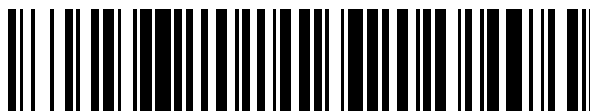


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 572**

51 Int. Cl.:

**C07D 231/12** (2006.01)

**A61K 31/415** (2006.01)

**A61P 25/04** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**C07D 213/75** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010 E 10819483 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2480536**

54 Título: **Moduladores del receptor de tipo toll y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**23.09.2009 US 244997 P**

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

**07.11.2014**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)  
1800 Grant Street, 8th Floor  
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

**YIN, HANG y  
WATKINS, LINDA R.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 519 572 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 del receptor de tipo toll y usos de los mismos

5 **Declaración en relación a investigación financiada por el Gobierno Federal**

Esta invención se efectuó con apoyo gubernamental con la subvención número UL1 RR025780 concedida por los *National Institutes of Health*. El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

10 **Campo de la invención**

La invención se refiere a moduladores del receptor de tipo toll, a composiciones que comprenden a los mismos, y a métodos para preparar y usar los mismos.

15 **Antecedentes de la invención**

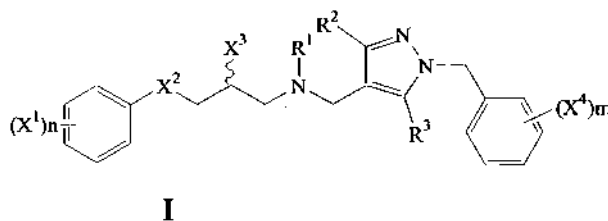
La farmacología y tratamiento del dolor tienen una historia larga y tumultuosa. Desde los comienzos del uso de extractos de la amapola del opio para tratar el dolor aproximadamente en el año 3500 AC, la búsqueda de tratamientos para proporcionar un alivio efectivo del dolor agudo y crónico ha continuado creciendo a un ritmo extraordinario. Hoy en día, el dolor sigue siendo un asunto de salud pública significativo, con dos tercios de los pacientes obteniendo poco o ningún alivio del dolor con la gran cantidad de farmacoterapias y pautas de tratamiento actualmente disponibles. El uso de farmacoterapia de opioides (es decir, opiáceos) produce varios efectos secundarios gratificantes y de refuerzo, lo que da lugar al uso del fármaco de manera abusiva. Desafortunadamente, un efecto secundario del intento de mejorar la calidad de vida de los pacientes es que algunos se hacen dependientes de los tratamientos que se prescribieron para ayudarles. En los últimos años, el mal uso de los opioides ha aumentado drásticamente, haciendo que médicos y pacientes se muestren reacios al tratamiento del dolor en su máxima extensión.

Por lo tanto, hay una necesidad continuada de compuestos, composiciones, y métodos para tratar el dolor que no den como resultado una dependencia no deseada.

30 **Sumario de la invención**

Algunos aspectos de la invención proporcionan varios compuestos, a composiciones que comprenden a los mismos, y estos compuestos y composiciones para su uso en la modulación de los receptores de tipo toll (TLR) así como para tratar varias afecciones clínicas asociadas con los TLR.

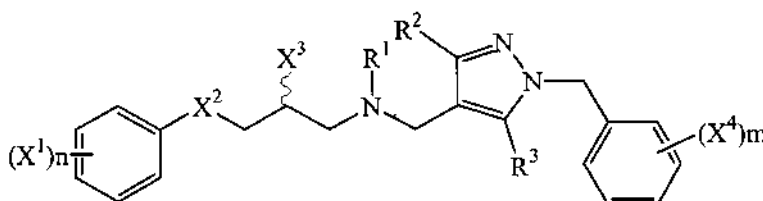
Otros aspectos de la invención proporcionan un compuesto de fórmula I



donde

40 cada uno de n y m es un número entero de 0 a 5;  
 cada uno de X<sup>1</sup> es independientemente alcoxi, alquilo opcionalmente sustituido, o alqueniilo;  
 X<sup>2</sup> es O, NR<sup>a</sup>, o S;  
 X<sup>3</sup> es -OR<sup>b</sup>, -SR<sup>b</sup>, o NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>; cada uno de X<sup>4</sup> es independientemente haluro o alcoxi; y  
 45 cada uno de R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, y  
 R<sup>3</sup> es independiente hidrógeno o alquilo.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la fórmula:



50 donde

cada uno de n y m es independientemente un número entero de 0-5;  
 normalmente cada uno de m y n es independientemente un número entero de 0-4;  
 a menudo cada uno de m y n es independientemente un número entero de 0-2; y  
 $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$ ,  $X^4$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^3$  son los definidos en el presente documento.

En estas realizaciones, en algunos casos  $X^2$  es O. Además en otros casos,  $X^3$  es -OH. En otros casos adicionales,  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son alquilo. Normalmente,  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^3$  son metilo. En otros casos adicionales,  $X^1$  es alcoxi, alquilo o alquenil-alquilo heterosustituido. A menudo  $X^1$  es metoxi, metoxietilo, o alilo. En otros casos más,  $X^4$  es alcoxi, Cl, o F. De forma típica,  $X^4$  es metoxi o Cl.

Otros aspectos más de la invención proporcionan un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la actividad del receptor de tipo Toll (TLR4) en un sujeto, para tratar el dolor o un efecto secundario opiáceo no deseado en dicho sujeto. El método comprende de forma típica administrar al sujeto un compuesto descrito en el presente documento. La dolencia clínica comprende a menudo dolor neuropático, o una combinación de las mismas. En otras realizaciones, la dolencia clínica comprende dolor crónico, nocicepción o una combinación de las mismas.

Otros aspectos más de la invención proporcionan una composición que comprende un opiáceo y un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, el opiáceo y el compuesto de la invención están íntimamente mezclados. En otras realizaciones, el opiáceo y el compuesto de la invención están en formas separadas. En general, se puede usar cualquier opiáceo conocido por un experto en la materia en las composiciones (y métodos) de la invención. Los opiáceos ilustrativos incluyen los isómeros (+) y (-). Normalmente, las composiciones (y métodos) de la invención comprenden una composición enantiómericamente enriquecida, por ejemplo, 90% ee o más, normalmente 95% ee o más, y a menudo 98% ee o más del (-)-opiáceo. Los ejemplos específicos de opiáceos adecuados incluyen, pero sin limitación, morfina, metadona, oxycodona, buprenorfina, fentanilo y petadina/meperidina, entre otros.

Como los compuestos de la invención potencian el efecto del opiáceo, normalmente la cantidad de opiáceo en la composición es menor que la cantidad de opiáceo normalmente utilizada en ausencia del compuesto de la invención. En algunas realizaciones, la cantidad de opiáceo presente en la composición es aproximadamente el 50% a aproximadamente el 100%. normalmente, de aproximadamente 75% a aproximadamente 100%, y a menudo de aproximadamente 90% a aproximadamente 100% con respecto a la dosificación recomendada del opiáceo en ausencia del compuesto de la invención. Como alternativa, la relación molar entre el opiáceo y el compuesto de la invención en la composición varía desde aproximadamente 1000: 1 a aproximadamente 10:1, normalmente de aproximadamente 100: 1 a aproximadamente 10: 1, y a menudo desde aproximadamente 50: 1 a aproximadamente 10: 1.

Otros aspectos adicionales de la invención proporcionan un compuesto de la invención para su uso en métodos para potenciar los efectos analgésicos de un compuesto opiáceo. Dichos métodos incluyen coadministrar al sujeto un opiáceo y una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención. El término "coadministrar" se refiere a administrar el opiáceo y el compuesto de la invención con una separación de unas horas entre sí, por ejemplo, con una o dos horas, normalmente en una hora o menos, a menudo con media hora o menos y más frecuentemente con tres minutos o menos. Debe apreciarse que cuando el opiáceo y el compuesto de la invención se administran por separado, el compuesto de la invención puede administrarse antes de o después de la administración del opiáceo. En algunas realizaciones, el opiáceo y el compuesto de la invención se administran sustancialmente de manera simultánea. Las expresiones "sustancialmente de manera simultánea" y "simultáneamente" se refieren a administrar el opiáceo y el compuesto de la invención con una separación de cinco minutos, normalmente con tres minutos, y a menudo con un minuto entre sí. En algunas realizaciones particulares, el compuesto de la invención se administran antes de la administración del opiáceo. En dichas realizaciones, generalmente, el compuesto de la invención se administra no más de 2 horas antes, normalmente no más de 1 hora antes, y a menudo no más de 0,5 hora antes de la administración del opiáceo. En otras realizaciones particulares, el compuesto de la invención se administran después de la administración del opiáceo. En dichas realizaciones, generalmente, el compuesto de la invención se administra aproximadamente 2 horas o menos después, normalmente 1 hora o menos después, y a menudo 0,5 horas o menos después de la administración del opiáceo.

### Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C muestran los resultados de los experimentos de acoplamiento molecular de (a, b) compuesto de comparación A-2 uniéndose a MD-2; (a) Vista global del complejo compuesto de comparación A-2/MD-2 humano, que muestra que el compuesto de comparación A-2 reconoce un sitio alostérico que es diferente del sitio de unión a LPS (indicado con una flecha) en la superficie de MD-2. (b) Vista en primer plano que muestra que el compuesto de comparación A-2 reconoce el bolsillo con alta complementariedad espacial. (c) Compuesto A-1 a repeticiones de LRR de TLR4<sup>1</sup>, uniéndose a la misma hendidura sobre la superficie de TLR4 que reconoce la proteína MD-2. La Figura 2 es un diagrama de barras que muestra el resultado del ensayo de inmunoprecipitación de TLR4/MD-2. Las Figuras 3A y 3B son gráficas que muestran que el Compuesto A-1 y el compuesto de comparación A-2, respectivamente, bloquean la activación de TLR4 inducida por LPS en macrófagos. La Figura 4 es un diagrama de barras de los resultados de un ensayo de viabilidad que mostraron que ni el Compuesto A-1 ni el compuesto de comparación A-2 causaron toxicidad celular significativa a estas

concentraciones ensayadas.

Las Figuras 5A-5C muestran los resultados del Test de Hargreaves para algunos de los compuestos de la invención.

## 5 Descripción detallada de la invención

### Definiciones

10 "Alquilo" se refiere a un resto de hidrocarburo monovalente lineal saturado de uno a doce, normalmente uno a seis, átomos de carbono o a un resto de hidrocarburo monovalente ramificado saturado de tres a doce, normalmente tres a seis, átomos de carbono. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo, terc-butilo, pentilo, y similares.

15 "Alquilo opcionalmente sustituido" se refiere a un grupo alquilo tal como se define en el presente documento en el que uno o más átomos de hidrógeno están opcionalmente sustituidos con un sustituyente tal como haluro, hidroxilo, alcoxi, u otro heteroátomo sustituyente.

20 "Alquileno" se refiere a un resto de hidrocarburo divalente lineal saturado de uno a doce, normalmente uno a seis, átomos de carbono o a un resto de hidrocarburo divalente ramificado saturado de tres a doce, normalmente tres a seis, átomos de carbono. Los grupos alquileno ilustrativos incluyen, pero sin limitación, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, y similares.

25 "Alquenilo" se refiere a un resto de hidrocarburo lineal monovalente de dos a diez átomos de carbono o un resto de hidrocarburo ramificado monovalente saturado de tres a diez átomos de carbono, que contiene al menos un doble enlace, por ejemplo, etenilo, propenilo, y similares.

"Alquenil alquilo" se refiere a un resto de la fórmula  $-R^a-R^b$ , donde  $R^a$  es alquileno y  $R^b$  es alquenilo tal como se define en el presente documento.

30 "Alcoxi" se refiere a un resto de la fórmula  $-OR^n$ , donde  $R^n$  es alquilo tal como se define en el presente documento.

"Alcoxialquilo" se refiere a un resto de la fórmula  $-R^p-O-R^q$ , donde  $R^p$  es alquileno y  $R^q$  es alquilo tal como se define en el presente documento.

35 "Antagonista" se refiere a un compuesto o composición que atenúa el efecto de un agonista. El antagonista puede unirse de forma reversible o irreversible a una región del receptor en común con un agonista. El antagonista puede unirse también a un sitio diferente en el receptor o un canal de iones asociado. Además, el término "antagonista" incluye también un antagonista funcional o un antagonista fisiológico. El antagonista funcional se refiere a un compuesto y/o composiciones que revierte(n) los efectos de un agonista en lugar que actuar en el mismo receptor, es decir, un antagonista funcional produce una respuesta en el tejido o en el animal que se opone a la acción de un agonista. Los ejemplos incluyen agentes que tienen efectos opuestos sobre un segundo mensajero intracelular, o, en un animal, sobre la tensión arterial. Un antagonista funcional puede producir algunas veces respuestas que imitan estrechamente las de tipo farmacológico.

45 "Centro quiral" (es decir, centro estereoquímico, estereocentro, o un centro estereogénico) se refiere a un átomo sustituido asimétricamente, por ejemplo, un átomo de carbono al cual se unen cuatro grupos diferentes. El criterio definitivo de un centro quiral, sin embargo, es la incapacidad de superposición de su imagen especular.

50 Los términos "halo", "halógeno" y "haluro" se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a flúor, cloro, bromo, o yodo.

55 "Haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo tal como se define en el presente documento en el que uno o más átomos de hidrógeno están opcionalmente sustituidos por átomos de halógeno iguales o diferentes. El término "haloalquilo" incluye también grupos alquilo perhalogenados en los que todos los átomos de hidrógeno del alquilo se sustituyen por átomos de halógeno. Los grupos haloalquilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación,  $-CH_2Cl$ ,  $-CF_3$ ,  $-CH_2CF_3$ ,  $-CH_2CCl_3$ , y similares.

60 "Alquilo heterosustituido" se refiere a un grupo alquilo tal como se define en el presente documento que contiene uno o más heteroátomos tales como N, O, o S. Dichos heteroátomos pueden ser hidroxilo, alcoxi, amino, mono o dialquilamino, tiol, alquiltiol, etc.

"Hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más sustituyentes hidroxilo.

65 "Exceso enantiomérico" se refiere a la diferencia entre la cantidad de enantiómeros. Se puede calcular el porcentaje de exceso enantiomérico (% ee) restando el porcentaje de un enantiómero del porcentaje del otro enantiómero. Por ejemplo, si el % ee del enantiómero-(R) es del 99% y el % ee del enantiómero-(S) es del 1%, el % ee del isómero-(R)

es del 99%-1% o del 98%.

"Grupo saliente" tiene el significado asociado convencionalmente con dicho término en química orgánica sintética, es decir, un átomo o un grupo que se puede desplazar mediante un nucleófilo e incluye halo (tal como cloro, bromo, y yodo), alcanosulfoniloxi, arenosulfoniloxi, alquilcarboniloxi (por ejemplo, acetoxi), arilcarboniloxi, mesiloxi, toxiloxi, trifluorometanosulfoniloxi, ariloxi (por ejemplo, 2,4-dinitrofenoxi), metoxi, N,O-dimetilhidroxilamino, y similares.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente seguro, no tóxico y ni biológicamente ni de otra manera indeseable, e incluye excipientes que son aceptables para el uso veterinario así como para el uso farmacéutico humano.

"Sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que tiene la actividad farmacológica deseada del compuesto progenitor. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidribenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto progenitor se sustituye por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o coordinadas con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares.

Los términos "pro-fármaco" y profármaco" se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a cualquier compuesto que libera un fármaco progenitor activo de acuerdo con la Fórmula I in vivo cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de un compuesto de Fórmula I se preparan modificando uno o más grupo(s) funcionales presentes en el compuesto de Fórmula I de tal manera que la(s) modificación(es) se puede(n) escindir in vivo para liberar el compuesto progenitor. Los profármacos incluyen compuestos de Fórmula I donde un grupo hidroxilo, amino, o sulfidrido en un compuesto de Fórmula I se une a cualquier grupo que se puede escindir in vivo para regenerar el grupo hidroxilo, amino, o sulfidrido libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero sin limitación, ésteres (por ejemplo, derivados de acetato, formato, y benzoato, carbamatos (por ejemplo, N,N-dimetilaminocarbonilo) de grupos funcionales hidroxilo en compuestos de Fórmula I, y similares.

"Grupo protector" se refiere a un resto, excepto los grupos alquilo, que cuando se une a un grupo reactivo en una molécula enmascara, reduce o evita esta reactividad. Se pueden encontrar ejemplos de grupos protectores en T.W. Green y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999, y Harrison y Harrison y col., Compendium of Synthetic Organic Methods, Volúmenes 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996). Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen grupos acilo, éteres de bencilo y tritilo, éteres de tetrahidropirranilo, éteres de trialkylsililo y alilo. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, grupos formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), terc-butoxicarbonilo (Boc), trimetil sililo (TMS), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), tritilo y tritilo sustituido, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC), nitro-veratriloxicarbonilo (NVO), y similares.

"Grupo protector correspondiente" significa un grupo protector adecuado que corresponde al heteroátomo (es decir, N, O, P o S) al cual está unido.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente efectiva" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su severidad, la edad, peso, etc., del mamífero que se esté tratando.

"Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye: (1) prevenir la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un mamífero que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de sus síntomas clínicos; o (3) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad o de sus síntomas clínicos.

Cuando se describe una reacción química, los términos "tratar", "poner en contacto" o "hacer reaccionar" se usan de manera indistinta en el presente documento, y se refieren a añadir o mezclar dos o más reactivos en las condiciones adecuadas para producir el producto indicado y/o deseado. Debe apreciarse que la reacción que produce el producto indicado y/o deseado puede no ser el necesariamente el resultado de la combinación de dos reactivos que se añadiesen inicialmente, es decir, puede haber uno o más intermedios que se producen en la mezcla que finalmente

conduce a la formación del producto indicado y/o deseado.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "aquellos definidos anteriormente" y "aquellos definidos en el presente documento" cuando se refieren a una variable incorporan por referencia la definición amplia de la variable así como cualquier definición más estrecha y/o preferida, más preferida y las más preferidas, en caso de haberlas.

La expresión "un derivado o un análogo de los mismos" se refiere a aquellos compuestos que se derivan de o que tienen una estructura básica similar y mantienen toda la actividad del compuesto al que se refieren. La expresión "toda la actividad biológica" se refiere a actividades biológicas citadas en el presente documento cuando se discute el compuesto, por ejemplo, la propiedad antagonista de TLR, etc.

"Dolor crónico" se refiere a dolor que persiste durante más tiempo que el curso temporal de la curación natural, asociado con un tipo concreto de lesión o proceso de enfermedad.

"Dolor nociceptivo" se refiere a dolor asociado con los nervios que sienten y responden a partes del cuerpo que sufren daños. El dolor nociceptivo está causado por una lesión o enfermedad fuera del sistema nervioso. Es a menudo un dolor o presión sorda permanente, en vez del dolor agudo similar al traumático más característico del dolor neuropático. Indican irritación de tejidos, lesión inminente, o lesión real. Cuando se activan, transmiten señales de dolor (a través de los nervios periféricos así como de la médula espinal) hasta el cerebro. El dolor está normalmente bien localizado, es constante, y tiene a menudo una cualidad de intenso. El dolor visceral es el subtipo de dolor nociceptivo que incluye a los órganos internos. Tiende a ser episódico y vagamente localizado. El dolor nociceptivo está a menudo limitado en el tiempo, por ejemplo, cuando el daño del tejido sana, el dolor normalmente desaparece. (La artritis es una excepción destacable en la que no está limitado). Normalmente, el dolor nociceptivo tiende a responder bien al tratamiento con opioides. Los dolores nociceptivos ejemplares incluyen esguinces, fracturas óseas, quemaduras, golpes, contusiones, inflamación (de una infección o trastorno inflamatorio), obstrucciones, y dolor miofascial (que pueden indicar esfuerzos musculares anormales).

### ***Descripción general***

Debido a la capacidad de transmisión del dolor, las neuronas han sido la principal diana intencional de todas las terapias farmacológicas desarrolladas hasta la actualidad. En general, se cree que los opioides modulan el dolor únicamente actuando en los receptores de opioides neuronales y que los antagonistas de opioides, del mismo modo, ejercen sus efectos únicamente en las neuronas. Además, se cree convencionalmente que los efectos perjudiciales (por ejemplo, tolerancia, hiperalgesia, dependencia, recompensa, etc.) y beneficiosos (por ejemplo, analgesia, supresión de la tos, etc.) de los opioides están mediados a través de mecanismos muy similares y potencialmente inseparables, dependientes de los receptores de opioides neuronales.

Por el contrario, los presentes inventores han demostrado que las células de inmunocomplemento del sistema nervioso central (glía), sus receptores, y sus factores de señalización secretados están involucradas en el procesamiento del dolor y farmacodinámica de los opioides. En particular, se ha demostrado que la glía tiene un papel en la iniciación y mantenimiento de la nocicepción aumentada en respuesta a una lesión nerviosa periférica. Recientemente, se ha sugerido que la glía también puede modular las acciones analgésicas de los opioides administrados de manera crónica. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención proporcionan direccionamiento farmacológico (por ejemplo, modulación) de la glía para modular (por ejemplo, reducir o eliminar) el dolor y una eficacia mejorada de los opioides.

Los presentes inventores también han demostrado que los opioides causan activación glial directa de una manera no típica de receptor de opioide, a través de la activación inducida por opioides de un tipo de receptores de reconocimiento de patrones llamados receptores de tipo toll (TLR). Los TLR son mediadores significativos del dolor neuropático, tolerancia a los opioides, dependencia de los opioides, y recompensa de los opioides. De esta manera, en algunos casos, antagonizar a los TLR revierte el dolor neuropático, y potencia la analgesia opioide y no opioide. También se divulgan en el presente documento los efectos beneficiosos (por ejemplo, la analgesia clásica mediada por el receptor de opioides neuronal) y perjudiciales (por ejemplo, efectos secundarios mediados por la glía) de compuestos analgésicos, como los opioides, y métodos para modularlos.

La activación glial también contribuye de manera significativa al dolor neuropático y al desarrollo de tolerancia a los opioides, dependencia de los opioides y recompensa de opioides. De esta manera, la atenuación de la activación glial alivia el dolor neuropático y reduce el desarrollo de tolerancia, dependencia y recompensa de los opioides. Se cree que la activación glial inducida por opioides sucede a través de un receptor no opioide debido a actividad de agonista no estereoselectiva. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención se refieren a la atenuación de la activación glial antagonizando o bloqueando a los TLR (por ejemplo, TLR2, TLR4, u otro TLR que pueda unirse tanto a analgésicos opioides, analgésicos no opioides o señales de peligro endógenas conocidas como agonistas de TLR, o una combinación de los mismos) o en generar reducir la activación glial. La reducción de la activación glial reduce los estados de dolor exagerados, potencia la analgesia de opioides, y reduce el desarrollo de tolerancia, dependencia y recompensa de los opioides.

Algunas de las demás afecciones clínicas asociadas con los TLR incluyen, pero sin limitación, patologías gastrointestinales (por ejemplo, colitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino irritable, y enfermedad celiaca), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, enfermedad coronaria inflamatoria, inflamación vascular, isquemia de miocardio/lesión de reperfusión, y aterosclerosis), diabetes (por ejemplo, diabetes/resistencia a la insulina, (muerte de células de islote)), afecciones relacionadas con el sistema inmune (por ejemplo, alergia, asma, eccema, trastornos autoinmunes incluyendo artritis, lupus y glomerulonefritis), patologías sistémicas (por ejemplo, septicemia primaria o secundaria, rechazo de trasplante de órganos, y toxicidad hepática), neurodegeneración (por ejemplo, trastornos neurodegenerativos que de manera general incluyen Alzheimer, Parkinson, demencia, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y envejecimiento), y otras funciones fisiológicas (por ejemplo, inducción del parto, fiebre, convulsiones, epilepsia, y epileptogénesis).

Convencionalmente, se vio la glía (astrocitos y microglía) como soporte estructural para neuronas e importante para mantener la homeostasis del sistema nervioso central (SNC). Se ha pasado por alto la glía en investigación sobre el dolor debido a su ausencia de axones y sus papeles aún por descubrir en la comunicación célula a célula. Los papeles de la glía del SNC en la provisión de vigilancia inmunaria, eliminación de residuos, y regulación de la composición iónica y química del espacio extracelular en la supervivencia del hospedador son bien conocidos. Sin embargo, se ha investigado solo recientemente una posible participación de la glía en varios estados del dolor. Una posible indicación de un papel potencial de la glía en la regulación del dolor es una unión asociativa entre la activación de astrocitos y el dolor neuropático, por ejemplo, los fármacos que bloquearon el dolor neuropático también disminuyeron la activación glial.

Tras la activación, las funciones de la microglía y astrocitos cambian en que producen y liberan varias sustancias neuroexcitantes que incluyen moduladores nociceptivos tradicionales, tales como especies de oxígeno reactivo, óxido nítrico, prostaglandinas, aminoácidos excitantes, factores de crecimiento, y citoquinas proinflamatorias, que también se reconoció recientemente. Las principales entre las citoquinas proinflamatorias son interleucina (IL)-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que la glía de la médula espinal es uno de los principales productores de estas citoquinas proinflamatorias en el sistema nervioso central. De hecho, la activación glial espinal y posterior liberación de mediadores proinflamatorios se cree que está relacionado con la iniciación y mantenimiento de varios estados de dolor potenciados incluyendo el dolor neuropático.

Hay varios puntos a lo largo de la regulación glial del dolor neuropático que pueden usarse como diana para tratar el dolor neuropático. Las terapias tradicionales para el dolor han usado normalmente como diana la transmisión de las señales de dolor a través de las neuronas con éxito limitado. Sin embargo, solo tratar el componente neuronal de la patología deja al componente glial sin disminuir, todavía intentando comunicarse con neuronas para propagar señales de dolor. Es posible que la glía sean neuronas activadoras mediante diferentes vías/cascadas de señalización intracelular que se modulan mediante fármacos dirigidos a neuronas. Quizá esta explicación puede aclarar la desafortunada ausencia de éxito generalizado de las actuales terapias para el dolor.

Se cree que uno de los pasos iniciales en la vía del dolor neuropático es la activación de la glía. Se han identificado varias señales de activación glial. La señal (o las señales) que inicia la activación glial puede variar dependiendo de la lesión. Varios mediadores de la activación glial están bien caracterizados incluyendo a fractalquina liberada neuronalmente y los moduladores y transmisores nociceptivos neuronales, tales como especies de oxígeno reactivo, óxido nítrico, prostaglandinas, aminoácidos excitantes, sustancia P, ATP, factores de crecimiento, y citoquinas proinflamatorias. En la mayoría de estos casos, se han caracterizado los sucesos mediados por receptores conocidos.

Pueden usarse como dianas varios puntos en el dolor neuropático para tratar el dolor neuropático con el que contribuye la glía. Se necesita una señal de activación o una serie de señales de activación para activar la glía. La activación de la glía está a menudo mediada mediante receptores de la superficie celular que pueden antagonizarse. La expresión "activación glial" se refiere al estado en que la glía libera mediadores proinflamatorios. Este estado (es decir, la activación glial) puede modularse o atenuarse, por tanto inhibiendo varios eventos celulares que bloquean la activación glial o sus consecuencias aguas abajo. Puede también producirse un ambiente antiinflamatorio que aumenta el umbral que tiene que superar una señal de activación para activar las células.

Los mediadores inflamatorios inmunes como citoquinas proinflamatorias pueden neutralizarse antes de alcanzar a su diana de receptor pretendida (pre y/o postsináptica) usando receptores solubles (que existen de manera endógena), anticuerpos neutralizantes, o compuestos que disminuyan la maduración de citoquinas en su forma activa o aumenten la velocidad de degradación de citoquinas. La acción de muchos mediadores o neuronas inflamatorias gliales (pre y/o postsinápticas) también pueden antagonizarse en sitios de receptor neuronal. Hay cientos de terapias dirigidas a neuronas empleadas actualmente que disminuyen la señalización neuronal de las señales de dolor (pre y/o postsinápticas).

Algunos aspectos de la invención se refieren a modular el iniciador y mediador del dolor neuropático que incluye señales retransmitidas por receptores similares a toll (TLR), tales como TLR2, TLR4, otro TLR que reconoce señales de peligro endógenas, o una combinación de las mismas. Los TLR son una familia de aproximadamente 10 receptores sencillos transmembrana que reconocen un intervalo amplio de restos o "patrones" de sustancias exógenas (por ejemplo, lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, tales como *E. coli* y *Salmonella*) y endógenas (por

ejemplo, proteínas de choque térmico y componentes de la membrana celular liberados por células dañadas) que se consideran como señales de peligro y por lo tanto ordenan la activación del sistema inmune innato dirigido a defender la supervivencia del hospedador. TLR4 se ha caracterizado de manera extensa, ya que es el TLR que reconoce a LPS. La unión de agonistas a TLR activa las vías de señalización intracelular aguas abajo (similar a la unión de IL-1 a su receptor cognato) lo que da como resultado una señal proinflamatoria.

Algunos aspectos de la invención modulan TLR4 que puede unirse tanto a analgésicos opioides, analgésicos no opioides o señales de peligro endógenas conocidas como agonistas de TLR, o una combinación de las mismas. Como se divulga en el presente documento, una amplia variedad de compuestos químicamente diversos pueden modular TLR2, TLR4, otros TLR como los anteriores o una combinación de las mismas. Sin estar ligado a ninguna teoría, usando TLR2 y TLR4 como ejemplares, se cree que TLR2 y TLR4 son algunos (pero no todos) los TLR claves para reconocer y responder a señales de peligro endógenas que se liberan por neuronas y otras células dañadas, en proceso de muerte o muertas y otras (ADN y ARN del hospedador, proteínas de choque térmico, componentes de la membrana celular, etc.) y aspectos más generales de lesión de tejidos (proteínas plasmáticas, productos de degradación de la matriz extracelular, etc.). Los presentes inventores han demostrado que la administración intratecal aguda de un antagonista selectivo de TLR4 en ratas normales suprime el dolor neuropático bien establecido introducido por lesión de constricción crónica.

La lesión del nervio periférico conduce a una expresión prolongada de proteínas de choque térmico en axones proximales de neuronas sensoriales dañadas y a la degradación de terminales presinápticos. La degeneración nerviosa en el sistema nervioso central sucede lentamente, tomándose de meses a años. Por lo tanto, está claro que las señales de peligro endógenas creadas como resultado de una lesión nerviosa pueden producir la activación conservativa de al menos TLR2 y TLR4 y, por lo tanto, una unidad conservativa para mantener el dolor neuropático. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que puede preverse que una activación en paralelo de al menos TLR2 y TLR4 suceda en, y sea a causa de, dolor por lesión en la médula espinal, dolor posterior a ictus, dolor por esclerosis múltiple y otros dolores cuyo origen está en el sistema nervioso central. Por consiguiente, puede usarse la modulación de la activación glial para tratar el dolor neuropático.

Algunos aspectos de la invención proporcionan compuestos y composiciones que pueden modular (por ejemplo, antagonizar) a TLR4 para el control del dolor neuropático. Ya que TLR2, TLR4, y otros TLR pueden señalar la presencia de señales de dolor endógenas, algunas realizaciones de la invención proporcionan compuestos y composiciones que pueden modular a TLR4. En algunas realizaciones, los compuestos y composiciones de la invención son permeables a la barrera sangre-cerebro.

El receptor de opioides se une a isómeros (-) de opioides de manera selectiva. Los presentes inventores han descubierto que una amplia variedad de compuestos son capaces de bloquear la activación de TLR4 inducida por LPS. Usando una línea celular transfectada de manera estable con TLR4 (Invivogen) con una cotransfección estable en un gen indicador de NF- $\kappa$ B (fosfatasa alcalina secretada embrionaria; SEAP) los presentes inventores han descubierto un antagonismo significativo no competitivo de la actividad de LPS en TLR4.

Los compuestos de la invención también revierten la alodinia inducida por CCI a continuación de una administración sistémica. Dichos resultados indican que moléculas pequeñas permeables a la barrera sangre-cerebro pueden usarse para antagonizar la actividad de TLR4 *in vivo*. Además, el antagonismo de TLR4 mediante moléculas pequeñas puede revertir la alodinia inducida por CCI. Estos datos también muestran un papel de los receptores TLR4 en el dolor neuropático. Se cree que la analgesia de los opioides puede no verse afectada ya que los compuestos de la invención carecen de actividad de opioide. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que los compuestos de la invención revierten el dolor neuropático antagonizando receptores TLR4.

Los compuestos de la invención también revierten la alodinia establecida y otros dolores neuropáticos. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que esta actividad se logra mediante sus acciones como antagonista de TLR4.

El modo de activación glial que da como resultado un dolor potenciado puede variar dependiendo de la lesión infligida. De esta manera, un tratamiento efectivo para el dolor neuropático depende normalmente de qué señales activadoras gliales son las responsables de la vía del dolor. Un enfoque terapéutico más amplio es inhibir o atenuar la actividad glial existente y/o productos liberados por la glía activada. En algunos casos, los compuestos de la invención revierten el dolor neuropático y devuelven al animal a la capacidad de respuesta al dolor basal, en vez de producir analgesia. Por lo tanto, todos estos tratamientos son anti alodínicos y/o anti hiperalgésicos, dejando la nocicepción basada sin afectar.

Los mediadores inflamatorios y pro-nociceptivos liberados por la glía en su estado activado son numerosos. Por lo tanto, antagonizar o neutralizar clínicamente cada mediador tiene sus limitaciones. Sin embargo, en algunos casos, las citoquinas proinflamatorias parecen ser uno de los factores en la potenciación glial del dolor. En algunos casos, neutralizar la acción de las citoquinas proinflamatorias principales (por ejemplo, IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) o antagonizar sus receptores se ha demostrado como una estrategia exitosa para prevenir y revertir el dolor neuropático.



Se ha observado que hay una similitud entre la activación glial observada en respuesta a neuropatía periférica y la activación glial posterior a la exposición crónica a opioides. También se ha observado que los agonistas opioides activan TLR2, TLR4, otros TLR, o una combinación de los mismos, y que los compuestos de la invención bloquean de manera no estereoselectiva uno o más de estos receptores.

5 Los presentes inventores han descubierto que los TLR son responsables tanto del dolor neuropático como de la activación glial inducida por opioides.

10 Desde el descubrimiento de la modulación de la función de los linfocitos T en 1979, una gran cantidad de trabajo se ha enfocado en caracterizar la influencia que la exposición a opioides tiene en el funcionamiento del sistema inmune en su papel tradicional de defensa del hospedador. Sin embargo, el impacto que tiene la activación de células inmunocompetentes sobre las acciones de los opioides se ha estudiado solo recientemente. Mientras que la modulación de las células inmunitarias periféricas mediante opioides es importante para entender la defensa del hospedador, estas células no tienen la misma probabilidad que la glía de tener un efecto profundo sobre la farmacodinámica de los opioides. Las células inmunocompetentes que median los efectos de la analgesia de los opioides son normalmente la glía de los ganglios de la raíz dorsal, médula espinal y cerebro. Las células inmunitarias periféricas se han implicado en varias enfermedades clínicas mediadas por TLR, como la enfermedad de Crohn.

20 Se ha reconocido recientemente una relación causal entre la activación glial inducida por opioides y el desarrollo de tolerancia a los opioides. Se cree que a continuación de la administración crónica de morfina, se producen tolerancia e hiperalgesia inducida por morfina, al menos en parte, como consecuencia de la activación glial. Un mecanismo que se ha propuesto como responsable de dichos efectos es mediante la activación de MAPK p38 inducida por óxido nítrico, con regulación positiva aguas abajo de citoquinas proinflamatorias. La interleucina-1, interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral, a su vez, se oponen a la analgesia de la morfina.

25 Se cree que la morfina actúa no solo en los receptores opioides clásicos en neuronas nociceptivas, sino también como una señal de activación glial que produzca los mismos, o al menos una cascada similar de eventos que de como resultado una nocicepción aumentada. La suma de la actividad anti nociceptiva neuronal de la morfina y su activación glial pro nociceptiva da como resultado una reducción neta en la analgesia. Además, la activación glial aumenta con el tratamiento prolongado con opioides y da como resultado una tolerancia analgésica que aumenta. Además, la activación glial inducida por opioides contribuye de manera significativa a la alodinia e hiperalgesia atípica como consecuencia de la administración crónica de opioides. Los presentes inventores han descubierto que IL-1, así como otras citoquinas proinflamatorias, se oponen a la analgesia de la morfina a los pocos minutos de la administración tanto sistémica como intratecal.

30 Los presentes inventores han observado una similitud entre las activaciones gliales inducidas por neuropatía o por opioides usando agentes que revierten la alodinia inducida por lesión nerviosa para definir si esos mismos agentes modulan también la analgesia de la morfina. Los presentes inventores han descubierto que agentes que se oponen al dolor neuropático ya sea suprimiendo la activación glial o neutralizando o antagonizando los productos gliales proinflamatorios también se oponen a la atenuación glial de la analgesia de la morfina, tanto aguda como crónica. La eficacia de la morfina puede potenciarse usando la activación glial inducida por opioides como diana o neutralizando o antagonizando la acción de citoquinas proinflamatorias.

45 Se cree que la activación de la glía no está mediada a través del receptor de opioides "similar a neuronal". Los presentes inventores han descubierto la participación de un receptor de opioides no clásico en la activación glial usando antagonistas de TLR, que posee actividad de receptor de opioides no clásica, causa una activación glial significativa, alodinia e hiperalgesia, así como la regulación positiva de ARNm, proteínas y liberación de citoquinas proinflamatorias. Algunas glías expresan receptores de opioides clásicos. Sin embargo, se cree que la inmunomodulación resultante de la exposición a los opioides no está mediada por estos receptores.

50 Se divulgan métodos para usar antagonistas de TLR para potenciar la analgesia de opioides (-) (por ejemplo, morfina), por ejemplo, bloqueando la activación glial inducida por opioides (-) y el consiguiente aumento de citoquinas proinflamatorias anti analgésicas. En algunas realizaciones, los antagonistas de TLR potenciaron de manera significativa la analgesia de los opioides tanto aguda como crónica.

55 Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que los opioides (-) que se usan para tratar el dolor son agonistas de TLR2, TLR4, otros TLR, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, cuando se ensayaron varios opioides (-) empleados clínicamente, se descubrió que eran antagonistas de TLR4. Estos agonistas de TLR4 opioides incluyeron morfina, metadona, oxycodona, buprenorfina, fentanilo y petadina/meperidina, entre otros.

60 En general, cualquier antagonista de TLR4 (por ejemplo, oxcarbazepina, venlafaxina u otros inhibidores de la recaptación de serotonina/norepinefrina) puede usarse para bloquear la activación de TLR por fármacos, por moléculas endógenas (señales de peligro endógenas) y por moléculas exógenas (bacterias, etc.). En general, un antagonista de TLR4 es útil para bloquear el agonismo de TLR4 por cualquier medio por el que se active TLR4.

65

Al usar como diana la activación de TLR gliales inducidos por opioides, los presentes inventores fueron capaces de reducir o prevenir este aspecto no deseado de la activación glial a causa del progreso hacia la tolerancia, alodinia e hiperalgesia inducida por opioides. La analgesia beneficiosa de opioides inducida neuronalmente deja de estar impedida mediante la activación glial inducida por opioides.

5 Se cree que al menos TLR4 es responsable de iniciar un componente de la activación glial inducida por opioides que contribuye de manera significativa a los efectos pro nociceptivos de la administración de opioides. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención proporcionan métodos para reducir los efectos pro nociceptivos de la administración de opioides mediante la administración de un antagonista de TLR.

10 Se ha observado que varios tratamientos inmunosupresores no selectivos mejoran los comportamientos de abstinencia a la morfina. Además, la participación glial en la potenciación del dolor durante la abstinencia de morfina se bloquea mediante antagonistas del receptor de IL-1 o IL-10.

15 La coadministración de un antagonista de TLR con un régimen de dependencia cada vez mayor de morfina redujo significativamente conductas precipitadas de abstinencia a naloxona. Además, hubo una reducción correspondiente en la activación glial en los núcleos cerebrales con acción opioide.

20 En otro experimento, se observó que un antagonista de TLR protege contra la dependencia previa y la abstinencia espontánea, como se refleja en la supresión de los niveles de actividad espontánea de abstinencia inducida y la pérdida de peso. Estos datos muestran que la activación glial inducida por opioides está involucrada en el desarrollo de dependencia a la morfina y la precipitación de comportamientos de abstinencia. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención proporcionan métodos para reducir la dependencia a los opioides, los comportamientos de abstinencia a los opioides, o una combinación de los mismos mediante la administración de un antagonista de TLR. Por ejemplo, los  
25 presentes inventores han observado que la coadministración de un antagonista de TLR redujo de manera significativa los comportamientos de abstinencia y atenuaron la pérdida de peso inducida por morfina.

30 Como se afirma anteriormente, los TLR median las acciones de refuerzo y adictivas de la morfina. Como tales, otros aspectos de la invención proporcionan métodos para aumentar las acciones beneficiosas, reducir los efectos no deseados, o una combinación de los mismos de los opioides. Dichos aspectos de la invención usan frecuentemente la activación glial como diana. Por ejemplo, se observó que la coadministración de un antagonista de TLR dio como resultado una reducción significativa de la recompensa de la morfina.

35 Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que la activación glial dependiente de TLR da como resultado dolor neuropático. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención proporcionan métodos para reducir el dolor neuropático modulando (por ejemplo, reduciendo o previniendo) la activación glial dependiente de TLR. Una realización particular incluye administrar un antagonista de TLR.

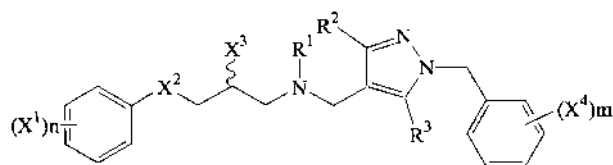
40 También se cree que la activación glial dependiente de TLR da como resultado efectos de opioide, tales como reducir la analgesia de opioides (por ejemplo, morfina), producir dependencia y recompensa a los opioides, y causar depresión respiratoria. Por lo tanto, otros aspectos de la invención proporcionan métodos para reducir o prevenir los efectos de opioides, por ejemplo, reducción de la analgesia, dependencia, recompensa o una combinación de los mismos de los opioides. Una realización particular incluye administrar un antagonista de TLR.

45 Los presentes inventores también han descubierto que antagonizar a los TLR o atenuar la activación glial en el dolor neuropático y durante la exposición a los opioides reduce, al menos parcialmente, la alodinia y reduce los efectos secundarios no deseados de los opioides, a la vez que mantienen la eficacia analgésica de los opioides. Los efectos secundarios negativos (es decir, no deseados) de los opioides pueden separarse de las acciones beneficiosas, por ejemplo, usando como diana la activación glial inducida por opioides usando farmacoterapias permeables a la barrera  
50 sangre cerebro, tales como antagonistas de TLR.

Se cree también que la activación glial es al menos responsable de la capacidad de recompensa de varios componentes abusados. Por lo tanto, la activación glial es un predictor del riesgo de abuso del fármaco por parte de un paciente. Los ejemplos de poblaciones de pacientes donde esto puede suceder incluyen VIH/SIDA, estrés, depresión,  
55 etc. En todos estos casos, el abuso de fármacos es una preocupación considerable. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención proporcionan métodos para reducir o prevenir el abuso del fármaco mediante la administración de un antagonista de la activación glial.

**Compuestos**

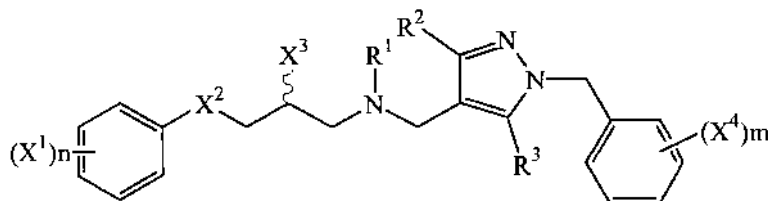
60 Algunos aspectos de la invención proporcionan un compuesto de fórmula I:

**I**

donde

5 cada uno de n y m es un número entero de 0 a 5;  
 cada uno de  $X^1$  es independientemente alcoxi, alquilo opcionalmente sustituido, o alqueniilo;  
 $X^2$  es O,  $\text{NR}^a$ , o S;  
 $X^3$  es  $-\text{OR}^b$ ,  $-\text{SR}^b$ , o  $-\text{NR}^b\text{R}^c$ ;  
 cada uno de  $X^4$  es independientemente haluro o alcoxi; y  
 cada uno de  $\text{R}^a$ ,  $\text{R}^b$ ,  $\text{R}^c$ ,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ , y  $\text{R}^3$  es independiente hidrógeno o alquilo.

10 En algunas realizaciones, el compuesto tiene la fórmula:



donde

15 cada uno de n y m es independientemente un número entero de 0-5;  
 normalmente cada uno de m y n es independientemente un número entero de 0-4;  
 a menudo cada uno de m y n es independientemente un número entero de 0-2; y  
 $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$ ,  $X^4$ ,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ , y  $\text{R}^3$  son los definidos en el presente documento.

20 En estas realizaciones, en algunos casos  $X^2$  es O. Además en otros casos,  $X^3$  es  $-\text{OH}$ . En otros casos adicionales,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  son alquilo. Normalmente,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ , y  $\text{R}^3$  son metilo. En otros casos adicionales,  $X^1$  es alcoxi, alquilo o alqueniil-alquilo heterosustituido. A menudo  $X^1$  es metoxi, metoxietilo, o alilo. En otros casos más,  $X^4$  es alcoxi, Cl, o F. De forma típica,  $X^4$  es metoxi o Cl.

25 Otros aspectos de la invención proporcionan una composición de un compuesto de Fórmula I, o una sal o su profármaco farmacéuticamente aceptable,

### Síntesis

30 Los compuestos de la invención pueden prepararse fácilmente a partir de los materiales de partida disponibles. Diversos sustituyentes en los compuestos de la invención pueden estar presentes en los compuestos, añadidos a uno cualquiera de los compuestos intermedios o añadidos tras la formación de los productos finales mediante métodos de sustitución o reacciones de conversión conocidos. Por ejemplo, se pueden añadir grupos nitro mediante nitración y el grupo nitro se puede convertir en otros grupos, tales como amino, mediante reducción, y halógeno, mediante diazotación del grupo amino y sustitución del grupo diazo con halógeno o sencillamente mediante reacción de halogenación. Se pueden añadir grupos acilo mediante acilación de Friedel-Crafts. A continuación, los grupos acilo se pueden transformar en los correspondientes grupos alquilo mediante diversos métodos, que incluyen la reducción de Wolff-Kishner y la reducción de Clemmenson. Los grupos amino se pueden alquilar para formar grupos mono y dialquilamino; y se pueden alquilar los grupos mercapto e hidroxilo para formar los éteres correspondientes. Los alcoholes primarios se pueden oxidar mediante agentes de oxidación conocidos en la materia para formar ácidos carboxílicos o aldehídos, y los alcoholes secundarios se pueden oxidar para formar cetonas. De esta manera, se pueden emplear reacciones de sustitución o alteración para proporcionar varios sustituyentes en la totalidad del material de partida, compuestos intermedios, o el producto final, incluyendo productos aislados.

45 Adicionalmente, como será evidente para los expertos en la materia, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales para evitar que determinados grupos funcionales experimenten reacciones indeseadas. La selección de un grupo protector adecuado para un grupo funcional concreto, así como las condiciones adecuadas de protección y desprotección, son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, se describen numerosos grupos protectores, y su introducción y eliminación, en T. W. Greene y G. M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1999, y las referencias citadas en los anteriores.

Como los compuestos de la invención pueden tener determinados sustituyentes que están necesariamente presentes, la introducción de cada sustituyente es, por supuesto, dependiente de los sustituyentes específicos implicados y de la química necesaria para su formación. De esta manera, las consideraciones de la forma en que un sustituyente se vería afectado por una reacción química cuando se forma un segundo sustituyente implicarían técnicas familiares para una persona normalmente experta en la materia. Esto sería dependiente del anillo implicado.

En algunos casos, se puede preparar una mezcla racémica de compuestos de la invención y el isómero (+) o (-) deseado se puede resolver o separar (es decir, enriquecerse enantioméricamente) utilizando cualquiera de la variedad de métodos de resolución quirales conocidos por un experto en la materia. Dichos métodos de resolución se describen, por ejemplo, en el cuarto volumen del compendio *Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds: Optical Resolution Information Center*, Manhattan College, Riverdale, N.Y., y en *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Jean Jacques, Andre Collet y Samuel H. Wilen; John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1981.

En algunos métodos de resolución, una mezcla racémica se convierte en una mezcla de diastereómeros mediante unión, tanto química como enzimática, de un resto relativamente enantioméricamente puro. A diferencia de los enantiómeros, la mayoría de los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo, solubilidad, punto de ebullición, afinidad (por ejemplo, para columnas de cromatografía y enzimas), y similares. Se pueden usar estas propiedades físicas diferentes para separar un diastereoisómero de otro, por ejemplo, mediante cristalización fraccionada, destilación cromatografía, resolución cinética usando una enzima, y similares.

Como alternativa, el compuesto se puede sintetizar enantioselectivamente partiendo de un material de partida enantioméricamente puro o enriquecido.

Cuando el compuesto de la presente invención contiene un resto olefina y dicho resto olefina puede tener configuración tanto cis como trans, se puede sintetizar el compuesto para producir cis o trans olefina, selectivamente, como el producto predominante. Como alternativa, se puede producir el compuesto que contiene un resto olefina como una mezcla de cis y transolefinas y separarse utilizando procedimientos conocidos, por ejemplo, mediante cromatografía tal como se describe en W.K. Chan, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96, 3642.

Los compuestos de la invención forman sales con ácidos cuando una función amino básica está presente y sales con bases cuando una función ácida, por ejemplo, ácido carboxílico o ácido fosfórico, está presente. Todas las sales mencionadas son útiles en el aislamiento y/o la purificación de los nuevos productos. De particular valor son las sales farmacéuticamente aceptables con ácidos y bases. Los ácidos adecuados incluyen, por ejemplo, clorhídrico, oxálico, sulfúrico, nítrico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, acético, maleico, tartárico y similares que son farmacéuticamente aceptables. Las sales básicas para uso farmacéutico incluyen sales de Na, K, Ca y Mg.

Están fácilmente disponibles métodos para producir muchos de los compuestos de la invención de diversos artículos de revistas, que se pueden obtener fácilmente, por ejemplo, investigando en la base de datos de los servicios del Chemical Abstrac, por ejemplo, CAS en línea.

### ***Composiciones farmacéuticas***

Los compuestos de la invención pueden administrarse a un paciente para lograr un efecto fisiológico deseado. Normalmente, el paciente es un mamífero, a menudo, un ser humano. El compuesto puede administrarse en varias formas adaptadas para la vía de administración seleccionada, es decir, por vía oral o parenteral. La administración parenteral, a este respecto, incluye la administración a través de las siguientes vías: intravenosa; intramuscular; subcutánea; intraocular; intrasinoval; transepitelial incluyendo transdérmica, oftálmica, sublingual y bucal; tópica incluyendo oftálmica, dérmal, ocular, rectal, y por inhalación (por ejemplo, por insuflación y aerosol); intraperitoneal; sistémica rectal, y central (por ejemplo, intratecal, tal como en el fluido cerebroespinal alrededor de la médula espinal, e intracerebral en el cerebro o en el fluido cefalorraquídeo del cerebro).

El principio activo puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede encapsularse en cápsulas duras o blandas de gelatina, o puede comprimirse en comprimidos, o puede incorporarse directamente con la comida de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el principio activo puede incorporarse con excipiente y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones pueden contener al menos un 0,1 % de principio activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones pueden, por supuesto, variarse y pueden estar convenientemente entre aproximadamente un 1 a aproximadamente un 10 % del peso de la unidad. La cantidad de principio activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones pereridas de acuerdo con la presente invención se prepararn de tal forma que una forma de dosificación unitaria oral contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg de principio activo.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener los siguientes: un aglutinante como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como

estearato de magnesio; y un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante como menta, aceite de gaultheria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, esta puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Pueden estar presentes otros varios materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la dosificación unitaria. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener al principio activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, y tintes y aromas, tales como aroma de cereza o fresa. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el principio activo puede incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

El principio activo también puede administrarse por vía parenteral. Las soluciones del principio activo como una base libre o sal farmacéuticamente aceptable pueden prepararse en agua adecuadamente mezcladas con un tensioactivo como hidroxipropilcelulosa. La dispersión también puede prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectables incluyen soluciones acuosas o dispersiones estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma tiene que ser estéril y tiene que ser fluido hasta el punto de que sea fácilmente inyectable. Puede ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y tiene que conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente de medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, usando un recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la adición de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el principio activo en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios otros ingredientes indicados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secados al vacío y la técnica de criodesecación que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución previamente esterilizada por filtración.

Los compuestos terapéuticos de la invención pueden administrarse a un mamífero solos o en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como se han señalado anteriormente, cuya proporción se determina mediante la solubilidad y naturaleza química del compuesto, vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar.

El médico determinará la dosificación de los presentes agentes terapéuticos que serán los más adecuados para la profilaxis o tratamiento y variarán con la forma de administración y el compuesto concreto elegido, y también, variará con el paciente concreto que esté sometido a tratamiento. El médico deseará generalmente iniciar el tratamiento con pequeñas dosis a pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto óptimo dependiendo de las circunstancias. La dosificación terapéutica puede ser generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg/día, y preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/día, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día y preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día y puede administrarse en varias dosificaciones unitarias separadas. Pueden necesitarse dosis mayores, del orden de aproximadamente 2X a aproximadamente 4X, para administración oral.

Objetos adicionales, ventajas, y características novedosas de esta invención harán evidentes para los expertos en la técnica tras la examinación de los siguientes ejemplos de la misma, que no se pretende que sean limitantes. En los ejemplos, los procedimientos que se reducen de manera constructiva a la práctica se describen en tiempo presente, y los procedimientos que se han llevado a cabo en el laboratorio se exponen en tiempo pasado.

## Ejemplos

Se cree que la glía se activa mediante opiáceos (por ejemplo, morfina, metadona, meperidina y oxicodona) y que esta respuesta glial inducida por opioides suprime la analgesia de los opioides, contribuyendo al desarrollo de tolerancia y dependencia a los opioides. Los presentes inventores han descubierto que la activación glial inducida por opioides se regula por la vía de señalización del receptor de tipo toll 4 (TLR4). TLR4 es un receptor transmembrana que funciona en complejo con su proteína accesoria, factor de diferenciación mieloide 2 (MD-2). El descubrimiento por parte de los

presentes inventores de que los opioides interactúan con TLR4 condujo al desarrollo de compuestos que pueden mejorar las terapias actuales de tratamiento del dolor basadas en opioides.

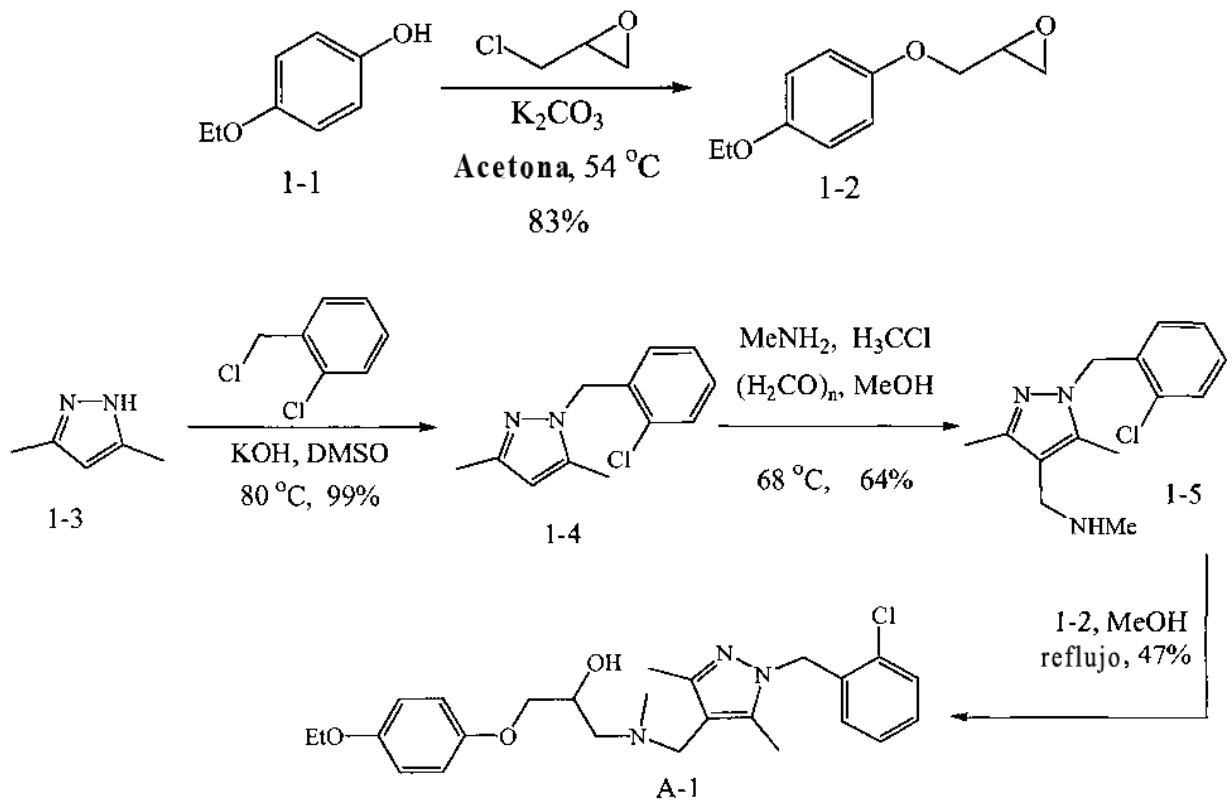
TLR4 es un receptor de superficie de la familia de proteínas TLR, un grupo de glucoproteínas integrales de membrana de tipo I que incluye más de 11 miembros homólogos. La estimulación de los distintos TLR induce distintos patrones de expresión génica, que no solo conduce a la activación de la inmunidad innata, sino que también instruye el desarrollo de la inmunidad adquirida específica de antígeno. Se cree que TLR4 detecta lipopolisacáridos (LPS, un agonista clásico de TLR4 y un componente de las paredes celulares bacterianas de bacterias gram negativas) y por lo tanto es importante en la activación del sistema inmune innato. Dentro del sistema nervioso central (SNC), se cree que TLR4 se expresa principalmente por la glía (predominantemente microglía pero también algunos astrocitos) pero no por neuronas. Esta glía está formada por células inmunocompetentes importantes en las respuestas inmunes innatas del SNC. La distinción funcional entre neuronas y glía indica que es posible usar de manera selectiva a la glía como diana sin afectar a las neuronas. Esta selectividad permitió métodos para potenciar los efectos analgésicos de la morfina. En algunas realizaciones, suprimiendo los efectos secundarios activadores de la glía de la morfina, pero manteniendo el efecto analgésico en las neuronas, es posible mejorar la actividad de la morfina mientras que se inhiben de manera simultánea las vías que contribuyen al desarrollo de tolerancia y adicción a los opioides.

La interacción TLR4/MD-2 es una de las dianas terapéuticas atractivas ya que la interacción es parte de la vía de señalización de TLR4. Además, MD-2 interactúa principalmente con TLR4 de entre la familia de proteínas TLR. Dichos descubrimientos permiten selectividad y especificidad para los moduladores de molécula pequeña (por ejemplo, inhibidores). En algunas realizaciones, se usó un enfoque de biología química para establecer el complejo TLR4/MD-2 como una diana válida para el descubrimiento de fármacos usando dos sondas de molécula pequeña que se dirigen a la interfaz TLR4/MD-2: uno que se dirige a ambos compañeros de unión de la proteína. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* mostraron la eficacia de las moléculas. Estos resultados muestran una nueva estrategia para suprimir la activación glial inducida por opioides. Dicha estrategia también proporciona herramientas para investigar el desarrollo de dependencia y tolerancia a los opioides.

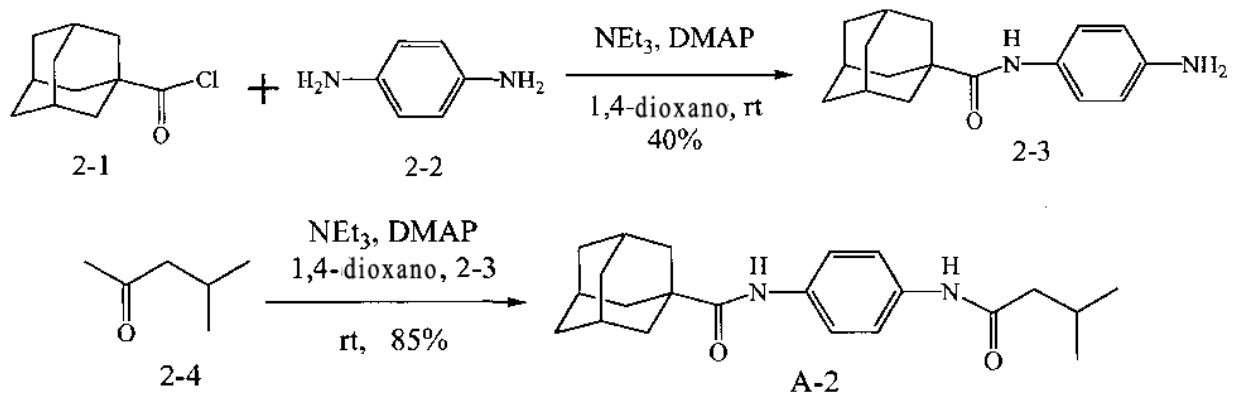
Para identificar sondas de molécula pequeña para investigar la activación glial mediada por TLR4, los presentes inventores usaron estructuras de rayos X de alta resolución del complejo TLR4/MD-2. Se desarrolló una metodología de detección *in silico* de alto rendimiento para identificar inhibidores selectivos de la vía de señalización de TLR4. La metodología se aplicó a ambas proteínas en el complejo, que usaba la interfaz proteína-proteína como diana para tanto validar la estrategia como maximizar las probabilidades de identificar sondas químicas útiles. Partiendo de la estructura en alta resolución de MD-2 (PDB ID 2E56, resolución 2,00 Å), se relajó primeramente la proteína con un ciclo de dinámica molecular para establecer cada diana de proteína, representadas usando varias conformaciones de proteína. La estructura de TLR4 se tomó del complejo del TLR4 humano con el antígeno 96 de linfocitos (PDB ID 2Z65, resolución 2,70 Å).

Las estructuras de ligandos para evaluación virtual se tomaron de la biblioteca de la colección de evaluación ENAMINE que contiene 1 millón de agentes de molécula pequeña tipo fármaco. La biblioteca se agrupó primeramente usando el algoritmo Jarvis-Patrick implementado en QUANTUM. La medida de la disimilitud ("distancia") entre las moléculas se determinó mediante similitud de Tanimoto calculada con Huellas de luz diurna de las moléculas. El ciclo de dinámica molecular de perturbación de energía libre para todo el complejo proteína-ligando en ambiente acuoso se efectuó usando un modelo de solvatación continua desarrollado por los presentes inventores. Este método ha demostrado ser altamente preciso para calcular la energía libre de un líquido polar. El modelado condujo a una biblioteca enfocada de aproximadamente 10 mil representantes agrupados de peso molecular adecuado. Todos los compuestos seleccionaron se extrajeron de archivos sdf suministrados por ENAMINE, procesados mediante la recuperación de estructuras QUANTUM y componentes del programa informático de tipificación en modo de lotes y preparados para su posterior acoplamiento. Esta configuración, junto con los centroides de mejor agrupamiento, se seleccionó para simulaciones dinámicas moleculares posteriores. Además, se perfiló una "huella" de las coincidencias identificadas acoplándolas a un panel original de proteínas que representan al proteoma humano completo (aproximadamente 500 proteínas representativas seleccionadas entre varias familias de proteínas) y los datos de  $Cl_{50}$  recogidos para cada proteína/molécula pequeña y complejo proteína/proteína fuera de este panel. Efectuando estos agrupamientos adicionales, la probabilidad de identificar inhibidores altamente selectivos y específicos para las dos proteínas aumentó. El modelado mostró que el Compuesto A-1 se une a TLR4 con valores de  $Cl_{50}$  calculados  $< 10 \mu\text{M}$  y el compuesto de comparación A-2 era un potente antagonista de MD-2. Véase Figura 1.

Estos compuestos se sintetizaron como se muestra en los Esquemas 1 y 2. El compuesto de comparación A-2 se preparó en dos etapas mediante acilaciones iterativas de 1,4-difenilendiamina (2-2). La síntesis del compuesto A-1 se logró mediante alquilación del pirazol (1-3), seguido de una reacción similar a reacción de Mannich para producir el derivado de pirazol tetrasustituido (1-5). Finalmente, la apertura de epóxido del compuesto 1-2 con la funcionalidad amino del compuesto 1-5 proporcionó el compuesto A-1.



Esquema 1



Esquema 2

5 Estos compuestos también se evaluaron para la inhibición de la vía de señalización de TLR4 *in vitro* e *in vivo*. Un ensayo de inmunoprecipitación mostró que el compuesto A-1 y el compuesto de comparación A-2 interrumpieron la interacción TLR4/MD-2. Se cotransfectaron células HeLa con vectores de expresión para FLAG.sTLR4 y MD-2-FLAG-his. El complejo MD-2/proteína TLR4 se purificó a partir de los sobrenadantes del cultivo usando resina de níquel, se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante inmunotransferencia contra el marcador FLAG. La incubación del complejo MD-2/TLR-4 en presencia de 0,1-100  $\mu$ M de compuesto de comparación A-2 suprimió sustancialmente la unión de TLR4 a MD-2, cuantificada mediante visualización de los marcadores FLAG mediante transferencia de Western. El compuesto A-1 mostró un efecto similar (Figura 2).

10

La observación de la señalización de Akt1 demostró que tanto el compuesto A-1 como el compuesto de comparación A-2 bloquearon la señalización de TLR4 en una línea celular de macrófagos de rata (RAW 264.7). La actividad de TLR4 inducida por lipopolisacárido (LPS) inicia la cascada de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), provocando la traslocación de Akt1 a la membrana plasmática en macrófagos murinos. Las células RAW 264.7 transfectadas con un

15

indicador Akt1-GFP se trataron con fármaco y a continuación se activaron con LPS. En ausencia de LPS, Akt1-GFP se difundió de manera uniforme por todo el citosol según se observó mediante microscopía de fluorescencia. La adición de LPS (2 ng/ml) causó una rápida traslocación de Akt1-GFP a la membrana plasmática, disminuyendo la concentración de Akt1-GFP en el citosol. Dosis del compuesto A-1 tan bajas como 2  $\mu$ M y de compuesto de comparación A-2 tan bajas como 200 nM suprimieron sustancialmente la activación de la vía de señalización inducida por LPS. Véanse las Figuras 3A y 3B,

Después de la adición de LPS, las células mostraron un perfil de activación muy similar al de las células no tratadas. Figuras 3A y 3B. Una pequeña dosis de péptido C5a quimiotáctico (25 ng/mL) que estimula a PI3K15 fue capaz de rescatar la señalización de Akt inhibida por cualquiera de los compuestos. Se observó la traslocación global de Akt1-GFP a la membrana plasmática, lo que confirma que estas células mantuvieron las funciones de transducción de la señalización de Akt normales. Akt1 está directamente aguas abajo de TLR4 en la vía de transducción de señales. Por lo tanto, estos datos indican que tanto el compuesto A-1 y el compuesto de comparación A-2 bloquean la señalización mediada por TLR4 interactuando directamente con el complejo TLR4/MD-2. Los macrófagos murinos expresan varios TLR y receptores inmunes. La inhibición del agonismo inducido por LPS de TLR4 indica que ambos antagonistas son específicos para la vía de TLR4 frente a otros TLR. La actividad del compuesto A-1 se confirmó adicionalmente en un ensayo establecido de TLR4 en células HEK293, donde se localiza un gen indicador de fosfatasa alcalina aguas abajo del promotor de NF- $\kappa$ B. El compuesto A-1 fue efectivo bloqueando a los efectores proinflamatorios aguas abajo de TLR4 de manera dependiente de la dosis. Además, ni el compuesto A-1 ni el compuesto de comparación A-2 mostraron una toxicidad celular significativa. Véase Figura 4.

Se usó un modelo animal establecido para ensayar si los antagonistas de la señalización de TLR4 eran capaces de potenciar el efecto analgésico de la morfina *in vivo*. Se usó el test de Hargreaves para medir el tiempo que tardan en observarse respuestas de abstinencia inducidas por calor radiante en las patas traseras y colas de ratas no retenidas.

Después de la administración del fármaco, se registraron dos lecturas para cada sitio con latencias iniciales de 5-6 segundos. Después de estas medidas iniciales prefármaco, se inyectaron por vía intratecal los fármacos (en el espacio del fluido cerebroespinal que rodea a la médula espinal lumbosacral) y se volvieron a determinar las respuestas a calor radiante de las ratas durante un transcurso de tiempo de dos horas. La inyección de compuesto A-1 o compuesto de comparación A-2 individualmente no produjo efectos de comportamiento detectables (por ejemplo, no se autolesionaron con mordeduras o lucha, sin vocalización, ni otros signos de angustia). Aunque las sondas de molécula pequeña no tuvieron efecto en la respuesta al dolor en ausencia de morfina coadministrada, potenciaron significativamente los efectos analgésicos de la morfina de tal modo que las ratas mostraron la analgesia registrable máxima en la prueba durante el tiempo de dos horas (el calor se terminó automáticamente a los 10 segundos para evitar lesiones de tejidos).

Un enfoque de biología química para estudiar el campo de la neurobiología ha proporcionado una herramienta útil para entender los mecanismos de la activación glial. Usando evaluación *in silico* de alto rendimiento, los presentes inventores han identificado inhibidores selectivos y específicos de la interacción TLR4/MD-2. El compuesto de comparación A-2 se dirigió a MD-2 y el compuesto A-1 se dirigió a TLR4. También se demostró que ambos compuestos potencian los efectos analgésicos de la morfina. La interacción TLR4/MD-2 es una diana molecular adecuada para la regulación de la activación glial inducida por opioides. Algunos aspectos de la invención también proporcionan una estrategia terapéutica para suprimir la tolerancia y dependencia a opioides.

#### Modelado molecular y predicción de parámetros fisicoquímicos

El procedimiento de evaluación virtual incluyó dos etapas: acoplamiento a un modelo de proteína estática y refinamiento usando modelado dinámico de proteínas. El acoplamiento a modelos de proteínas dinámicos y estáticos se efectuó usando las utilidades del programa informático Quantum. El acoplamiento a un modelo estático de proteína incluyó la identificación de la posición del ligando en el bolsillo de unión con la energía mínima de unión, y estimación de la energía de unión. En el estudio de dinámica molecular, la energía de unión proteína-ligando calculada se refinó respecto a la flexibilidad de la proteína. El procedimiento de refinado usado fue un ciclo completo de dinámica molecular de perturbación de energía libre para todo el complejo proteína-ligando en ambiente acuoso. De esta manera, se refiere a flexibilidad tanto de proteína como de ligando.

#### Síntesis químicas

Todas las reacciones se llevaron a cabo en material de vidrio secado al horno o secado a la llama con nitrógeno seco o atmósfera de argón. Se destiló el metanol mediante destilación simple y se almacenó con tamices moleculares de 4 A. Se destiló la acetona antes del uso. La sal de HCl de metilamina se secó a alto vacío durante la noche utilizando P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> como oxidante. Todos los restantes reactivos y disolventes se usaron tal como se recibieron del proveedor. Se llevó a cabo la cromatografía instantánea utilizando gel de sílice 32-64  $\mu$ m. Se registraron los espectros de RMN <sup>1</sup>H a 300 MHz, 400 MHz, o 500 MHz en CDCl<sub>3</sub> usando el CHCl<sub>3</sub> residual (7,26 ppm) como patrón interno. Se registraron los espectros de RMN <sup>13</sup>C a 75 MHz en CDCl<sub>3</sub> utilizando el CHCl<sub>3</sub> residual (77,23 ppm) como referencia interna. Se determinó la masa exacta utilizando ionización por electropulverización.

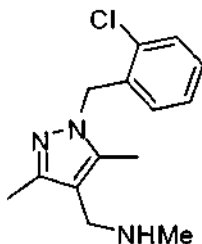


2-((4-etoxifenoxi)metil)oxirano

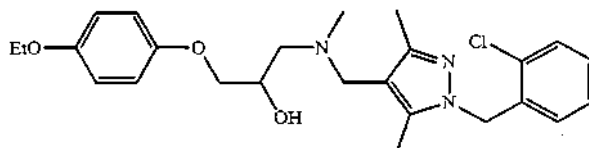
4-Etoxifenol (0,25 g, 1,81 mmol), carbonato de potasio anhidro (0,50 g, 3,62 mmol) y epíclorohidrina (0,57 ml, 7,24 mmol) se añadieron a acetona (4,52 ml) y la disolución heterogénea resultante se mantuvo a temperatura de reflujo durante 16 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un parche de celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El aceite resultante se disolvió en tolueno (20 ml), se lavó secuencialmente con agua (15 ml), disolución acuosa de NaOH al 5% (20 ml) y agua de nuevo (20 ml). La capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida para dar como resultado 0,292g (83%) de 2-((4-etoxifenoxi)metil)oxirano como un sólido de color blanco (pf= 41 °C). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,91 - 6,77 (m, 4H), 4,17 (dd, J= 11,0, 3,2, 1H), 3,98 (c, J = 7,0, 2H), 3,91 (dd, J = 11,0, 5,6, 1H), 3,34 (m, 1H), 2,90 (dd, J = 4,9, 4,1, 1H), 2,75 (dd, J = 5,0, 2,7, 1H), 1,39 (t, J = 6,98, 3H). RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153,72, 152,78, 115,90, 115,90, 115,59, 115,59, 69,71, 64,18, 50,49, 44,98, 15,15. HRMS (m/z): [MNa]<sup>+</sup> calc. para C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 217,08; encontrado 217,0826.

1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol

Se añadió hidróxido de potasio en polvo (1,751 g, 31,2 mmol) a una disolución de 3,5-dimetilpirazol (2 g, 20,81 mmol) en DMSO anhidro (10,40 ml) y la disolución heterogénea resultante se agitó durante 1,5 h a 80 °C antes de enfriarse a temperatura ambiente. A continuación se añadió cloruro de 2-cloro bencilo (2,64 ml, 20,81 mmol) en DMSO 6 M durante 15 min, y la disolución se agitó durante 1,5 h. Tras la finalización, que se observó mediante TLC, la reacción se vertió en agua y la fase acuosa resultante se extrajo con porciones de 20 ml de CHCl<sub>3</sub>. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 100 ml de agua, se secaron con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a presión reducida para dar como resultado 4,55 g (99%) de 1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol como un líquido transparente. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,41 - 7,31 (m, 1H), 7,24 - 7,09 (m, 2H), 6,59 - 6,50 (m, 1H), 5,90 (s, 1H), 5,31 (s, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,15 (s, 3H). RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148,32, 139,96, 135,46, 131,96, 129,42, 128,76, 127,72, 127,48, 105,84, 50,12, 13,80, 11,15. HRMS (m/z): [MNa]<sup>+</sup> calc para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 243,07; encontrado 243,0651.

1-(1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-N-metilmetanamina

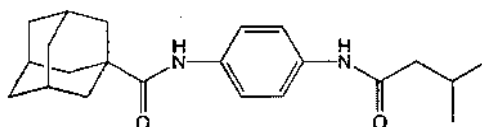
Una disolución de 1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol (1,00 g, 4,53 mmol), paraformaldehído (0,82 g, 27,20 mmol) y HCl de metilamina (0,92 g, 13,59 mmol) se disolvió en metanol (9,06 ml) se agitó a 60 °C durante 24 h. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se inactivó rápidamente con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (15 ml). Se extrajo la capa acuosa 3 veces con éter (15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml). La capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El aceite de color amarillo resultante se purificó utilizando cromatografía instantánea en columna con 1:4:0.01 de acetato de etilo:hexanos:trietilamina como disolvente eluyente dando como resultado 0,73 g (62%) de 1-(1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-N-metilmetanamina como un aceite transparente. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,40 - 7,31 (m, 1H), 7,23 - 7,08 (m, 2H), 6,54 - 6,43 (m, 1H), 5,32 (s, 2H), 3,31 (s, 2H), 2,91 (s, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,12 (s, 3H). RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148,12, 138,48, 135,57, 131,94, 129,42, 128,72, 127,61, 127,41, 114,38, 50,24, 49,08, 40,68, 12,36, 9,75. HRMS (m/z): [MH]<sup>+</sup> calc para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>, 264,13; encontrado 264,1253.

1-(((1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)metil)(metil)amino)-3-(4-etoxifenoxi)propan-2-ol

2-((4-Etoxifenoxi)metil)oxirano (0,06 g, 0,32 mmol) y 1-(1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-N-metilmetanamina (0,10 g, 0,38 mmol) se disolvió en metanol (0,32 ml), se calentó a 68 °C y se agitó hasta que se consumió el oxirano tal como se observó mediante TLC. La disolución se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite resultante se purificó utilizando cromatografía instantánea en columna con 1:2:0,01 acetato de etilo:hexanos:trietilamina como el disolvente eluyente para dar como resultado 0,09g (63%) de 1-(((1-(2-clorobencil)-3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)metil)(metil)amino)-3-(4-etoxifenoxi)propan-2-ol como un

líquido transparente. RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,35 (dd, *J* = 7,8, 1,2, 1H), 7,17 (td, *J* = 7,7, 1,3, 1H), 7,12 (td, *J* = 7,5, 1,2, 1H), 6,85 - 6,79 (m, 4H), 6,48 (dd, *J* = 7,6, 0,9, 1H), 5,28 (s, 2H), 4,12 - 4,04 (m, 1H), 3,97 (c, *J* = 7,0, 2H), 3,90 (d, *J* = 4,9, 2H), 3,47 (d, *J* = 13,2, 1H), 3,34 - 3,29 (m, 1H), 2,60 (dd, *J* = 12,2, 9,7, 1H), 2,48 (d c, *J* = 12,2, 3,9, 1H), 2,26 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 1,38 (t, *J* = 9,1, 3H). RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153,47, 153,04, 148,04, 138,67, 135,31, 131,92, 129,43, 128,79, 127,58, 127,50, 115,63, 115,63, 115,53, 115,53, 113,71, 71,25, 66,37, 64,14, 59,51, 51,70, 50,28, 42,09, 15,13, 12,36, 9,82. HRMS (*m/z*): [MNa]<sup>+</sup> calc para C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>CN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>, 480,20; encontrado 480,2030.

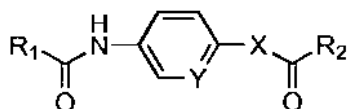
#### Compuesto comparativo A-2



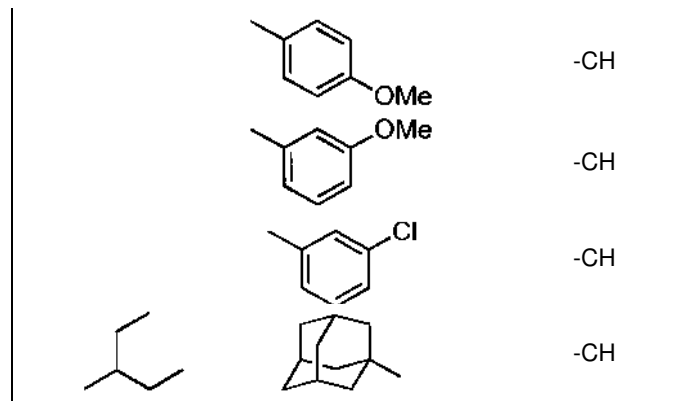
El cloruro de 1-adamantocarbonilo (238 mg, 1,20 mmol) se añadió a una mezcla de 1,4-difenilendiamina (108 mg, 1,0 mmol), trietilamina (202 mg, 2,00 mmol), DMAP (6 mg, 0,05 mmol) y 1,4-dioxano (4.0 ml) a ta. Después de agitar durante 12 horas, la mitad del disolvente de reacción se evaporó y la disolución posterior se sometió a cromatografía en columna con EtOAc como eluyente. El compuesto intermedio se obtuvo como un polvo incoloro; rendimiento 113 mg, 40 %. Se añadió cloruro de isovalerilo (14 mg, 0,10 mmol) a una disolución del intermedio (27 mg, 0,10 mmol), trietilamina (20 mg, 0,20 mmol), DMAP (1,2 mg, 0,010 mmol) y 1,4-dioxano (1.0 ml) a ta. Después de agitar durante 12 horas, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía en columna (1:1 EtOAc-Hexanos). El compuesto A-2 se obtuvo como un polvo incoloro; rendimiento 30 mg, 85 %.

#### Otros compuestos

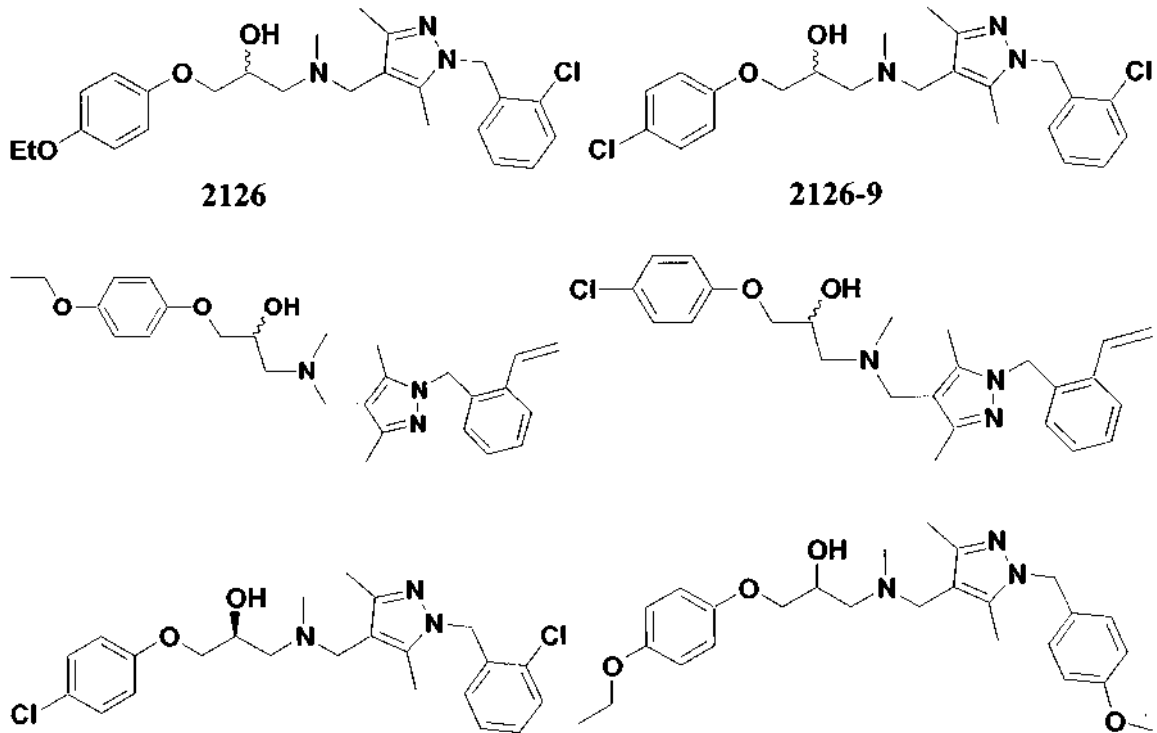
Algunos de los compuestos comparativos representativos que se prepararon y ensayaron se relacionan a continuación (algunas de las sales y los isómeros enantioméricamente enriquecidos se prepararon también pero no se muestran por separado):

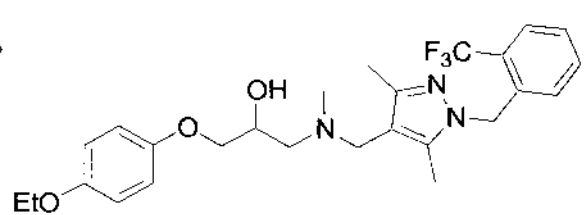
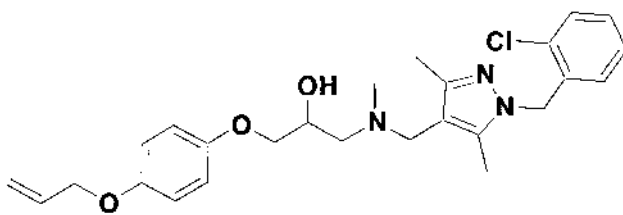
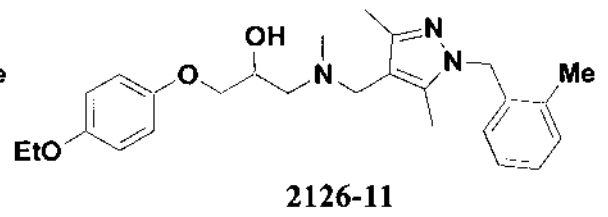
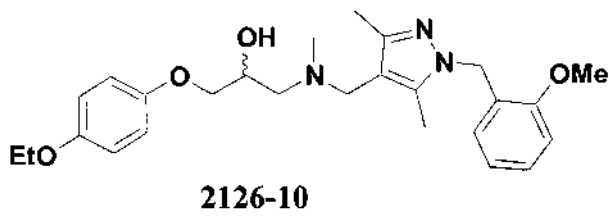
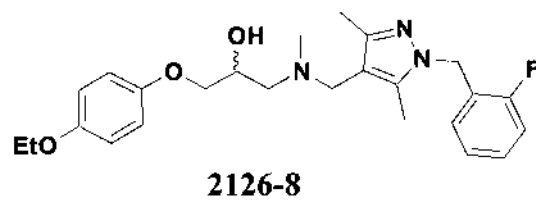
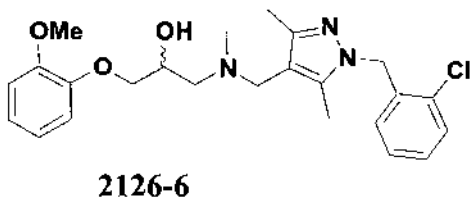
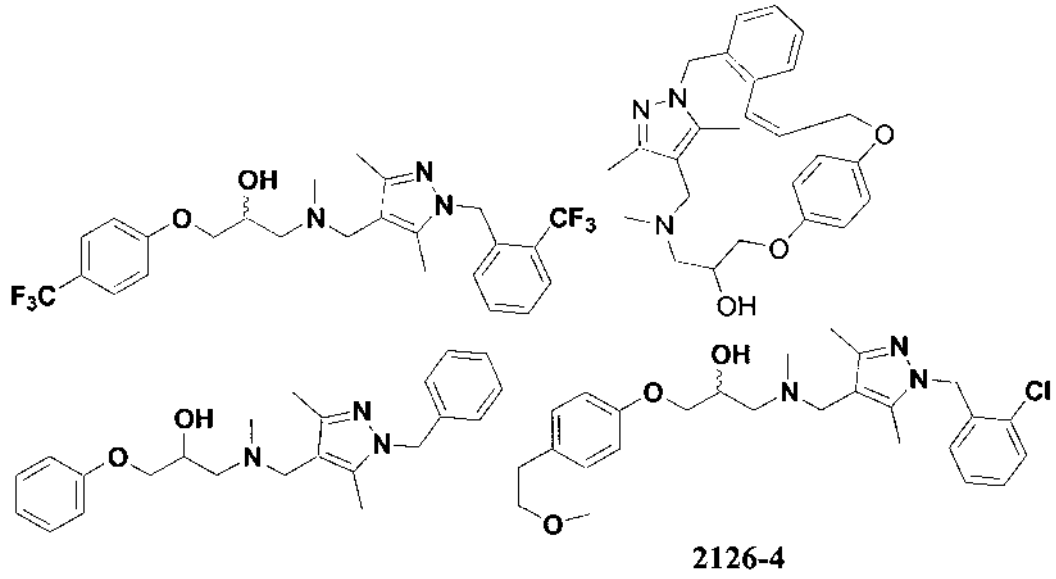
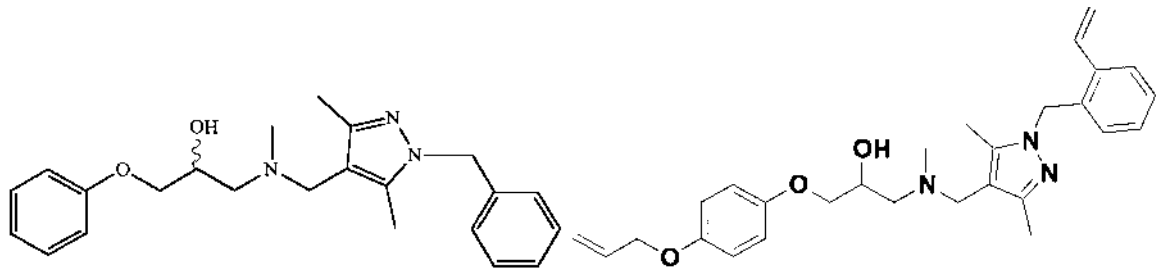


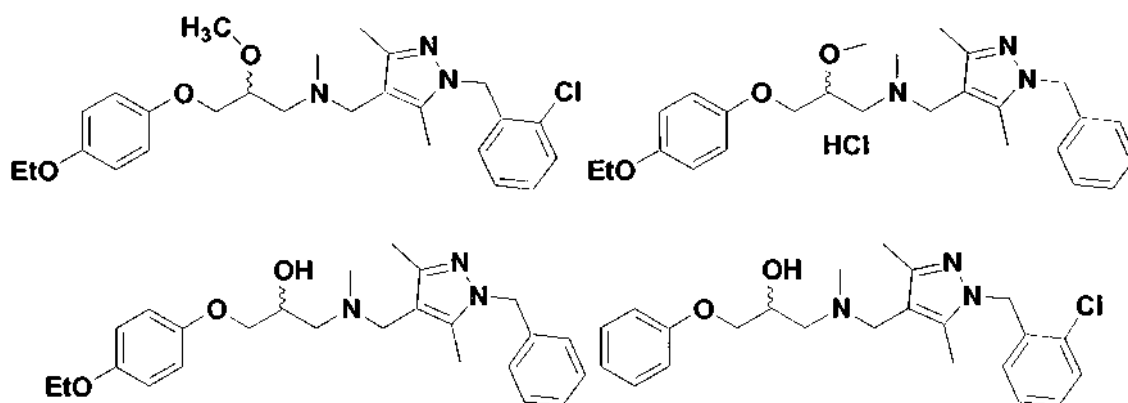
X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Y
-NH-		<i>iso</i> -butilo (A-2)	-CH (cpd nº 4019)
		<i>n</i> -butilo	-CH
		<i>sec</i> -butilo	-CH
		terc-butilo	-CH
			-CH
		<i>iso</i> -butilo	-N
		<i>n</i> -butilo	-CH
		<i>sec</i> -butilo	-CH
-O-			-CH
		<i>iso</i> -butilo	-CH
		<i>n</i> -butilo	-CH
		<i>sec</i> -butilo	-CH
		terc-butilo	-CH
		<i>n</i> -pentilo	-CH
			-CH
			-CH



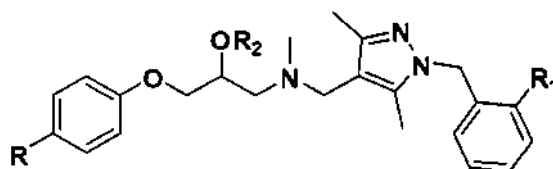
Se relacionan a continuación algunos de los compuestos representativos de la invención que se prepararon y ensayaron (algunas de las sales y los isómeros enantioméricamente enriquecidos se prepararon también pero no se muestran por separado):







Otros compuestos ilustrativos de la invención incluyen los siguientes:



5

R	R1	R2
-OH	-Cl	-H
-H	-H	-CH <sub>3</sub>
-OEt	-Cl	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

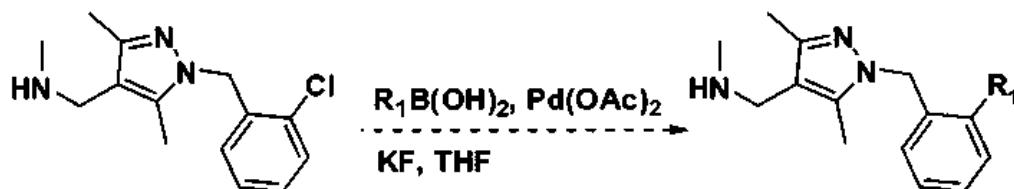
La sustitución de un OH en la posición R amplía las relaciones de actividad de la estructura (SAR) con respecto a los éteres que se prepararon en esta posición.

10

Una versión metil éter del compuesto 2126 mostró una excelente actividad. Los compuestos de la invención incluyen otros derivados de éter tales como bencil éter. Si los compuestos de éter muestran una actividad biológica aumentada, entonces esto puede indicar que el grupo hidroxilo está enfrentado a un bolsillo hidrófobo en el sitio de unión. Las versiones quirales de estos compuestos y de los éteres adicionales están comprendidas en el alcance de la presente invención, por ejemplo, R<sub>2</sub>= Et, iPr, t-Bu, etc.).

15

Los datos experimentales indican que los fragmentos de epóxido y de la amina son activos. Se pueden introducir interacciones hidrófobas adicionales en los compuestos de la invención, por ejemplo, utilizando la siguiente estrategia de reacción.



R<sub>1</sub> = Ph, Bn, alilo

20

#### Simulación de acoplamiento asistida por ordenador.

Los estudios de acoplamiento se efectuaron usando AutoDock 4.0. El algoritmo genérico Lamarckiano (LGA) y los ángulos de torsión del ligando se variaron usando AUTOTORS. Todos los demás procedimientos para el experimento de acoplamiento se siguieron como se describe en el manual del usuario para el programa AutoDock 4.0. Las conformaciones acopladas se clasificaron automáticamente por el programa AutoDock 4.0 usando una función de clasificación de campo de fuerza. Se encontraron un total de 100 agrupaciones conformacionales tras 100 ciclos usando una tolerancia de rmsd de 1,0 Å. Entre estos, uno de las estructuras con mayor calificación se usó para visualización

25

molecular.

#### Ensayo de inmunoprecipitación de TLR4/MD-2

5 Se crecieron células HeLa en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS) a una densidad de  $8 \times 10^6$ /ml y se transfectaron mediante electroporación (250V, 960  $\mu$ F) con 20  $\mu$ g de Flag-sTLR4 y 10  $\mu$ g de MD-2-Flag-His en Dulbecco PBS/DMSO al 1,25 %. Los plásmidos fueron una amable donación del laboratorio Fabio. Las células se replantaron en placas de 10 cm en DMEM que contenía FBS para permitir la recuperación y adhesión celular. Después de 6-8 h el medio celular se sustituyó por medio libre de suero 293 SFM2 (Invitrogen, CA, EE.UU.). El medio se recogió 24 h más tarde. Para capturar los complejos de proteína marcada con His, el medio filtrado se incubó con resina de níquel ProBond (Invitrogen, CA, EE.UU.) durante la noche. La resina se lavó a continuación con suero salino tamponado con fosfato (PBS), se resuspendió en tampón de muestra Lemmli, se hirvió y analizó mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirió usando AcM anti-Flag. El efecto de las moléculas pequeñas sobre la interacción de TLR4/MD-2 se determinó mediante la adición de compuestos disueltos en DMSO (y una cantidad igual de DMSO para el control) a las células antes de la incubación durante la noche.

#### Microscopía en tiempo real de la señalización de TLR4 en una línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7.

20 La señalización de TLR4 conduce a la activación simultánea de tres vías de señalización intracelulares paralelas. Dos de estas (a través de NF- $\kappa$ B y MAPK) se cree que son principalmente responsables de las respuestas proinflamatorias inducidas por la activación de TLR4, mientras que la tercera vía paralela (PI3K/Akt) se cree que está más relacionada con la supervivencia celular, la apoptosis y la motilidad celular. Ya que las tres se activan por agonismo en TLR4, cualquiera de estas puede usarse como un reflejo de la activación de TLR4. Dada la disponibilidad de una línea celular de macrófago de ratón RAW264.7 transfectada de manera estable para expresar Akt1 marcado con proteína verde fluorescente (GFP), la movilización y aclaramiento citosólico de GFP-Akt1 se usó como un indicador de la activación de TLR4. El lipopolisacárido (LPS; *Escherichia coli*, serotipo: 0111:B4) se obtuvo a través de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se crecieron en medio de crecimiento suplementado con FBS al 10 %, penicilina/estreptomicina 10x y L-glutamina 10x y después se emplacaron a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en medio de crecimiento en placas de fondo de vidrio de 35 mm MatTek (Ashland, MA, EE.UU.) durante 18 h antes de la obtención de las imágenes. Justo antes de la obtención de las imágenes, el medio de crecimiento se retiró de las placas, se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina tamponada de Hank (HBSS) suplementada con HEPES 25 mM tamponado a pH 7,4 y se reemplazó con 1 ml de medio tamponado de Hank templado acondicionado para la obtención de imágenes (el medio se acondicionó mediante una incubación de 24 h con células RAW264.7). La obtención de las imágenes se llevó a cabo en un microscopio invertido Nikon (Melville, NY, EE.UU.) con un objetivo de inmersión en aceite de 60x, un espejo dicroico GFP/RFP con los correspondientes filtros de excitación de una banda y de emisión (Chroma Technology, VT, EE.UU.) y una cámara CoolSNAP ES (Photometrics, Tucson, AZ, EE.UU.). Una lámpara de mercurio proporcionó la excitación. Las imágenes se capturaron cada 7,5 s. La fluorescencia inicial se capturó durante 5 fotogramas, tras lo cual se añadió vehículo o antagonista en 200  $\mu$ l. La obtención de imágenes continuó durante 20 fotogramas más, tras lo cual se aplicaron LPS o antagonista de ensayo (200  $\mu$ l) y se controlaron durante 20 fotogramas más. Si no se obtenía respuesta visual, se añadía C5a (200  $\mu$ l) a las placas para confirmar si las células tenían capacidad de respuesta. El aclaramiento citosólico de GFP-Akt1 se cuantificó usando ImageJ y se expresó como un cambio normalizado en la fluorescencia citoplásmica respecto al tiempo.

#### Ensayo de selectividad de LTR RAW264.7 con óxido nítrico

45 Se crecieron células RAW en DMEM suplementado con FBS al 10 %, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y L-glutamina (2 mM). Las células RAW se plantaron a continuación en placas de 96 pocillos a 100,000 células por pocillo y se crecieron durante 24 h en el medio descrito anteriormente. Después de 24 h, el medio se retiró y se reemplazó con Macrophage-SFM (Invitrogen, CA, EE.UU.). Las calles se doparon con los ligandos específicos de TLR apropiados: LPS (lipopolisacárido), poli(I:C) (ácido poliinosínico-policitidílico), FSL-1 ((S,R)-(2,3-bis(palmitoilo)propil)-Cys-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe), R848 (4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha$ , $\alpha$ -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol) y Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (W-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoilo)xi)-(2RS)-propil]-[R]-cisteinil-[S]-seril-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisina.3HCl) se usaron para ctivar de manera selectiva a TLR4, TLR3, TLR2/6, TLR7 y TLR2/1 respectivamente. Se prepararon dos calles para cada ligando, uno que contenía solo ligando y el otro con el ligando y 300 nM de compuesto A-1. Las placas se incubaron a continuación durante 24 h. Después de la incubación se retiraron 100  $\mu$ L de medio y se añadieron a placas de microfluorescencia negras planas de 96 pocillos (Thermo scientific, MA, EE.UU.). 10  $\mu$ L de 2,3-diaminonaftaleno (0,05 mg/ml en HCl 0,62 M) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 15 min. La reacción se inactivó mediante la adición de 5  $\mu$ L de NaOH 3 M y la placa se leyó en un lector Beckman Coulter DTX880 (Beckman Coulter, CA, EE.UU.) con excitación a 365 nm y emisión a 450 nm. La concentración de nitrito (un metabolito estable del óxido nítrico) se determinó a partir de una curva patrón de nitrito.

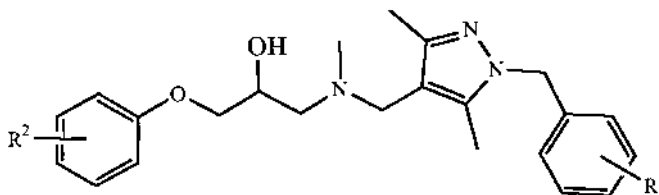
65 Para entender la especificidad de los inhibidores entre los diferentes TLR, la selectividad de un compuesto que mostró una inhibición del 99 % en el ensayo de activación del gen indicador SEAP (ver a continuación) se investigó midiendo la producción de óxido nítrico (NO) en células RAW. Las células RAW expresan todos los TLR y cada TLR específico puede activarse de manera individual mediante tratamiento con un ligando específico de receptor. La activación de los

TLR da como resultado la señalización aguas abajo y producción de mediadores proinflamatorios, tales como óxido nítrico (NO). Este compuesto (27  $\mu$ M) inhibió la producción de NO mediada por TLR4 pero mostró efectos insignificantes en la señalización de TLR3, TLR 2/6, TLR 2/1 y TLR7. Estos resultados indican que este compuesto inhibe selectivamente la activación de TLR4 inducida por LPS sin afectar de manera significativa a otros receptores tipo toll homólogos.

#### Ensayo de fosfatasa alcalina secretada (SEAP)

Los materiales para el ensayo SEAP se obtuvieron a través de Applied Biosystems (CA, EE.UU.) y se utilizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) transfectadas de manera estable con TLR4 y un gen indicador de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) se obtuvieron a través de Invivogen (CA, EE.UU.). Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina/estreptomicina 10x, L-glutamina 10x, normocina (ant-nr-1) 1x y HEK Blue (hb-sel) 1x. Las células se implantaron en placas de 96 pocillos durante 24 horas a 37 °C antes del tratamiento con el fármaco. En el día del tratamiento, el medio se eliminó de las placa de 96 pocillos, se reemplazó por tampón de fluido cerebroespinal (CSF) (NaCl 124 mM, KCl 5 mM, 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 3,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM y glucosa 10 mM, pH 7,4) que contenía 1-20 ng/ml de LPS, así como 0,2-50,0  $\mu$ M de fármaco o 3-400 ng/mL de LPS-RS con DMSO al 0,5 %.

Se recogió una muestra de tampón de CSF (15  $\mu$ L) de cada pocillo y se transfirió a una placa blanca opaca de 96 pocillos (Microfluor 2, Thermo Scientific, MA, EE.UU.). Cada pocillo se trató con 45  $\mu$ L de tampón de dilución 1x, se recubrió con Microseal (MSB1001, Bio-Rad, CA, EE.UU.) y se incubaron durante 30 min a 65 °C. Después de 30 min, se enfriaron las placas a temperatura ambiente sobre hielo y se añadieron 50  $\mu$ L de tampón de ensayo SEAP a cada pocillo. Después de una incubación de 5 min, se añadieron a cada pocillo 50  $\mu$ L de 3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2-(5-cloro)tríciclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il)fenil fosfato disódico (CSPD) diluido a 1:20 con tampón de reacción. Después de 20 min, se midió la luminiscencia de cada pocillo usando un lector de placas (Beckman Coulter, DTX 880, CA, EE.UU.) con programa informático de análisis multimodo. Algunos de los ensayos de activación de gen indicador de SEAP se muestran en la tabla a continuación:



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	% Inhibición
2-Cl	4-OEt	52 %
2-Cl	4-OEt	61 %
2-Cl	4-OEt	0 %
4-OMe	4-OEt	4 %
H	H	1 %
2-Cl	4-(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )OMe	32 %
2-Cl	2-OMe	36 %
2-Cl	4-Cl	99 %
2-F	4-OEt	40 %
2-OMe	4-OEt	35 %
2-Me	4-OEt	31 %

#### Ensayo de viabilidad celular

Se transfectaron células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) con TLR4 y las proteínas de ensamblaje y señalización necesarias (MD-2, CD-14, LPSBP, etc.). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10 %, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM), 0,1 mg/ml de normocina (InvivoGen, CA, EE.UU.) y reactivo de selección HEK Blue 1x (InvivoGen, CA, EE.UU.). Las células se implantaron en placas de 6 cm y se crecieron hasta un 65-75 % de confluencia incubando a 37 °C, antes del tratamiento con el fármaco. En el día del tratamiento, se retiró el medio de la placa de 6 cm y se reemplazó por tampón de fluido cerebroespinal (CSF) suplementado con tratamiento de fármaco. Después de 24 h de incubación a 37 °C, se retiró el CSF y se agitaron las células con tripsina al 0,05 % más 0,2 g/l de EDTA (Invitrogen, CA, EE.UU.) y se resuspendieron en medio DMEM fresco suplementado. Después de la resuspensión, se tomó una muestra de 100  $\mu$ l de cada placa de 6 cm, se mezcló suavemente con 100  $\mu$ l de Trypan Blue al 0,4 % (Sigma, MO, EE.UU.) y se dejó asentar durante 5 min. La proporción de células teñidas de azul respecto a células totales se cuantificó a continuación usando un hemocitómetro Bright Line de 0,1 mm de profundidad (VWR, PA, USA) bajo un microscopio de luz TMS de Nikon (Nikon Instrumentals, CA, EE.UU.).

### La regulación negativa de TLR4 y MD-2 mediante ARNi inhibe la activación de la microglía inducida por morfina

5 Una línea celular microglial murina, BV-2, se creció en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % FBS en un  
 matraz tratado con Primaria (Falcon, BD Bioscience, CA, EE.UU.). Las células se desprendieron del matraz mediante  
 digestión de tripsina cuando se alcanzó una confluencia de ~80 %. 6 µl de solución madre de ARNi SMART pool  
 (Dharmacon, Lafayette, CO, EE.UU.) (50 µM) se diluyó con 14 µl de D-PBS, y 8 µl de lipofectamina LTX (Invitrogen,  
 10 Carlsbad, CA, EE.UU.) se diluyó con 12 µl de D-PBS. A continuación, las soluciones de ARNi de TLR4 y lipofectamina  
 LTX se mezclaron suavemente juntas en los pocillos de una placa de 6 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente  
 durante 30 min. A continuación, se plantaron las células en la placa de 6 pocillos a una densidad celular de  $5 \times 10^4$   
 células por ml. Después de 48 h con el ARNi, se añadieron 200 µM de morfina. Las placas se incubaron durante 24 h  
 adicionales. Después se recogieron las células y se lisaron mediante reactivo de extracción de proteínas de mamífero  
 M-PER (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Para investigar el efecto de regular negativamente MD-2 o TLR4 en  
 15 un fondo de factores inflamatorios, se recogieron las células 72 h después de la adición del ARNi. Se analizaron los  
 niveles de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$  mediante ELISA (BD Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones  
 del fabricante.

### Inhibición de la activación de la microglía inducida por morfina mediante inhibidores de molécula pequeña

20 Se crecieron células BV-2 en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % FBS en un matraz tratado con Primaria  
 (Falcon, BD Bioscience, CA, EE.UU.). Las células se desprendieron del matraz mediante digestión de tripsina cuando  
 se alcanzó una confluencia de ~80 %. Las células se plantaron entonces en una placa de 6 pocillos a  $4 \times 10^5$  células  
 por pocillo y se crecieron durante 24 h. Después de 24 h, se retiró el medio y se reemplazó con DMEM suplementado  
 con FBS al 1 % y se añadió morfina (200 µM). Además, se coadministró el compuesto 1, 2 o 3 (10 µM) con la morfina  
 25 o en solitario. Las placas se incubaron durante 24 h adicionales. Después se recogieron las células y se lisaron  
 mediante reactivo de extracción de proteínas de mamífero M-PER (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). IL-1 $\beta$  se  
 analizó mediante ELISA (BD Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Determinación de comportamiento de respuesta a calor radiante (Prueba de Hargreaves)

30 Se usaron en todos los experimentos ratas macho adultas Sprague-Dawley libres de patógenos (n=5-6 ratas/grupo  
 para cada experimento; 300-375 g; Harlan Labs, Madison, WI, EE.UU.). Las ratas se alojaron en salas de temperatura  
 (23 + 3 °C) y luz (ciclo de 12 hr:12 hr de luz:oscuridad; las luces se encienden a las 07:00) controladas con comida  
 estándar para roedores y agua disponibles *ad libitum*. Todo el ensayo se llevó a cabo en ciego respecto a la asignación  
 35 de grupos. Las ratas recibieron al menos tres habituaciones de 60 minutos al ambiente de ensayo adecuado antes de  
 la prueba de comportamiento. Los umbrales de respuesta de comportamiento a estímulos de calor aplicados a la cola  
 se determinaron usando una prueba de Hargreaves modificada. En resumen, los valores iniciales de abstinencia se  
 calcularon a partir de una media de dos latencias de abstinencia consecutivas de la cola, medidas a intervalos de 15  
 minutos. Las latencias para el estímulo termal al comienzo se encontraban en el intervalo de 2 a 3 segundos y se  
 40 impuso un tiempo de parada de 10 segundos para evitar el daño de tejidos. Las determinaciones de latencia de  
 abstinencia iniciales se efectuaron antes de, y de nuevo durante el curso temporal después de la administración del  
 fármaco. Los vehículos se administraron en volúmenes iguales a los fármacos ensayados.

### Modelo de inflamación de sangre completa

45 El ensayo de inhibición de TLR4 mediante compuestos de la invención respecto al impacto en la secreción de  
 citoquinas IL-6, IL-8, (TNF- $\alpha$ ) e IL-1 $\beta$  en el modelo de sangre completa de inflamación se llevó a cabo usando el  
 procedimiento descrito por Mollnes et al., (Blood, 2002, 100, 1869-1877) usando (i) LPS para comparar las dos  
 variantes de 2126-HCl en una configuración restringida, (ii) bacterias gram negativas para iniciar la respuesta  
 50 inmunitaria innata que incluye tanto a TLR4/MD-2, TLR2, así como el sistema de complemento (comparado con  
 anti-CD14 y compstatina).

La sal clorhidrato del compuesto 2126 (es decir, 2126-HCl) fue uno de los inhibidores de TLR4 más efectivos, en el  
 ensayo de sangre completa. Sus efectos sobre la liberación de citoquinas tras la estimulación de LPS se observaron a  
 55 concentraciones en el intervalo micromolar, y fue más efectivo que la sal de clorhidrato del compuesto 2126-9 a  
 concentraciones equimolares (150 µM) en presencia del activador inflamatorio LPS. La sal clorhidrato del compuesto  
 2126 no mostró efectos tóxicos significativos ni indujo hemólisis apreciable a estas concentraciones. La sal clorhidrato  
 del compuesto 2126 mostró una de las mayores inhibiciones de la secreción de IL-8 tras la estimulación con LPS y *E.*  
*coli*, en comparación y a diferencia de anti-CD14. La adición de inhibidor complementario compstatina disminuyó  
 60 adicionalmente la liberación de citoquinas en respuesta a *E. coli*. Sin embargo, la proporción entre los niveles de  
 citoquina ensayados permaneció igual para el bloqueo tanto mediante anti-CD14 como para la sal clorhidrato del  
 compuesto 2126 de la señalización aguas abajo. La compstatina por sí misma pareció específica para IL-8 e IL-1 $\beta$  y  
 tuvo escaso impacto en la secreción de la citoquina IL-6 temprana dependiente de CD14. Pero aumentó el efecto  
 65 inhibidor tanto de anti-CD14 como de 2126-HCl en los niveles de IL-6 cuando se usó *E. coli* como activador. Anti-CD14  
 fue muy activo en la reducción de los niveles plasmáticos de IL-6. Por el contrario, 2126-HCl pareció inhibir a IL-6 así  
 como a TNF- $\alpha$  y a IL-1 $\beta$ , pero de una manera significativamente menor a IL-8.

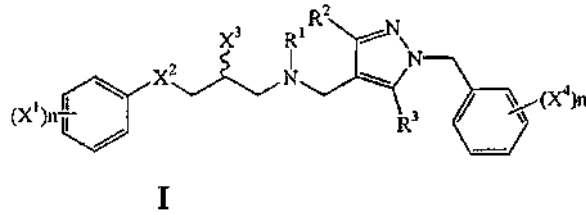


Interesantemente, la inhibición de CD14 no alteró los niveles en plasma de IL-1 $\beta$  regulados por complemento tras la estimulación con *E. coli* a pesar de que hubo una reducción del 100% cuando se usó LPS como activador. El supuesto inhibidor de TLR4, 2126- HCl (500  $\mu$ M), sin embargo, sí tuvo un impacto. Redujo los niveles en plasma de IL-1 $\beta$  en aproximadamente un 50 %, similar a lo que se logró mediante compstatina (25  $\mu$ M), y condujo a una reducción adicional del 30 % en presencia de compstatina.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



5 donde

cada uno de n y m es un número entero de 0 a 5;  
 cada uno de X<sup>1</sup> es independientemente alcoxi, alquilo opcionalmente sustituido o alquenilo;  
 X<sup>2</sup> es O, NR<sup>a</sup> o S;  
 X<sup>3</sup> es -OR<sup>b</sup>, -SR<sup>b</sup> o -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>;  
 cada uno de X<sup>4</sup> es independientemente haluro o alcoxi; y  
 cada uno de R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> es independiente hidrógeno o alquilo.

15

2. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1, donde X<sup>2</sup> es O.

3. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1, donde X<sup>3</sup> es -OH

4. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1, donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son alquilo.

20

5. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 4, donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son metilo.

6. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1, donde X<sup>1</sup> es alcoxi, alquilo o alquenil-alquilo heterosustituidos.

25

7. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1, donde X<sup>4</sup> es alcoxi, Cl o F.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la inhibición de la actividad del receptor TLR4 en un sujeto, tratando el dolor o un efecto secundario de opioides no deseado en dicho sujeto.

30

9. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho dolor comprende dolor crónico, nocicepción o una combinación de los mismos.

10. Una composición que comprende un opiáceo y un compuesto de la Reivindicación 1.

35

11. La composición de la Reivindicación 10, donde dicho opiáceo y dicho compuesto de la Reivindicación 1 se mezclan en último lugar.

12. La composición de la Reivindicación 10, donde la cantidad de dicho opiáceo es desde aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 % en relación a la dosificación recomendada de dicho opiáceo en ausencia de dicho compuesto de la Reivindicación 1.

40

13. La composición de la Reivindicación 10, donde la relación molar de dicho opiáceo a dicho compuesto de la Reivindicación 1 está en el intervalo de aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 10:1.

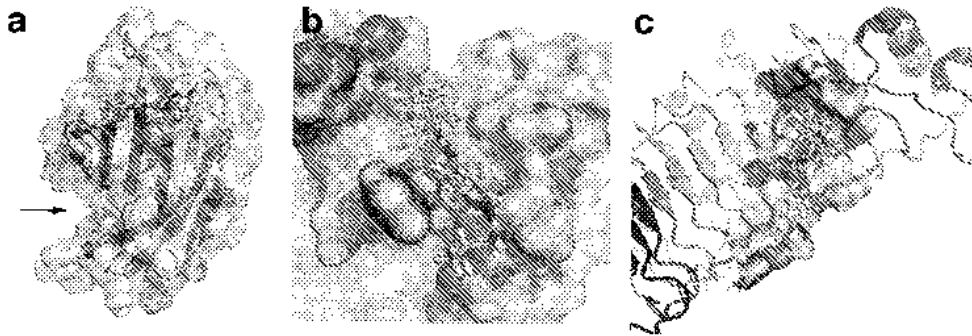


FIGURA 1

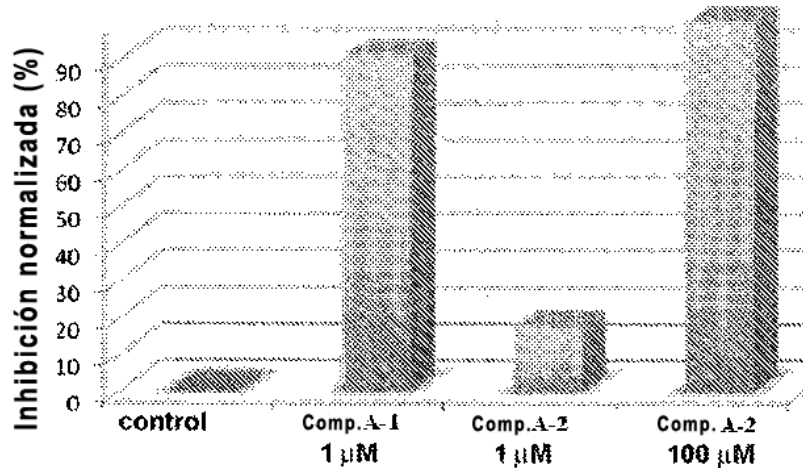


FIGURA 2

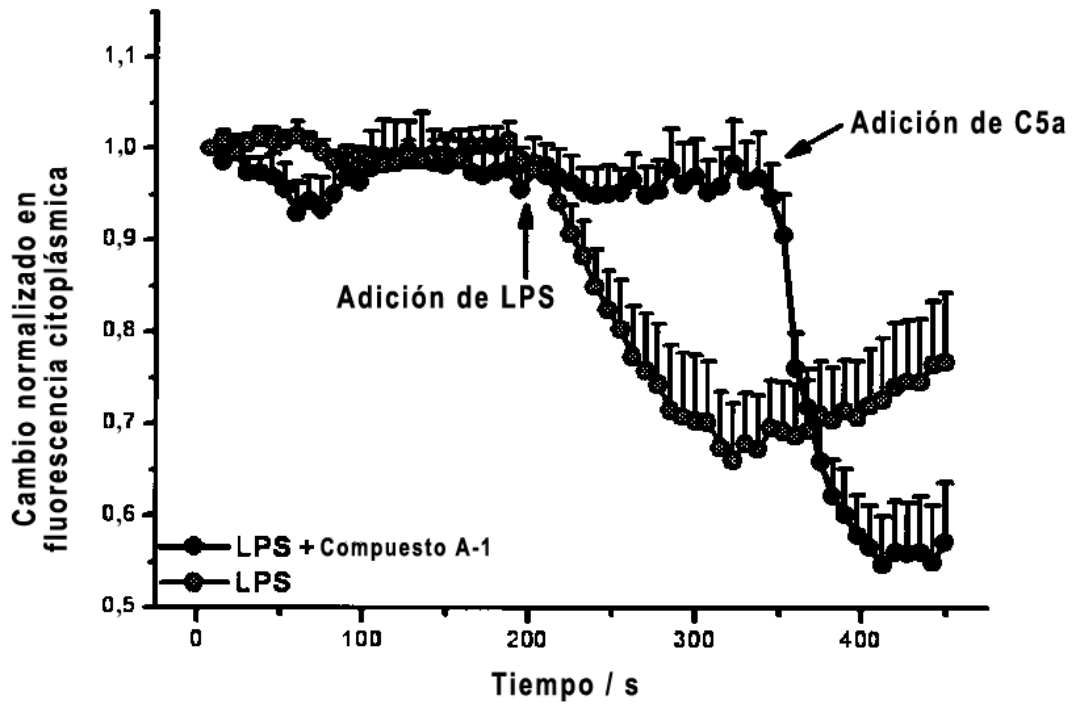


FIGURA 3A

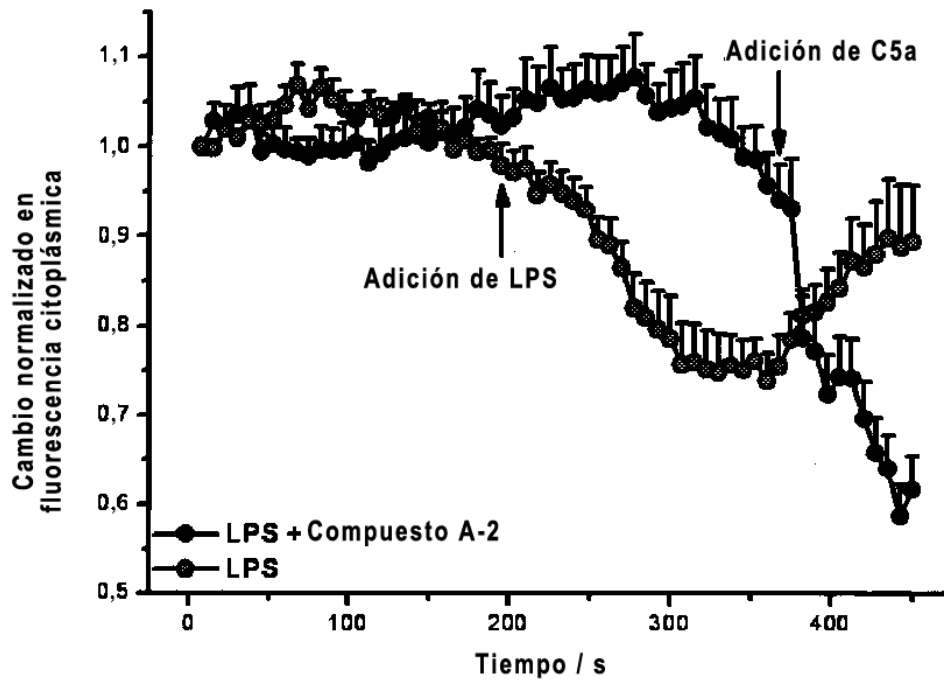


FIGURA 3B

### Viabilidad Celular

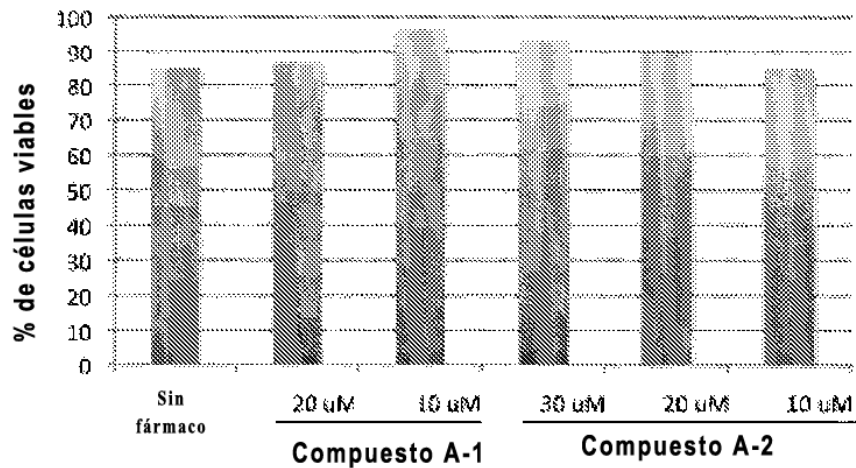


FIGURA 4

**Morfina + base de sal 2126**

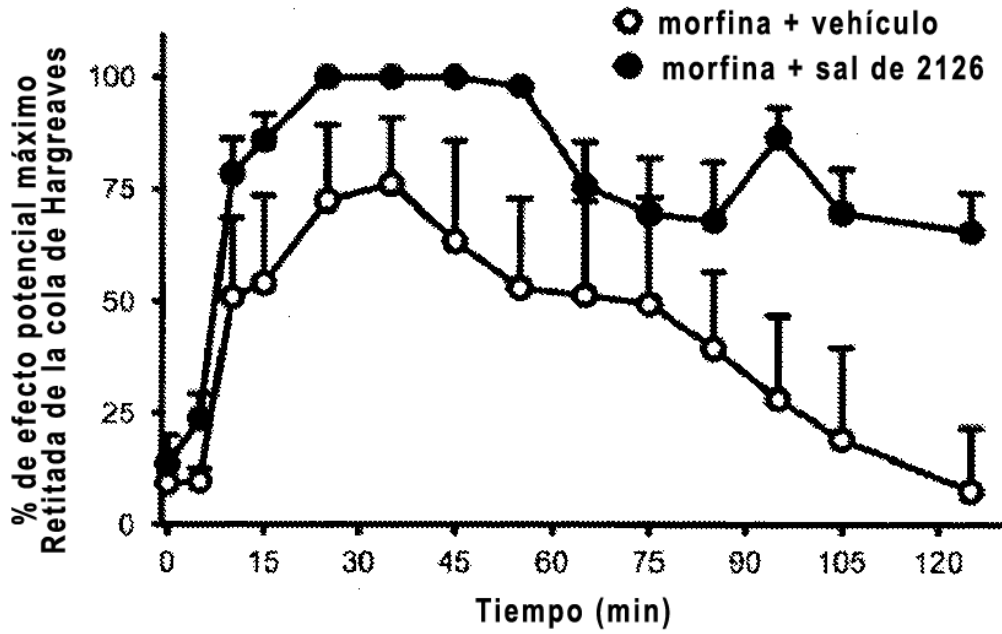


FIGURA 5A

**Cola**

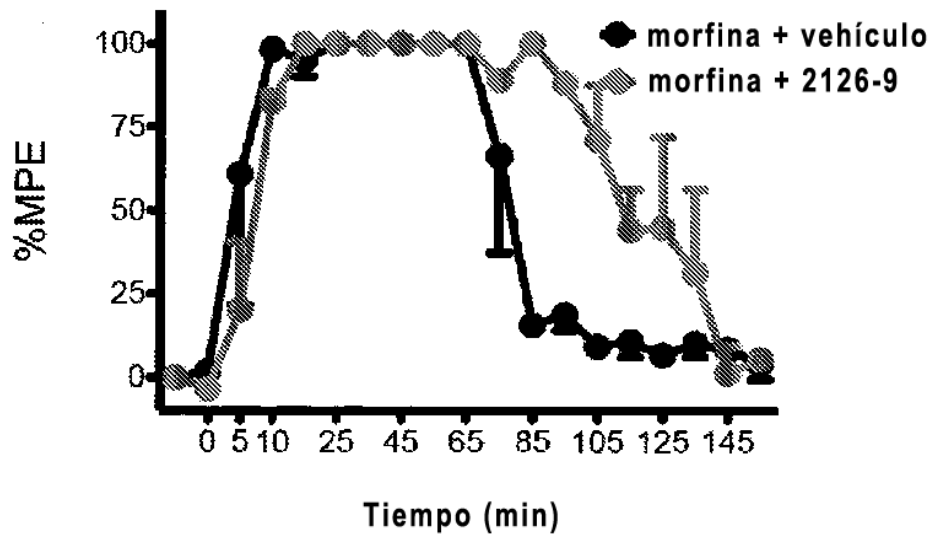


FIGURA 5B

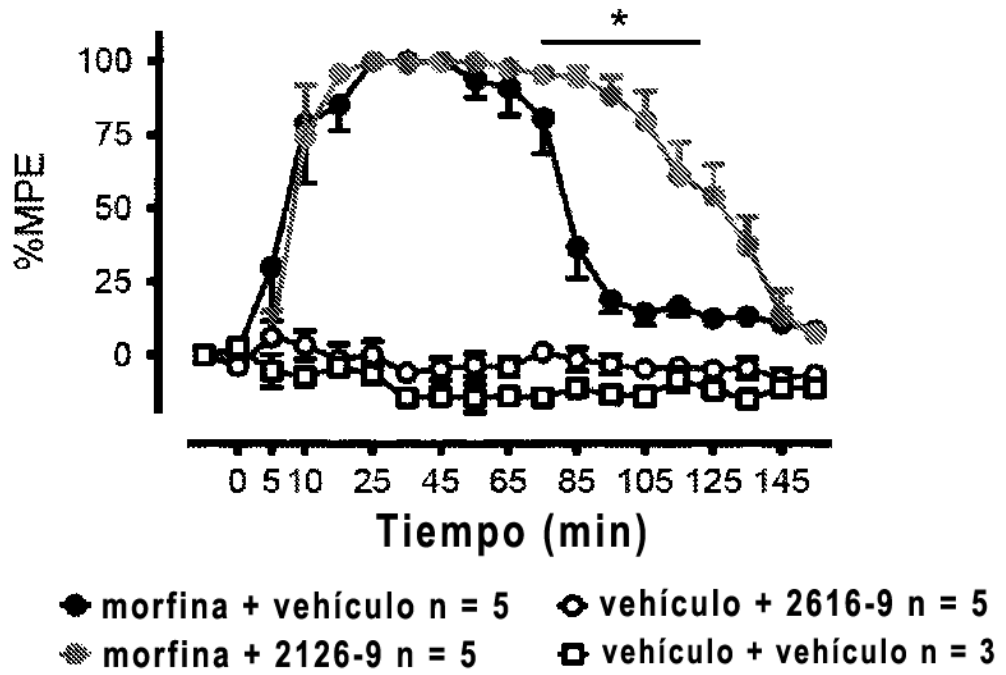


FIGURA 5C