

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 867**

51 Int. Cl.:

**C07D 473/34** (2006.01)

**A61K 31/52** (2006.01)

**A61P 25/06** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011** **E 11713150 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 2552916**

54 Título: **Compuestos de purina usados como agonistas de CB2**

30 Prioridad:

**31.03.2010 US 319532 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**31.07.2014**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)**

**Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**HOLLINSHEAD, SEAN, PATRICK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 481 867 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

Compuestos de purina usados como agonistas de CB<sub>2</sub>

Los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> pertenecen a la clase de receptores acoplados a la proteína G (GPCR). Los receptores CB<sub>1</sub> se expresan tanto centralmente como periféricamente mientras que los receptores CB<sub>2</sub> se expresan en su mayoría periféricamente, principalmente en tejidos y células inmunes.

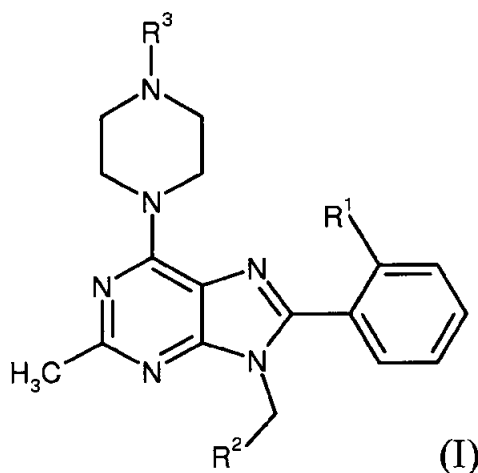
El potencial farmacológico y terapéutico del receptor CB<sub>2</sub> se ha revisado recientemente (*Br. J. Pharmacol.* (2008) 153, 319-334) identificando al CB<sub>2</sub> como una diana terapéutica para el tratamiento del dolor, en particular, del dolor neuropático e inflamatorio.

Los agonistas de CB<sub>2</sub>, en particular los agonistas selectivos de CB<sub>2</sub>, proporcionan una diana para el tratamiento del dolor con efectos secundarios mediados centralmente limitados.

El documento WO 2004/037823 se refiere a compuestos de purina y al uso de los mismos como ligandos de receptores de cannabinoides, en particular como antagonistas del receptor CB<sub>1</sub>. El documento WO 2010/080306, publicado el 15 de julio de 2010, se refiere a compuestos de purina para el tratamiento del dolor. El documento WO 2010/019762 se refiere a compuestos de purina como bloqueadores de los receptores de cannabinoides. El documento *J. Med. Chem.* 2009, 52, 234-237 se refiere al CP-945.598 como antagonista del receptor CB<sub>1</sub>.

Como consecuencia de los efectos secundarios asociados a los actuales agentes farmacológicos orales, continua existiendo la necesidad de desarrollar terapias alternativas para el tratamiento del dolor.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula:



en la que;

R<sup>1</sup> es Cl o CH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> es C≡N, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CONHCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, o -CH<sub>2</sub>C≡N;

R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> o C(O)CH<sub>3</sub>;

R<sup>4</sup> es H, C(O)CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; y

R<sup>5</sup> es H o se combina con R<sup>4</sup> para formar pirrolidin-2-ona;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención son agonistas del receptor CB<sub>2</sub> *en vitro*. Algunos de los compuestos de la presente invención exhiben mayor potencia que los agonistas de CB<sub>2</sub> existentes. Algunos de los compuestos de la presente invención son agonistas selectivos de CB<sub>2</sub>. Algunos de los compuestos de la presente invención exhiben mayor selectividad por el CB<sub>2</sub> que los agonistas de CB<sub>2</sub> existentes.

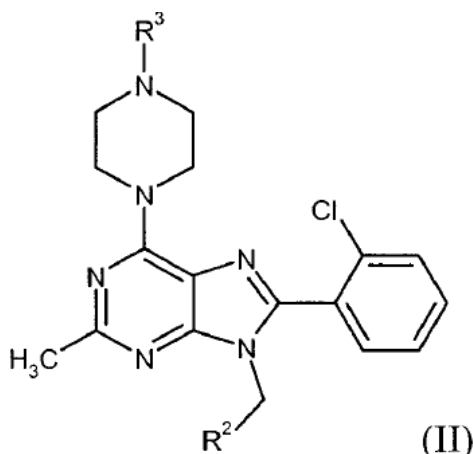
La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Asimismo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, uno o más ingredientes terapéuticos.

La presente invención proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia. La presente invención proporciona también un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del dolor, en particular del dolor osteoartítico o de la migraña. En otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor, en particular del dolor osteoartítico o de la migraña.

Se prefiere usar los compuestos de la presente invención en el tratamiento del dolor, en particular del dolor osteoartítico o de la migraña.

También se han identificado agonistas del receptor CB<sub>2</sub> que poseen potencial terapéutico en el tratamiento de la esclerosis múltiple (*Br. J. Pharmacol.* (2008) 153, 216-225 y *J. Biol. Chem.* (2008) 283, 13320-13329).

Las especies preferidas de la presente invención son los compuestos de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> tienen el significado que se describe en el presente documento.

Se prefieren ciertas clases de los compuestos de Fórmula I o II. Las selecciones que se enumeran a continuación describen dichas clases preferidas:

1) R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, o -CH<sub>2</sub>C≡N;

2) R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;

3) R<sup>3</sup> es metilo, etilo, 2-fluoroetilo o C(O)CH<sub>3</sub>;

4) R<sup>3</sup> es metilo o etilo;

5) R<sup>4</sup> es C(O)CH<sub>3</sub> o CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;

6) R<sup>5</sup> es H;

7) R<sup>5</sup> es H y R<sup>4</sup> es C(O)CH<sub>3</sub> o CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;

8) R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, o -CH<sub>2</sub>C≡N; R<sup>5</sup> es H y R<sup>4</sup> es C(O)CH<sub>3</sub> o CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;

9) R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, o -CH<sub>2</sub>C≡N; R<sup>5</sup> es H; R<sup>4</sup> es C(O)CH<sub>3</sub> o CO<sub>2</sub>; y R<sup>3</sup> es metilo, etilo, 2-fluoroetilo o C(O)CH<sub>3</sub>;

10) R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sup>3</sup> es metilo, etilo, 2-fluoroetilo o C(O)CH<sub>3</sub>;

11) R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sup>3</sup> es metilo o etilo.

Dentro del alcance de la presente solicitud se contemplan las sales farmacéuticamente aceptables de cada uno de los compuestos de la presente invención.

Tal y como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se entiende que cuando un grupo es calificado como "definido en el presente documento" o "en el presente documento definido" dicho grupo engloba la primera y más amplia definición, así como todas y cada una de las definiciones particulares de ese grupo.

Tal y como se usa más arriba y a lo largo de la descripción de la invención, los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tendrán el siguiente significado:

Tal y como se usa en el presente documento el término alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> se refiere a metilo o etilo.

5 Tal y como se usa en el presente documento el término fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> se refiere a un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> tal y como se define en el presente documento, en el que uno o más hidrógenos están sustituidos por flúor e incluye, trifluorometilo, 2-fluoroetilo, 2,2-difluoroetilo y 2,2,2-trifluoroetilo. Un grupo fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> preferido es el 2-fluoroetilo.

10 Tal y como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos de la presente invención que son sustancialmente no tóxicas para los organismos vivos. Dichas sales y la metodología convencional para prepararlas son bien conocidas en el estado de la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al., *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties Selection and Use*, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); y J. Pharm. Sci. 66, 2-19 (1977). Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas son las sales clorhidrato.

15 Las realizaciones de la invención incluyen los ejemplos proporcionados en el presente documento y, si bien los ejemplos proporcionados puedan ser de una forma quiral o conformacional, o una sal de los mismos, realizaciones adicionales de la invención incluyen también todas las otras formas estereoisómeras y o conformacionales de los ejemplos descritos, así como las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

20 Tal y como se usa en el presente documento el término "agonistas selectivos de CB<sub>2</sub>" o "selectividad por el CB<sub>2</sub>" se refiere a compuestos que tienen mayor potencia por el CB<sub>2</sub> que por el CB<sub>1</sub>. Preferiblemente los compuestos de la presente invención exhiben una selectividad por el CB<sub>2</sub> ≥ 50 veces. Más preferiblemente, los compuestos de la presente invención exhiben una selectividad por el CB<sub>2</sub> ≥ 100 veces. Aún más preferiblemente, los compuestos de la presente invención exhiben una selectividad por el CB<sub>2</sub> ≥ 500 veces.

25 Los compuestos de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas administradas a través de una variedad de rutas de administración. Preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y los procedimientos para preparar las mismas son bien conocidos en el estado de la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (A. Gennaro, et al., eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995).

30 Los siguientes Esquemas, Preparaciones y Ejemplos se proporcionan para elucidar mejor la práctica de la presente invención. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estos Esquemas, Preparaciones, y Ejemplos son bien conocidas en el estado de la técnica y las modificaciones apropiadas de las condiciones de reacción, incluyendo la sustitución de disolventes y co-reactivos, se encuentran dentro de las capacidades del experto en la materia.

35 Asimismo, el experto en la materia apreciará que, en determinadas circunstancias, el orden en que se introducen los restos no es crítico. El orden particular de las etapas requeridas para producir los compuestos de Fórmula I depende del compuesto particular que se ha de sintetizar, del compuesto de partida, y de la labilidad relativa de los restos sustituidos, tal como apreciará el experto químico. El experto en la materia apreciará también que no todos los sustituyentes son compatibles con todas las condiciones de reacción. Estos compuestos pueden estar protegidos o modificados en un punto conveniente de la síntesis mediante procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica.

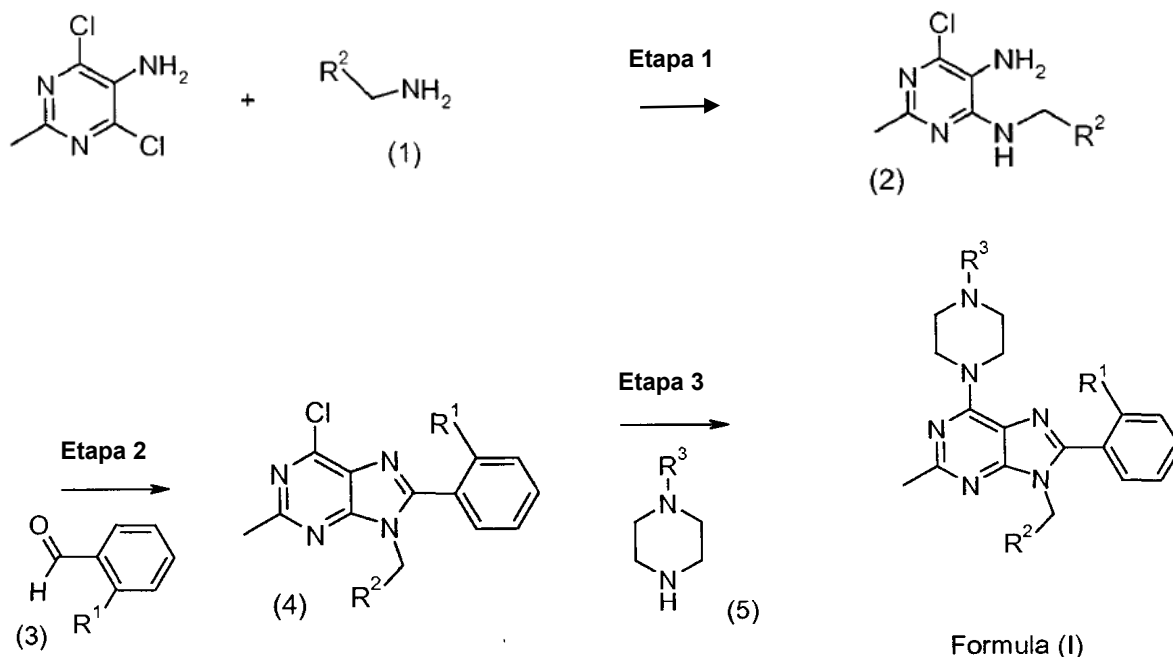
40 Grupos protectores adecuados incluyen los descritos en T.W. Greene, "*Protective Groups in Organic Synthesis*", John Wiley y Sons, New York, N.Y., 1991, en adelante citado como "Greene". Greene indica condiciones apropiadas para la "protección" y "desprotección" de grupos protectores adecuados para ser usados por el experto en la materia.

45 Los intermedios y productos finales de la presente invención pueden ser posteriormente purificados, si se desea, mediante técnicas convencionales tales como recristalización o cromatografía sobre soportes sólidos tales como gel de sílice o alúmina.

Los nombres de los compuestos de la presente invención se generan usando Symyx Version 3.1.NET con la funcionalidad de nomenclatura de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada).

50 Las abreviaturas usadas en el presente documento se definen tal como sigue: "Salmuera" significa una solución de cloruro de sodio acuosa y saturada; "BSA" significa albúmina de suero bovino; "DDQ" significa 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona; "EDTA" significa ácido etilendiaminotetraacético; "GDP" significa guanosina difosfato; "HEPES" significa ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico; "MCPBA" significa ácido meta-cloroperoxibenzoico; "MeOH" significa metanol; "THF" significa tetrahidrofurano; "tBOC" significa terc-butoxicarbonilo.

Esquema 1



5

Un compuesto de Fórmula (I) se puede preparar de acuerdo con las reacciones mostradas en el Esquema 1.

En la etapa 1, la 4,6-dicloro-2-metil-pirimidin-5-ilamina se hace reaccionar con una amina (1) en una reacción de desplazamiento para proporcionar una diamino piridina (2). La reacción puede llevarse a cabo en presencia de una base adecuada, tal como trietilamina o diisopropiletilamina, en un disolvente tal como etanol o isopropanol, a una temperatura elevada tal como aproximadamente de 90 °C a 160 °C, preferiblemente en un tubo sellado. De modo alternativo la reacción puede llevarse a cabo usando radiación microondas.

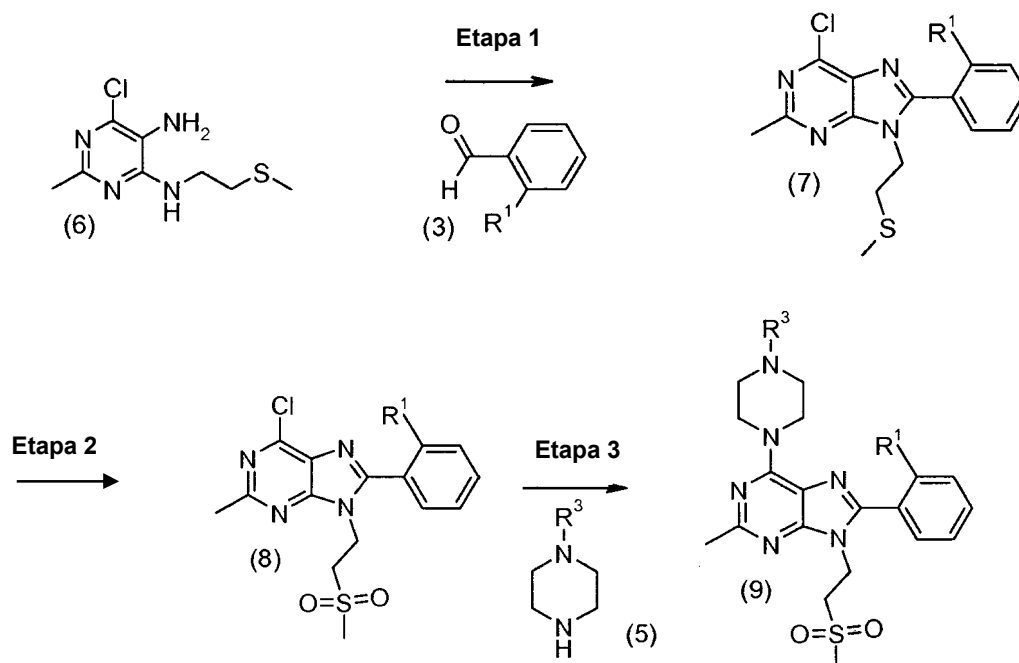
En la etapa 2, se forma una imina a partir de la diamino piridina (2) y un benzaldehído (3) en presencia de un catalizador ácido tal como cloruro férrico sobre sílice, o ácido p-toluensulfónico. La reacción tiene lugar en un disolvente adecuado tal como 1,4-dioxano o tolueno, a una temperatura elevada tal como aproximadamente de 70 °C a 110 °C. En ausencia de sílice, se pueden añadir tamices moleculares para eliminar el agua de la reacción. Tras el filtrado para eliminar los sólidos y la concentración, puede llevarse a cabo la ciclación oxidativa de la imina en un disolvente adecuado tal como diclorometano, en presencia de un oxidante tal como DDQ, a una temperatura adecuada tal como aproximadamente -30 °C a 40 °C para dar una 6-cloropurina (4).

En la etapa 3, una 6-cloropurina (4) sufre una reacción de desplazamiento con una piperazina (5) para proporcionar un compuesto de Fórmula (I). La reacción puede llevarse a cabo en presencia de una base adecuada, tal como trietilamina o diisopropiletilamina, en un disolvente tal como metanol, etanol, o isopropanol, a una temperatura elevada tal como aproximadamente 50 °C a 100 °C. De modo alternativo, la reacción puede llevarse a cabo usando radiación microondas.

El experto en la materia reconocerá que la funcionalidad amina presente en el resto piperazinilo, puede ser protegida con un grupo protector adecuado tal como tBOC. Tras el desplazamiento de la etapa 3, el grupo protector puede ser eliminado posteriormente y la amina acilada o alquilada para obtener compuestos de Fórmula (I) adicionales. Análogamente, cuando  $R^2$  incluye una funcionalidad amina, la amina puede ser protegida con un grupo protector adecuado tal como un grupo tBOC en las secuencias anteriormente mencionadas. Posteriormente, puede ser desprotegida y acilada o sulfonilada para proporcionar compuestos de la invención adicionales.

Además, algunos grupos funcionales pueden sufrir reacciones adicionales en las diversas etapas de la ruta sintética. Por ejemplo, un intermedio acetamida (en el que  $R^2 = C(O)NH_2$ ) se puede convertir en un nitrilo con cloruro de fosforilo.

## Esquema 2



5 En el Esquema 2 se muestran procedimientos para preparar un compuesto de fórmula (9).

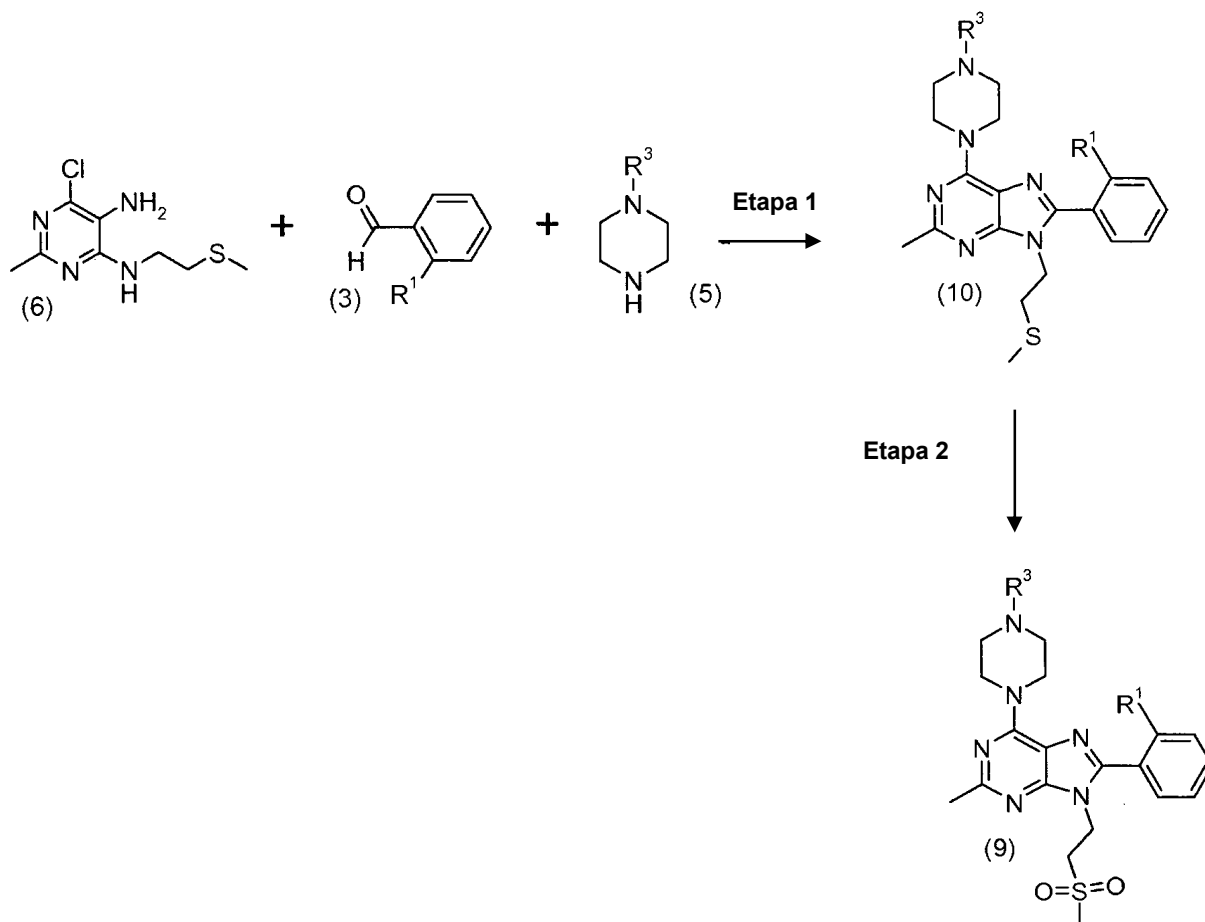
En la etapa 1, la 6-cloro-2-metil-N4-(2-metilsulfaniletil)pirimidina-4,5-diamina (6) se hace reaccionar con un benzaldehído (3) esencialmente tal y como se describe para el Esquema 1, Etapa 2, anterior para proporcionar una alquiltio purina (7)

10 En la etapa 2, una alquiltio purina (7) se oxida a una alquilsulfonil purina (8). La reacción transcurre en presencia de un agente oxidante adecuado tal como MCPBA en un disolvente adecuado tal como diclorometano, a una temperatura adecuada tal como aproximadamente 0 °C a 40 °C.

En la etapa 3, una cloro alquilsulfonil purina (8) sufre una reacción de desplazamiento con una piperazina (5) sustituida adecuadamente para proporcionar una piperazinil purina (9) esencialmente tal y como se describe en el Esquema 1, Etapa 3, anterior.

15

Esquema 3



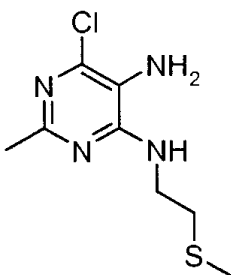
En el Esquema 3 se muestra una ruta alternativa para sintetizar los compuestos de fórmula (9).

- 10 En la etapa 1, la 6-cloro-2-metil-N4-(2-metilsulfaniletil)pirimidina-4,5-diamina (6) se combina junto con un benzaldehído (3) y una piperazina (5) en un disolvente adecuado, tal como anisol, a una temperatura elevada tal como aproximadamente 120 °C a 150 °C, durante un periodo de aproximadamente 3 a 6 días, para proporcionar una alquiltio piperazinil purina (10).

- 15 En la etapa 2, una alquiltio piperazinil purina (10) se oxida a la sulfona de fórmula (9). La reacción tiene lugar en un disolvente adecuado, por ejemplo, una mezcla de THF y MeOH, usando una solución acuosa de peroximonosulfato de potasio (Oxone®) a una temperatura adecuada tal como aproximadamente de 0 °C a 60 °C. De modo alternativo el alquiltio se puede oxidar usando MCPBA.

### Preparación 1

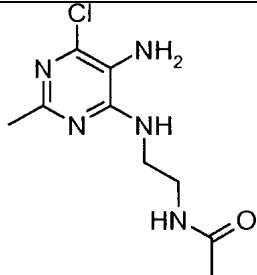
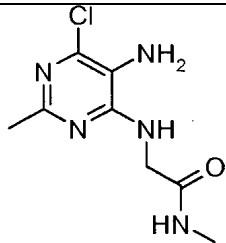
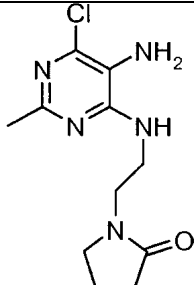
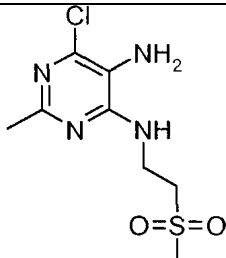
- 20 6-Cloro-2-metil-N4-(2-metilsulfaniletil)pirimidina-4,5-diamina



5 Se calienta una solución de 4,6-dicloro-2-metil-pirimidin-5-amina (46,0 g, 0,258 mol), 2-(metiltio)etil amina (40,05 g, 0,439 mol) y trietilamina (53,3 g, 0,517 mol) en isopropanol (500 ml) a 90 °C durante 30 h. Se enfría la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se concentra. El residuo se disuelve en diclorometano (2 l) y se lava con agua (2 x 500 ml) y salmuera (500 ml). Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio sólido, se filtra y se evapora para proporcionar un sólido marrón. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo para dar el compuesto del título (56 g). ES/MS (m/z) 233 (M+1).

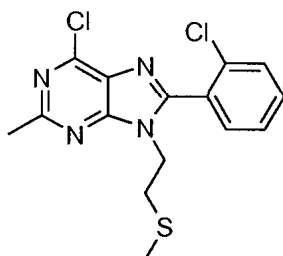
10 Se preparan las diamino piridinas de la tabla que sigue a continuación siguiendo esencialmente el procedimiento tal y como se describe en la Preparación 1, usando la amina apropiada y 4,6-dicloro-2-metil-pirimidin-5-amina. Se purifica usando cromatografía de gel de sílice con un eluyente de diclorometano/metanol, acetato de etilo/hexano (Preparación 6), o acetona/hexanos (Preparación 8).

| Prep. | Nombre químico                                                                    | Estructura | ES/MS m/z |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|
| 2     | 2-[(5-Amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)amino]acetamida                        |            | 216 (M+1) |
| 3     | 3-[(5-Amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)amino]propanonitrilo                   |            | 212 (M+1) |
| 4     | N-[2-[(5-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)amino]etil]carbamato de terc-butilo |            | 302 (M+1) |

|   |                                                                           |                                                                                       |           |
|---|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5 | N-[2-[(5-Amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)amino]etil]acetamida        |     | 244 (M+1) |
| 6 | 2-[(5-Amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)amino]-N-metilacetamida        |    | 230 (M+1) |
| 7 | 1-[2-[(5-Amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)amino]etil]pirrolidin-2-ona |   | 270 (M+1) |
| 8 | 6-Cloro-2-metil-N4-(2-metilsulfoniletil)pirimidina-4,5diamina             |  | 265 (M+1) |

**Preparación 9**

6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-9-(2-metilsulfaniletil)purina

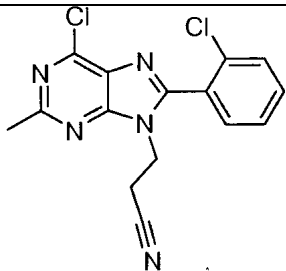
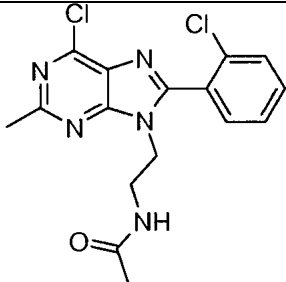
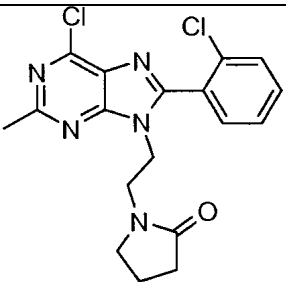
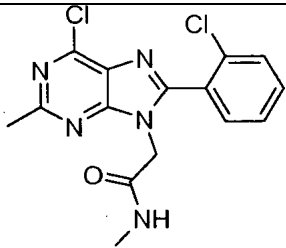
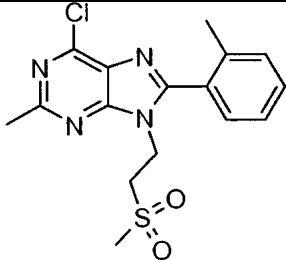


- 5 Se calienta una mezcla de 6-cloro-2-metil-N4-(2-metilsulfaniletil)pirimidina-4,5-diamina (1,63 g, 0,007 mol), 2-clorobenzaldehído (1,96 g, 0,014 mol), y  $\text{FeCl}_3$  al 15% sobre  $\text{SiO}_2$  (4,89 g) en 1,4-dioxano (15 ml) a 100 °C durante 16 h. Se enfría la reacción y se elimina la sílice mediante filtración a través de tierra de diatomeas. Se concentra el filtrado a presión reducida para dar un residuo. El residuo se disuelve en diclorometano seco (10 ml) y se añade 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (1,58 g, 0,007 mol) a 0 °C. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluye la mezcla de reacción con diclorometano, y se lava con solución acuosa de hidróxido de sodio 1N, agua y salmuera. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se
- 10

concentra para dar un residuo. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano (15:85) para dar el compuesto del título (1,9 g). ES/MS m/z 353 (M+1).

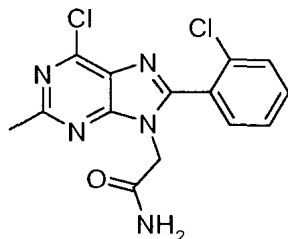
Se preparan las fenilpurinas de la tabla que sigue a continuación siguiendo esencialmente el procedimiento tal y como se describe en la Preparación 9, usando la diamino piridina apropiada y el benzaldehído apropiado. Se purifica mediante cromatografía de gel de sílice con un eluyente de acetato de etilo:hexano, diclorometano:metanol, o hexano:acetona.

5

| Prep. | Nombre químico                                                          | Estructura                                                                           | ES/MS m/z |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 10    | 3-[6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]propanonitrilo           |    | 332 (M+1) |
| 11    | N-[2-[6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]etil]acetamida        |   | 364 (M+1) |
| 12    | 1-[2-[6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]etil]pirrolidin-2-ona |  | 390 (M+1) |
| 13    | 2-[6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]-N-metilacetamida        |  | 350 (M+1) |
| 14    | 6-cloro-2-metil-9-(2-metilsulfoniletil)-8-(o-tolil)purina               |  | 365 (M+1) |

**Preparación 15**

2-[6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]acetamida

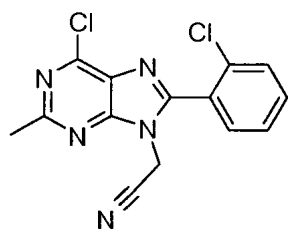


- 5 Se calienta una mezcla de 2-[(5-amino-6-cloro-2-metil-pirimidin-4-il)amino]acetamida (2,2 g, 0,01 mol), 2-clorobenzaldehído (2,86 g, 0,02 mol), ácido p-toluensulfónico (0,2 g) y tamices moleculares (1,0 g) en tolueno (50 ml) a reflujo durante 16 h. Se enfría y se eliminan los tamices moleculares mediante filtración a través de tierra de diatomeas. Se concentra el filtrado a presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo se disuelve en diclorometano seco (50 ml) y se añade 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (2,3 g, 0,01 mol) a 0 °C. Se deja
- 10 que se caliente hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 h. Se diluye la mezcla de reacción con diclorometano, y se lava con solución acuosa de hidróxido de sodio 1N, agua, y salmuera. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra para dar un residuo. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice eluyendo con diclorometano:metanol (98:2) para proporcionar el compuesto del título (0,3 g). ES/MS m/z 336 (M+1).
- 15 Se prepara la fenilopurina de la tabla que sigue a continuación siguiendo esencialmente el procedimiento tal y como se describe en la Preparación 15, usando la diamino pirimidina y el 2-clorobenzaldehído apropiados.

| Prep. | Nombre químico                                                                  | Estructura | ES/MS m/z |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|
| 16    | N-[2-[6-cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo |            | 422 (M+1) |

**Preparación 17**

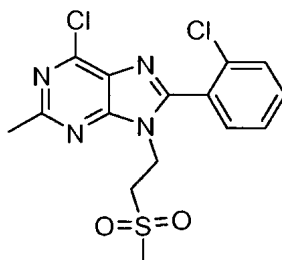
- 20 2-[6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]acetonitrilo



- 25 Se calienta una solución de 2-[6-cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]acetamida (0,3 g, 0,8 mmol) y cloruro de fosforilo (2,5 ml) a 110 °C durante 16 h. Se desactiva la reacción con solución acuosa de bicarbonato de sodio y se extrae con diclorometano. Se lavan los extractos orgánicos con agua y salmuera. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra para dar el compuesto del título (0,2 g). ES/MS m/z 318 (M+1).

**Preparación 18**

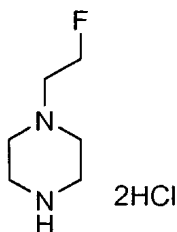
6-Cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-9-(2-metilsulfonietil)purina



- 5 Se añade ácido meta-cloroperbenzoico (2,4 g, 0,014 mol) a una solución de 6-cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-9-(2-metilsulfonietil)purina (1,98 g, 5,0 mmol) en diclorometano (15 ml) y se calienta a reflujo durante 6 h. Se enfría la mezcla de reacción, se desactiva con solución saturada de bicarbonato de sodio, y se extrae con acetato de etilo. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra a presión reducida para dar un residuo. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice eluyendo con diclorometano:metanol (98:2) para proporcionar el compuesto del título (1,95 g). ES/MS m/z 385 (M+1).

**Preparación 19**

Diclorhidrato de 1-(2-fluoroetil)piperazina

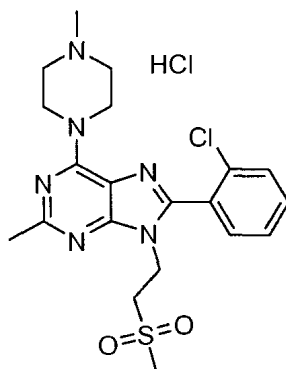


- 15 Se cargó un recipiente de reacción con N-terc-butoxicarbonilpiperazina (1,600 g, 8,590 mmol), carbonato de potasio (3,56 g, 25,77 mmol), yoduro de sodio (catalítico) (10 mg, 66,7  $\mu$ mol), 1,4-dioxano (20 ml), y 1-bromo-2-fluoroetano (704,0  $\mu$ l 9,45 mmol). Se calienta la mezcla con agitación a la temperatura de reflujo durante la noche. Una vez finalizada la reacción, se enfría a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. Se reparte el residuo resultante con acetato de etilo y agua. Se separa la capa orgánica y se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra a presión reducida para proporcionar el éster terc-butílico del ácido 4-(2-fluoro-etil)-piperazin-1-carboxílico. GC-MS m/z 232 (M).
- 20 Se añade HCl 4 N en 1,4-dioxano (21,52 ml, 86,1 mmol) a una solución agitada de éster terc-butílico del ácido 4-(2-fluoro-etil)-piperazin-1-carboxílico (2,00 g, 8,61 mmol) en diclorometano seco (60 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Se agita durante la noche en atmósfera de nitrógeno. Se concentra la reacción a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (1,78 g).

ES/MS m/z 133 (M+1).

**Ejemplo 1**

Clorhidrato de 8-(2-clorofenil)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-metil-9-(2-metilsulfonietil)purina

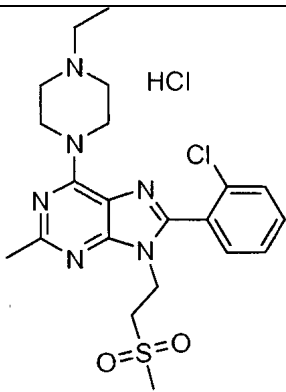
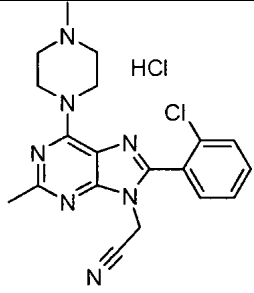
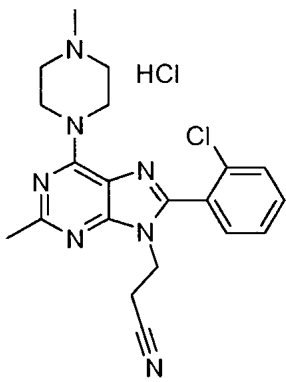


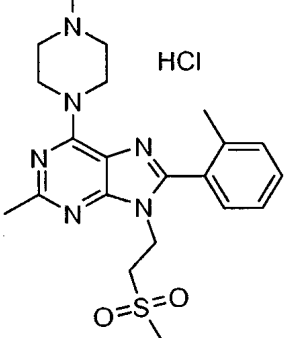
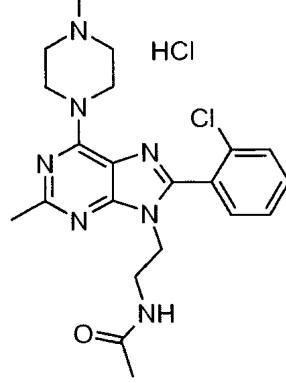
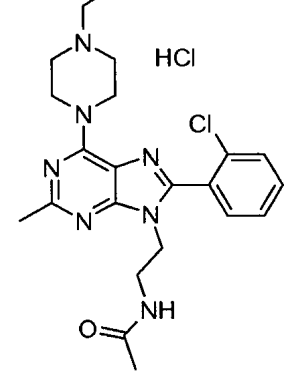
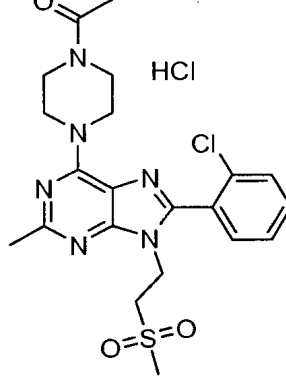
Se calienta una solución de 6-cloro-8-(2-clorofenil)-2-metil-9-(2-metilsulfoniletil)purina (0,3 g, 0,0007 mol), N-metilpiperazina (0,08 g, 0,0008 mol) y trietilamina (0,08 g, 0,0008 mol) en etanol (15 ml) a 90 °C durante 16 h. Se enfría la mezcla de reacción y se concentra a presión reducida. El residuo se disuelve en diclorometano seco y se lava con solución saturada de bicarbonato de sodio, agua, y salmuera. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra para dar un residuo. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice usando diclorometano:metanol (96:4) como eluyente para proporcionar la 8-(2-clorofenil)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-metil-9-(2-metilsulfoniletil)purina (0,24 g).

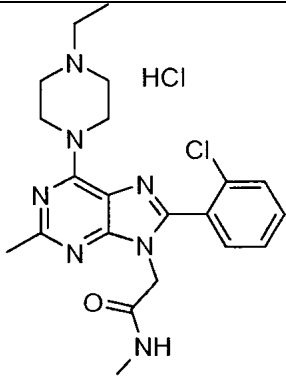
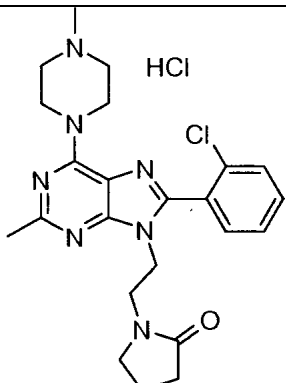
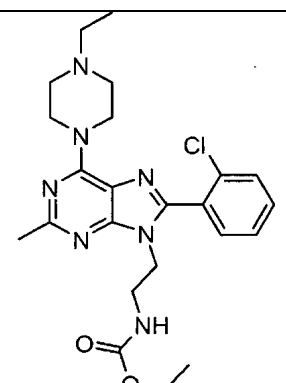
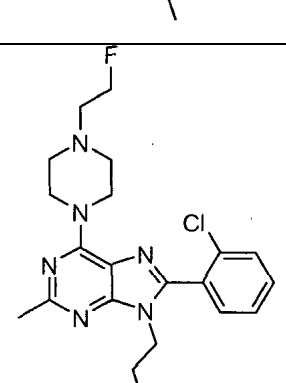
ES/MS m/z 449 (M+1).

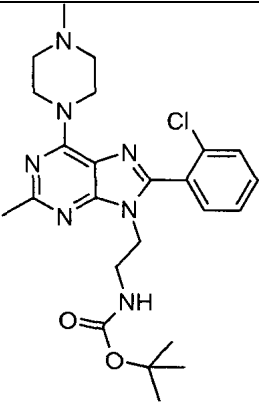
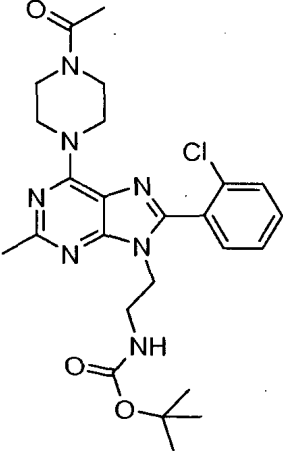
Se añade HCl (solución 2,0M en éter) (0,018 g, 0,0005 mol, 1,0 eq) a una solución de 8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-9-(2-(metilsulfonil)etil)-9H-purina (0,24 g, 0,0005 mol) en éter (4 ml) a 0 °C y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se filtra el precipitado, y se lava con éter y se seca a vacío para proporcionar el compuesto del título (0,15 g) en forma de un sólido blanco. ES/MS m/z 449 (M+1).

Se preparan las fenil piperazinilpurinas de la tabla que sigue a continuación siguiendo esencialmente el procedimiento tal y como se describe en el Ejemplo 1, usando la 6-cloropurina sustituida y la piperazina con las sustituciones adecuadas.

| Ej. o Prep. | Nombre químico                                                                                 | Estructura                                                                           | ES/MS m/z |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ej. 2       | Clorhidrato de 8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-9-(2-metilsulfoniletil)purina |   | 463 (M+1) |
| Ej. 3       | Clorhidrato de 2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]acetonitrilo    |  | 382 (M+1) |
| Ej. 4       | Clorhidrato de 3-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]propanonitrilo  |  | 396 (M+1) |

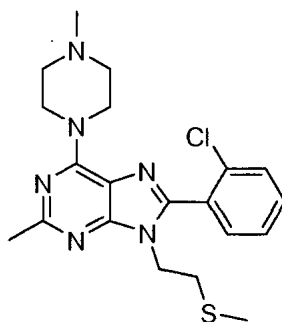
|       |                                                                                                        |                                                                                      |           |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ej. 5 | Clorhidrato de 2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-9-(2-metilsulfoniletil)-8-(o-tolil)purina             |    | 429 (M+1) |
| Ej. 6 | Clorhidrato de N-[2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etil]acetamida       |   | 428 (M+1) |
| Ej. 7 | Clorhidrato de N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-purin-9-il]etil]acetamida       |  | 442 (M+1) |
| Ej. 8 | Clorhidrato de 1-[4-[8-(2-clorofenil)-2-metil-9-(2-metilsulfoniletil)purin-6-il]piperazin-1-il]etanona |  | 477 (M+1) |

|                 |                                                                                                            |                                                                                      |           |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Ej. 9</b>    | Clorhidrato de 2-[8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-purin-9-il]-N-metilacetamida           |    | 428 (M+1) |
| <b>Ej. 10</b>   | Clorhidrato de 1-[2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etil]pirrolidin-2-ona    |   | 454 (M+1) |
| <b>Prep. 20</b> | N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo           |  | 500 (M+1) |
| <b>Prep. 21</b> | N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-[4-(2-fluoroetil)piperazin-1-il]-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo |  | 518 (M+1) |

|                 |                                                                                                    |                                                                                     |           |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Prep. 22</b> | N-[2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo   |   | 486 (M+1) |
| <b>Prep. 23</b> | N-[2-[6-(4-acetilpiperazin-1-il)-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo |  | 514 (M+1) |

**Preparación 24**

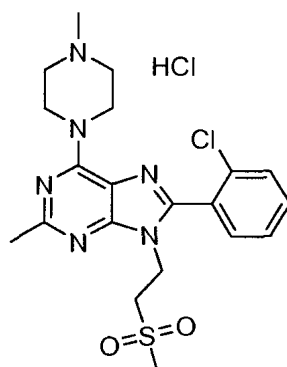
8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-9-(2-metilsulfaniletíl)purina



- 5 Se disuelve 6-cloro-2-metil-N4-(2-(metiltio)etil)pirimidina-4,5-diamina (28,1 g, 120,7 mmol), y N-metil piperazina (14,76 ml, 132,81 mmol) en metoxibenceno en un matraz de fondo redondo de 2 l. Se añade 2-clorobenzaldehído (20,38 ml, 181,1 mmol) en una porción y se eleva la temperatura a 140 °C y se mantiene a esa temperatura durante 4 días. Se enfría la mezcla de reacción y se concentra a presión reducida. Se diluye el aceite resultante con cloruro de hidrógeno 2N acuoso (200 ml) y se lava con diclorometano (500 ml). Se desecha la capa orgánica. Se trata la
- 10 capa acuosa con una solución de hidróxido de sodio hasta que se alcanza pH = 14. Se extrae en diclorometano. Los extractos orgánicos se secan sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran, y se concentran para dar el compuesto del título en forma de un aceite marrón (43 g). ES/MS m/z 417 (M+1).

**Ejemplo 11**

Clorhidrato de 8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-9-(2-metilsulfoniletíl)purina

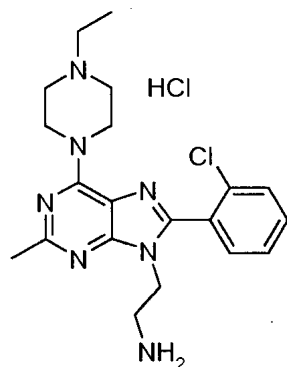


Se disuelve 8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-9-(2-metilsulfaniletil)purina (38,5 g, 92,3 mmol) en una solución de tetrahidrofurano (277 ml) y metanol (277 ml). Se preparó una solución de peroximonosulfato de potasio (Oxone®) (79,5 g, 129,3 mmol) en agua (554 ml). Se añade la solución de peroximonosulfato de potasio (300 ml) durante un periodo de 5 min y se agita durante 30 min. A continuación se añade solución de peroximonosulfato de potasio adicional (150 ml, seguido de 50 ml tras 30 min). Se agita la mezcla de reacción durante 30 min tras la adición final. Se añade metabisulfito de sodio sólido (49,1 g, 258,5 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se añade solución acuosa de bicarbonato de sodio (400 ml) y se extrae en acetato de etilo (3 x 1 l). Se secan las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran, y se concentran para proporcionar un residuo naranja. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice usando un 5-50 % de etanol en 1:1 diclorometano-hexano como eluyente. Se combinan y se evaporan las fracciones apropiadas para proporcionar un sólido. Se tritura el sólido con éter y se seca a vacío para proporcionar la 8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-9-(2-metilsulfoniletil)purina (11,4 g). ES/MS m/z 449 (M+1).

Se suspende 8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-9-(2-metilsulfoniletil)purina (11,3 g, 25,2 mmol) en etanol (150 ml) y se añade solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1N (6,29 ml, 25,2 mmol, 1 eq). La mezcla se deja en agitación durante la noche y se concentra a presión reducida. Se recogen los sólidos precipitados mediante filtración, se lavan con acetona, y se secan a vacío para proporcionar el compuesto del título (10,6 g). ES/MS m/z 449 (M+1).

### Ejemplo 12

Clorhidrato de 2-[8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-purin-9-il]etanamina



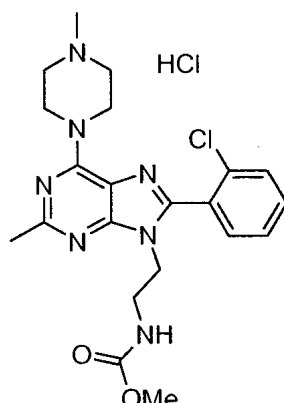
Se añade ácido trifluoroacético (3 ml) a una solución de N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo (0,6 g, 1,2 mmol) en diclorometano (3 ml) a 0 °C y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se desactiva la mezcla de reacción con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, y se extrae con diclorometano. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra para dar un residuo. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice usando diclorometano-metanol (96:4) como eluyente para dar 2-[8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-purin-9-il]etanamina (0,3 g). ES/MS m/z 400 (M+1).

Se añade HCl (solución 2,0M en éter) (0,027 g, 0,7 mmol) a una mezcla de 2-[8-(2-clorofenil)-6-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-purin-9-il]etanamina (0,3 g, 0,7 mmol) en éter (5 ml) a 0 °C y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se recoge el precipitado mediante filtración y se lava con éter. Se seca a vacío para dar el compuesto del título (0,25 g) en forma de un sólido blanco.

ES/MS m/z 400 (M+1).

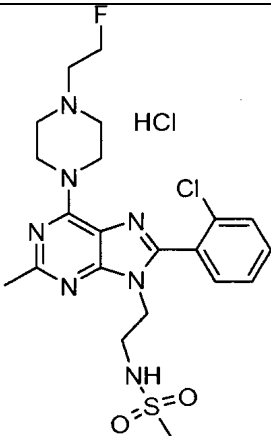
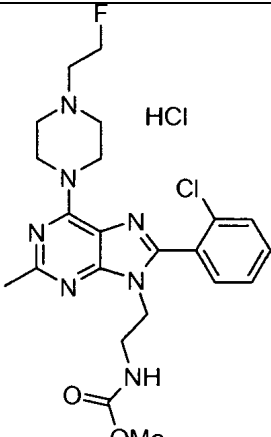
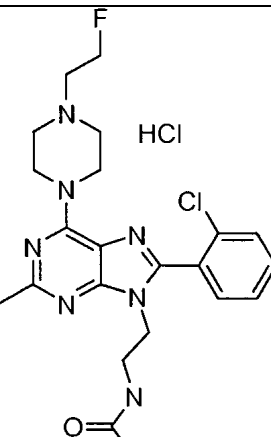
### Ejemplo 13

Clorhidrato de N-[2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etil]carbamato de metilo



- 5 Se añade ácido trifluoroacético (5 ml) a una solución de N-[2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo (0,51 g, 0,001 mol) en diclorometano (5 ml) a 0 °C. Se deja calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 h. Se desactiva la mezcla de reacción con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrae después con diclorometano. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra para dar 2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etanamina (0,39 g). ES/MS m/z 386 (M+1).
- 10 Se añade cloroformiato de metilo (0,25 g, 0,0027 mol) a una solución de 2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etanamina (0,39 g, 0,0010 mol) y piridina (4,0 ml) en diclorometano seco (4 ml) a 0 °C. Se deja que se caliente hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. Se desactiva la mezcla de reacción con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrae después con diclorometano. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, y se concentra para dar un residuo. Se purifica el residuo en una columna de gel de sílice usando diclorometano:metanol (97:3) como eluyente para proporcionar N-[2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etil]carbamato de metilo (0,3 g). ES/MS m/z 444 (M+1).
- 15 Se añade HCl (solución 2,0M en éter) (0,024 g, 0,0006 mol) a una solución de N-[2-[8-(2-clorofenil)-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)purin-9-il]etil]carbamato de metilo (0,3 g, 0,0006 mol) en éter (6 ml) a 0 °C y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se filtra el precipitado, se lava con éter, y se seca a vacío para proporcionar el compuesto del título (0,28 g) en forma de un sólido blanco. ES/MS m/z 444 (M+1).
- 20 Se preparan los Ejemplos de la tabla que sigue a continuación siguiendo esencialmente el procedimientos tal y como se describe en el Ejemplo 13, partiendo de N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-[4-(2-fluoroetil)piperazin-1-il]-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo o N-[2-[6-(4-acetilpiperazin-1-il)-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de terc-butilo. Se desprotege y se hace reaccionar con cloroformiato de metilo, cloruro de metanosulfonilo, o anhídrido acético.

| Ej.    | Nombre químico                                                                                               | Estructura | ES/MS m/z |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|
| Ej. 14 | Clorhidrato de N-[2-[6-(4-acetilpiperazin-1-il)-8-(2-clorofenil)-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de metilo |            | 472 (M+1) |

|        |                                                                                                                      |                                                                                      |           |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ej. 15 | Clorhidrato de N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-[4-(2-fluoroetil)piperazin-1-il]-2-metil-purin-9-il]etil]metanosulfonamida   |    | 496 (M+1) |
| Ej. 16 | Clorhidrato de N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-[4-(2-fluoroetil)piperazin-1-il]-2-metil-purin-9-il]etil]carbamato de metilo |   | 476 (M+1) |
| Ej. 17 | Clorhidrato de N-[2-[8-(2-clorofenil)-6-[4-(2-fluoroetil)piperazin-1-il]-2-metil-purin-9-il]etil]acetamida           |  | 460 (M+1) |

### Ensayos funcionales *in vitro* de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>

Los compuestos ilustrados se ensayan en modo agonista usando un ensayo de unión a GTP-γ-<sup>35</sup>S basado en SPA (ensayo de proximidad de centelleo). Todos los componentes del ensayo se preparan en tampón de ensayo constituido por HEPES 20mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, (pH 7,4 a temperatura ambiente). Se efectúan diluciones semilogarítmicas del compuesto en tampón de ensayo que contiene BSA (final 0,125%). La unión a GTP-γ-<sup>35</sup>S se mide en un formato de 96 pocillos usando una técnica de captura de membrana completa para el ensayo de CB<sub>1</sub> y modificaciones de una técnica de captura de anticuerpos previamente descrita (DeLapp et al. *J Pharmacol Exp Ther* 289:946-955, 1999) para el ensayo de CB<sub>2</sub>. Todas las incubaciones se efectúan a temperatura ambiente.

#### CB<sub>1</sub>:

Se añaden membranas hCB<sub>1</sub>-CHO, GDP (1μM final), y saponina (10 ug/ml final) a tampón de ensayo y se homogeneizan. Se añaden los compuestos diluidos, el GTP-γ-<sup>35</sup>S (500nM final) y las membranas a la placa de

ensayo y se incuban durante 30 minutos. Se añade después 1mg/pocillo de perlas de SPA recubiertas de aglutinina de trigo, y las placas se sellan, se agitan en vórtex, y se incuban durante una hora más. A continuación las placas se centrifugan a 700 x g durante 10 minutos y se cuentan durante 1 minuto por pocillo usando un contador de centelleo.

#### CB<sub>2</sub>-Sf9:

- 5 Se añaden membranas hCB<sub>2</sub>-Sf9 y GDP (1uM final) a tampón de ensayo y se homogeneizan. Los compuestos diluidos y las membranas se añaden a la placa de ensayo y se preincuban durante 15 minutos. A esto le sigue la adición de GTP-γ<sup>35</sup>S (500nM final) y otros 35 minutos de incubación. A continuación se añaden una mezcla que contiene detergente Nonidet P40 (0,2% final), anticuerpos anti-Gi (dilución final de 1:362), y 1,25 mg de perlas de ensayo de proximidad de centelleo recubiertas de anticuerpos anti-conejo. A continuación las placas se sellan, se agitan en vórtex, y se incuban durante 2 horas adicionales antes de ser centrifugadas y contadas al igual que para CB<sub>1</sub>.

- 10 Con el fin de analizar los datos, se resta en primer lugar la señal de fondo de todos los pocillos. Se determina el porcentaje de eficacia agonista normalizando los datos de respuesta a la dosis de agonista/agonista inverso con respecto a la respuesta obtenida para un agonista completo (metanandamida). Los datos se analizan usando un ajuste logístico reducido de 4 parámetros con Activity BaseTM y XLFit3TM.

- 15 Todos los compuestos ilustrados se ensayaron esencialmente tal y como se describe anteriormente y se encontró que cada uno tenía un valor EC<sub>50</sub> relativo para el CB<sub>2</sub> ≤ 100nM. El ejemplo 2 tiene un valor EC<sub>50</sub> relativo para el CB<sub>2</sub> de 17,2nM y para el CB<sub>1</sub> de 5560nM. El ejemplo 16 tiene un valor EC<sub>50</sub> relativo para el CB<sub>2</sub> de 13,5nM y para el CB<sub>1</sub> de > 100000nM.

- 20 Así pues, los compuestos de la presente invención muestran actividad CB<sub>2</sub> *in vitro*. Asimismo, los compuestos de la presente invención presentan selectividad por el CB<sub>2</sub> sobre el CB<sub>1</sub> y, por tanto, proporcionan un potencial limitado en cuanto a los efectos secundarios mediados centralmente.

#### Desplazamiento de 3H-CP55940 a partir de receptores CB<sub>2</sub> humanos y de rata

- 25 Se utilizaron los métodos de Felder et al. (*Mol. Pharmacol.* 48:443-450, 1995) con modificaciones menores. Específicamente, se lavaron mediante centrifugación homogeneados de membranas de células que expresan de modo estable o temporal el receptor CB<sub>2</sub> humano o de rata y se diluyeron en un tampón de Tris HCl 50mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 5mM, EDTA 2,5mM, y BSA al 0,1%. Se definió la unión específica de 3H-CP55940 con CP55940 1μM. Se ensayó la capacidad de los compuestos para desplazar la unión específica de 3H-CP55940 en un intervalo de concentraciones en el tampón Tris, MgCl<sub>2</sub>, EDTA, BSA en presencia de dimetilsulfóxido al 1% incubando a temperatura ambiente durante 90 minutos en un volumen de 300 μl. Las microplacas de 96 pocillos Unifilter se pretrataron con polivinilpirrolidona al 0,5%, polisorbato 20 al 0,1% en agua, se lavaron tres veces con tampón Tris frío. La mezcla de reacción se transfirió entonces a la placa de filtración inmediatamente antes de terminar la incubación mediante filtración rápida y tres lavados de 200 μl con tampón Tris frío. Tras el secado de las placas de filtración, se añadió a cada pocillo MicroScint 20, la placa se selló y se contó para determinar las desintegraciones por minuto. Se representaron las curvas de desplazamiento y los valores de Ki resultantes se determinaron utilizando Graphpad Prism.

- 35 El ejemplo 3 presenta un valor Ki del receptor humano de 27,8nM y un valor Ki del receptor de rata de 12,6nM. El ejemplo 2 presenta un valor Ki del receptor humano de 28,4nM y un valor Ki del receptor de rata de 48,7nM.

- 40 Así pues, se ha demostrado que los compuestos de la presente invención se unen a receptores CB<sub>2</sub> tanto humanos como de rata *in vitro*.

#### Modelo de monoyodoacetato (MIA)

- 45 Para todos los estudios se usaron ratas Lewis macho de aproximadamente 8 semanas de edad en el momento de la inyección de MIA para medir el dolor en el modelo MIA. Las ratas se alojan en grupos de 2 o 3 por jaula y se mantienen a una temperatura constante y en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Los animales tienen libre acceso a la comida y al agua todo el tiempo excepto durante la recogida de datos.

- 50 En el modelo MIA estándar, la rodilla derecha de cada rata se inyecta con 0,3 mg de MIA en 50 ul de solución salina y la rodilla izquierda con 50 ul de solución salina. El dolor se mide a distintos tiempos tras la inyección con MIA (normalmente no antes del día 10 tras la inyección con MIA) usando una prueba de incapacidad. Esta mide la diferencia del peso apoyado en la pata trasera entre la rodilla inyectada con MIA y la inyectada con solución salina, y cada medición es el promedio de 3 mediciones separadas, cada una medida durante 1 segundo.

- 55 Para los estudios con agonistas de CB<sub>2</sub> las ratas se dividen aleatoriamente en grupos de dosis (n = 5 o 6) y se dosifican después una vez con el compuesto a investigar. La dosificación se escalona en 15 minutos para cada rata y, a un tiempo post-dosis determinado (normalmente 2 horas), se mide el dolor usando pruebas de incapacidad. Los estudios se efectúan rutinariamente con 4 grupos: vehículo (carboximetilcelulosa al 1% en agua más polisorbato 80 al 0,25%) y 3 grupos de compuestos que pueden ser bien cada uno de los compuestos a una dosis única o bien el

mismo compuesto a 3 dosis. Se dan los resultados como la diferencia del peso apoyado entre la rodilla inyectada con MIA y la inyectada con solución salina y se hacen comparaciones estadísticas entre los animales tratados con vehículo y los tratados con el compuesto para determinar el efecto de los compuestos sobre el dolor de rodilla en el modelo.

- 5 El ejemplo 1 se ensayó esencialmente tal y como se describe anteriormente y se encontró que reducía el dolor frente al vehículo a dosis de 0,3 y 1 mg/kg. El ejemplo 17 se ensayó esencialmente tal y como se describe anteriormente y se encontró que reducía el dolor frente al vehículo a dosis de 0,1, 0,3 y 1 mg/kg.

Por tanto, se ha mostrado que los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento del dolor, en particular del dolor de las articulaciones.

#### 10 **Modelo animal de extravasación de proteína del plasma dural (PPE)**

Se anestesiaron ratas Harlan Sprague-Dawley macho (250-350 g) con pentobarbital de sodio (65 mg/kg, i.p.) y se colocaron en un bastidor estereotáxico (David Kopf Instruments) con la barra de incisión colocada a -2,5 mm. Siguiendo la incisión en la línea media sagital del cuero cabelludo, se taladran dos pares de agujeros bilaterales a través del cráneo (3,2 mm posteriormente, 1,8 y 3,8 mm lateralmente, todas las coordenadas con referencia al bregma). Se introducen pares de electrodos estimulantes de acero inoxidable, aislados excepto en las puntas (Rhodes Medical Systems, Inc.), a través de los agujeros en ambos hemisferios a una profundidad de 9,2 mm.

- 15 Se expone la vena femoral y se inyecta intravenosamente (i.v.) una dosis del compuesto de ensayo a un volumen de dosificación de 1 ml/kg. Aproximadamente 8 minutos después de la inyección i.v., se inyecta una dosis de 20 mg/kg de isotiocianato de fluoresceína - albúmina de suero bovino (FITC-BSA) también intravenosamente. El FITC-BSA funciona como marcador para la extravasación de proteína. 10 minutos después de la inyección del compuesto de ensayo, el ganglio trigémino izquierdo se estimula durante 5 minutos a una intensidad de corriente de 1,0 mA (5 Hz, 5 ms de duración) con un estimulador modelo S48 de Grass Instrument con unidad de aislamiento fotoeléctrico PSIU6 (Grass-Telefactor).

- 25 De modo alternativo, se dosifican oralmente ratas mantenidas en ayunas durante la noche con el compuesto de ensayo mediante sonda gástrica a un volumen de 2 ml/kg. Aproximadamente 50 minutos después los animales se anestesian y se colocan en el bastidor estereotáxico tal y como se ha descrito anteriormente. 60 minutos después de la dosificación p.o., los animales se dosifican con FITC-BSA (20 mg/kg, i.v.). Una hora después de la dosificación p.o., los animales se estimulan tal y como se ha descrito anteriormente.

- 30 Cinco minutos después de la estimulación, se sacrifican los animales mediante exsanguinación con 40 ml de solución salina. Se retira la parte superior del cráneo para facilitar la recogida de las membranas dures. Las muestras de membrana se retiran de ambos hemisferios, se aclaran con agua, y se extienden de un modo liso en las platinas del microscopio. Una vez secados, los tejidos se cubren con una solución de glicerol/agua al 70%.

- 35 Se usa un microscopio de fluorescencia (Zeiss) equipado con un monocromador de rejilla y un espectrofotómetro para cuantificar la cantidad de FITC-BSA en cada muestra. Se utiliza una longitud de onda de excitación de aproximadamente 490 nm y se determina la intensidad de emisión a 535 nm. El microscopio está equipado con una fase motorizada interconectada con un ordenador personal. Esto facilita el movimiento controlado del ordenador del montaje con las medidas de fluorescencia en 25 puntos (etapas de 500 nm) en cada muestra dural. La media y la desviación estándar de las mediciones se determina mediante el ordenador.

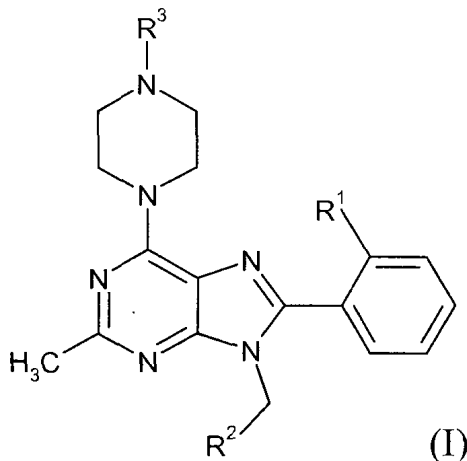
- 40 La extravasación inducida por la estimulación eléctrica del ganglio trigémino es un efecto ipsilateral (es decir sucede solamente en el lado de la dura en el que se estimuló el ganglio trigémino). Esto permite el uso de la otra mitad (no estimulada) de la dura como un control. Se calcula la proporción de la cantidad de extravasación en la dura del lado estimulado con respecto a la cantidad de extravasación en el lado no estimulado. Los animales de control dosificados sólo con solución salina, dieron una proporción de aproximadamente 2,0. Por el contrario, un compuesto que prevenía eficazmente la extravasación en la dura desde el lado estimulado dio una proporción de 1,0 aproximadamente.

El ejemplo 1 se ensayó esencialmente tal y como se describe anteriormente y se encontró que tenía una proporción de extravasación de 1,12 a 10 mg/kg, 2 horas después de la dosificación p.o. El ejemplo 7 se ensayó esencialmente tal y como se describe anteriormente y se encontró que tenía una proporción de extravasación de 1,18 a 10 mg/kg, 2 horas después de la dosificación p.o.

- 50 Se ha mostrado, por tanto, que los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento del dolor, en particular de la migraña.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



en la que

$R^1$  es Cl o  $CH_3$ ;

$R^2$  es  $C\equiv N$ ,  $-CH_2SO_2CH_3$ ,  $-CONHCH_3$ ,  $-CH_2NR^4R^5$ , o  $-CH_2C\equiv N$ ;

$R^3$  es alquilo  $C_1-C_2$ , fluoroalquilo  $C_1-C_2$  o  $C(O)CH_3$ ;

$R^4$  es H,  $C(O)CH_3$ ,  $CO_2CH_3$  o  $SO_2CH_3$ ; y

$R^5$  es H o se combina con  $R^4$  para formar pirrolidin-2-ona;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^1$  es Cl.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^2$  es  $-CH_2SO_2CH_3$ ,  $-CH_2NR^4R^5$ , o  $-CH_2C\equiv N$ .

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^2$  es  $-CH_2SO_2CH_3$ .

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^3$  es metilo, 2-fluoroetilo o  $C(O)CH_3$ .

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^3$  es metilo.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^5$  es H y  $R^4$  es  $C(O)CH_3$  o  $CO_2CH_3$ .

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es la 8-(2-clorofenil)-6-(4-metilpiperazin-1-il)-2-metil-9-(2-metilsulfoniletil)purina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del dolor.

12. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el tratamiento del dolor osteoartítico o de la migraña.