

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 242**

51 Int. Cl.:

C07D 405/12	(2006.01) A61P 19/10	(2006.01)
A61K 31/496	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
A61P 25/16	(2006.01) A61P 15/00	(2006.01)
A61P 25/22	(2006.01) A61P 3/00	(2006.01)
A61P 25/24	(2006.01) A61P 3/10	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)	
A61P 25/30	(2006.01)	
A61P 29/00	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 37/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2011 E 11719136 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2566861**

54 Título: **Moduladores de hidrolasa amida de ácido graso**

30 Prioridad:

03.05.2010 US 330522 P

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

06.08.2014

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V. (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**KEITH, JOHN, M. y
LIU, JING**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 483 242 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

Moduladores de hidrolasa amida de ácido graso

5 Referencia cruzada con solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con número de serie 61/330.522, presentada el 3 de mayo, 2010.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere al compuesto 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto, métodos de sintetizar el compuesto y uso del compuesto para el tratamiento de estados enfermos, trastornos y condiciones medidas por la actividad de hidrolasa amida de ácido graso (HAAG).

Antecedentes de la invención

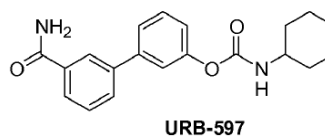
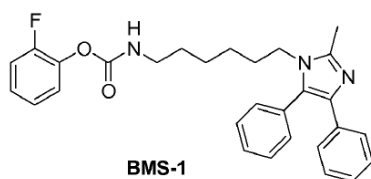
Durante siglos se han atribuido beneficios medicinales a la planta de cannabis. El principal constituyente activo de cannabis es Δ^9 -tetrahydro-cannabinol (THC). El descubrimiento de THC finalmente llevó a la identificación de dos receptores cannabinoides endógenos responsables de sus acciones farmacológicas, esto es CB₁ y CB₂ (Goya et al., Exp. Opin. Ther. Patents, 2000, 10, 1529). Estos descubrimientos no solamente establecieron el sitio de acción de THC, sino que también inspiraron investigaciones sobre los agonistas endógenos de estos receptores, o "endocannabinoides". El primer endocannabinoide identificado fue amida araquinodil etanolamina o anandamida (AEA). AEA por sí mismo provoca muchos de los efectos farmacológicos de cannabinoides exógenos (Piomelli et al., Nat. Rev. Neurosci., 2003, 4(11), 873).

El catabolismo de AEA se atribuye principalmente a la hidrolasa amida de ácidos grasos (HAAG) unida a la membrana integral, que hidroliza AEA a ácido araquidónico y etanolamina. HAAG se caracterizó en 1996 por Cravatt y compañeros (Cravatt et al., Nature, 1996, 384, 83). Posteriormente se determinó que HAAG es además responsable del catabolismo de un gran número de amidas de ácido graso que señalizan lípidos, incluyendo: otro principal endocannabinoide, 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Devane et al., Science, 1992, 258, 1946-1949); la sustancia que induce el sueño, oleamida (Cravatt et al., Science, 1995, 268, 1506); el agente supresor de apetito, N-oleoiletanolamida (OEA) (Rodríguez de Fonesca, Nature, 2001, 414, 209); y el agente antiinflamatorio, palmitoiletanolamida (PEA) (Lambert et al., Curr. Med. Chem. 2002, 9(6), 663).

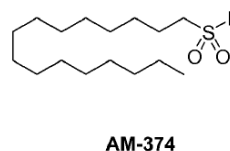
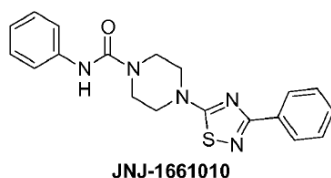
Los inhibidores de molécula pequeña de HAAG deberían elevar las concentraciones de estos endógenos que señalizan lípidos y de este modo producir sus efectos farmacológicos beneficiosos asociados. Ha habido algunos informes de los efectos de varios inhibidores de HAAG en modelos pre-clínicos.

En particular, dos inhibidores con base de carbamato de HAAG presentaron tener propiedades analgésicas en modelos animales. En ratas, BMS-1 (véase WO 02/087569), que tiene la estructura mostrada más abajo, presentó tener un efecto analgésico en el modelo de ligadura de nervio espinal (Chung) de dolor neuropático, y el test de Hargreaves de nocicepción termal severa. URB-597 presentó tener eficacia en el modelo de ansiedad de laberinto cero elevado en ratas, así como eficacia analgésica en el test de placa caliente en ratas y tests de formalina (Kathuria et al., Nat. Med., 2003, 9(1), 76). La urea, 4-(3-Fenil-[1,2,4]tiadiazol-5-il)-piperazina-1-ácido carboxílico fenilamida, resultó ser eficaz en el modelo de ligadura de nervio espinal (Chung) de dolor neuropático y en el modelo de lesión termal leve de dolor de lesión de quemadura severa (Karbarz et al., Anesth Analg., 2009, 108(1), 316-329). SE han presentado otros inhibidores potentes de urea de la enzima HAAG (WO 06/074025). El sulfonilfluoruro AM374 también demostró reducir de manera significativa la espasticidad en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental de recaída crónica (EAERC), un modelo animal de esclerosis múltiple (Baker et al., FASEB J. 2001, 15(2), 300).

55



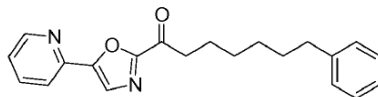
60



65

Además, la cetona de oxazolopiridina OL135 presentó ser un inhibidor potente de HAAG con actividad analgésica en los test de placa caliente e inmersión de cola de nocicepción termal en ratas (WO 04/033652).

5



OL-135

10

15

Los resultados de la investigación sobre los efectos de ciertos cannabinoides exógenos han elucidado que un inhibidor de HAAG puede ser útil en el tratamiento de varias condiciones, enfermedades, trastornos o síntomas. Estos incluyen dolor, náusea/emesis, anorexia, espasticidad, trastornos del movimiento, epilepsia y glaucoma. Hasta la fecha, los usos terapéuticos aprobados para cannabinoides incluyen el alivio de náuseas y emesis inducidas por la quimioterapia entre pacientes con cáncer y mejora del apetito en paciente con VIH/SIDA que experimentan anorexia como resultado del síndrome del desgaste. En algunos países hay disponibles en el mercado dos productos para estas indicaciones, esto es, dronabinol (Marinol[®]) y nabilona.

20

25

Aparte de las indicaciones aprobadas, un campo terapéutico que ha recibido mucha atención para el uso de cannabinoides es la analgesia, esto es, el tratamiento de dolor. Cinco ensayos pequeños controlados aleatorios mostraron que THC es superior a placebo, produciendo analgesia relacionada con las dosis (Robson et al., Br. J. Psychiatry, 2001, 178, 107-115). Se informa que Atlantic Pharmaceuticals está desarrollando un cannabinoide sintético, CT-3, un derivado de 1,1-dimetil heptilo del metabolito carboxílico de tetrahidrocannabinol, como un analgésico oralmente activo y agente antiinflamatorio. Un ensayo piloto en fase II en dolor neuropático crónico con CT-3 se inició supuestamente en Alemania en mayo de 2002.

30

35

Un número de individuos con enfermedades relacionadas con la actividad locomotora, tales como esclerosis múltiple, han asegurado un beneficio por parte de cannabis para dolor relacionado con la enfermedad y espasticidad, con la ayuda de ensayos pequeños controlados (Croxford et al., J. Neuroimmunol, 2008, 193, 120-9; Svendsen, Br. Med. J., 2004, 329, 253). De la misma manera, varias víctimas de lesiones en la médula espinal, tales como paraplejia, han presentado que sus espasmos dolorosos se han aliviado después de fumar marihuana. Un informe que muestra que los cannabinoides parecen controlar la espasticidad y temblor en el modelo de EAERC de esclerosis múltiple demostró que estos efectos están mediados por los receptores CB₁ y CB₂ (Baker, Nature, 2000, 404, 84-87). Se han emprendido ensayos clínicos en fase 3 en paciente con esclerosis múltiple y lesión en médula espinal con una estrecha mezcla proporcional de tetrahidrocannabinol/cannabidiol (THC/CBD). Se ha informado de que los ratone con gen eliminado de HAAG se recuperan consistentemente a un mejor resultado clínico que los controles de tipo salvaje, y esta mejora no es el resultado de una actividad antiinflamatoria, sino más bien un reflejo de algún efecto promotor de neuroprotección o remielinación de falta de la enzima (Webb et al., Neurosci Lett., 2008, 106-110).

40

45

Se han hecho informes de ensayos pequeños controlados para investigar los potenciales usos comerciales de cannabinoides. Se han presentado ensayos en voluntarios que han confirmado que los cannabinoides orales, inyectados o fumados producen reducciones relacionadas con la dosis en presión intraocular (PIO) y por lo tanto pueden aliviar los síntomas de glaucoma. Los oftalmólogos han prescrito cannabis a pacientes con glaucoma a los que otros fármacos no han funcionado para controlar de manera adecuada la presión intraocular (Robson et al., 2001, supra).

50

55

60

La inhibición de HAAG usando inhibidores de molécula pequeña puede ser ventajosa en comparación con el tratamiento con agonistas CB₁ de acción directa. La administración de agonistas CB₁ exógenos puede producir una variedad de respuesta, incluyendo una reducida nocicepción, catalepsia, hipotermia y un comportamiento con mayor ingesta de alimentos. Estos cuatro en particular se denominan la "tétrada cannabinoide". Los experimentos con ratones HAAG^{+/-} muestran respuestas reducidas en tests de nocicepción, pero no mostraron catalepsia, hipotermia o un comportamiento con mayor ingesta de alimentos (Cravatt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(16), 9371). El ayuno provocó que los niveles de AEA aumentaron en el lóbulo frontal límbico de ratas, pero no en otras áreas del cerebro, proporcionando evidencia de que la estimulación de biosíntesis de AEA puede regionalizarse anatómicamente a vías dirigidas del SNC (Kirkham et al., Br. J. Pharmacol., 2002, 136, 550). El descubrimiento de que los incrementos de AEA se localizan en el cerebro, más que sistémico, sugiere que la inhibición de HAAG con una molécula pequeña podría mejorar las acciones de AEA y otras amidas de ácido graso en regiones del tejido donde la síntesis y liberación de estas moléculas señalizadoras ocurren en una condición patofisiológica dada (Piomelli et al., 2003, supra).

65

Además de los efectos de un inhibidor HAAG en AEA y otros endocannabinoides, pueden usarse inhibidores de catabolismo de HAAG y otros mediadores lípidos en el tratamiento de ciertas indicaciones terapéuticas. Por ejemplo, PEA ha demostrado efectos biológicos en modelos animales de inflamación (Holt et al., Br. J. Pharmacol., 2005, 146, 467-476), inmunosupresión, analgesia y neuroprotección (Ueda et al., J. Biol. Chem., 2001, 276(38), 35552). Oleamida, otro sustrato de HAAG, induce sueño (Boger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

2000, 97(10), 5044; Mendelson et al., *Neuropsychopharmacology*, 2001, 25, S36). La inhibición de HAAG también se ha implicado en la cognición (Varvel et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, 317(1), 251-257) y depresión (Gobbi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(51), 18620-18625).

5 Dos indicaciones adicionales de HAAG se apoyan en datos recientes que indican que los receptores activados por el sustrato de HAAG son importantes en el metabolismo de energía, y en homeostasis ósea (Overton et al., *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 143 Supl 1, S76-81; y Plutzky et al., *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 2007, 4 Supl 3, S12-4). Se ha demostrado que uno de las amidas de ácido graso señalizadoras de lípido previamente mencionadas catabolizada por FAAH, OEA, es uno de los agonistas más activos de GPCR 119 recientemente "deorfanizado" (GPR119) (también llamado receptor insulínico dependiente de glucosa). Este receptor se expresa predominantemente en el páncreas de humanos y la activación mejora la homeostasis de glucosa por medio de liberación de insulina dependiente de glucosa en células pancreáticas beta. Los agonistas de GPR119 pueden suprimir las salidas de glucosa cuando se administra durante tests de tolerancia a glucosa oral, y OEA también ha demostrado independientemente regular la ingesta de comida y el aumento de peso corporal cuando se administra a roedores, lo que indica un beneficio probable en los trastornos de metabolismo de energía, tales como resistencia a la insulina y diabetes. El sustrato PEA de HAAG es un agonista en el receptor PPAR α . La evidencia de marcadores sustitutos en estudios con humanos con fenofibrato de agonista PPAR α es de apoyo al concepto de que el agonismo de PPAR α ofrece el potencial para inducir una respuesta coordinada de PPAR α que puede mejorar la dislipidemia, reprimir inflamación y limitar la aterosclerosis en pacientes con el síndrome metabólico o diabetes tipo 2. Anandamida es un agonista en el receptor PPAR α . El tratamiento con anandamida induce la diferenciación de 3T3-L1 en adipocitos, así como la acumulación de gotas de triglicérido y la expresión de adiponectina (Bouaboula et al., *E. J. Pharmacol.*, 2005, 517, 174-181). La terapia con dosis baja de cannabinoide ha demostrado reducir aterosclerosis en ratones, además de sugerir un beneficio terapéutico de inhibición de HAAG en dislipidemia, esteatosis hepática, esteatohepatitis, obesidad y síndrome metabólico (Steffens et al., *Nature*, 2005, 434, 782-6).

25 La osteoporosis es una de las enfermedades degenerativas más comunes. Se caracteriza por una reducida densidad mineral ósea (DMO) con un mayor riesgo de fracturas óseas. Los ratones deficientes de CB₂ tienen una pérdida ósea trabecular y expansión cortical marcadamente aceleradas relacionada con la edad. Un agonista selectivo de CB₂ mejora el número y actividad de osteoblastos endocorticales e impide la osteoclastogénesis trabecular y atenúa la pérdida ósea inducida por la ovariectomía (Ofek et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, 103, 696-701). Hay una sustancial contribución genética a DMO, aunque los factores genéticos implicados en la patogénesis de osteoporosis humana son en gran parte desconocidos. La aplicabilidad a DMO humano la sugieren estudios genéticos en los que se descubrió que una asociación significativa de polimorfismos y haplotipos sencillos que abarcan el gen CNR2 en el cromosoma humano 1p36, lo que demuestra un papel para el receptor CB₂ periféricamente expresado en la etiología de osteoporosis (Karsak et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2005, 14, 3389-96).

40 De este modo, los inhibidores de HAAG de molécula pequeña deberían ser útiles en el tratamiento de dolor de varias etiologías, ansiedad, esclerosis múltiple y otros trastornos del movimiento, náuseas/emesis, trastornos alimenticios, epilepsia, glaucoma, inflamación, inmunosupresión, neuroprotección, depresión, mejora de la cognición y trastornos del sueño, y potencialmente con menores efectos secundarios que el tratamiento con un cannabinoide exógeno.

45 Se ha presentado un número de ureas sustituidas por heteroarilo en varias publicaciones. Ciertos compuestos de piperazinil y piperidinil como moduladores de HAAG se han descrito en la solicitud de patente internacional n° WO 2006/074025, solicitud de patente internacional con n° de serie PCT/US2009/065757, solicitud de patente internacional con n° de serie PCT/US2009/065752, solicitud de publicación de Estados Unidos N° US 2009/0062294, y solicitud provisional de Estados Unidos con n° de serie 61/263.477. Ciertos derivados de piperazina-1-carboxamida y piperidina-1-carboxamida se describen en la solicitud de patente internacional n° WO 2008/023720. Ciertas ariloxobutilpiperidinas, ariloxobutilpirrolidinas y ariloxobutilpiperazinas se describen en la solicitud de patente internacional n° WO 2001/005763. Ciertos derivados de piperidina se presentan en la solicitud de patente internacional n° WO 99/42107. Ciertas N-aralquelpiperazinas se describen en la solicitud de patente internacional n° WO 98/37077. Ciertos derivados de urea heterocíclica sustituida por arilo se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos n° 61/184606. Sin embargo, sigue habiendo un deseo de moduladores potentes de HAAG con propiedades farmacéuticas adecuadas.

55 Las características y ventajas de la presente invención son aparentes para aquel experto en la técnica. En base a esta divulgación, incluyendo el resumen, descripción detallada, antecedentes, ejemplos y reivindicaciones, un experto en la técnica será capaz de hacer modificaciones y adaptaciones a varias condiciones y usos.

60 Resumen de la invención

65 4-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, se describen aquí, que han resultado tener actividad moduladora de HAAG. La invención está dirigida a las realizaciones generales y preferentes definidas, respectivamente, por las reivindicaciones independientes y dependientes aquí adjuntas, que aquí se incorporan como referencia.

La presente invención proporciona evidencia experimental que demuestra que las entidades químicas de la presente invención muestra valores más altos de IC₅₀ en la inhibición de CYP2D6 cuando se compara con un compuesto comparador. Además, 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida mostró mejor comportamiento y mejores efectos secundarios de función fisiológica como resultado de la administración del compuesto cuando se comparó con el compuesto comparador en un test de observación primaria (Irwin) en ratas.

La actividad IC₅₀ 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida de CYP2D6 se mejora en comparación con un compuesto de urea de piperazinil previamente descrito 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico piridin-3-ilamida (véase solicitud e publicación PCT N° WO 2006/074025, ejemplo 150), que aquí se describe como un compuesto comparador. 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida mostró un valor IC₅₀ de 7,5 a 5,5 más alto contra el compuesto comparador con bufuralol o dextrometorfano que se usaba como sustratos, respectivamente.

Además, las entidades químicas de la presente invención muestran características no pronosticadas en un test de observación primaria (Irwin) en ratas cuando se compararon con el compuesto comparador. En particular, el compuesto comparador 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico piridin-3-ilamida aumentó su reactividad al tocar todas las ratas analizadas en la dosis de 10 mg/kg mientras que 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida indujo reactividad solamente en una de cuatro ratas analizadas en la misma dosis. El compuesto comparador indujo sedación en el intervalo de tiempo de 15 a 120 minutos y paso anormal (rodando) 15 minutos después del tratamiento en todas las ratas analizadas con 60 mg/kg mientras que tales observaciones no fueron aparentes en las ratas tratadas con 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida. También aparente en la dosis de 60 mg/kg, el compuesto comparador redujo el tono muscular para todas las ratas en el intervalo de tiempo de 60 a 120 minutos mientras que 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida aumentó el tono muscular abdominal en solamente una de cuatro ratas analizadas. Finalmente, en la dosis de 60 mg/kg el compuesto comparador indujo hipotermia en los sujetos ratas en intervalos de tiempo de 15 a 60 minutos y 180 minutos mientras que esta observación estuvo ausente en ratas analizadas con el compuesto de la presente invención.

En un aspecto general, la invención se dirige al compuesto de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida. En una realización particular, el compuesto es una sal de hidrocloreuro de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida.

La invención también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida

En un aspecto más general, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas comprendiendo cada una: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, sales farmacéuticamente aceptables de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, las realizaciones de la invención son útiles como moduladores de HAAG. También se desvela un método para modular actividad de HAAG, que comprende exponer HAAG a una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, sales farmacéuticamente aceptables de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, profármacos farmacéuticamente aceptables de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida y metabolitos farmacéuticamente activos de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida.

En otro aspecto general, la invención se dirige al uso de al menos un agente seleccionado de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida y sus sales farmacéuticamente aceptables, en un método para tratar un sujeto que sufre o se le diagnostica una enfermedad, trastorno o condición médica mediada por la actividad de hidrolasa amida de ácido graso (HAAG), mientras la enfermedad, trastorno o condición médica se selecciona de: ansiedad, depresión, dolor, trastornos del sueño, trastornos alimenticios, inflamación, esclerosis múltiple y otros trastornos del movimiento, síndrome del desgaste en VIH, lesión cerrada en la cabeza, apoplejía, trastornos del aprendizaje y memoria, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, síndrome de Tourette, trastorno de Niemann-Pick, corea de Huntington, neuritis óptica, uveítis autoinmune, síntomas de retirada de drogas o alcohol, náuseas, emesis, disfunción sexual, ansiedad, trastorno de estrés post-traumático, vasoespasmo cerebral, glaucoma, síndrome de colon irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, inmunosupresión, picor, enfermedad por reflujo gastroesofágico, ileo paralítico, diarrea secretora, úlcera gástrica, artritis reumatoide, hipertensión, cáncer, hepatitis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias, diabetes

autoinmune, pruritis no tratable, neuroinflamación, diabetes, síndrome metabólico, osteoporosis, dislipidemia, esteatosis hepática y esteatohepatitis.

En otro aspecto general, la invención se dirige a un método de síntesis de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida usando 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbaldehído y piperazina en una reacción de hidrogenación con una única etapa.

Realizaciones, características y ventajas adicionales de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada y a través de la práctica de la invención.

Descripción detallada de la invención y sus realizaciones preferentes

La invención puede apreciarse de manera más completa por referencia a la siguiente descripción, que incluye el siguiente glosario de términos y los ejemplos concluyentes.

Como aquí se usan, los términos "incluyendo", "conteniendo" y "comprendiendo" aquí se usan en su sentido abierto, no limitativo.

Una fórmula estructural aquí dada también pretende representar formas no etiquetadas así como formas isotópicamente etiquetadas de los compuestos. Los compuestos isotópicamente etiquetados tienen estructuras representadas por las fórmulas aquí dadas excepto en que uno o más átomos se sustituyen por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa seleccionada. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y flúor, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O y ^{18}F , respectivamente. Tales compuestos isotópicamente etiquetados son útiles en estudios metabólicos (preferentemente con ^{14}C), estudios de reacción cinética (con, por ejemplo ^2H o ^3H), técnicas de detección y representación de imágenes [tales como tomografía por emisión de positrones (TEP) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU), incluyendo ensayos de distribución de fármaco o tejido de sustrato, o en tratamiento radiactivo de pacientes. En particular, un compuesto etiquetado con ^{18}F u ^{11}C puede ser preferente para estudios TEP o TCEFU. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (esto es, ^2H) puede permitir ciertas ventajas terapéuticas dando como resultados una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor vida media *in vivo* o requisitos de menor dosis. Los compuestos isotópicamente etiquetados de esta invención y profármacos de los mismos pueden prepararse generalmente realizando los procedimientos desvelados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones descritas más abajo sustituyendo un reactivo disponible isotópicamente etiquetado por un reactivo etiquetado no isotópicamente.

En una realización general, la invención se refiere a 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida y sales farmacéuticamente aceptables de tal compuesto. En otra realización general, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas cada una comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva de agente modulador de HAAG seleccionado de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida y sales farmacéuticamente aceptables de tal compuesto.

La invención también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida. Una "sal farmacéuticamente aceptable" pretende significar una sal de un ácido o base libre de un compuesto de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida que es no tóxico, biológicamente tolerable o de otra manera biológicamente adecuada para su administración a un sujeto. Véase, generalmente, G. S. Paulekuhn, et al., "Trends in Active Pharmaceutical Ingredient Salt Selection based on Analysis of the Orange Book Database", J. Med. Chem., 2007, 50:6665-72, S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", J Pharm Sci., 1977, 66:1-19, y Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use, Stahal y Wermuth, Eds., Wiley-VHC y VHCA, Zurich, 2002. Las sales farmacéuticamente aceptables preferentes son aquellas que son farmacológicamente aceptables y adecuadas para su contacto con tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica inapropiada. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, fosfatos de monohidrógeno, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formatos, isobutiratos, caproatos, heptanoato, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butino-1,4-dioatos, hexino-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, xilenosulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ -hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos, metano-sulfonatos, propanosulfonatos, naftleno-2-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos y mandelatos.

En ciertas realizaciones, el compuesto 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida es una sal de hidrocioruro.

Un compuesto de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida puede poseer un grupo suficientemente básico y por lo tanto puede reaccionar con un número de ácidos inorgánico y orgánicos para formar una sal farmacéuticamente aceptable.

El compuesto de la invención contiene al menos un nitrógeno básico, por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse mediante cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, mediante tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido hidrocórico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido fosfórico y similares; o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido fenilacético, ácido propiónico, ácido esteárico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido isetiónico, ácido succínico, ácido valérico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido láurico, un ácido piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa-hidroxi, tal como ácido mandélico, ácido cítrico, o ácido tartárico; un ácido amino, tal como ácido aspártico o ácido glutámico; un ácido aromático, tal como ácido benzoico, ácido 2-acetoxibenzóico, ácido naftoico o ácido cinnámico; un ácido sulfónico, tal como ácido laurilsulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico o ácido etanosulfónico; o cualquier otro ácido o mezcla de los mismos que se consideren como sustituyentes equivalentes o aceptables a la luz del nivel ordinario del experto en la técnica.

También se describen profármacos farmacéuticamente aceptables de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida. El término "profármaco" significa un precursor de un compuesto designado que, después de su administración a un sujeto, produce el compuesto in vivo por medio de un proceso químico o fisiológico tal como solvolisis o división enzimática, o bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, un profármaco con pH fisiológico se convierte en el compuesto del Ejemplo 1). Un "profármaco farmacéuticamente aceptable" es un profármaco que es no-tóxico, biológicamente tolerable, y de otra manera biológicamente adecuado para su administración al sujeto. Procedimientos ilustrativos para la selección y preparación de derivados de profármaco adecuados se describen, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Ejemplos de profármacos incluyen compuestos que tiene un residuo de aminoácido, o una cadena de polipéptido de dos o más residuos de aminoácido (por ejemplo, dos, tres o cuatro), covalentemente unidos a través de un enlace de amida o éster con un grupo amino libre de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida. Ejemplos de residuos de aminoácido incluyen los veinte aminoácidos que ocurren de manera natural, comúnmente designados por tres símbolos de letra, así como 4-hidroxi prolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, 3-metilhistidina, norvalina, beta-alanina, gamma-ácido amionobutírico, citrulina, homocisteína, homoserina, ornitina y metionina sulfona. Pueden producirse tipos adicionales de profármacos, por ejemplo, derivando aminas libres como amidas, sulfonamida o fosfonamida.

También se describen metabolitos farmacéuticamente activos de de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida. Un "metabolito farmacéuticamente activo" significa un producto farmacológicamente activo del metabolismo en el cuerpo de de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida o una sal del mismo. Los profármacos y metabolitos activos de un compuesto pueden determinarse usando técnicas rutinarias conocidas o disponibles en la técnica. Véase, por ejemplo, Bertolini et al., J. Med. Chem. 1997, 40, 2011-2016; Shan et al., J. Pharm. S ci. 1997, 86 (7), 765-767; Bagshawe, Drug Dev. Res. 1995, 34, 220-230; Bodor, Adv. Drug Res. 1984, 13, 224-331; Bundgaard, Design of Prodrugs (Elsevier Press, 1985); y Larsen, Desgins and Application of Prodrugs, Drug Designs and Development (Krogsgaard-Larsen et al., eds. Hardwood Academic Publishers, 1991).

Un compuesto de de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, y sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos farmacéuticamente aceptables y metabolitos farmacéuticamente activos (colectivamente, "agentes activos" de la presente invención son útiles como inhibidores de HAAG. El término "inhibidores" se refiere a compuestos que disminuyen, previenen, inactiva, insensibilizan o reducen la expresión o actividad de HAAG. Los agentes activos de la invención pueden usarse para el tratamiento de condiciones médicas, enfermedades o trastornos mediados a través de la inhibición o modulación de HAAG, tales como los aquí descritos. Los agentes activos de acuerdo con la invención pueden por lo tanto usarse como analgésicos, antidepresivos, potenciadores de cognición, neuroprotectores, sedantes, estimulantes/supresores del apetito o contraceptivos.

Condiciones médicas, enfermedades y trastornos ejemplares mediaos por actividad de HAAG incluyen ansiedad, depresión, dolor, trastornos del sueño, trastornos alimenticios, inflamación, esclerosis múltiple y otros trastornos del movimiento, síndrome del desgaste en VIH, lesión cerrada en la cabeza, apoplejía, trastornos del aprendizaje y memoria, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, síndrome de Tourette, trastorno de Niemann-Pick, corea de Huntington, neuritis óptica, uveítis autoinmune, síntomas de retirada de drogas o alcohol, náuseas, emesis, disfunción sexual, trastorno de estrés post-traumático, vasoespasmo cerebral, diabetes, síndrome metabólico, osteoartritis y osteoporosis.

De este modo, los agentes activos pueden usarse para tratar sujetos diagnosticados con o que sufren tal enfermedad, trastorno o condición. El término "tratar" o "tratando" como aquí se usa pretende referirse a la administración de un agente o composición de la invención a un sujeto con el fin de efectuar un beneficio terapéutico a través de la inhibición de la actividad de HAAG. El tratamiento incluye revertir, mejorar, aliviar, inhibir el progreso de, disminuir la severidad, reducir la incidencia de, o prevenir la enfermedad, trastorno o condición, o uno o más síntomas de tal enfermedad, trastorno o condición mediada a través de la modulación de actividad de HAAG. El

término “sujeto” se refiere a un paciente mamífero que necesita tal tratamiento, tal como un humano. Los “moduladores” incluyen tanto inhibidores como activadores, donde “inhibidores” se refieren a compuestos que disminuye, previenen, inactivan, insensibilizan o reducen la expresión o actividad de HAAG, y “activadores” son compuestos que incrementa, activan, facilitan, sensibilizan o aumentan la expresión o actividad de HAAG.

Por consiguiente, la invención se refiere al uso de los agentes activos aquí descritos para tratar sujetos diagnosticados con o que sufren una enfermedad, trastorno o condición mediada a través de la actividad de HAAG, tal como: ansiedad, dolor, trastornos del sueño, trastornos alimenticio, inflamación, trastornos del movimiento (por ejemplo, esclerosis múltiple), metabolismo de glucosa y lípidos (por ejemplo, diabetes) y homeostasis ósea (por ejemplo, osteoporosis).

Los síntomas y estados de enfermedad pretenden incluirse dentro del alcance “condiciones médicas, trastornos y enfermedades”. Por ejemplo, el dolor puede asociarse a varias enfermedades, trastornos o condiciones, y puede incluir varias etiologías. Tipos ilustrativos de dolor tratable con agentes modulador de HAAG, en un ejemplo aquí agente inhibidor de HAAAG, de acuerdo con la invención incluyen dolor por cáncer, dolor postoperativo, dolor del tracto GI, dolor por lesión de la médula espinal, hiperalgesia visceral, dolor talámico, dolor de cabeza (incluyendo dolor de cabeza por estrés y migraña), dolor en la zona lumbar, dolor musculoesquelético, dolor neuropático periférico, dolor neuropático central, dolor relacionado con trastorno neurodegenerativo y dolor menstrual. El síndrome del desgaste de VIH incluye síntomas asociados como pérdida de apetito y náuseas. La enfermedad de Parkinson incluye, por ejemplo, disquinesia inducida por levodopa. El tratamiento de esclerosis múltiple puede incluir el tratamiento de síntomas tales como espasticidad, dolor neurogénico, dolor central o disfunción de la vesícula biliar. Los síntomas de la retirada de drogas pueden estar causados, por ejemplo, por la adición a opiáceos o nicotina. Las náuseas o emesis pueden ser debido a la quimioterapia, postoperativos o causas relacionadas con opiáceos. El tratamiento de disfunción sexual puede incluir la mejora de libido o retraso de eyacuación. El tratamiento de cáncer puede incluir tratamiento de glioma. Los trastornos del sueño incluyen, por ejemplo, apnea del sueño, insomnio, y trastornos que requieren tratamiento con un agente que tiene un efecto de tipo sedante o narcótico. Los trastornos alimenticios incluyen, por ejemplo, anorexia o pérdida de apetito asociada con una enfermedad tal como cáncer o infección de VIH/SIDA.

Una cantidad efectiva de al menos un agente activo de acuerdo con la invención se usa en un método para tratar un sujeto sufre o al que se le ha diagnosticado que tiene tal enfermedad, trastorno o condición. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad efectiva” significa una cantidad o dosis de un agente modulador de HAAG suficiente para producir generalmente un beneficio terapéutico deseable en pacientes que necesitan tratamiento para una enfermedad, trastorno o condición mediada por la actividad de HAAG. Las cantidades o dosis efectivas de los agentes activos de la presente invención pueden determinarse mediante métodos rutinarios tales como modelación, estudios de escalas de dosis o ensayos clínicos, y tomando en consideración factores rutinarios, por ejemplo, el modo o ruta de administración o la administración del fármaco, la farmacocinética del agente, la severidad y curso de la enfermedad, trastorno o condición, la terapia previa o en desarrollo del paciente, el estado de salud del sujeto y la respuesta a fármacos, y el juicio del médico que lo esté tratando. Una dosis ejemplar está en el rango de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 200 mg de agente activo por kg de peso corporal del sujeto por día, preferentemente de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,1 a 35 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg al día en una dosis única o en unidades de dosis divididas (por ejemplo, 2 veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día). Para un humano de 70 kg, un rango ilustrativo para una cantidad adecuada de dosis es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 7 g/día, o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 g/día. Una vez que se ha dado una mejora de la enfermedad, trastorno o condición del paciente, la dosis puede ajustarse para un tratamiento de mantenimiento. Por ejemplo, la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse como una función de los síntomas, a un nivel en el que se mantenga el efecto terapéutico deseado. Por supuesto, si los síntomas se han aliviado hasta un nivel apropiado, el tratamiento puede cesar. Sin embargo, pacientes pueden requerir un tratamiento intermitente en una base a largo plazo después de cualquier recurrencia de síntomas.

Además, los agentes activos de la invención pueden usarse en combinación con ingredientes activos adicionales en el tratamiento de las condiciones anteriores. Los ingredientes activos adicionales pueden co-administrarse por separado con un agente activo de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, o incluirse con tal agente en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. En una realización ejemplar, los ingredientes activos adicionales son aquellos que se sabe o se descubre que son efectivos en el tratamiento de condiciones, trastornos o enfermedades mediadas por actividad de HAAG, tal como otro modulador de HAAG o un compuesto activo contra otra diana asociada con la condición, trastorno o enfermedad particular. La combinación puede servir para aumentar su eficacia (por ejemplo, incluyendo en la combinación un compuesto que potencie la potencia o efectividad de un agente activo de acuerdo con la invención), disminuir uno o más efectos secundarios o disminuir la dosis requerida del agente activo de acuerdo con la invención. En una realización ilustrativa, una composición de acuerdo con la invención puede contener uno o más ingredientes activos adicionales seleccionados de opiáceos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, ibuprofeno, inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y naproxeno), gabapentina, pregabalina, tramadol, acetaminofeno y aspirina.

Los agentes activos de la invención se usan, solos o en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales, para formular composiciones farmacéuticas de la invención. Una composición farmacéutica de la invención comprende: (a) una cantidad efectiva de al menos un agente activo de acuerdo con la invención; y (b) un excipiente farmacéuticamente activo.

5 Un “excipiente farmacéuticamente activo” se refiere a una sustancia que es no tóxica-biológicamente tolerable, y de otra manera biológicamente adecuado para su administración a un sujeto, tal como una sustancia inerte, añadida a una composición farmacológica o de otra manera usado como un vehículo, transportador o diluyente para facilitar la administración de un agente y que sea compatible con el mismo. Ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables se revisan en “Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 6^a ed., Pharmaceutical Press, 2009. Ejemplos de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y glicoles de polietileno.

10 Las formas de administración de las composiciones farmacéuticas que contienen una o más unidades de dosis de los agentes activos pueden prepararse usando excipientes farmacéuticos y técnicas de composición conocidas o que están disponibles para aquellos expertos en la técnica. Las composiciones pueden administrarse en los métodos inventivos mediante una ruta adecuada de administración, por ejemplo, ruta parenteral, rectal, tópica u ocular, o mediante inhalación.

15 La preparación puede tener forma de comprimidos, cápsulas, sobres, grageas, polvos, gránulos, pastillas, polvos para reconstitución, preparaciones líquidas o supositorios. Preferentemente, las composiciones se formulan para infusión intravenosa, administración tópica o administración oral.

20 Para administración oral, los agentes activos de la invención pueden proporcionarse en forma de comprimidos o cápsulas, o como una solución, emulsión o suspensión. Para preparar las soluciones orales, los agentes activos pueden formularse para producir una dosis, por ejemplo, de aproximadamente 5 mg a 5 g al día, o de aproximadamente 50 mg a 5 g al día, en una única dosis o en dosis divididas. Por ejemplo, una dosis total diaria de aproximadamente 5 mg a 5 g al día puede llevarse cabo dosificando una vez, dos, tres o cuatro veces al día.

25 Los comprimidos orales pueden incluir el ingrediente o ingredientes activos mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes endulzantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservadores. Rellenos inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, lactosa, almidón, azúcar, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Excipientes líquidos orales ejemplares incluyen etanol, glicerol, agua y similares. Almidón, polivinil-pirrolidona (PVP), almidón glicolato de sodio, celulosa microcristalina y ácido algínico son agentes desintegrantes ejemplares. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina. El agente lubricante, si está presente, puede ser estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden estar cubiertos de un material tal como monoestearato de gliceril o diestearato de gliceril para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal, o puede estar cubierto de un revestimiento entérico.

30 Las cápsulas para administración oral incluyen cápsulas de gelatina dura y blanda. Para preparar cápsulas de gelatina dura, el ingrediente o ingredientes activos pueden mezclarse con un diluyente sólido, semi-sólido o líquido. Las cápsulas de gelatina blanda pueden prepararse mezclando el ingrediente activo con agua, un aceite tal como aceite de cacahuete o aceite de oliva, parafina líquida, una mezcla de mono y di-glicéridos de ácidos grasos de cadena corta, glicol de polietileno 400 o glicol de propileno.

35 Los líquidos para administración oral pueden tener forma de suspensiones, soluciones, emulsiones o jarabes o pueden liofilizarse o presentarse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales composiciones líquidas pueden contener opcionalmente: excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes suspensores (por ejemplo, sorbitol, metilcelulosa, alginato de sodio, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y similares); vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite (por ejemplo, aceite de almendra o aceite de coco fraccionado), glicol de propileno, alcohol etílico o agua; conservante (por ejemplo, metilo o propilo p-hidroxibenzoato o ácido sórbico); agentes humectantes tales como lecitina; y si se desea, agentes aromatizantes o colorantes.

40 Los agentes activos de esta invención pueden también administrarse mediante rutas no orales. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse para administración rectal como un supositorio. Para uso parenteral, los agentes de la invención pueden proporcionarse en soluciones o suspensiones estériles acuosas, amortiguadas hasta un pH apropiado e isotonicidad o en aceite parentalmente aceptable. Los vehículos acuosos adecuados incluyen solución de Ringer y cloruro sódico isotónico. Tales formas pueden presentarse en formas de dosis de unidad tales como ampollas o dispositivos de inyección desechables, en forma de múltiples dosis como viales de los cuales puede sacarse la dosis apropiada o en forma sólida o pre-concentrada que puede usarse para preparar una formulación inyectable. La dosis ilustrativas de infusión oscilan entre aproximadamente 1 000 µg/kg/minuto de agente mezclado con un transportador farmacéutico durante un periodo que oscila entre varios minutos y varios días.

Para administración tópica, los agentes pueden mezclarse con un transportador farmacéutico en una concentración de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% de fármaco con vehículo. Otro modo de administrar los agentes de la invención puede utilizar una formulación en parche para afectar a la administración transdérmica.

Los agentes activos de la invención pueden administrarse alternativamente mediante inhalación, por medio de rutas nasales u orales, por ejemplo, en una formulación de aerosol que también contiene un transportador adecuado.

Agentes activos ejemplares de la invención se describirán ahora mediante referencia a esquemas sintéticos ilustrativos para su preparación general más abajo y los siguientes ejemplos específicos.

Los compuestos como los descritos anteriormente pueden hacerse de acuerdo con procesos dentro de la experiencia de la técnica y/o los descritos en los siguientes esquemas y ejemplos. Ciertos esquemas de reacción pueden ocurrir con o sin protección como sea apropiado. Esto puede conseguirse por medio de grupos protectores convencionales, tales como los descritos en "Protective Groups in Organic Chemistry", ed. J. F. W. McOmie, Plenum Press, 1973; y T. W. Greene & P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., John Wiley & Sons, 1999. Los grupos protectores pueden extraerse en una fase posterior convenientes usando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, puede ser necesario emplear, en lugar del sustituyente últimamente deseado, un grupo adecuado que puede transportarse mediante el esquema de reacción y sustituirse cuando sea apropiado por el sustituyente deseado. Tales compuestos, precursores o profármacos también se describen.

Con el fin de ilustrar la invención, se incluyen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan la invención. Solo pretenden sugerir un método de práctica de la invención. Aquellos expertos en la técnica pueden encontrar otros métodos para practicar la invención, que son obvios para ellos. Sin embargo, se considera que esos métodos están dentro del alcance de esta invención.

La síntesis de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida se describirá ahora por referencia a esquemas sintéticos ilustrativos y un protocolo específico para su preparación. Los artesanos reconocerán que, para obtener los diferentes compuestos en el presente documento, los materiales de inicio pueden seleccionarse adecuadamente para que los sustituyentes últimamente deseados se transporten a través de el esquema de reacción con o sin protección como se apropiado para producir el producto deseado. Alternativamente, puede ser necesario o deseable emplear, en lugar del sustituyente últimamente deseado, un grupo adecuado que puede transportarse a través del esquema de reacción y sustituirse cuando sea apropiado por el sustituyente deseado.

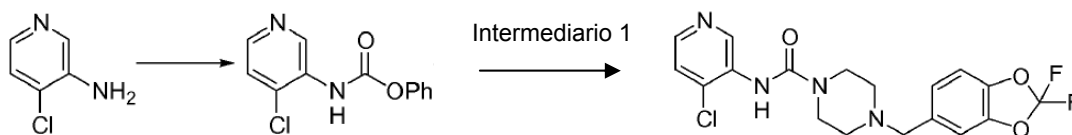
ESQUEMA A



Intermediario 1

En referencia al Esquema A, el Intermediario se obtuvo reaccionando 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbaldehído con piperazina bajo condiciones de hidrogenación. La reacción puede realizarse usando Pd(OH)₂, Pt o Pd como un catalizador, en disolventes tales como MeOH, EtOH o AcOH. La reacción puede realizarse en temperaturas entre 20 a 80 °C. La presión aceptable de H₂ puede estar entre 1 y 60 bares. La cantidad de 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbaldehído con piperazina es típicamente de uno a seis equivalentes. La reacción puede realizarse en un aparato de hidrogenación de lotes o un aparato de hidrogenación de flujo.

ESQUEMA B



Intermediario 2

En referencia al Esquema B, 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida se preparó a partir de 3-amino-4-cloropirina e Intermediario 1. 3-Amino-4-cloropiridina se preparó con clorofornato de fenilo y piridina en un disolvente tal como tolueno para dar el compuesto del Intermediario 2. El Intermediario 2 reaccionó directamente con el Intermediario 1 para dar 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida.

Química:

En la preparación de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida y el ejemplo comparador más abajo, se usaron los siguientes métodos generales experimentales y analíticos.

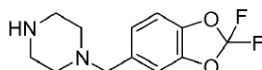
Las mezclas de reacción se agitaron bajo atmósfera de nitrógeno a menos que se manifieste lo contrario. Donde las soluciones o mezclas se concentran, típicamente se concentran bajo presión reducida usando un evaporador rotatorio.

Los espectros de masa se obtuvieron en un Agilent serie 1100 MSD usando ionización por electrospray (IES) en modo positivo a menos que se indique lo contrario.

Los espectros NMR se obtuvieron con un espectrómetro Bruker modelo DPX400 (400 MHz), DPX500 (500 MHz), DRX600 (600 MHz). El formato de los datos 1H NMR más abajo es: cambio químico en ppm campo inferior de la referencia de tetrametilsilano (multiplicidad, constante de enlace J en Hz, integración).

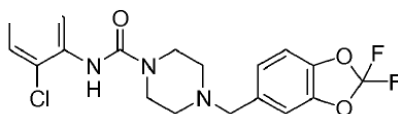
Los nombres químicos se generaron usando ChemDraw Ultra 6.0.2 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA) o ACD/Name Versión 9 (Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario, Canadá).

Intermediario 1: 1-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina



Un matraz Erlenmeyer de 2L se cargó con piperazina (185,1 g, 2,15 mol), 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbaldehído (100,0 g, 0,537 mol) y metanol (1,08 L). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, después pasó dos veces a través de un H-Cube Midi™ (ThalesNano, Budapest, Hungría), con un cartucho nuevo 20% Pd(OH)2/C MidiCart, en los siguientes ajustes: 70 °C, presión 1 atm, velocidad de flujo 6 mL/min, y 10% exceso de producción H₂. El material de inicio de aldehído fue > 90% consumido después del primer paso, y se consumió por completo después del segundo paso como lo indica el análisis HPLC. El metanol se evaporó, se añadió tolueno (1,20 L) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La suspensión blanca resultante se filtró y el sólido se enjuagó con tolueno (200 mL). El filtrado combinado se lavó con agua (2 x 300 mL), secó sobre Na₂SO₄, filtró y concentró para producir el producto como un aceite incoloro. El aceite se disolvió en heptano (100 mL) y el producto se dejó cristalizar a temperatura ambiente. Para posteriores experimentos de síntesis, se usó la adición de una pequeña cantidad de cristales de semilla para acelerar el proceso de cristalización. La suspensión se enfrió a 0 °C, filtró y el sólido se secó en un horno con vacío a 50 °C durante 24 horas para dar el compuesto del título como un sólido blanco (108,0 g, 78%). El filtrado de heptano se concentró hasta aproximadamente 20 mL seguido de la adición de cristales de semilla del producto. La solución se agitó después durante la noche. El segundo lote del compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco después de filtración y secado (6,7 g, 5%). La producción combinada fue (115 g, 83%). MS (ESI⁺): calcd para C₁₂H₁₄F₂N₂O₂ m/z 256,1, encontrado 256,9 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: (d, J = 0,9 Hz, 1H), 6,99 (dd, J = 9,0, 0,9 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 3,45 (s, 2H), 2,92-2,83 (m, 4H), 2,39 (s, 4H), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)δ: 143,89, 142,72, 134,68, 131,65 (t, JC-F = 255,3), 123,88, 110,13, 108,82, 63,10, 54,38, 46,07.

Ejemplo 1: 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida



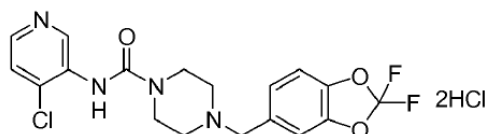
Un matraz Morton con tres cuellos de 2 L se equipó con un agitador mecánico, termopar, y un embudo adicional bajo una atmósfera de nitrógeno se cargó con 3-amino-4-cloropiridina (35,0 g, 272 mmol) y tolueno (740 mL). La solución marrón se enfrió a 2 °C. Se añadió piridina (25,3 mL, 310 mmol) en una parte, seguido de la adición en forma de gotas de clorofornato de fenil (32,6 mL, 259 mmol) durante 30 minutos. La temperatura interna máxima fue 5 °C. Después de agitación a 2-5 °C durante 7 horas la mezcla de la reacción se transformó en una suspensión espesa amarilla. Una solución enfriada de K₂CO₃ (53,6 g, 388 mmol) en agua (216 mL) se añadió durante 3 minutos,

durante los cuales la temperatura interna máxima fue 6 °C. 1-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina (66,3 g, 259 mmol) se añadió después como un sólido durante 1 minuto. La mezcla se dejó templar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 15 horas. Se añadió agua (200 mL) y la capa de tolueno se separó y extrajo con HCl acuoso (1,8 M, 600 mL). El extracto acuoso se lavó con tolueno (2 x 300 mL). Se añadió MeOH (500 mL) a la capa acuosa y la solución se enfrió a 5 °C. El pH se ajustó a pH 8-9 con la adición de solución NaOH (50% peso, ca. 50 mL). La adición fue a tal velocidad que la temperatura interna no excedió 17 °C. La suspensión resultante se agitó a 5 °C durante 2 horas. El producto se recogió mediante filtración y enjuagó con MeOH/H₂O (1:1, 70 mL). El sólido se secó en un horno con vacío a 50 °C durante 24 horas para producir el compuesto del título como un sólido amarillo/verde (73 g, 69%).

Un matraz Morton con tres cuellos de 1 L equipado con una barra mezcladora, termopar y condensador de reflujo se cargó con 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida crudo (98 g, 239 mmol) y acetato de isopropilo (318 ml). La suspensión se calentó a 65 °C, trató con carbón activado (10,0 g) y agitó a 65 °C durante 1 hora. La mezcla se calentó después a 80 °C y se filtró rápidamente a través de una almohadilla fina de celite. El filtrado se enfrió lentamente a temperatura ambiente y después se colocó en un baño de hielo durante 30 minutos. El sólido se recogió mediante filtración, enjuagó con iPrOAc frío (10 mL), y secó para dar el producto 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida como un sólido amarillo (72 g, 73%).

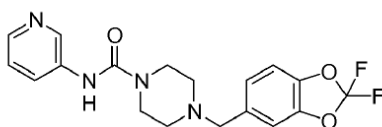
Un matraz Morton con tres cuellos de 2 L equipado con un agitador mecánico, termopar y condensador de reflujo se cargó con producto 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida crudo (191 g, 465 mmol) y acetato de isopropilo (705 ml). La suspensión se calentó a 65 °C, trató con carbón activado (11,2 g) y agitó a 65 °C durante 1 hora. La mezcla se calentó después a 75 °C y se filtró rápidamente. El filtrado se enfrió lentamente a temperatura ambiente durante la noche y después se colocó en un baño de hielo durante 30 minutos. El sólido se recogió mediante filtración, enjuagó con iPrOAc frío (40 mL), y secó en horno con vacío a 50 °C durante 72 horas. El producto 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida se obtuvo como un sólido ligeramente amarillo (161 g, 84%). MS (ESI⁺): calcd para C₁₈H₁₇ClF₂N₄O₃ m/z 410,1, encontrado 411,1 (M+H)⁺. Calculado analt. para C₁₈H₁₇ClF₂N₄O₃: C, 52,63; H, 4,17; N, 13,64. Encontrado: C, 52,73; H, 4,15; N, 13,62; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 9,36 (s, 1H), 8,19 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,29 (dd, J = 5,3, 0,3 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 7,02-6,98 (m, 2H), 6,84 (s, 1H), 3,58-3,54 (m, 4H), 3,53 (s, 2H), 2,54-2,48 (m, 4H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 153,49, 144,02, 143,88, 143,28, 142,98, 134,05, 133,09, 131,66 (t, JC-F = 254,6 Hz), 131,55, 123,89, 123,53, 110,03, 109,02, 62,28, 52,47, 44,23.

Ejemplo 1A: 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida, bis hidrocioruro.



Una solución consistente en 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida (5,0 g, 12 mmol) y etanol (200 mL) se trató con HCl acuoso saturado (3,0 mL, 3 equiv.). El disolvente se extrajo en vacío, se añadió etanol (100 mL) y la suspensión se enfrió a 0 °C y filtró. El sólido blanco resultantes se enjuagó con etanol frío (25 mL) y secó bajo vacío para dar 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida bis-hidrocioruro (4,25 g, 72%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11,61 (br s, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,37 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,46 (dd, J = 8,3, 1,5 Hz, 1H), 4,39 (s, 2H), 4,38-4,12 (m, 2H), 3,49-3,26 (m, 4H), 3,03 (s, 2H).

Compuesto Comparador: 4-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico piridin-3-ilamida.



Piridin-3-il-ácido carbámico éster fenilo: A una solución consistente en piridin-3-il amina (9,49 g, 101 mmol) y piridina (8,77 g, 111 mmol) en CH₃CN (80 mL) a 0 °C se añadió clorofornato de fenilo (15,8 g, 101 mmol) en forma de gotas. La mezcla de la reacción se dejó templar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La reacción se enfrió con H₂O (200 mL) y el precipitado resultante se filtró y secó bajo vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido tostado (17,34 g, 80%). MS (ESI⁺): calcd para C₁₂H₁₀N₂O₂ m/z 214,07, encontrado 215,3 (M+H)⁺. ¹H NMR (500 MHz, d⁶-DMSO): 10,46 (s, 1H), 8,69 (d, J = 2,4 Hz), 8,27 (dd, J = 4,7, 1,4 Hz, 1H), 7,93 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,47-7,41 (m, 2H), 7,37 (dd, J = 8,4, 4,7 Hz, 1H), 7,31-7,22 (m, 3H).

4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico piridin-3-ilamida: A una solución de piridina-3-il-ácido carbámico éster fenilo (9,08 g, 42,4 mmol) en DMSO (84 mL) se añadió 1-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina (11,4 g, 44,5 mmol): la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 165 horas, después se trató con agua (130 mL). El sólido resultante se aisló mediante filtración, se enjuagó con agua (4 x 50 mL) y secó bajo vacío. El sólido se volvió a cristalizar (EtOH-H₂O) para dar 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico piridin-3-ilamida (13,4 g, 84%). MS (ESI⁺): calcd para C₁₈H₁₈F₂N₄O₃ m/z 376,13, encontrado 377,1 (M+H)⁺. ¹H NMR (CDCl₃): 8m46 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 8,23-8,21 (m, 1H), 7,99-7,96 (m, 1H), 7,22-7,19 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,99-6,98 (m, 2H), 3,54-3,52 (m, 4H), 3,49 (s, 2H), 2,46-2,44 (m, 4H).

Ensayo Bilógico

15 - Método de Ensayo 1

A. Transfección de Células con HAAG Humano

Un plato de cultivo de 10 cm con una monocapa confluyente de célula SK-N-MC se dividió 2 días (d) antes de la transfección. Usando una técnica estéril, el medio se extrajo y las células se separaron del plato mediante la adicción de tripsina. Un quinto de las células se colocaron después en un plato nuevo de 10 cm. Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C con 5% CO₂ en medio esencial mínimo Eagle con 10% de suero bovino fetal. Después de 2 d, las células fueron aproximadamente 80% confluentes. Estas células se extrajeron del plato con tripsina y se transformaron en gránulos en un centrifugado clínico. El gránulo se volvió a suspender en 400 µL medio completo y se transfirió a una cubeta de electroporación con un espacio de 0,4 cm entre los electrodos. cADN superenrollado de HAAG de rata (1 µg) se añadió a las células y se mezcló. El voltaje para la electroporación se fijó en 0,25 kV y la capacitancia se fijó en 960 µg. Después de la electroporación, las células se diluyeron en medio completo (10 mL) y se colocaron en cuatro platos de 10 cm. Debido a la variabilidad en la eficiencia de la electroporación, se colocaron en platos cuatro concentraciones diferentes de células. Las proporciones usadas fueron 1:20, 1:10 y 1:5, con el resto de las células añadidas al cuarto plato. Se dejó que las células se recuperaran durante 24 horas antes de añadir el medio de selección (medio completo con 600 µg/mL G418). Después de 10 d, los platos se analizaron para colonias supervivientes de células. Se usaron los platos con colonias bien aisladas. Las células de colonias individuales se aislaron y analizaron. Los clones que mostraron la mayor actividad de HAAG, como lo midió la hidrólisis de anandamida, se usaron para más estudios.

35

B. Ensayo HAAG

Gránulos de célula T84 congelados o células SK-N-MC transfectadas (contenidos de platos de cultivo de 1 x 15 cm) se homogenizaron en 50 mL de tampón de ensayo HAAG (125 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2% Glicerol, 0,02% Triton X-100, 0,4 mM Hepes, pH 9). La mezcla del ensayo consistió en 50 µL del homogenado, 10 µL del compuesto del test y 40 µL de anandamida [³H-etanolamina] (³H-AEA, Perkin-Elmer, 10,3 Ci/mmol), que se añadió por último, para una concentración indicadora final de 80 nM. La mezcla de la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Durante la incubación, placas de filtro Multiscreen con 96 pozos (número de catálogo MAFCNOB50; Millipore, Bedford, MA, USA) se cargaron con 25 µL de carbón activado (cargador de columna Multiscreen, número de catálogo MACL09625, Millipore) y se lavaron una vez con 100 µL de MeOH. También durante la incubación, placas MicroLite DYNEX de 96 pozos (número de catálogo NL510410) se cargaron con 100 µL de MicroScint 40 (número de catálogo 6013641, Packard Bioscience, Meriden, CT, USA). Después de 1 hora de incubación, 60 µL de la mezcla de reacción se transfirió a las placas de carbón, que después se montaron en la parte superior de las placas DYNEX usando Estructuras de Alineación Centrifugas (número de catálogo MACF09604, Millipore). La etanolamina etiquetada no unida se centrifugó a través de la placa inferior (5 minutos a 2000 rpm), que se precargó con el escintilador, como se ha descrito anteriormente. Las placas se sellaron y dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de contar en un TopCount de Hewlett Packard.

55 - Método de Ensayo 2

A. Transfección de Células con HAAG de rata

Un plato de cultivo de tejido de 10 cm con una monocapa confluyente de células SK-N-MC se dividió 2 días (d) antes de la transfección. Usando una técnica estéril, el medio se extrajo y las células se separaron del plato mediante la adicción de tripsina. Un quinto de las células se colocaron después en un plato nuevo de 10 cm. Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C con 5% CO₂ en medio esencial mínimo Eagle con 10% de suero bovino fetal. Después de 2 d, las células fueron aproximadamente 80% confluentes. Estas células se extrajeron del plato con tripsina y se transformaron en gránulos en un centrifugado clínico. El gránulo se volvió a suspender en 400 µL medio completo y se transfirió a una cubeta de electroporación con un espacio de 0,4 cm entre los electrodos. cADN superenrollado de HAAG de rata (1 µg) se añadió a las células y se mezcló. El voltaje para la electroporación se fijó en 0,25 kV y la capacitancia se fijó en 960 µg. Después de la electroporación, las células se diluyeron en

65

medio completo (10 mL) y se colocaron en cuatro platos de 10 cm. Debido a la variabilidad en la eficiencia de la electroporación, se colocaron en platos cuatro concentraciones diferentes de células. Las proporciones usadas fueron 1:20, 1:10 y 1:5, con el resto de las células añadidas al cuarto plato. Se dejó que las células se recuperaran durante 24 horas antes de añadir el medio de selección (medio completo con 600 µg/mL G418). Después de 10 d, los platos se analizaron para colonias supervivientes de células. Se usaron los platos con colonias bien aisladas. Las células de colonias individuales se aislaron y analizaron. Los clones que mostraron la mayor actividad de HAAG, como lo midió la hidrólisis de anandamida, se usaron para más estudios.

B. Ensayo HAAG

Células SK-N-MC transfectadas (contenidos de platos de cultivo de 1 x 15 cm) se homogenizaron en 50 mL de tampón de ensayo HAAG (125 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2% Glicerol, 0,02% Triton X-100, 0,4 mM Hepes, pH 9). La mezcla del ensayo consistió en 50 µL del homogenado, 10 µL del compuesto del test y 40 µL de anandamida [$1\text{-}^3\text{H}$ -etanolamina] (^3H -AEA, Perkin-Elmer, 10,3 Ci/mmol), que se añadió por último, para una concentración indicadora final de 80 nM. La mezcla de la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Durante la incubación, placas de filtro Multiscreen con 96 pozos (número de catálogo MAFCNOB50; Millipore, Bedford, MA, USA) se cargaron con 25 µL de carbón activado (cargador de columna Multiscreen, número de catálogo MACL09625, Millipore) y se lavaron una vez con 100 µL de MeOH. También durante la incubación, placas MicroLite DYNEX de 96 pozos (número de catálogo NL510410) se cargaron con 100 µL de MicroScint 40 (número de catálogo 6013641, Packard Bioscience, Meriden, CT, USA). Después de 1 hora de incubación, 60 µL de la mezcla de reacción se transfirió a las placas de carbón, que después se montaron en la parte superior de las placas DYNEX usando Estructuras de Alineación Centrifugas (número de catálogo MACF09604, Millipore). La etanolamina etiquetada no unida se centrifugó a través de la placa inferior (5 minutos a 2000 rpm), que se precargó con el escintilador, como se ha descrito anteriormente. Las placas se sellaron y dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de contar en un TopCount de Hewlett Packard.

Los resultados para los compuestos analizados en estos ensayos se resumen en la Tabla 1, como un promedio de los resultados obtenidos. Los compuestos se analizaron en su base libre o en forma de sal de hidrocloreto. El compuesto comparador 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico piridin-3-ilamida, se sintetizó como se describe en PCT número de solicitud de publicación N° WO 2006/074025, ejemplo 150.

Tabla 1

Compuesto	Ensayo 1 IC ₅₀ (nM)	Ensayo 2 IC ₅₀ (nM)
Ejemplo 1	75	320
Compuesto Comparador	340	450

Ensayo de Interacción Fármaco-Fármaco (IFF)

El potencial de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida y el compuesto comparador 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico piridin-3-ilamida, para inhibir isoenzimas de citocroma humano P-450 (CIPs) se investigó incubando el compuesto en varias concentraciones con microsomas de hígado humano y sustratos específicos de sonda CIP (Tabla 2). La inhibición de CIP puede impactar el perfil de seguridad de una sustancia de fármaco al interferir con el metabolismo de otras moléculas del fármaco.

El ensayo se estableció y ejecutó usando la cabina de manipulación de Biomek Fxp robótico líquido (Beckman Coulter Corp, Fullerton, CA), integrada con una incubadora de agitación Cytomat fijada a 3 °C (Thermo Electron Corp., Bellefonte, Pa). Se usó un lote de microsomas de hígado humano de 50 donantes, agrupados y caracterizados por Gentes BD, (Cat #457111, lote 01220, 20 mg/mL en 250 mM sacarosa). Cada sustrato se incubó en una concentración de proteína de 0,1, 0,15 o 0,2 mg/mL en un volumen total de incubación de 0,16 mL. Los incubados se prepararon en 100 mM tampón de fosfato de potasio (pH 7,4) complementado con 5 mM cloruro de magnesio y 1 mM EDTA. Se usó quinidina como un inhibidor de control positivo para CYP2D6. La quinidina se preparó como una solución de trabajo en disolvente orgánico (principalmente metanol, con DMSO y acetonitrilo como disolventes secundarios), y se clavó en la suspensión microsomal para producir el nivel de concentración deseado. La solución se diluyó después en serie con suspensión microsomal adicional para producir ocho niveles de concentración. El contenido orgánico final fue inferior a 0,07%. Una solución patrón del compuesto del test se preparó en una concentración de 50 mM o mayor, si es posible, en un disolvente orgánico adecuado (DMSO, metanol o acetonitrilo), dependiendo de las limitaciones de solubilidad. La solución patrón se diluyó en serie con metanol y posteriormente se clavó en la suspensión microsomal para producir las concentraciones finales de incubación de 0, 0,1, 0,3, 1,3, 10, 30 y 100 µM para el compuesto comparador y 0,006, 0,18, 0,6, 1,8, 6, 18 y 60 µM para El potencial de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-

amida. El contenido orgánico final fue 0,2%. Las incubaciones se realizaron por triplicado para cada sustrato de sonda.

El inhibidor control (quinidina) y el sustrato marcador (dextrometorfano o bufuralol) se transfirieron a los recipientes de incubación (60 μ L alícuotas cada uno). Después del periodo de pre-incubación a 37 °C, se iniciaron las reacciones mediante la adición de una alícuota de 40 μ L de sistema regenerador de NADPH (BD Gentest). Una alícuota de 40 μ L (diluida 6:19 con tampón de incubación) proporcionó la concentración final de 1,3 nM NADP+, 3,3 mM glucosa-6-fosfato y 0,4 U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los tiempos de incubación fueron 12 minutos para dextrometorfano y bufuralol. Las reacciones se terminaron mediante la adición directa de acetonitrilo (160 μ L) a la mezcla de incubación seguida de la transferencia a una placa de agrupamiento que contenía acetonitrilo (400 μ L).

Las reacciones de incubación se agruparon por igual concentración de compuesto de test o inhibidor control, se transfirieron a una placa con filtro de precipitación de proteína Phenomenex Strata™ Impact que contenía acetonitrilo y estándares internos (100 μ L de una mezcla de los siguientes compuestos deuterados que oscilan en una concentración entre 0,5 y 2,8 μ M: hidoxibufuralol-d₉, dextrofano-d₃). El filtrado resultante se evaporó hasta secarse bajo un flujo de nitrógeno, después se reconstituyó en una fase móvil de 250 μ L (1:1 metanol:agua, que contenía 0,1% de ácido acético). Las muestras y los estándares se analizaron en un espectrómetro de masa triple cuadrupolo Sciex API4000. Los datos se adquirieron en Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems/MDS Sciex). Para ensayos IC₅₀, las proporciones de radio del metabolito y los picos cromatográficos estándares internos se transfirieron a SigmaPlot (versión 8,0) y se trazaron como una escala de semi-logaritmo (actividad residual porcentual vs. concentración de inhibidor) para determinar el valor IC₅₀.

4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida inhibió CYP2D6 con un valor IC₅₀ de 24 μ M usando Bufuralol como el sustrato del test, y 11 μ M usando Dextromorfano como el sustrato del test. 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida se comparó de manera favorable con el Compuesto Comparador, que inhibió CYP2D6 con un valor IC₅₀ de 3,2 μ M usando Bufuralol, y 2,0 μ M usando Dextromorfano como los sustratos del test. Estos resultados demuestran un reducido riesgo potencial de las interacciones fármaco-fármaco para 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida en relación con el Compuesto Comparador.

Tabla 2

Compuesto	2D6 Bufuralol (μ M)	Dextrometorfano (μ M)
Ejemplo 1	24	11
Compuesto Comparador	3,2	2,0

Test de Observación Primaria (Irwin) en la rata

4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida hidrocloreuro y la sal de hidrocloreuro del Compuesto Comparador se investigaron con administración oral en el Test de Observación Primaria (Irwin) en la rata para evaluar sus efectos generales en el comportamiento y las funciones fisiológicas. El método, que detecta la primera dosis tóxica, el rango de dosis activo y los principales efectos de una sustancia de test en el comportamiento y la función fisiológica, sigue lo descrito por Irwin et al., Psychopharmacologia, 1968, 13, 222-257. A las ratas se les administró la sustancia del test y se observaron en comparación simultánea con un grupo de control al que se le dio un vehículo (condiciones no ciegas). Todos los animales dentro de un grupo de tratamiento fueron observados simultáneamente. Las modificaciones de comportamiento, los síntomas fisiológicos y de neurotoxicidad, la temperatura rectal y el diámetro de la pupila se registraron de acuerdo con un cuadro estandarizado de observación derivado del de Irwin. El cuadro contiene los siguientes puntos: paso anormal (rodar, de puntillas), descoordinación motora, tono muscular abdominal alterado, pérdida de agarre, aquinesia, catalepsia, pérdida de tracción, pérdida de equilibrio, pisar con la pata delantera, retortijones, piloerección, estereotipias (olisquear, masticar, movimientos de cabeza), sacudidas de cabeza, rascarse, respiración alterada, agresión, miedo/sobresalto alterado, reactividad alterada al tacto, ptosis, exoftalmia, pérdida del reflejo de enderezamiento, pérdida del reflejo corneal, analgesia, defecación/diarrea, salivación, lacrimación, temperatura rectal (hipotermia/hipertermia) y diámetro de pupila (midosis/midriasis). Las sustancias del test se evaluaron en 2 dosis (10 y 60 mg/kg), administradas p.o inmediatamente antes del test, y se compararon con un grupo de control vehículo. Las observaciones se realizaron 15, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la administración de las sustancias/vehículos de test y también 24 horas más tarde.

Tabla 3

5
10
15
20
25
30
35

Ejemplo 1 (mg/kg p.o.)		Compuesto Comparador HCl (mg/kg p.o.)	
10	60	10	60
Mayor reactividad al tacto: ¼) en 180 min.	Sedación : (0/4) Paso anormal: (0/4) Hipotermia: (0/4) Mayor tono muscular abdominal: (1/4) a los 60 min. Mayor reactividad al tacto: (1/4) a los 60 min. (1/4) a los 180 min.	Mayor reactividad al tacto: (3/3) en 15 min.	Sedación : (3/3) de 15 a 120 min. Paso anormal (rodar): (3/3) a los 15 min. Hipotermia: Inducción ligera de 15 a 60 min y a los 180 min. Menor tono muscular: (1/3) a los 30 min. (3/3) de 60 a 120 min. Mayor reactividad al tacto: (0/3) a los 60 min. Y 180 min.

40
45

4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida hidrocloreto causó efectos excitantes transitorios en solamente una rata con un rango de dosis de 10-60 mg/kg en el Test de Irwin (Tabla 3). En 10 mg/kg 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida hidrocloreto aumentó la reactividad al tacto en 1 de 4 ratas a los 180 minutos. En 60 mg/kg 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida hidrocloreto aumentó el tono muscular abdominal en 1 de 4 ratas a los 60 minutos y aumentó la reactividad al tacto en 1 de 4 ratas a los 60 y 180 minutos. Aparte del aumento transitorio y ocasional en el tono muscular abdominal en 60 mg/kg, no se observaron otros signos hasta 24 horas después de la administración.

50
55

4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida hidrocloreto demostró diferenciación favorable de HCL del Compuesto Comparador en el Test de Irwin en ambas dosis. Mientras 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida hidrocloreto causó una mayor actividad al tacto en solamente 1 de 4 ratas en 10 mg/kg, HCl del Compuesto Comparador aumentó la actividad al tacto las 3 ratas. En 60 mg/kg, HCL del Compuesto Comparador indujo sedación de 15 a 120 minutos y paso anormal (rodar) a los 15 minutos en las 3 ratas. Redujo el tono muscular en 1 rata a los 30 minutos y a partir de 60 a 120 minutos en las 3 ratas. También indujo hipotermia de 15 a 60 minutos y a los 180 minutos. Estos resultados sugieren la presencia de efectos sedantes/tranquilizantes (sedación, signos motores e hipotermia) para HCl del Compuesto Comparador en 60 mg/kg p.o que no se observaron con 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida hidrocloreto.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un compuesto que es 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 **2.** La sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, donde dicha sal es una sal de hidrocioruro de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida.
- 3.** La sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 2, donde dicha sal de hidrocioruro es bis-hidrocioruro.
- 15 **4.** Una composición farmacéutica que comprende:
 (a) una cantidad terapéuticamente aceptable de al menos uno de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
 (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 **5.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende:
 Una cantidad terapéuticamente efectiva de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 **6.** El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, para su uso en terapia.
- 30 **7.** El compuesto o composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 6 en un método para tratar un sujeto que sufre o al que se le ha diagnosticado una enfermedad, trastorno o condición médica medida por la actividad de HAAG, donde la enfermedad, trastorno o condición médica se selecciona del grupo consistente en:
 35 enfermedad del desgaste en VIH, lesión cerrada en la cabeza, apoplejía, trastornos del aprendizaje y memoria, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, síndrome de Tourette, trastorno de Niemann-Pick, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, neuritis óptica, uveítis autoinmune, retirada de drogas, náuseas, emesis, disfunción sexual, trastorno de estrés post-traumático, vasoespasmo cerebral, glaucoma, síndrome de colon irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, inmunosupresión, enfermedad por reflujo gastroesofágico, íleo paralítico, diarrea secretora, úlcera gástrica, artritis reumatoide, hipertensión, cáncer, hepatitis, enfermedad alérgica de las vías respiratorias, diabetes autoinmune, pruritis no tratable, neuroinflamación, diabetes, síndrome metabólico y osteoporosis.
- 40 **8.** El compuesto o la composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 7 donde la enfermedad, trastorno o condición médica es dolor o inflamación.
- 45 **9.** El compuesto o la composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 7 donde el trastorno, enfermedad o condición médica es ansiedad, un trastorno del sueño, un trastorno alimenticio o un trastorno del movimiento.
- 10.** El compuesto o la composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 7 donde el trastorno, enfermedad o condición médica es esclerosis múltiple.
- 11.** El compuesto o la composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 6 en un método para tratar metabolismo de energía o homeostasis ósea.
- 50 **12.** Un método de síntesis de 4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilmetil)-piperazina-1-ácido carboxílico (4-cloro-piridin-3-il)-amida usando 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carbalehído y piperazina en una reacción de hidrogenación con una única etapa.