794 describe algunos agonistas de δ.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de agonistas de δ mejorados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

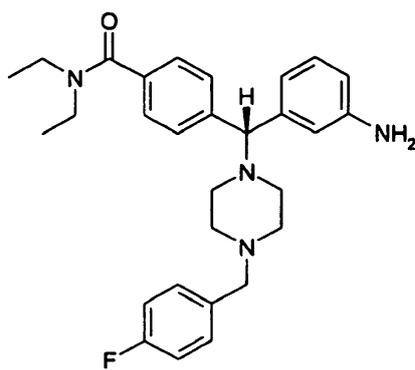
- 25 Se ha descubierto sorprendentemente que ciertos compuestos exhiben una o más propiedades mejoradas, es decir, potencia de agonista de δ mejorada, potencia in vivo, farmacocinética, biodisponibilidad, estabilidad in vitro, estabilidad in vivo, penetración en el cerebro, y/o baja toxicidad.

- 30 A menos que se especifique de otro modo dentro de esta memoria descriptiva, la nomenclatura usada en esta memoria sigue en general los ejemplos y reglas establecidas en *Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F, and H*, Pergamon Press, Oxford, 1979, que se incorpora como referencia en la presente memoria por sus ejemplos de nombres de estructuras químicas y reglas sobre la denominación de estructuras químicas. Opcionalmente, el nombre de un compuesto se puede generar utilizando un programa de denominación química: ACD/ChemSketch, Versión 5.09/Septiembre de 2001, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canadá.

- 35 "Enantioméricamente puro" se refiere a un compuesto que contiene al menos un 75% del enantiómero nombrado respecto de la cantidad total de los dos enantiómeros posibles contenidos en él. En una realización particular, "enantioméricamente puro" se refiere a un compuesto que contiene al menos un 90% del enantiómero nombrado respecto de la cantidad total de los dos enantiómeros posibles contenidos en él. En una realización más particular, "enantioméricamente puro" se refiere a un compuesto que contiene al menos un 95% del enantiómero nombrado respecto de la cantidad total de los dos enantiómeros posibles contenidos en él.

- 40 "Animal de sangre caliente" incluye los seres humanos.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula I, sales farmacéuticamente aceptables del mismo, diastereómeros del mismo, uno o más enantiómeros del mismo, y mezclas de los mismos:



En una realización adicional, el compuesto de la presente invención se puede seleccionar de 4-{{(R)}-(3-aminofenil)}[4-(4-fluorobencil)piperazin-1-il]metil}-N,N dietilbenzamida y las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

5 En otra realización adicional, el compuesto de la presente invención se puede seleccionar de 4-{{(R)}-(3-aminofenil)}[4-(4-fluorobencil)piperazin-1-il]metil}-N,N-dietilbenzamida enantioméricamente pura; y las sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

Se entenderá que cuando los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros quirales, los compuestos de la invención pueden existir en, y ser aislados como, formas enantioméricas o diastereoméricas, o como una mezcla racémica. La presente invención incluye todos los posibles enantiómeros, diastereoisómeros, racematos o mezclas de los mismos, de un compuesto de la fórmula I. Las formas ópticamente activas del compuesto de la invención se pueden preparar, por ejemplo, por separación cromatográfica quiral de un racemato, por síntesis a partir de materiales ópticamente activos o por síntesis asimétrica basada en los procedimientos descritos en adelante.

10 Debe entenderse también que determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas solvatadas, por ejemplo, hidratadas, así como sin solvatar. Se entenderá además que la presente invención abarca todas las formas solvatadas tales de los compuestos de la Fórmula 1.

Dentro del alcance de la invención también están las sales de los compuestos de la Fórmula I. De manera general, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se pueden obtener usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico, por ejemplo una alquilamina con un ácido adecuado, por ejemplo, HCl o ácido acético, para proporcionar un anión fisiológicamente aceptable. También puede ser posible preparar una sal correspondiente de metal alcalino (tal como sodio, potasio o litio) o un metal alcalinotérreo (tal como calcio) tratando un compuesto de la presente invención que tiene un protón adecuadamente ácido, tal como un ácido carboxílico o un fenol, con un equivalente de un hidróxido o alcóxido de un metal alcalino o alcalinotérreo (tal como el etóxido o metóxido), o una amina orgánica adecuadamente básica (tal como colina o meglumina) en un medio acuoso, seguido de técnicas de purificación convencionales.

En una realización, el compuesto de la Fórmula I anterior se puede convertir en una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular, una sal de adición de ácido tal como un hidrocloruro, hidrobromuro, fosfato, acetato, fumarato, maleato, tartrato, citrato, metanosulfonato o p-toluenosulfonato.

30 Los compuestos nuevos de la presente invención son útiles en terapia, especialmente para el tratamiento de diversas afecciones de dolor tales como el dolor crónico, el dolor neuropático, el dolor agudo, el dolor por cáncer, el dolor provocado por artritis reumatoide, la migraña, el dolor visceral, etc. Sin embargo, esta lista no debería interpretarse como exhaustiva.

Los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de la diarrea, depresión, ansiedad y/o trastornos relacionados con el estrés tales como trastornos de estrés post-traumático, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad generalizada, fobia social y trastorno obsesivo compulsivo, incontinencia urinaria, eyaculación precoz, diversas enfermedades mentales, tos, edema pulmonar, diversos trastornos gastrointestinales, p.ej., estreñimiento, trastornos gastrointestinales funcionales tales como Síndrome del Intestino Irritable y Dispepsia Funcional, enfermedad de Parkinson y otros trastornos motores, lesión cerebral traumática, apoplejía, cardioprotección después del infarto de miocardio, lesión espinal y adición a los fármacos, incluyendo el tratamiento del abuso del alcohol, nicotina, opioides y otras drogas, y para trastornos del sistema nervioso simpático, por ejemplo hipertensión.

Los compuestos de la invención son útiles como inmunomoduladores, especialmente para enfermedades autoinmunes, tales como artritis, para injertos de piel, transplantes de órganos y necesidades quirúrgicas similares, para enfermedades del colágeno, diversas alergias, para uso como agentes antitumorales y agentes antivirales.

Los compuestos de la invención son útiles en estados de enfermedad donde está presente o implicada la degeneración o disfunción de receptores opioides en ese paradigma. Esto puede implicar el uso de versiones marcadas isotópicamente de los compuestos de la invención en técnicas diagnósticas y aplicaciones de imagen tales como tomografía de emisión de positrones (PET).

5 Los compuestos de la invención son útiles como agentes analgésicos para el uso durante el cuidado con anestesia general y anestesia monitorizada. A menudo se usan combinaciones de agentes con diferentes propiedades para conseguir un equilibrio de efectos necesarios para mantener el estado anestésico (p.ej. amnesia, analgesia, relajación muscular y sedación). Están incluidos en esta combinación los anestésicos inhalados, hipnóticos, ansiolíticos, bloqueantes neuromusculares y opioides.

10 Dentro del alcance de la invención está el uso de cualquier compuesto de la Fórmula I definido anteriormente para la fabricación de un medicamento.

Además, dentro del alcance de la invención está el uso de cualquier compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para la terapia del dolor que incluye, pero sin limitación: dolor agudo, dolor crónico, dolor neuropático, dolor de espalda, dolor por cáncer y dolor visceral.

15 Además, dentro del alcance de la invención está el uso de cualquier compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para la terapia de la ansiedad, que incluye, pero sin limitación: fobia social, trastorno de ansiedad generalizada, ansiedad aguda.

También está dentro del alcance de la invención el uso de cualquier compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para la terapia de la depresión.

20 También está dentro del alcance de la invención el uso de cualquier compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para la terapia de la enfermedad de Parkinson.

También está dentro del alcance de la invención el uso de cualquiera de los compuestos de la presente invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de las afecciones discutidas anteriormente.

25 Por tanto, la invención proporciona un compuesto de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como se definió anteriormente en la presente memoria, para uso en terapia.

30 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "terapia" también incluye "profilaxis" a menos que haya indicaciones específicas a lo contrario. El término "terapéutico" y "terapéuticamente" deben ser interpretados del mismo modo. El término "terapia", dentro del contexto de la presente invención, engloba además administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, para mitigar bien un estado de enfermedad preexistente, aguda o crónica, o bien una dolencia recurrente. Esta definición también abarca terapias profilácticas para la prevención de dolencias recurrentes y terapia continuada para trastornos crónicos.

35 En el uso para terapia en un animal de sangre caliente tal como un ser humano, el compuesto de la invención se puede administrar en la forma de una composición farmacéutica convencional por cualquier ruta, que incluye vía oral, intramuscular, subcutánea, tópica, intranasal, intraperitoneal, intratorácica, intravenosa, epidural, intratecal, intracerebroventricular y por inyección en las articulaciones.

En una realización de la invención, la vía de administración puede ser oral, intravenosa o intramuscular.

La dosificación dependerá de la ruta de administración, la gravedad de la enfermedad, la edad y peso del paciente y otros factores normalmente considerados por el médico asistente, cuando se determina el régimen individual y nivel de dosificación más apropiado para un paciente particular.

40 Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, solvatos del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 En particular, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, solvatos del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la terapia, más en particular para la terapia del dolor y la ansiedad.

Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, solvatos del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable para el uso en cualquiera de las afecciones discutidas anteriormente.

50 Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de esta invención, los excipientes inertes, farmacéuticamente aceptables pueden ser bien sólidos o bien líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, obleas y supositorios.

Un excipiente sólido puede ser una o más sustancias, que pueden actuar también como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, o agentes disgregantes de comprimidos; también puede ser un material encapsulante.

5 En los polvos, el excipiente es un sólido finamente dividido, que está en mezcla con el compuesto de la invención finamente dividido, o el principio activo. En los comprimidos, el principio activo se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias, en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

10 Para preparar composiciones en supositorios, se funde primero una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos y manteca de cacao y el ingrediente activo se dispersa en ella mediante, por ejemplo, agitación. Después, la mezcla homogénea fundida se vierte en moldes de tamaño conveniente y se deja enfriar y solidificar.

Los excipientes adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

15 El término "composición" también pretende incluir la formulación del principio activo con material de encapsulación como excipiente, proporcionando una cápsula en la que el principio activo (con o sin otros excipientes) está rodeado por un excipiente que está así en combinación con él. De manera similar, se incluyen los sellos.

Los comprimidos, polvos, sellos y cápsulas se pueden usar como formas de dosificación sólidas adecuadas para administración oral.

20 Las composiciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Por ejemplo, las soluciones en agua estéril o en propilenglicol con agua, de los compuestos activos pueden ser preparaciones líquidas adecuadas para administración parenteral. Las composiciones líquidas se pueden formular también como solución en disolución acuosa de polietilenglicol.

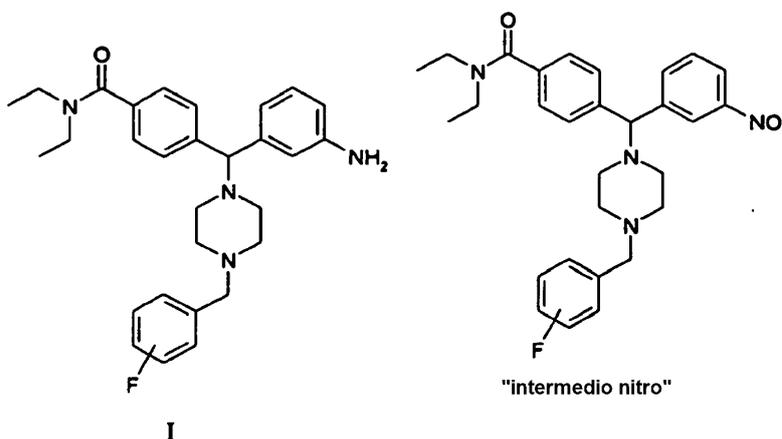
25 Las disoluciones acuosas para administración oral pueden prepararse disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, agentes aromatizantes, estabilizantes y agentes espesantes adecuados como se desee. Las suspensiones acuosas para uso oral se pueden preparar dispersando el principio activo finamente dividido en agua junto con un material viscoso tal como gomas sintéticas y naturales, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y otros agentes de suspensión conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica.

30 Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica incluirá preferiblemente de 0,05% a 99% p (por ciento en peso), más preferiblemente de 0,10 a 50% p, del compuesto de la invención, estando todos los porcentajes en peso basados en la composición total.

35 Una cantidad terapéuticamente eficaz para la práctica de la presente invención puede ser determinado mediante el uso de criterios conocidos, que incluyen la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, e interpretado dentro del contexto de la enfermedad que se está tratando o que se está previniendo, por alguien con experiencia habitual en la técnica.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de preparación de los compuestos de la presente invención.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de Fórmula I, que comprende:



hacer reaccionar *N,N*-dietil-4-[(3-nitrofenil)(1-piperazinil)metil]benzamida con R-CH₂X o R-CHO para formar un compuesto intermedio nitro;

reducir dicho compuesto intermedio con un agente reductor adecuado, en el que

5 R se selecciona de 2-fluorofenilo, 3-fluorofenilo y 4-fluorofenilo; y X se selecciona de Cl, I, Br, -OTs (tosilo) y -OMs (mesilato).

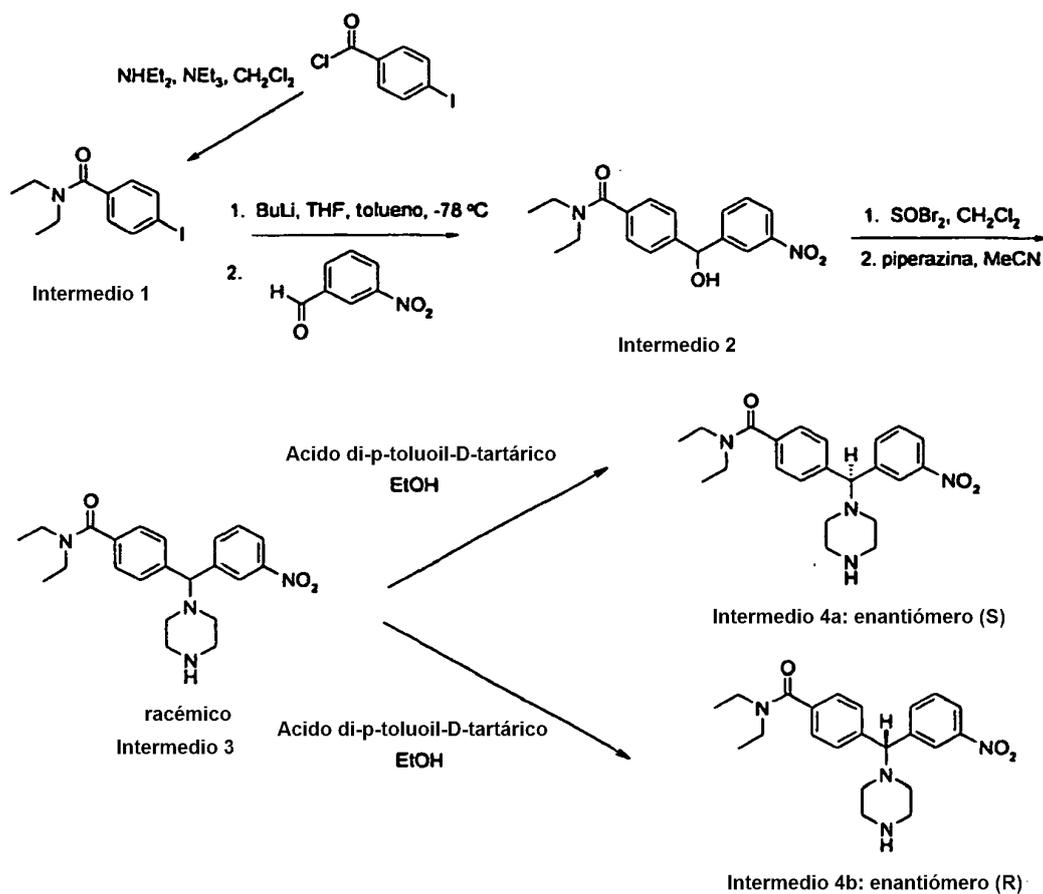
En una realización, dicho agente reductor se puede seleccionar de hidrógeno, zinc y hierro.

En otra realización, dicha *N,N*-dietil-4-[(3-nitrofenil)(1-piperazinil)metil]benzamida se puede seleccionar de *N,N*-dietil-4-[(S)-(3-nitrofenil)(1-piperazinil)metil]benzamida y *N,N*-dietil-4-[(R)-(3-nitrofenil)(1-piperazinil)metil]benzamida.

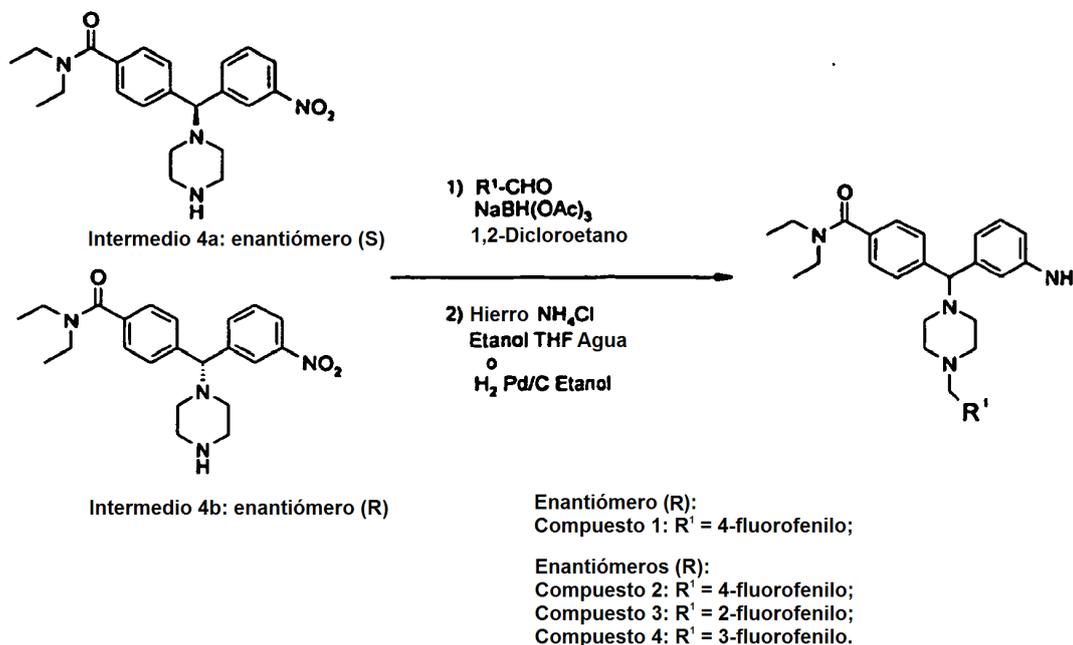
10 En una realización adicional, R puede ser 4-fluorofenilo; y el compuesto de fórmula I puede ser 4-[(3-aminofenil)[4-(4-fluorofenil)metil]-1-piperazinil]metil]-*N,N*-dietilbenzamida.

Más en particular, los compuestos de la presente invención e intermedios usados para la preparación de los mismos se pueden preparar según las rutas sintéticas ejemplificadas en los Esquemas 1 y 2.

Esquema 1



Esquema 2



EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y PROPIEDADES

Se ha descubierto que los compuestos de la invención son activos hacia los receptores δ en animales de sangre caliente, p.ej., seres humanos. En particular, se ha descubierto que los compuestos de la invención son ligandos eficaces para el receptor δ . Los ensayos *in vitro*, más adelante, demuestran estas actividades sorprendentes, en especial con respecto a la potencia y eficacia de los agonistas tal como se demuestra en el ensayo funcional en cerebro de rata y/o el ensayo funcional de receptores δ humanos (bajo). Esta característica puede estar relacionada con la actividad *in vivo*, y puede no correlacionarse de manera lineal con la afinidad de unión. En estos ensayos *in vitro*, se analiza en un compuesto la actividad hacia los receptores δ y se obtiene la CI_{50} para determinar la actividad selectiva por un compuesto particular hacia los receptores δ . En el contexto actual, CI_{50} se refiere en general a la concentración del compuesto a la que se ha observado un 50% de desplazamiento de un ligando de receptor δ radiactivo estándar.

Las actividades del compuesto hacia los receptores κ y μ también se miden en un ensayo similar.

Modelos in vitro15 Cultivo celular

Se cultivan células 293S humanas que expresan los receptores κ , δ y μ humanos y resistencia a neomicina en suspensión a 37 °C y un 5% de CO₂ en matraces con agitación que contienen DMEM sin calcio, 10% de FBS, 5% de BCS, 0,1% de Pluronic F-68, y 600 μ g/ml de geneticina.

20 Los cerebros de las ratas se pesan y se lavan en PBS helado (que contiene EDTA 2,5 mM, pH 7,4). Los cerebros se homogeneizan con un politrón durante 30 seg (rata) en tampón de lisis helado (Tris 50 mM, pH 7,0, EDTA 2,5 mM, con fluoruro de fenilmetilsulfonilo añadido justo antes del uso a 0,5 mM de una disolución de reserva 0,5 M en DMSO:etanol).

Preparación de membranas

25 Las células se sedimentan y se resuspenden en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,0, EDTA 2,5 mM, con PMSF añadido justo antes del uso a 0,1 mM de una disolución de reserva 0,1 M en etanol), se incuban en hielo durante 15 minutos, y a continuación se homogeneizan con un politrón durante 30 seg. La suspensión se centrifuga a 1000 g (máx.) durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se conserva en hielo y los sedimentos se resuspenden y se centrifugan como se ha indicado antes. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se combinan y se centrifugan a 46.000 g (máx.) durante 30 min. Los sedimentos se resuspenden en tampón Tris frío (Tris/Cl 50 mM, pH 7,0) y se centrifugan de nuevo. Los sedimentos finales se resuspenden en tampón de membrana (Tris 50 mM, sacarosa 0,32 M, pH 7,0). Se congelan alícuotas (1 ml) en tubos de polipropileno en hielo seco/etanol y se almacenan a -70 °C

hasta su uso. Las concentraciones de proteína se determinan mediante un ensayo de Lowry modificado con dodecilsulfato sódico.

Ensayos de unión

5 Las membranas se descongelan a 37 °C, se enfrían en hielo, (o se mantienen en hielo si no se usan inmediatamente), se hacen pasar 3 veces a través de una aguja de 0,5 mm de diámetro, y se diluyen en tampón de unión (Tris 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 1 mg/ml de BSA (Sigma A-7888), pH 7,4, que se almacena a 4 °C tras la filtración a través de un filtro de 0,22 mm, y al que se le han añadido recientemente 5 µg/ml de aprotinina, bestatina 10 µM, diprotina A 10 µM si las membranas proceden de tejido (rata, ratón, mono, sin DTT). Se añaden alícuotas de 100 µl a tubos de polipropileno de 12x75 mm enfriados en hielo que contienen 100 µl del radioligando apropiado, y 100 µl del compuesto de ensayo en diversas concentraciones. Se determina la unión total (TB) y la unión inespecífica (NS) en ausencia y presencia de naloxona 10 µM, respectivamente. Los tubos se agitan en vórtex y se incuban a 25 °C durante 60-75 minutos, tras lo cual su contenido se filtra rápidamente a vacío y se lava con aproximadamente 12 mL/tubo de tampón de lavado helado (Tris 50 mM, pH 7,0, MgCl₂ 3 mM) a través de filtros GF/B (Whatman) empapados previamente durante al menos 2 h en polietileno al 0,1%. La radioactividad (dpm) retenida en los filtros se mide con un contador beta después de empapar los filtros durante al menos 12 h en miniviales que contienen 6-7 ml de líquido de centelleo. Si el ensayo se realiza en placas de 96 pocillos profundos, la filtración se lleva a cabo sobre unifiltros empapados con PEI de 96 plazas, que se lavan con 3 x 1 mL de tampón de lavado, y se secan en una estufa a 55 °C durante 2 h. Las placas de filtro se cuentan en un TopCount (Packard) después de añadir 50 µl de líquido de centelleo MS-20/pocillo. En el caso de los ensayos llevados a cabo en placas de 96 pocillos profundos, la CI₅₀ de los compuestos se determina a partir de curvas de desplazamiento de 10 puntos en el caso de Delta, y curvas de desplazamiento de 5 puntos en el caso de Mu y Kappa. El ensayo se lleva a cabo en 300 µl con la cantidad adecuada de proteína de membrana (2 µg, 35 µg, y 1 µg, en el caso de Delta, Mu, y Kappa, respectivamente) y 50000-80000 dpm/pocillo del marcador adecuado (125I-Deltorfina II, 125I-FK33824, y 125I-DPDYN para Delta, Mu, y Kappa, respectivamente). La unión total y la unión inespecífica se determinan en ausencia y presencia de 10 µM de Naloxona.

Ensayos Funcionales

La actividad de agonista de los compuestos se mide determinando el grado en que el complejo receptor de los compuestos activa la unión de GTP a proteínas G, a las que se acoplan los receptores. En el ensayo de unión de GTP, se combina GTP[γ]³⁵S con los compuestos de ensayo y membranas procedentes de células HEK-293S que expresan los receptores opioides humanos clonados, o de cerebro homogeneizado de rata o de ratón. Los agonistas estimulan la unión de GTP[γ]³⁵S en estas membranas. Los valores CE₅₀ y E_{max} de los compuestos son determinados a partir de curvas dosis-respuesta. Se llevan a cabo desplazamientos a la derecha de la curva dosis respuesta por el antagonista delta naltrindola para verificar que la actividad de agonista está mediada a través de receptores delta. Para los ensayos funcionales de receptor δ humano, la CE₅₀ (bajo) se mide cuando los receptores δ humanos usados en el ensayo se expresaron a niveles bajos en comparación con los usados para determinar la CE₅₀ (elevado). Los valores de E_{max} se determinaron con relación al agonista de δ estándar SNC80, es decir, mayor del 100% es un compuesto que tiene una eficacia mejor que SNC80.

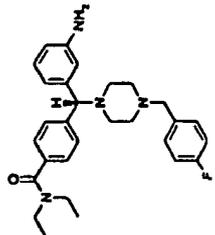
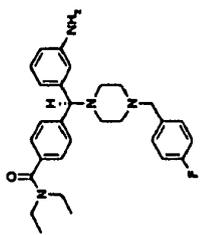
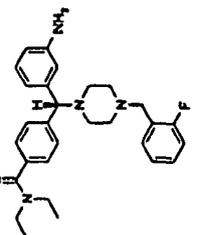
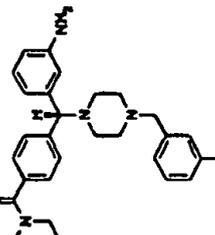
Procedimiento para GTP de cerebro de rata

Se descongelan membranas de cerebro de rata a 37 °C, se hacen pasar 3 veces a través de una aguja de punta roma de 0,5 mm de diámetro y se diluyen en el tampón de unión de GTPγS (Hepes 50 mM, NaOH 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,4, Añadir fresco: DTT 1 mM, BSA 0,1%). Se añade GDP a una concentración final de 120 µM a las diluciones de membrana. La CE₅₀ y E_{max} de los compuestos se determinan a partir de curvas dosis-respuesta de 10 puntos realizadas en 300 µl con la cantidad adecuada de proteína de membrana (20 µg/pocillo) y 100000-130000 dpm de GTPγ³⁵S por pocillo (0,11 -0,14 nM). La unión basal y estimulada máxima se determinan en ausencia y presencia de SNC80 3µM. El ensayo llevado a cabo con células HEK 293S que expresan de manera estable receptores Delta clonados se realiza en un tampón ligeramente diferente (Hepes 50 mM, NaOH 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,4, Añadir fresco: 0,5% de BSA, sin DTT) y con una conc. final de 3 µM de GDP.

Análisis de datos

50 La unión específica (SB) se calculó como TB-NS, y la SB en presencia de varios compuestos de ensayo fue expresada como un porcentaje de la SB de control. Los valores de CI₅₀ y el coeficiente de Hill (n_H) para los ligandos para desplazar los radioligandos específicamente unidos se calcularon a partir de representaciones logarítmicas o de programas de ajuste de curvas tales como Ligand, GraphPad Prism, SigmaPlot o ReceptorFit. Los valores de K_i fueron calculados mediante la ecuación de Cheng-Prussoff. Se presentan los valores de Media ± E.E.M. correspondientes a CI₅₀, K_i y n_H para los ligandos evaluados en al menos tres curvas de desplazamiento.

La Tabla I muestra algunos de los datos biológicos de ciertos compuestos de la invención medidos mediante el uso de los ensayos anteriormente descritos.

Estructura	CI50hd	CI50hk	CI50hm	CE50h (bajo)	CE50h (bajo) Emax	CE50h (elevado)	CE50h (elevado) Emax	CE50tb	CE50rb Emax
	0,587	5524	715	20,63	95,3	4,18	103,8	22,82	130,3
	8,80	>10000	3316	N/D	N/D	100,3	89,09	465,9	66,32
	0,717	7258	2262	48,10	89,96	N/D	N/D	N/D	N/D
	1,08	5767	2736	77,42	84,44	N/D	N/D	N/D	N/D

N/D: no disponible

Experimentos de Saturación de Receptor

Se determinan los valores K_{δ} del radioligando llevando a cabo los ensayos de unión con membranas celulares con los radioligandos adecuados a concentraciones que oscilan de 0,2 a 5 veces el K_{δ} estimado (hasta 10 veces si las cantidades de radioligando necesarias son factibles). La unión de radioligando específica se expresa en forma de pmol/mg de proteína de membrana. Los valores de K_{δ} y B_{max} de experimentos individuales se obtuvieron a partir de ajustes no lineales de radioligando unido específicamente (B) frente a nM de radioligando libre (F) del experimento individual de acuerdo con un modelo de sitio único.

Determinación de la Alodinia Mecánica Mediante el Uso del Ensayo de Von Frey

El ensayo se lleva a cabo entre las 08:00 y las 16:00 h mediante el uso del método descrito por Chaplan et al. (1994). Las ratas se colocan en jaulas de Plexiglás sobre una rejilla de alambre que permite el acceso a las patas, y se deja que se habitúen durante 10-15 minutos. El área ensayada es la zona plantar media de la pata trasera izquierda, evitando las almohadillas menos sensibles de las patas. Se toca la pata con una serie de 8 pelos de Von Frey con una rigidez que aumenta logarítmicamente (0,41; 0,69; 1,20; 2,04; 3,63; 5,50; 8,51 y 15,14 gramos; Stoelting, III, EE.UU.). El pelo de Von Frey se aplica por debajo del suelo de rejilla perpendicularmente a la superficie plantar con una fuerza suficiente para causar una ligera doblez contra la pata, y se mantiene durante aproximadamente 6-8 segundos. Se anota una respuesta positiva si la pata se retira bruscamente. Un estremecimiento justo al retirar el pelo también se considera una respuesta positiva. Una deambulación se considera una respuesta ambigua, y en tal caso se repite el estímulo.

Protocolo de Ensayo

Se realiza el ensayo con los animales en el día 1 post-operatorio para el grupo tratado con FCA. Se determina un umbral de retirada del 50% mediante el uso del método arriba-abajo de Dixon (1980). El ensayo comienza con el pelo de 2,04 g, en el medio de la serie. Los estímulos se realizan siempre de un modo consecutivo, tanto ascendente como descendente. En ausencia de una respuesta de retirada de la pata con el pelo seleccionado inicialmente, se presenta un estímulo más fuerte; en el caso de retirada de la pata, se selecciona el siguiente estímulo más débil. El cálculo del umbral óptimo mediante este método requiere 6 respuestas en la proximidad inmediata del umbral del 50%, y la contabilización de estas 6 respuestas comienza cuando se produce el primer cambio en la respuesta, p.ej., cuando se cruza por primera vez el umbral. En los casos en los que los umbrales se hallan fuera del intervalo de estímulos, se asignan valores de 15,14 (sensibilidad normal) o 0,41 (alodinia máxima), respectivamente. El patrón resultante de respuestas positivas y negativas se tabula mediante el uso de la convención, X = sin retirada; O = retirada, y el umbral de retirada del 50% se interpola mediante el uso de la fórmula:

$$\text{Umbral del 50\% g} = 10^{(X_f + k\delta)} / 10.000$$

en donde X_f = valor del último pelo Von Frey usado (unidades logarítmicas); k = valor tabular (de Chaplan et al. (1994)) para el patrón de respuestas positivas / negativas; y δ = diferencia media entre estímulos (unidades logarítmicas). En este caso, $\delta = 0,224$.

Los umbrales de Von Frey se convierten en porcentajes del efecto máximo posible (% EMP), de acuerdo con Chaplan et al. 1994. Se usa la siguiente ecuación para computar el % EMP:

$$\% \text{ de EMP} = \frac{\text{Umbral tratado con fármaco (g)} - \text{umbral de alodinia (g)} \times 100}{\text{Umbral de control (g)} - \text{umbral de alodinia (g)}}$$

Administración de la Sustancia de Ensayo

Se inyecta a las ratas (de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa u oral) una sustancia de ensayo antes del ensayo de Von Frey, y el tiempo entre la administración del compuesto de ensayo y el ensayo de Von Frey varía en función de la naturaleza del compuesto de ensayo.

Ensayo de Retorcimiento

El ácido acético produce contracciones abdominales cuando se administra intraperitonealmente a ratones. Éstas hacen que el cuerpo se estire de un modo particular. Cuando se administran fármacos analgésicos, este movimiento descrito se observa con menos frecuencia, y el fármaco se selecciona como un buen candidato potencial.

Se considera un reflejo de Retorcimiento completo y típico sólo cuando se reúnen los siguientes elementos: el animal no está en movimiento; el dorso inferior es ligeramente deprimido; el aspecto plantar de ambas patas es observable. En este ensayo, los compuestos de la presente invención demuestran una inhibición significativa de las respuestas de retorcimiento tras una dosis oral de 1-100 $\mu\text{mol/Kg}$.

(i) Preparación de las disoluciones

Ácido Acético (AcOH): se añaden 120 µL de ácido acético a 19,88 mL de agua destilada a fin de obtener un volumen final de 20 mL con una concentración final de AcOH del 0,6%. A continuación la disolución es mezclada (vórtice) y queda lista para inyección.

- 5 Compuesto (fármaco): cada compuesto se prepara y se disuelve en el vehículo más adecuado de acuerdo con los procedimientos estándares.

(ii) Administración de las disoluciones

- 10 El compuesto (fármaco) se administra oralmente, intraperitonealmente (i.p.), subcutáneamente (s.c.) o intravenosamente (i.v.) a 10 mL/Kg (considerando el peso corporal medio del ratón) 20, 30 ó 40 minutos (de acuerdo con la clase de compuesto y sus características) antes del ensayo. Cuando el compuesto se administra centralmente: intraventricularmente (i.c.v) o intratecalmente (i.t.), se administra un volumen de 5 µL.

El AcOH se administra intraperitonealmente (i.p.) en dos localizaciones a 10 ml/Kg (considerando el peso corporal medio del ratón) inmediatamente antes del ensayo.

(iii) Ensayo

- 15 El animal (ratón) es observado durante un periodo de 20 minutos y se anota el número de ocasiones (reflejos de Retorcimiento) y se recopila al final del experimento. Los ratones se mantienen en jaulas "caja de zapato" individuales con lecho de contacto. Normalmente se observa un total de 4 ratones al mismo tiempo: un control y tres dosis de fármaco.

- 20 Para las indicaciones de ansiedad y tipo ansiedad, se ha establecido la eficacia en el ensayo de conflicto Geller-Seifter en ratas.

Para la indicación de trastorno gastrointestinal funcional, la eficacia puede establecerse en el ensayo descrito por Coutinho S.V. y col., en American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology. 282 (2): G307-16, Febrero de 2002, en ratas.

PROTOCOLOS DE ENSAYO IN VIVO ADICIONALES**25 Sujetos y alojamiento**

Se albergan ratas Sprague Dawley macho (175-200 g) sin tratamiento previo en grupos de 5 en una habitación de temperatura controlada (22 °C, humedad del 40-70%, 12-h de luz/oscuridad). Los experimentos se llevan a cabo durante la fase de luz del ciclo. Los animales tienen alimento y agua a voluntad, y se sacrifican inmediatamente tras la recogida de datos.

30 Muestra

- 35 El ensayo del compuesto (Fármaco) incluye grupos de ratas que no reciben tratamiento, y otros que se tratan con lipopolisacárido (LPS) de E. coli. Para el experimento de tratamiento con LPS, se inyecta LPS a cuatro grupos, y uno de los cuatro grupos se trata después con vehículo, mientras a los otros tres grupos se les inyecta el fármaco y su vehículo. Se lleva a cabo un segundo grupo de experimentos que implican cinco grupos de ratas; todas las cuales no reciben tratamiento con LPS. El grupo sin tratamiento no recibe compuesto (fármaco) o vehículo; los otros cuatro grupos se tratan con vehículo con o sin fármaco. Esto se lleva a cabo para determinar los efectos ansiolíticos o sedantes de los fármacos, que pueden contribuir a una reducción de USV.

Administración de LPS

- 40 Se deja que las ratas se habitúen al laboratorio experimental durante 15-20 min antes del tratamiento. La inflamación se induce mediante la administración de LPS (endotoxina de bacterias E. coli gram-negativas del serotipo 0111:B4, Sigma). Se inyecta LPS (2,4 µg) de manera intracerebro-ventricular (i.c.v.), en un volumen de 10 µl, mediante el uso de técnicas quirúrgicas estereotáxicas habituales con anestesia de isoflurano. La piel entre las orejas se empuja en dirección rostral y se realiza una incisión longitudinal de alrededor de 1 cm para exponer la superficie del cráneo. La localización de la punción se determina mediante las coordenadas: 0,8 mm posterior al bregma, 1,5 mm lateral
- 45 (izquierda) al lambda (sutura sagital), y 5 mm por debajo de la superficie del cráneo (vertical) en el ventrículo lateral. Se inyecta LPS a través de una aguja estéril de acero inoxidable (26-G 3/8) de 5 mm de longitud unida a una jeringa Hamilton de 100 µl mediante un tubo de polietileno (PE20; 10-15 cm). Se coloca encima un tapón de 4 mm hecho de una aguja cortada (20-G) y se ajusta a la aguja 26-G mediante pegamento de silicona para crear la profundidad deseada de 5 mm.

- 50 Tras la inyección de LPS, la aguja permanece en su lugar durante otros 10 s para permitir la difusión del compuesto, y después se retira. La incisión se cierra, y la rata se devuelve a su jaula original y se deja descansar durante un mínimo de 3,5 h antes del ensayo.

Condiciones experimentales para la estimulación con soplos de aire

Las ratas permanecen en el laboratorio experimental tras la inyección de LPS y la administración del compuesto (fármaco). En el momento del ensayo, todas las ratas se extraen y se colocan fuera del laboratorio. Se lleva una rata cada vez al laboratorio de ensayo y se coloca en una caja clara (9 x 9 x 18 cm) que después se coloca en un cubículo ventilado que atenúa el sonido que mide 62 (a) x35 (p) x46 (a) cm (BRS/LVE, Div. Tech-Serv Inc). La producción de soplos de aire, a través de una boquilla de salida de aire de 0,32 cm, se controla mediante un sistema (AirStim, San Diego Instruments) capaz de producir soplos de aire de duración fija (0,2 s) e intensidad fija con una frecuencia de 1 soplo cada 10 s. Se administra un máximo de 10 soplos, o hasta que comience la vocalización, lo que se produzca primero. El primer soplo de aire marca el comienzo del registro.

10 Condiciones experimentales para el registro de ultrasonidos

Las vocalizaciones se registran durante 10 minutos mediante el uso de micrófonos (G.R.A.S. sound and vibrations, Vedbaek, Dinamarca) colocados dentro de cada cubículo y controlados mediante un soporte informático LMS (LMS CADA-X 3.5B, Data Acquisition Monitor, Troy, Michigan). Se registran las frecuencias entre 0 y 32000 Hz, se almacenan y se analizan mediante el mismo soporte informático (LMS CADA-X 3.5B, Time Data Processing Monitor y UPA (User Programming and Analysis)).

Compuestos (fármacos)

Se ajusta el pH de todos los compuestos (fármacos) entre 6,5 y 7,5 y se administran en un volumen de 4 ml/kg. Tras la administración del compuesto (fármaco), los animales se devuelven a sus jaulas originales hasta el momento del ensayo.

20 Análisis

El registro se lleva a cabo por medio de una serie de análisis estadísticos y de Fourier para filtrar (entre 20-24 kHz) y para calcular los parámetros de interés. Los datos se expresan como la media \pm EEM. La significación estadística se determina mediante el uso de la prueba T para la comparación entre ratas sin tratamiento y tratadas con LPS, y ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett (a posteriori) para la eficacia del fármaco. Una diferencia entre grupos se considera significativa con un valor p mínimo de $\leq 0,05$. Los experimentos se repiten un mínimo de dos veces.

Determinación de la hiperalgesia térmica mediante el uso del ensayo plantar de Hargreaves**Administración de FCA o carragenano**

Adyuvante Completo de Freund (FCA): SIGMA nº de cat. F 5881, *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177), 1 mg/ml, inactivado térmicamente, seco, 0,85 ml de parafina, 0,15 ml de monooleato de manida. O carragenano Lambda tipo IV (Cg): SIGMA nº de cat. C-3889, (Gelatina, vegetal; Irish moss), (disolución del 1,0%) en NaCl.

Las inyecciones se llevan a cabo con una jeringa Hamilton con un tamaño de aguja estéril 26G5/8". Las ratas se manipulan y se colocan en una cámara para la anestesia con isoflurano. Cuando se alcanza el efecto deseado, la rata se extrae y se coloca en decúbito prono (posición boca abajo). La pata trasera izquierda se sujeta y la aguja se introduce de manera subcutánea, en la cara anterior, entre la almohadilla del dedo nº 2 y nº 3 para alcanzar el centro de la pata (área metatarsiana). Finalmente, se inyecta lentamente un volumen de 100 μ l de FCA, o 100 μ l de disolución de carragenano, en la pata, y se aplica una pequeña presión durante 3-4 segundos tras la extracción de la aguja.

40 Si los animales se están despertando durante el procedimiento, se devuelven a la cámara de inhalación hasta que se consigue el efecto deseado.

Después de la inyección intraplantar, se deja que los animales se despierten bajo observación en su jaula.

Para el tratamiento con FCA, las ratas se dejan durante 48 horas para desarrollo del proceso inflamatorio. Para el tratamiento con carragenano, las ratas se dejan durante 3 horas para el desarrollo del proceso inflamatorio. En la mañana del ensayo, las ratas se colocan en el laboratorio (en sus jaulas). Se deja que se habitúen a la sala durante al menos 30 minutos.

Sitio de Ensayo

50 El estímulo térmico se aplica en el centro de la superficie plantar, entre las almohadillas. El sitio de ensayo debe estar en contacto con el vidrio, sin orina o heces en medio, para mantener las propiedades de transferencia térmica correctas desde el vidrio a la piel.

El aparato plantar consiste en una caja con una tapa/plataforma de vidrio, y la superficie de vidrio se mantiene a 30 °C mediante un mecanismo de retroalimentación interna. Por debajo de esta plataforma de vidrio hay una

lámpara montada en un brazo movable, y se pone un espejo por debajo para permitir que la luz se coloque bajo la pata de la rata. Cuando se activa la luz, brilla a través de una apertura de ~2 mm de diámetro. El investigador activa la luz, y los sensores automáticos apagan la luz cuando se retira la pata; un límite de 20,48 segundos asegura que no ocurra ningún daño tisular en el caso de que la rata no retire la pata. El investigador también puede apagar la luz en cualquier momento. Un cronómetro registrará la duración del tiempo que la luz está activada.

Flujómetro: mide el flujo/cm² cuando la luz está activada. Se debería mantener a ~97-98; el flujo se puede modificar ajustando el dispositivo plantar, pero no se debe cambiar nunca en medio de un experimento.

Transcurso Temporal

El experimento se puede llevar a cabo después de periodos de tiempo variables tras la inducción de la inflamación. La hiperalgesia se mide 48 h tras la inyección de FCA o 3 h tras la inyección de carragenano.

Procedimiento de Ensayo

Ratas sin tratamiento: Para el procedimiento de establecer una Curva Dosis-Respuesta, se usa un grupo de 7 ratas como grupo de control; se anestesian con las 28 ratas restantes, pero no se les administra ninguna inyección. El ensayo del grupo sin tratamiento se puede realizar antes de comenzar o inmediatamente tras el experimento, con el mínimo estrés posible, y las ratas se colocan en cajas de Plexiglás individuales (14 x 21 x 9 cm) sobre el dispositivo plantar; se deja que se habitúen durante un periodo de 30 minutos. Cuando los animales están preparados para el ensayo, la luz se coloca directamente bajo el sitio de ensayo y se activa, y se registra la latencia de la retirada. Tras un periodo de 5-8 minutos, para permitir que la temperatura de la piel vuelva a su valor normal, se toma una segunda lectura, y después las ratas se sacan y se vuelven a colocar en su jaula.

Valores Basales: Las 28 ratas restantes (divididas en 4 grupos) a las que se les ha inyectado FCA (o carragenano) se colocan en cajas individuales en el aparato y se deja que se habitúen durante 30 minutos. El investigador debería verificar el grado de inflamación de la pata y comprobar la existencia de decoloración. El estímulo térmico se coloca bajo el sitio de ensayo, y se registra la latencia de la retirada; se toman dos lecturas, como anteriormente. La comparación de estos valores basales con los de los animales sin tratamiento es la que establece si hay presente hiperalgesia.

Ensayo post-fármaco: Una vez que la hiperalgesia se ha establecido, se inyecta el compuesto de interés a las ratas. cada compuesto se prepara y se disuelve en el vehículo más adecuado de acuerdo con los procedimientos estándares. La vía de administración, dosis, volumen, y tiempo de ensayo tras la inyección son específicos para ese compuesto (o clase de compuestos). Cuando se ensayan compuestos a los 20-30 minutos tras la inyección, tal como para las inyecciones i.v. o s.c., las ratas se colocan y se dejan habituar en el aparato plantar mientras el fármaco produce su efecto. Cuando se ensayan los compuestos a los 60 minutos o más tras la inyección, las ratas se vuelven a colocar en su jaula original con sus compañeros de jaula. Las ratas siempre se vuelven a colocar en sus jaulas originales con sus compañeros de jaula originales para reducir al mínimo el estrés de restablecer una estructura social dentro de un grupo de ratas. 30 min más tarde las ratas se colocan en el aparato plantar y se les dan 30 minutos para habituarse al aparato. El ensayo se lleva a cabo como se describió anteriormente. Se toman dos lecturas.

Criterios para el Ensayo:

El animal debe estar tranquilo y quieto, aunque alerta, y en la posición correcta, sin orina o heces entre la piel de la pata y la superficie de vidrio del aparato. Un animal no se debería someter al ensayo si:

- El animal tiene locomoción, lo que incluye olfateo, acicalamiento y exploración.
- El animal está durmiendo.
- El animal muestra signos evidentes de estrés (inmovilidad tónica, vocalizaciones, orejas planas), a menos que estos sean el posible resultado de un efecto secundario de un compuesto y no se puedan evitar.
- El animal está colocado de tal manera que la pata no está en contacto directo con el vidrio (pata reposando sobre el extremo de la cola);
- La pata del animal exhibe una coloración azul como resultado de una mala inyección. En este caso, el animal se descarta del experimento completamente (al comienzo).

Quando hay presentes orina o heces, el animal se extrae, se limpia la superficie de vidrio y el animal se vuelve a colocar. Cuando el animal está durmiendo, o exhibiendo inmovilidad tónica, el investigador puede mover suavemente la caja o mover la mano frente a la caja para provocar un comportamiento de atención a corto plazo. Se debería realizar una observación estricta del comportamiento del animal a lo largo de todo el ensayo.

Re-Ensayos:

En cualquier momento durante el experimento, si el investigador no está seguro de que la respuesta de retirada de la pata fuera una respuesta al estímulo térmico, se puede re-ensayar el animal después de 5-8 minutos. Esto se puede deber a que el animal se mueva repentinamente, u orine o defeque mientras se esté aplicando el estímulo.

5 **Respuestas aceptables:**

Cualquiera de las siguientes se consideran respuestas al estímulo térmico

- Movimiento de retirada de la pata del vidrio (a menudo seguido por la acción de lamerse la pata)
- Movimiento lateral del cuerpo (contralateral para la pata estimulada)
- Los dedos se separan del vidrio

10 - La cara centroplanar (pata media) de la pata inflamada se retira del vidrio.

Análisis

15 Los datos se expresan como la media ± EEM. La significación estadística se determina mediante el uso de la prueba T para la comparación entre ratas sin tratamiento e inflamadas, y ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett (a posteriori) para la eficacia del fármaco. Una diferencia entre grupos se considera significativa con un valor p mínimo de ≤0,05.

PROPIEDADES METABÓLICAS Y FARMACOCINÉTICAS DE LOS FÁRMACOS

20 Se descubrió sorprendentemente que una o más propiedades metabólicas y farmacocinéticas de los fármacos de los compuestos mejoran debido a la fluoro-sustitución en el bencilo inferior del resto bencil-piperazinilo de fórmula I. En una realización, se descubrió que ciertos metabolitos reactivos se reducen o se eliminan para los compuestos de la presente invención. En otra realización, ciertos compuestos de la presente invención proporcionan una biodisponibilidad mejorada, que puede ser el resultado de una afinidad débil con el citocromo P450 2D6 y 3A4. Los siguientes ensayos demostraron una o más de estas propiedades sorprendentes de estos compuestos.

Incubaciones Microsómicas

25 Un compuesto de la presente invención (concentración inicial nominal 10 µM) se incubó individualmente con microsomas de hígado de rata (0,5 mg/ml de proteína) en tampón KH₂PO₄ 0,1 M (pH 7,4) con MgCl₂ 5 mM y reactivo de captura 5 mM (glutación(GSH), N-acetilcisteína (NAC), o CH₃ONH₂) durante 60 min a 37 °C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de NADPH. (1 mM) y se terminaron mediante la adición de un volumen igual de ácido (0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo) a la mezcla de incubación.

Incubaciones de Hepatocitos

30 Un compuesto de la presente invención (concentración inicial nominal 10 µM) se incubó individualmente con hepatocitos de rata recién aislados (Sprague Dawley) y de perro (Beagle) crioconservados (1 x 10⁶ células/mL) a pH 7,4 a 37 °C durante 1 hora. Las mezclas de incubación de hepatocitos contenían medio E de Williams complementado con HEPES 25 mM, 1% de disolución ITS-G (Life Technologies, n° de cat. 41400-045), HEPES 10 mM (pH 7,4), y L-glutamina 2 mM. Las incubaciones finalizaron mediante la adición de un volumen igual de acetoneitrilo acidificado (0,1% de ácido fórmico) a la mezcla de incubación.

Análisis mediante LS-MS

40 Tras la precipitación de proteínas, se analizaron los metabolitos en los sobrenadantes de las muestras mediante un barrido completo con LC-MS. Se obtuvo información de peso molecular para cada metabolito detectado. Se analizaron los patrones de fragmentación de experimentos adicionales de LC-MS/MS para ayudar a asignar las estructuras de los metabolitos principales. Instrumentos

HPLC	Sistema de HPLC HP 1100 (Hewlett Packard, D-76337 Waldbronn, Alemania)
------	------------------------------------------------------------------------

MS	LCQ (Finnigan Corporation, 355 River Oaks Parkway, San Jose, CA)
----	------------------------------------------------------------------

Condiciones de MS (LCQ)

Tensión de la Fuente	4,5 Kv
----------------------	--------

Temp. del Capilar	180 °C
Caudal de Gas Envolvente	80
Caudal de Gas Auxiliar	5
Tipo de Fuente	EPI
Modo de Ionización	Positivo

Condiciones de HPLC

Columna	Phenomenex Synergi MAX-RP, 4 μ, 2,0 x 150 mm (Phenomenex, Torrance, CA)
Fase Móvil	A = 0,1% de ácido fórmico en agua, B = ACN
Caudal	0,2 ml/min
Temperatura	45°C
Detección	Espectrómetro de masas LCQ

Método de gradiente

Tiempo	A	B
0	90	10
30	40	60
30,1	10	90
33	10	90
33,1	90	10
40	90	10

Resultados de los Ensayos

5 Las rutas de biotransformación principales observadas para los compuestos fueron la N-desetilación, N-desalquilación e hidroxilación. Para el compuesto de la presente invención, que tiene un resto bencil-piperazinilo fluoro-sustituido, no se detectó un aducto de glutatión en el benceno en las incubaciones de hepatocitos de rata. En contraste, se observó cierto aducto de glutatión en el anillo en las incubaciones de hepatocitos de rata para compuestos similares sin el anillo de bencilo fluoro-sustituido.

MÉTODOS DE MICRODIÁLISIS IN VIVO

Procedimiento

10 Las ratas se asignan de manera aleatoria a ocho grupos de tratamiento: vehículo-tranquilo, vehículo-estrés, fármaco-tranquilo, fármaco-estrés. Se implantan sondas de microdiálisis (CMA/12, longitud de membrana de 4 mm para mPFC) en el cerebro 2 hrs antes del experimento y se perfunden con CSF artificial (aCSF, CMA Microdialysis AB) a un caudal de 1,1 mL/min durante 2 h para estabilizar el valor inicial. Se recogen tres muestras de 20 min para definir el valor inicial, se inyecta ip a los animales vehículo o compuestos y la recogida de muestras se lleva a cabo durante las siguientes 5 h. El programa de paradigma de estrés comienza 20 min tras la administración de los
15 compuestos. Las muestras se inyectan inmediatamente (en línea) en los sistemas de HPLC para el análisis de las concentraciones de monoaminas. Se hace la media de las concentraciones de neurotransmisores en 3 muestras

recogidas antes de la administración de compuestos/vehículo y se define como el valor inicial (100%). Las concentraciones de los neurotransmisores en los microdializados posteriores se expresan después como el porcentaje de los niveles iniciales.

Procedimiento de Estrés

- 5 Para el procedimiento de estrés, se usan cajas de evitación pasiva estándar, equipadas con luz, tonos y aplicadores de choques eléctricos (Med Associates, Inc). Las cajas se colocan en cámaras atenuadoras del sonido. El paradigma de estrés se da a lo largo de un día. Los animales se aclimatan a las cámaras durante 2 horas, después se exponen a lo largo del transcurso de 6 min a una serie de luz destelleante, seguido de choques eléctricos en las patas (0,5 seg de duración, intensidad 1,5 mA, total 10 choques). El grupo "tranquilo" se expone a cámaras con
10 luces, pero no reciben choques eléctricos. 40 minutos más tarde se repite la secuencia de luz con los animales, pero no se administran choques eléctricos.

Administración de fármacos.

Todos los compuestos se disuelven en agua destilada estéril (Vehículo) y se administran de manera intraperitoneal (IP) 20 min antes del procedimiento de estrés del día.

HPLC y detección electroquímica.

- 15 El sistema de HPLC consiste en una bomba 5041, detector modelo 5200A Coulochem II, columna MD-150 3 x 150 mm, célula amperométrica modelo 5041 (todas de ESA Inc) y un inyector en línea (de BAS Inc). La fase móvil es: Na₂HPO₄ 75 mM, EDTA 25 mM, ácido 1-octanosulfónico 1,7 mM, 100 ul/L de trietilamina, 10% de acetonitrilo, pH 3,0. El potencial se ajusta a +0,65 V, el caudal se mantiene a 0,3 ml/min. Los datos se recogen
20 mediante el uso de un sistema de adquisición/análisis basado en PC (ordenador 501 y programa A/D, ESA, Inc), se integran y se transfieren a un programa de hojas de cálculo/gráficos para el análisis posterior.

- 25 Cuando los grupos de 6-8 ratas, preparados con sondas de microdialisis intracerebral colocadas en la corteza prefrontal media (en donde la señal neuroquímica es más fuerte) se someten al paradigma de condicionamiento descrito anteriormente, se observan incrementos de norepinefrina (NE) y dopamina en los animales tratados con vehículo. Ciertos compuestos de la invención bloquean el incremento sostenido de NE y dopamina.

Método del Modelo de Ansiedad de Geller-Siefter

- En el ensayo de conflicto, los animales hambrientos se entrenan para presionar una palanca para la administración de alimento en una cámara operativa estándar en dos condiciones. En la primera condición, denominada
30 componente sin inhibir, se administra alimento como media después de haber realizado 17 presiones de palanca (también denominado calendario de refuerzo VR17). En la segunda condición, denominada componente inhibido y señalizada mediante luces destelleantes dentro de la cámara operativa, también se administra alimento después de una media de 17 presiones de palanca, pero también se administra un choque eléctrico en el suelo de la jaula con un calendario VR17 distinto. Las sesiones diarias consisten en 5 presentaciones alternantes de cada tipo de
35 componente: inhibido (3 min de duración) y sin inhibir (3 min de duración). El número de presiones de palanca emitidas en el componente inhibido es obviamente menor respecto del componente sin inhibir. Los agentes ansiolíticos, tales como diazepam, incrementan el número de presiones de palanca que los animales realizarán en el componente inhibido dentro de ciertos intervalos de dosis, sin alterar el número de presiones de palanca que se realizan en el componente sin inhibir. Ciertos compuestos de la invención tienen un comportamiento ansiolítico en este procedimiento.

EJEMPLOS

La invención será descrita adicionalmente en más detalle por los siguientes Ejemplos, que describen métodos por los que los compuestos de la presente invención se pueden preparar, purificar, analizar y ensayar biológicamente, y que no se deben interpretar como limitantes de la invención.

INTERMEDIO 1: 4-Yodo-N,N-dietilbenzamida

- 45 A una mezcla de cloruro de 4-yodo-benzoilo (75 g) en 500 mL de CH₂Cl₂ se le añadió una mezcla de Et₃N (50 mL) y Et₂NH (100 mL) a 0 °C. Tras la adición, la mezcla de reacción resultante se calentó a temperatura ambiente durante 1 hr y después se lavó con cloruro amónico saturado. El extracto orgánico se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. El residuo se recristalizó a partir de hexanos calientes para proporcionar 80 g del INTERMEDIO 1.

INTERMEDIO 2: 4-[hidroxi(3-nitrofenil)metil]-N,N-dietilbenzamida

- 50 Se disolvió N,N-dietil-4-yodobenzamida (5,0 g, 16 mmol) en THF (150 mL) y se enfrió a -78 °C en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió n-BuLi (15 mL, disolución 1,07 M en hexano, 16 mmol) gota a gota durante 10 min a -65 a -78 °C. La disolución se añadió a través de una cánula a 3-nitrobenzaldehído (2,4 g, 16 mmol) en tolueno/THF (aprox. 1:1, 100 mL) a -78 °C. Se añadió NH₄Cl (ac.) tras 30 min. Tras la concentración a vacío, extracción con EtOAc / agua, secado (MgSO₄) y evaporación de la fase orgánica, el residuo se purificó mediante cromatografía con sílice

(0 - 75% de EtOAc/heptano) para proporcionar el INTERMEDIO 2 (2,6 g, 50%). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 1,0-1,3 (m, 6H), 3,2 (m, 2H), 3,5 (m, 2H), 5,90 (s, 1H), 7,30-7,40 (m, 4H), 7,50 (m, 1H), 7,70 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 8,12 (m, 1H), 8,28 (m, 1H).

INTERMEDIO 3: *N,N* dietil-4-[(3-nitrofenil)(1-piperazinil)metil]benzamida

5 A una disolución del alcohol INTERMEDIO 2 (10,01 g, 30,5 mmol) en diclorometano (200 mL) se le añadió bromuro de tionilo (2,58 mL, 33,6 mmol). Después de una hora a temperatura ambiente la reacción se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado (100 mL) y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se lavó con diclorometano (3 x 100 mL) y los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron.

10 El bromuro de bencilo bruto se disolvió en acetonitrilo (350 mL) y se añadió piperazina (10,5 g, 122 mmol). Después de calentar la reacción durante una hora a 65 °C la reacción se lavó con cloruro amónico saturado/acetato de etilo y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 mL) y los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron para proporcionar el INTERMEDIO 3 racémico.

INTERMEDIO 4b: *N,N*-dietil-4-*r(R)*-(3-nitrofenil)(1-piperazinil)metil]benzamida

15 El INTERMEDIO 3 racémico se disolvió en etanol (150 mL) y se añadió ácido di-*p*-toluoil-D-tartárico (11,79 g, 1 equivalente). El producto precipitó a lo largo de un periodo de 12 horas. El sólido se recogió mediante filtración y se redisolvió en etanol a reflujo hasta que todo el sólido se disolvió (aproximadamente 1200 mL de etanol). Después de enfriar, el sólido se recogió mediante filtración y la recristalización se repitió una segunda vez. El sólido se recogió mediante filtración y se trató con hidróxido sódico acuoso (2 M) y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se secó después (Na_2SO_4), se filtró y se concentró para proporcionar 1,986 g del

20 **INTERMEDIO 4b.**

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 1,11 (s ancho, 3H), 1,25 (s ancho, 3H), 2,37 (s ancho, 4H), 2,91 (t, $J = 5$ Hz, 4H), 3,23 (s ancho, 2H), 3,52 (s ancho, 2H), 4,38 (s, 1H), 7,31-7,33 (m, 2H), 7,41-7,43 (m, 2H), 7,47 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7,75-7,79 (m, 1H), 8,06-8,09 (m, 1H), 8,30-8,32 (m, 1H).

La pureza quiral se determinó mediante HPLC con el uso de las condiciones siguientes:

25 Columna Chiralpack AD (Daicel Chemical Industries)

Caudal de 1 ml/minuto

Tiempo de funcionamiento 30 minutos a 25 °C

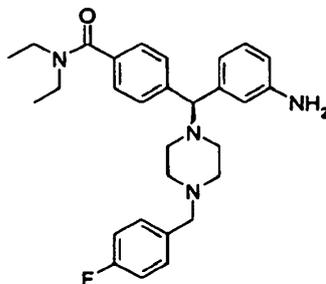
Isocrático 15% de etanol (que contiene 0,1% v/v de dietilamina) 85% de hexanos (que contiene 0,1% v/v de dietilamina)

30 Tiempo de retención de la molécula = 20 minutos

INTERMEDIO 4a: *N,N*-dietil-4-[(S)-3-nitrofenil](1-piperazinil)metil]benzamida

El enantiómero (S) INTERMEDIO 4a se puede obtener llevando a cabo el procedimiento de resolución anterior con ácido di-*p*-toluoil-L-tartárico.

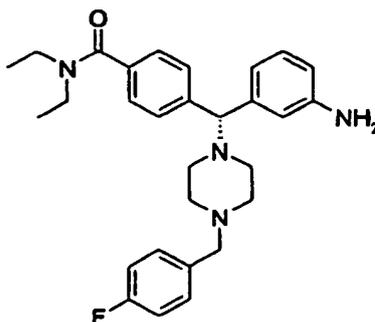
35 **COMPUESTO 1: 4-[(S)-(3-aminofenil)[4-(4-fluorobencil)piperazin-1-il]metil]-*N,N*-dietilbenzamida (ejemplo de referencia)**



40 A una disolución de INTERMEDIO 4a (467 mg) en 1,2-dicloroetano (13 ml) se le añadió 4-fluorobenzaldehído (252 μL ; 2 eq) y triacetoxiborohidruro sódico (498 mg; 2 eq). La reacción se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 18 horas y se concentró. Se añadió bicarbonato sódico saturado y la disolución acuosa se extrajo con tres porciones de diclorometano, y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron. El compuesto se disolvió en una mezcla de etanol, tetrahidrofurano, agua y cloruro amónico saturado (4 ml; proporciones 4:2:1:1 v/v). Se añadieron nanopartículas de hierro (3 puntas de espátula) y la

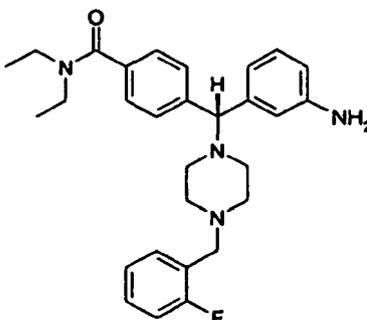
disolución se calentó a 150 °C durante 10 minutos en el microondas. La mezcla resultante se enfrió, se filtró a través de Celite y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida con gel de sílice, eluyendo con un gradiente del 1% al 5% de MeOH en diclorometano. El producto obtenido se disolvió en diclorometano, en el que se añadieron 1,2 mL de HCl 1 M en éter. Se eliminó el disolvente, y el producto se aisló en forma de la sal de hidrocloreto para proporcionar el COMPUESTO 1 (164 mg, rendimiento del 30%) en forma de un sólido incoloro. Pureza (HPLC): > 99%; Pureza óptica (HPLC quiral): > 99%; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD), 1,08 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 1,21 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 3,20-3,26 (m, 4H), 3,51-3,54 (m, 6H), 4,43 (s, 2H), 7,19-7,23 (m, 2H), 7,34 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,54-7,63 (m, 3H), 7,70-7,82 (m, 4H). Encontrado: C, 54,63; H, 6,49; N, 8,68. C₂₉H₃₆N₄OF x 4,1 HCl x 0,8 H₂O x 0,1 C₄H₁₀O tiene C, 57,67; H, 6,51; N, 8,67%.

10 **COMPUESTO 2: 4-[(R)-(3-aminofenil)[4-(4-fluorobencil)piperazin-1-il]metil]-N,N-dietilbenzamida**



A una disolución de INTERMEDIO 4b (5,790 g, 14,6 mmol) en 1,2-dicloroetano (60 mL) se le añadió 4-fluorobenzaldehído (2,04 mL, 19,0 mmol) y triacetoxi borohidruro sódico (4,02 g, 19,0 mmol). Después de 20 horas a temperatura ambiente la reacción se paró con bicarbonato sódico acuoso y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 100 mL) y los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida, con elución del 30% al 50% de acetona en hexanos para proporcionar una espuma incolora (5,285 g, 71%), que es el intermedio nitro. El intermedio nitro (5,285 g, 10,4 mmol) se disolvió en una mezcla de etanol, tetrahidrofurano, agua y cloruro amónico acuoso saturado (proporción 4:2:1:1 v/v) (100 mL) y se añadieron gránulos de hierro (0,63 mg, 11,5 mmol). La reacción se calentó a reflujo y periódicamente se añadieron más gránulos de hierro. Después de 24 horas a reflujo (90 °C) la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de celite y se concentró. Al residuo se le añadió bicarbonato sódico acuoso y diclorometano. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 100 mL), y los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto se purificó con gel de sílice, mediante elución del 1% al 5% de metanol en diclorometano para proporcionar el COMPUESTO 2 (3,505 g) en forma de una espuma amarilla pálida. También se obtuvo el material impuro de la cromatografía rápida anterior, y se volvió a purificar mediante una segunda cromatografía rápida, mediante elución con un 100% de acetato de etilo hasta un 5% de metanol en acetato de etilo para proporcionar otros 0,949 g del COMPUESTO 2. Material combinado obtenido: 4,454 g (rendimiento del 90%). Pureza (HPLC): > 99%; Pureza óptica (HPLC quiral): > 99%; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD), 1,08 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 1,21 (t, J = 6,5 Hz, 3H), 3,20-3,26 (m, 4H), 3,51-3,54 (m, 6H), 4,43 (s, 2H), 7,19-7,23 (m, 2H), 7,34 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,54-7,63 (m, 3H), 7,70-7,82 (m, 4H). Encontrado: C, 54,00; H, 6,34; N, 8,47. C₂₉H₃₅FN₄O x 4,7 HCl x 0,2 C₄H₁₀O x 0,1 H₂O tiene C, 54,02; H, 6,37; N, 8,46%.

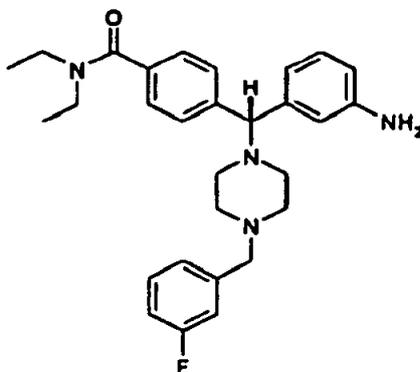
35 **COMPUESTO 3: 4-[(R)-(3-aminofenil)[4-(2-fluorofenil)metil]-1-piperazinil] metil]-N,N-dietil-benzamida (ejemplo de referencia)**



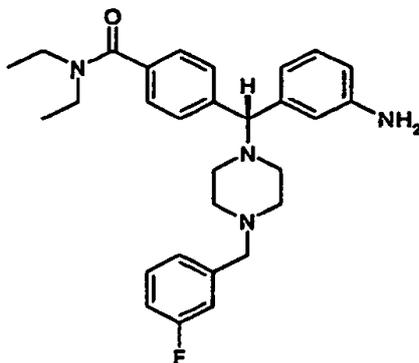
A una disolución de INTERMEDIO 4b (298 mg, 0,752 mmol) en 1,2-dicloroetano (8,5 ml) se le añadió 2-fluorobenzaldehído (160 mg, 1,503 mmol, 2 eq) y triacetoxiborohidruro sódico (319 mg, 1,503 mmol, 2 eq). La reacción se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 18 horas y se concentró. Se añadió bicarbonato sódico saturado y la disolución acuosa se extrajo con tres porciones de diclorometano, y las capas orgánicas

combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron. El compuesto se disolvió en una mezcla de etanol, tetrahidrofurano, agua y cloruro amónico saturado (3 ml; proporciones 4:2:1:1 v/v). Se añadieron nanopartículas de hierro (3 puntas de espátula) y la disolución se calentó a 150 °C durante 10 minutos en el microondas. La mezcla resultante se enfrió, se filtró a través de Celite y se concentró. El producto bruto se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente del 5-50 % de CH₃CN en H₂O que contenía un 0,1 % de TFA) para proporcionar el COMPUESTO 3 (0,28 g, rendimiento del 46 %) en forma de la sal de TFA. Este material se liofilizó a partir de CH₃CN/H₂O para producir un polvo amarillo pálido. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) 1,08 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 1,22 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 2,39 (s ancho, 2H), 3,02 (s ancho, 2H), 3,18-3,38 (m, 4H), 3,43 (s ancho, 2H), 3,52 (q, J = 6,8 Hz, 2H), 4,43 (s, 2H), 4,53 (s, 1H), 7,09 (dt, J = 2,3, 6,8 Hz, 1H), 7,24-7,30 (m, 1H), 7,30-7,41 (m, 6H), 7,52-7,60 (m, 4H). Anál. Calc. para C₂₉H₃₅FN₄O x 2,8 TFA x 0,4 H₂O: C, 51,88; H, 4,86; N, 6,99. Encontrado: C, 51,89; H, 4,89; N, 6,97%. M.S. (calc.): 475,3 (MH⁺), M.S. (encontrado): 475,2 (MH⁺). HPLC: k': 2,35, Pureza: >99% (215 nm), >99% (254 nm), >99% (280 nm). Condiciones de HPLC: Zorbax C-18, gradiente 10-95% B, caudal: 1 mL/min, 25 °C, A: 0,1% de TFA en H₂O, B: 0.1% de TFA en MeCN. Rotación: [α]_D¹⁶ = - 8,91 (c = 1,179, MeOH).

COMPUESTO 4 4-[(R)-(3-aminofenil)[4-[(3-fluorofenil)metil]-1-piperazinil] metil]-N,N-dietil-benzamida (ejemplo de referencia)



A una disolución de INTERMEDIO 4b (281 mg, 0,709 mmol) en 1,2-dicloroetano (8 ml) se le añadió 3-fluorobenzaldehído (180 mg, 1,417 mmol, 2 eq) y triacetoxiborohidruro sódico (300 mg, 1,417 mmol, 2 eq). La reacción se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 18 horas y se concentró. Se añadió bicarbonato sódico saturado y la disolución acuosa se extrajo con tres porciones de diclorometano, y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto se disolvió en una mezcla de etanol, tetrahidrofurano, agua y cloruro amónico saturado (3 ml; proporciones 4:2:1:1 v/v). Se añadieron nanopartículas de hierro (3 puntas de espátula) y la disolución se calentó a 150 °C durante 10 minutos en el microondas. La mezcla resultante se enfrió, se filtró a través de Celite y se concentró. El producto resultante se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente del 5-50 % de CH₃CN en H₂O que contenía un 0,1 % de TFA) para proporcionar el COMPUESTO 4 (0,375 g, rendimiento del 65 %) en forma de su sal de TFA. Este material se liofilizó a partir de CH₃CN/H₂O para producir un polvo amarillo pálido. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) 1,08 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,21 (t, J = 6,8 Hz, 3H), 2,38 (s ancho, 2H), 3,00 (s ancho, 2H), 3,16-3,28 (m, 4H), 3,40 (s ancho, 2H), 3,51 (q, J = 6,8 Hz, 2H), 4,37 (s, 2H), 4,56 (s, 1H), 7,18 (ddd, J = 1,2,2,3,7,8 Hz, 1H), 7,24 (ddd, J = 1,0, 2,7, 8,8 Hz, 1H), 7,28-7,38 (m, 4H), 7,55 (d, J = 8,2 Hz, 2H). Anál. Calc. para C₂₉H₃₅FN₄O x 2,7 TFA x 1,1 H₂O: C, 51,50; H, 5,01; N, 6,98. Encontrado: C, 51,52; H, 5,01; N, 6,87%. M.S. (calc.): 475,3 (MH⁺), M.S. (encontrado): 475,2 (MH⁺). HPLC: k': 2,43; Pureza: >99% (215 nm), >99% (254 nm), >99% (280 nm). Condiciones de HPLC: Zorbax C-18, gradiente 10-95% B, caudal: 1 mL/min, 25 °C, A: 0,1% de TFA en H₂O, B: 0.1% de TFA en MeCN. Rotación: [α]_D¹⁶ = - 8,94 (c = 1,04, MeOH) agua. Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente del 5-50 % de CH₃CN en H₂O que contenía un 0,1 % de TFA) para proporcionar el COMPUESTO 3 (0,28 g, rendimiento del 46 %) en forma de la sal de TFA. Este material se liofilizó a partir de CH₃CN/H₂O para producir un polvo amarillo pálido. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) 1,08 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 1,22 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 2,39 (s ancho, 2H), 3,02 (s ancho, 2H), 3,18-3,38 (m, 4H), 3,43 (s ancho, 2H), 3,52 (q, J = 6,8 Hz, 2H), 4,43 (s, 2H), 4,53 (s, 1H), 7,09 (dt, J = 2,3, 6,8 Hz, 1H), 7,24-7,30 (m, 1H), 7,30-7,41 (m, 6H), 7,52-7,60 (m, 4H). Anál. Calc. para C₂₉H₃₅FN₄O x 2,8 TFA x 0,4 H₂O: C, 51,88; H, 4,86; N, 6,99. Encontrado: C, 51,89; H, 4,89; N, 6,97%. M.S. (calc.): 475,3 (MH⁺), M.S. (encontrado): 475,2 (MH⁺). HPLC: k': 2,35; Pureza: >99% (215 nm), >99% (254 nm), >99% (280 nm). Condiciones de HPLC: Zorbax C-18, gradiente 10-95% B, caudal: 1 mL/min, 25 °C, A: 0,1% de TFA en H₂O, B: 0.1% de TFA en MeCN. Rotación: [α]_D¹⁶ = - 8,91 (c = 1,179, MeOH).

COMPUESTO 4 4-[(R)-(3-aminofenil)]4-[(3-fluorofenil)metil]-1-piperazinil] metil]-N,N-dietyl-benzamida

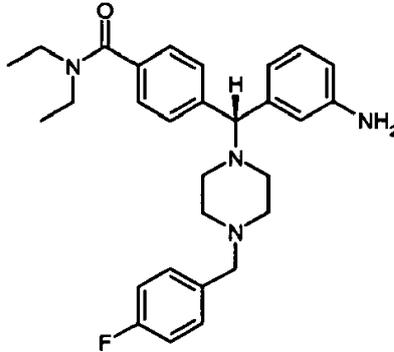
5 A una disolución de INTERMEDIO 4b (281 mg, 0,709 mmol) en 1,2-dicloroetano (8 ml) se le añadió 3-fluorobenzaldehído (180 mg, 1,417 mmol, 2 eq) y triacetoxiborohidruro sódico (300 mg, 1,417 mmol, 2 eq). La reacción se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno durante 18 horas y se concentró. Se añadió bicarbonato sódico saturado y la disolución acuosa se extrajo con tres porciones de diclorometano, y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron. El producto se disolvió en una

10 mezcla de etanol, tetrahidrofurano, agua y cloruro amónico saturado (3 ml; proporciones 4:2:1:1 v/v). Se añadieron nanopartículas de hierro (3 puntas de espátula) y la disolución se calentó a 150 °C durante 10 minutos en el microondas. La mezcla resultante se enfrió, se filtró a través de Celite y se concentró. El producto resultante se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con agua. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente del 5-50 % de CH₃CN en H₂O que contenía un 0,1 % de TFA) para proporcionar el COMPUESTO 4 (0,375 g, rendimiento del 65 %) en forma de su sal de TFA. Este material se liofilizó a partir de CH₃CN/H₂O para producir un polvo amarillo pálido. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) 1,08 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 1,21 (t, J = 6,8 Hz, 3H), 2,38 (s ancho, 2H), 3,00 (s ancho, 2H), 3,16-3,28 (m, 4H), 3,40 (s ancho, 2H), 3,51 (q, J = 6,8 Hz, 2H), 4,37 (s, 2H), 4,56 (s, 1H), 7,18 (ddd, J = 1,2, 2,3, 7,8 Hz, 1H), 7,24 (ddd, J = 1,0, 2,7, 8,8 Hz, 1H), 7,28-7,38 (m, 4H), 7,55 (d, J = 8,2 Hz, 2H). Anál. Calc. para C₂₉H₃₅FN₄O x 2,7 TFA x 1,1 H₂O: C, 51,50; H, 5,01; N, 6,98. Encontrado: C, 51,52; H, 5,01; N, 6,87%. M.S. (calc.): 475,3 (MH⁺), M.S. (encontrado): 475,2 (MH⁺). HPLC: k': 2,43; Pureza: >99% (215 nm), >99% (254 nm), >99% (280 nm). Condiciones de HPLC: Zorbax C-18, gradiente 10-95% B, caudal: 1 mL/min, 25 °C, A: 0,1% de TFA en H₂O, B: 0,1% de TFA en MeCN. Rotación: [α]_D¹⁶ = - 8,94 (c = 1,04, MeOH)

20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso como un medicamento.
3. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor.
4. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad.
- 10 5. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la depresión.
6. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento del dolor.
7. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de la ansiedad.
8. Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de la depresión.
- 15 9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. 4-((*R*)-(3-Aminofenil)[4-(4-fluorobencil)piperazin-1-il]metil)-*N,N* dietilbenzamida enantioméricamente pura según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.