

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 689**

51 Int. Cl.:

C07D 409/12 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009 E 09835701 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2382206**

54 Título: **Compuestos y métodos para el tratamiento del dolor y otras enfermedades**

30 Prioridad:

29.04.2009 US 214863 P
23.12.2008 US 203548 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2016

73 Titular/es:

AQUILUS PHARMACEUTICALS, INC (100.0%)
225 Mystic Valley Parkway
Winchester, MA 01890, US

72 Inventor/es:

SUCHOLEIKI, IRVING

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 575 689 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos y métodos para el tratamiento del dolor y otras enfermedades

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente a compuestos que inhiben metaloproteasa, y más particularmente a compuestos etnil que inhiben MMP.

Antecedentes de la invención

10 La inflamación se define como la repuesta biológica compleja de los tejidos vasculares a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas, o irritantes. Es un intento protector del organismo para eliminar los estímulos perjudiciales así como para iniciar el proceso de cicatrización para el tejido. La inflamación puede ser aguda (fase temprana de respuesta) o crónica (ocurre durante un tiempo prolongado). La inflamación aguda implica a los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares mientras la inflamación crónica implica a los monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (colectivamente, leucocitos mononucleares). Un efecto tanto de la inflamación aguda como crónica es la sensación de dolor que puede ser bien neuropático o nociceptivo. Algunas dolencias comunes asociadas con el dolor neuropático son dolor de la parte inferior de la espalda, neuralgia/fibromialgia, dolor neuropático diabético y dolor asociado con esclerosis múltiple. Las dolencias comunes asociadas con el dolor nociceptivo son dolor artrítico, particularmente osteoartritis y artritis reumatoide, dolor post-operatorio, dolor relacionado con el cáncer y dolor relacionado con VIH.

15 Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son una familia de enzimas que contienen cinc estructuralmente relacionadas que se ha reportado que median la degradación de tejido conectivo en procesos fisiológicos normales tales como el desarrollo embrionario, reproducción, y remodelado de tejidos. Se ha sugerido que la sobre-expresión de las MMP o un desequilibrio entre las MMP son factores en los procesos de enfermedades inflamatoria, maligna y degenerativa caracterizados por la degradación de la matriz extracelular o tejidos conectivos. Las MMP son, por lo tanto, dianas para inhibidores terapéuticos en varias enfermedades inflamatorias, malignas y degenerativas tales como artritis reumatoide, osteoartritis, osteoporosis, periodontitis, esclerosis múltiple, gingivitis, ulceración epidérmica corneal y gástrica, aterosclerosis, proliferación de la neointima (que da lugar a restenosis y fallo cardiaco isquémico) y metástasis tumorales. La MMP-2 (72 kDa gelatinasa/GelatinasaA) degrada los componentes de la matriz extracelular de la membrana basal. Sus sustratos incluyen el colágeno tipos IV y V, fibronectina, elastina, y colágenos intersticiales desnaturalizados. Se ha mostrado que la degradación de la matriz atribuida a esta proteínasa juega un papel importante en la progresión de enfermedades tales como aterosclerosis, inflamación, ictus, y crecimiento y metástasis tumorales. Sin embargo, no ha habido demasiada bibliografía demostrando el uso de inhibidores de MMP y específicamente inhibidores de MMP-2 para tratar el dolor. Por ejemplo, Yamamoto y colaboradores (Neuroscience Letters, 347(2), (2003), 77-80) mostraron que la inyección de MMP-2 intratecalmente en el ensayo de formalina en rata (un modelo de dolor inflamatorio) deprimió el comportamiento de agitación de Fase I pero no el comportamiento de fase II y que este efecto analgésico fue antagonizado por el inhibidor de MMP de amplio espectro, que contiene ácido hidroxámico, ONO-4817 (los valores K_i son 0,45, 0,73, 1,1, 1,1, 2,1, 42 y 2.500 nM para MMP-12, MMP-2, MMP-8, MMP-13, MMP-9, MMP-3 y MMP-7 respectivamente). Cuando el inhibidor de MMP ONO-4817 se proporcionó solo no tuvo efecto en el ensayo de formalina en rata.

20 Recientemente, Ji y colaboradores (Nature Medicine 14 (13), (2008), 331-336) han encontrado que determinadas metaloproteinasas de la matriz (MMP) estaban reguladas al alza durante los estadios tempranos de daño mediante un modelo animal de ligadura de nervio espinal. Específicamente, encontraron que MMP-9 estaba regulada al alza en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) dañados en la fase temprana del modelo de dolor neuropático de ligadura del nervio espinal L5 (SNL) (primer día y después disminuyendo después del 3^{er} día) y que MMP-2 tenía una respuesta retardada en el modelo (regulándose al alza empezando en el día 7 y todavía presente en el día 21). También encontraron que MMP-2 induce dolor neuropático por escisión de IL-1 β y activación de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) astocítica. También encontraron que los inhibidores de la metaloproteínasa de la matriz endógenos (TIMP-1 y TIMP-2) también suprimían el dolor neuropático en el modelo. Kobayashi y colaboradores (Molecular and Cellular Neuroscience, 39, (2008), 619-627) también han demostrado recientemente que las MMP degradan la proteína básica de mielina (MBP) periférica y se encontró que un inhibidor de MMP de amplio espectro, que contiene ácido hidroxámico (GM6001) atenúa la nocicepción mecánica.

25 La metaloproteínasa de matriz se han ensayado clínicamente en unas pocas indicaciones. Lo más predominantemente en artritis y cáncer. Los inhibidores que se han incluido en ensayos clínicos para una indicación oncológica incluyen prinomastat (AG3340; Agouron/Pfizer), BAY 12-9566 (Bayer Corp.), batimistat (BB-94; British Biotech, Ltd.), BMS-275291 (anteriormente D2163; Celltech/Bristol-Myers Squibb), marimastat (BB 2516; British Biotech, Ltd./Schering-Plough) y MMI270(B) (anteriormente CGS-27023A; Novartis). Muchos de los inhibidores de MMP que contienen ácido hidroxámico presentan toxicidades muy amplias en los seres humanos. Por ejemplo, Marimastat, que contiene un resto hidroxamato, presentó toxicidades músculo-esqueléticas dependientes del tiempo y dependientes de la dosis (artralgia, mialgia, tendinitis) en los seres humanos. Otras toxicidades para marimastat incluyen ascitis, carcinoma diseminado, escalofríos, colangitis, mareo, disnea, edema, fatiga, fiebre,

gastrointestinales (anorexia, náusea, vómito, diarrea, estreñimiento), hemorragia gastrointestinal, dolor de cabeza, acidez estomacal, toxicidad hepática, hipercalcemia, hiperglucemia, erupción, y dificultad para respirar. No se sabe si las toxicidades presentadas por muchos de los inhibidores de MMP se atribuyen al resto de ácido hidroxámico, sin embargo, está claro que el tener un inhibidor de MMP que no contiene un grupo ácido hidroxámico podría reducir muchas responsabilidades metabólicas potenciales. Uno de los pocos compuestos que no contienen ácido hidroxámico que se han ensayado en los seres humanos exclusivamente para el tratamiento del cáncer es el ácido basado en triptófano S-3304 (ácido (R)-3-(1H-Indol-3-il)-2-(5-p-toliletinil-tiofeno-2-sulfonilamino)-propiónico) y para el que no se ha observado evidencia de toxicidades músculo-esqueléticas en animales o el hombre. Sin embargo, se ha encontrado que S-3304 proporciona eventos adversos en los seres humanos tales como dolores de cabeza, somnolencia, vómito, náusea y dolor gastrointestinal (van Marle, S. et al. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther* 2005; 43: 282-293). Los análisis adicionales de este compuestos en la sangre humana encontraron la formación de varios metabolitos hidroxilados (Chiappori, A.A. et al. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13(7), 2091-2099). Dos de los metabolitos principales implicaron la hidroxilación alrededor del anillo indol del resto triptófano. Otro metabolito implicó la hidroxilación de la parte metil del tolueno de la molécula. Está claro que la reducción de la proporción de dichas hidroxilaciones metabólicamente inducidas podría reducir las responsabilidades metabólicas de S3304 y/o aumentar la biodisponibilidad global del compuesto y posiblemente dar lugar a un aumento de la exposición del tejido diana.

Kushner y colaboradores (Kushner, D.J.; Baker, A.; Dunstall, T.G. *Can J. Physiol Pharmacol*, 77(2), (1999) p.79-88) han presentado ejemplos de cómo la incorporación de deuterio en un fármaco puede reducir frecuentemente el nivel de transformaciones metabólicas inducidas especialmente aquellas mediadas por el Citocromo P450. Esta proporción reducida de metabolismo inducido por el Citocromo P450 puede en algunas ocasiones traducirse directamente en biodisponibilidad aumentada. La razón de esto se debe al hecho de que la sustitución atómica de un hidrógeno por un deuterio en un fármaco altera la fuerza del enlace carbono-deuterio del fármaco, mientras se mantiene su superficie 3D muy similar a la de la versión no deuterada. La sustitución de deuterio por hidrógeno, puede dar lugar a un efecto de isótopo que puede alterar las farmacocinéticas del fármaco. En una reacción en la que la escisión de un enlace C-H es determinante de la velocidad, la misma reacción del análogo C-D se reducirá. Por ejemplo, Schneider y colaboradores (Schneider, F.; et al., *BiRDS Pharma GmbH, Arzneimittel Forschung* (2006), 56(4), p. 295-300) han mostrado que el reemplazo de varios de los átomos de hidrógeno alrededor de uno de los anillos aromáticos del inhibidor de COX-2 Refecoxib (4-(4-metilsulfonilfenil)-3-fenil-5H-furan-2-ona) con deuterio (en las posiciones 2',3', 4',5' y 6') aumentaba la biodisponibilidad oral del fármaco sin afectar su selectividad para COX-2. Si se aplica esta estrategia al ácido basado en triptófano S-3304 se podría reducir su susceptibilidad a la hidroxilación por el citocromo P-450 y finalmente aumentar su biodisponibilidad global y posiblemente su concentración de compuesto en el tejido diana.

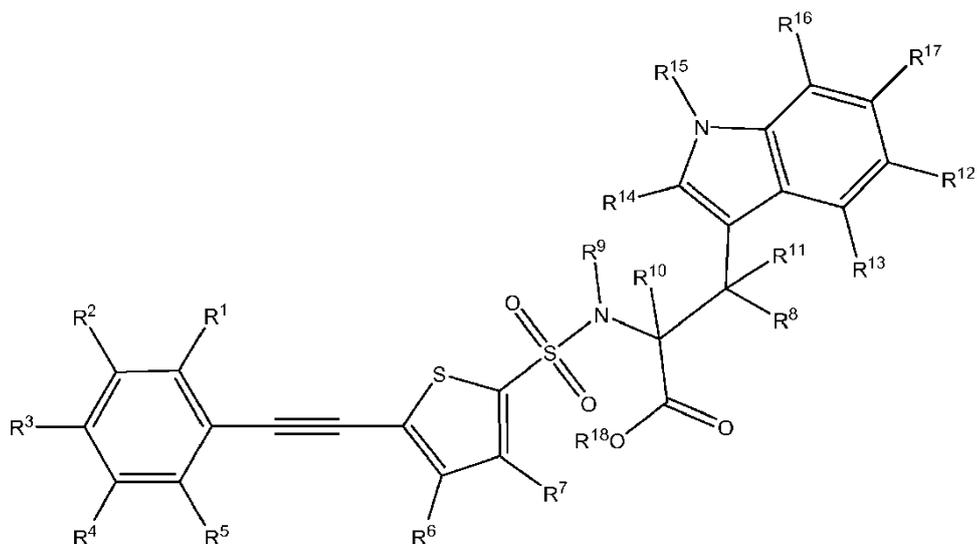
Otro posible efecto de incorporar deuterio en un fármaco es en sus propiedades polimórficas (es decir, diferentes formas cristalinas). Por ejemplo, Hirota y Urushibara (*Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 32(7), (1959), 703-706) han mostrado que el reemplazo de un único hidrógeno vinílico por deuterio en ácido Alocinámico puede cambiar tanto el punto de fusión como la intensidad del patrón de difracción de rayos X de la molécula. Lin y Guillory (*Journal of Pharmaceutical Science*, Vol. 59(7), (2006), 972-979) han mostrado que la sulfanilamida-d4 presentaba calores de transición y calores de fusión menores para sus varios estados cristalinos si se compara con sus formas no deuteradas correspondientes. Finalmente, Crawford y colaboradores (*Crawford, S. et al., Angewandte Chemie International Edition*, 48(4), (2009), 755-757) mostraron recientemente que la forma cristalina de piridina completamente deuterada adopta una configuración única que sólo puede obtenerse bajo alta presión con el parental no deuterado. Su trabajo mostró claramente que el reemplazo de hidrógeno por deuterio cambia la fuerza de la interacción entre varios átomos en moléculas vecinas causando un cambio en la organización cristalina a una que es más energéticamente favorable. Este cambio en la organización cristalina o polimorfo puede permitir propiedades de disolución mejoradas y una biodisponibilidad aumentada.

Se describe una serie de compuestos que inhiben MMP que contienen un grupo funcional feniletinil-tiofeno y que no tienen la funcionalidad ácido hidroxámico. Adicionalmente, la invención se refiere a los presentes compuestos y a su uso en el tratamiento de dolor en un paciente.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a agentes farmacéuticos que contienen alquino. En particular, la presente invención proporciona compuestos que inhiben MMP como se define en la reivindicación 1 que contienen un grupo feniletinil-tiofeno que presenta actividad inhibidora potente de MMP, para uso en el tratamiento del dolor.

La presente invención proporciona compuestos inhibidores que contienen alquino que están representados por la Fórmula general (II):



(II) en la que:

cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , y R^{17} se selecciona independientemente del grupo que consiste en deuterio, hidrógeno, alquilo, y deuterioalquilo; y

- 5 R^{18} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, deuterio, alquilo, deuterioalquilo, sodio, potasio; o

N-óxidos, sales farmacéuticamente aceptables, formulaciones, polimorfos, tautómeros, mezclas racémicas o estereoisómeros de éstos, para uso en el tratamiento del dolor.

- 10 Los compuestos que inhiben MMP usados en la presente invención también pueden usarse en el tratamiento de otras enfermedades mediadas por metaloproteasa, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, aneurisma aórtico abdominal, cáncer, inflamación, aterosclerosis, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades oculares, enfermedades neurológicas, enfermedades psiquiátricas, trombosis, infección bacteriana, enfermedad de Parkinson, fatiga, temblor, retinopatía diabética, enfermedades vasculares de la retina, envejecimiento, demencia, cardiomiopatía, alteración tubular renal, diabetes, psicosis, disquinesia, anomalías pigmentarias, sordera, síndromes inflamatorios y fibróticos, síndrome inflamatorio intestinal, alergias, enfermedad de Alzheimer, formación de placa arterial, periodontal, infección viral, ictus, enfermedad cardiovascular, lesión por perfusión, trauma, exposición química o daño oxidativo a tejidos, cicatrización de heridas, hemorroides, embellecimiento de la piel y dolor.

- 20 En particular, los compuestos que inhiben MMP usados en la presente invención se usan en el tratamiento del dolor en un paciente, mediante la administración al paciente de una cantidad efectiva para tratar el dolor de un compuesto presente en combinación con un vehículo, en el que el paciente padece sensibilidad aumentada o exagerada al dolor, tal como hiperalgesia, causalgia y alodinia; dolor agudo; dolor inducido mecánicamente; dolor por quemadura; dolor facial atípico; dolor neuropático; dolor de espalda; síndromes de dolor regional complejo I y II; dolor artrítico; dolor por lesión deportiva; dolor relacionado con infección viral, neuralgia post-herpética; y dolor de la extremidad fantasma; dolor de parto; dolor de cáncer; dolor post-quimioterapia; dolor post-ictus; dolor post-operatorio; dolor fisiológico; dolor inflamatorio; afecciones inflamatorias agudas/dolor visceral, por ejemplo, angina, síndrome del intestino irritable (IBS), y enfermedad inflamatoria del intestino; dolor neuropático; neuralgia; neuropatía diabética dolorosa; lesión nerviosa traumática; lesión en la médula espinal; y tolerancia a narcóticos o abandono de narcóticos.

- 30 Los compuestos que inhiben MMP y/o otra metaloproteasa descritos en la presente memoria son útiles como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por metaloproteasa - especialmente MMP. Dichos compuestos pueden usarse en composiciones farmacéuticas para administración oral o parenteral, que comprenden uno o más de los compuestos que inhiben MMP descritos en la presente memoria.

- 35 Los compuestos descritos en la presente memoria pueden usarse en métodos para inhibir MMP-2 y/o otras metaloproteasas, mediante la administración de formulaciones, que incluyen, pero no están limitadas a, formulaciones orales, rectales, tópicas, intravenosas, parenterales (incluyendo, pero no limitado a, intramusculares, intravenosas), oculares (oftálmicas), transdérmicas, inhalativas (incluyendo, pero no limitado a, pulmonares, inhalación de aerosol), nasales, sublinguales, intratecales, subcutáneas o intraarticulares, que comprenden los compuestos que inhiben metaloproteasa heterocíclicos por métodos estándar conocidos en la práctica médica, para el tratamiento de enfermedades o síntomas que surgen de o están asociados con metaloproteasa,

especialmente MMP-2 e incluyendo el tratamiento profiláctico y terapéutico. Aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de las afecciones que se están tratando y de la naturaleza del ingrediente activo. Los compuestos usados en esta invención se presentan convenientemente en forma de dosificación unitaria y se preparan mediante cualquiera de los métodos muy conocidos en la técnica farmacéutica.

Los compuestos que inhiben MMP usados en la presente invención pueden usarse en combinación con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, un inhibidor selectivo de COX-2, un inhibidor de COX-1, un inmunosupresor, un esteroide, un modificador de la respuesta biológica u otros agentes anti-inflamatorios.

10 Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de un experimento en ratón Intratecal (i.t.) (SNL). El ensayo de monofilamento de von Frey para alodinia mecánica. Las flechas representan tiempos de inyección. Los resultados se describen en umbrales de retirada de la pata (g). BL = Línea base post-operatoria.

15 La Figura 2 es un gráfico de un experimento en ratón Intraperitoneal (i.p.) (SNL). El ensayo de monofilamento de von Frey para alodinia mecánica. Las flechas representan tiempos de inyección. Los resultados se describen en umbrales de retirada de la pata (g). BL = Línea base post-operatoria.

Descripción detallada de la invención

El término "D" tal y como se usa en la presente memoria solo o como parte de una estructura o grupo químico, indica deuterio.

20 El término "deutero" tal y como se usa en la presente memoria solo o como parte de un grupo, indica átomos de deuterio sustituidos opcionalmente.

Los términos "alquilo" o "alk", tal y como se usan en la presente memoria solos o como parte de otro grupo, indican grupos hidrocarbonados saturados de cadena lineal y ramificada, que tienen preferiblemente 1 a 10 carbonos en la cadena normal, lo más preferiblemente grupos alquilo inferiores. Dichos grupos no sustituidos ejemplares incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y semejantes.

Los términos "alk inferior" o "alquilo inferior" tal y como se usan en la presente memoria, indican dichos grupos como se ha descrito anteriormente para alquilo que tienen 1 a 4 átomos de carbono en la cadena normal.

30 El término "enriquecimiento isotópico" se refiere a un proceso mediante el cual se altera la abundancia relativa de un isótopo de un elemento dado, produciendo así una forma del elemento que se ha enriquecido en un isótopo particular y deplecionado de sus otras formas isotópicas.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto parental se modifica haciendo sales ácidas o básicas de éste. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y semejantes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto parental formadas, por ejemplo, a partir de ácidos no tóxicos inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como, pero no limitado a, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y semejantes; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como, pero no limitado a, acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, y semejantes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácido orgánico deuterado de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y semejantes.

45 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Los disolventes orgánicos incluyen, pero no están limitados a, medios no acuosos como éteres, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990, p. 1445.

55 La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación, que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

El término "N-óxido" indica compuestos que pueden obtenerse de una manera conocida haciendo reaccionar un compuesto de la presente invención que incluye un átomo de nitrógeno (tal como en un grupo piridilo) con peróxido de hidrógeno o un perácido, tal como ácido 3-cloroperoxi-benzoico, en un disolvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura entre aproximadamente -10-80°C, deseablemente aproximadamente 0°C.

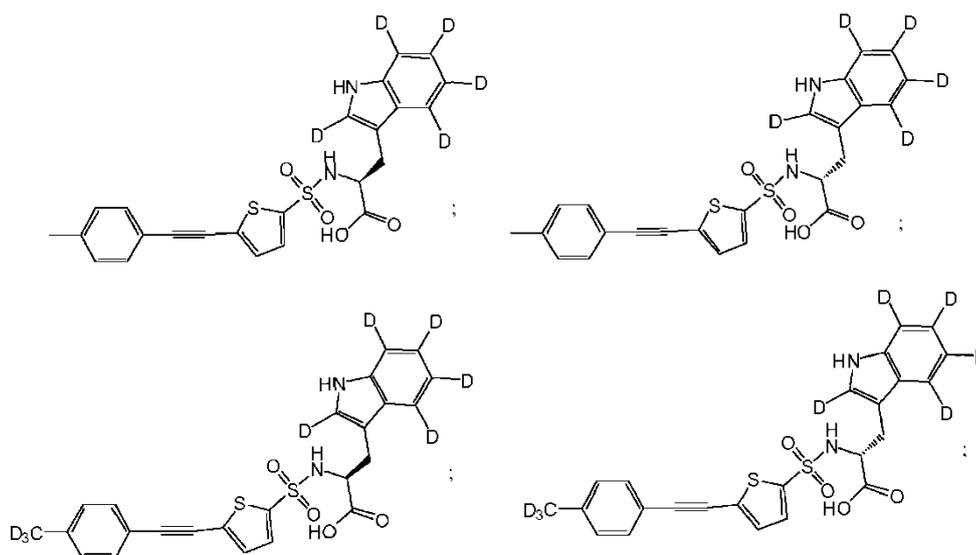
- 5 El término "polimorfo" indica una forma de un compuesto químico en una organización cristalina particular. Determinados polimorfos pueden presentar estabilidad termodinámica aumentada y pueden ser más adecuados que otras formas polimórficas para inclusión en formulaciones farmacéuticas. Los compuestos que tienen hidrógenos reemplazados por deuterio pueden formar polimorfos que pueden aumentar sus propiedades de solubilidad y/o biodisponibilidad.
- 10 Los compuestos de la invención pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por lo tanto, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de doble enlace (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros o diastereómeros. Según la invención, las estructuras químicas representadas en la presente memoria, y por lo tanto los compuestos de la invención, engloban todos los enantiómeros y estereoisómeros correspondientes, esto es, tanto la forma estereoméricamente pura (por ejemplo, geoméricamente pura, enantioméricamente pura, o diastereoméricamente pura) como mezclas enantioméricas y estereoisoméricas.

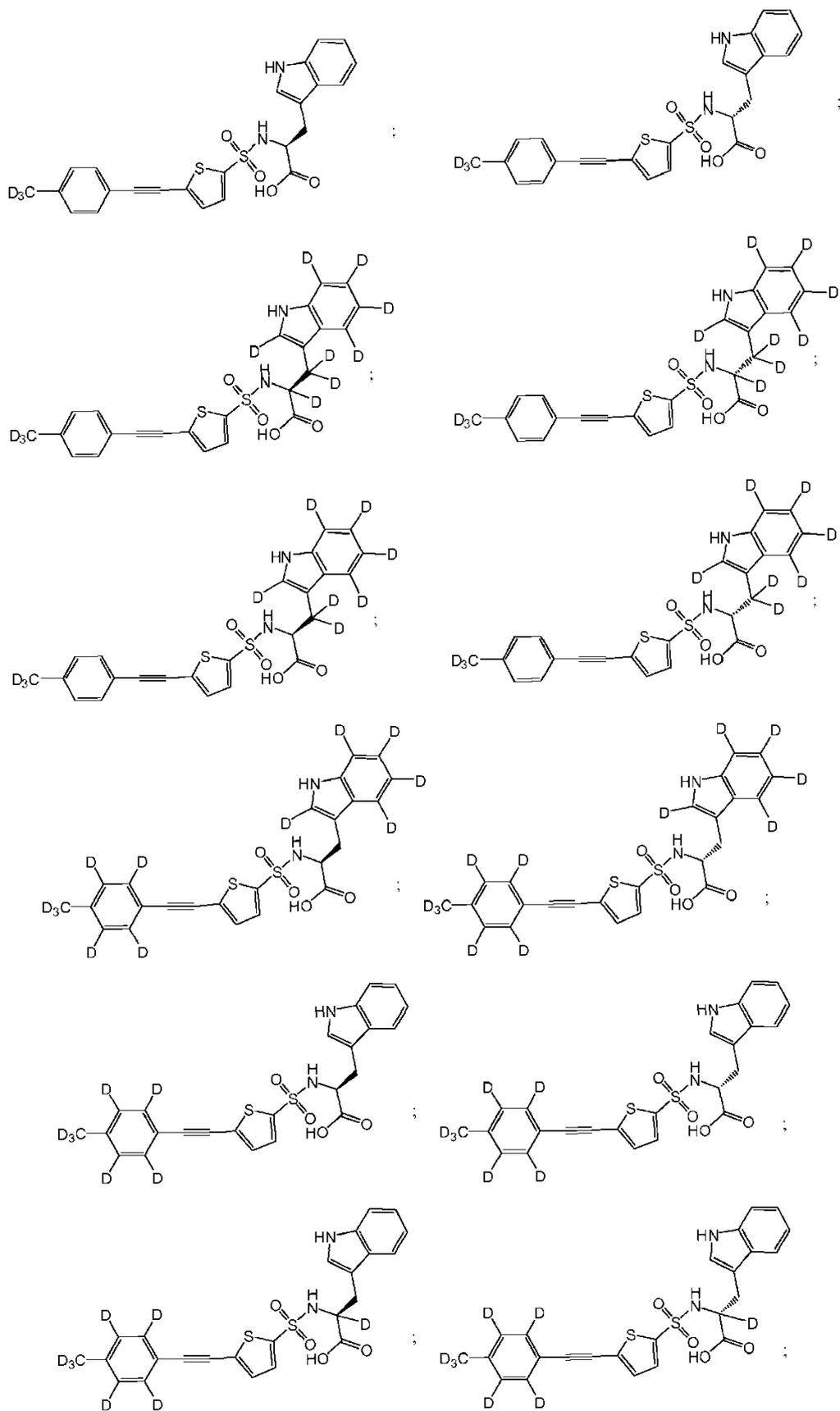
El término "mezcla racémica" indica una mezcla que es aproximadamente 50% de un enantiómero y aproximadamente 50% del enantiómero correspondiente respecto a todos los centros quirales en la molécula. Así, la invención engloba todas las mezclas enantioméricamente puras, enantioméricamente enriquecidas, y racémicas de compuestos de Fórmulas (I) y (II).

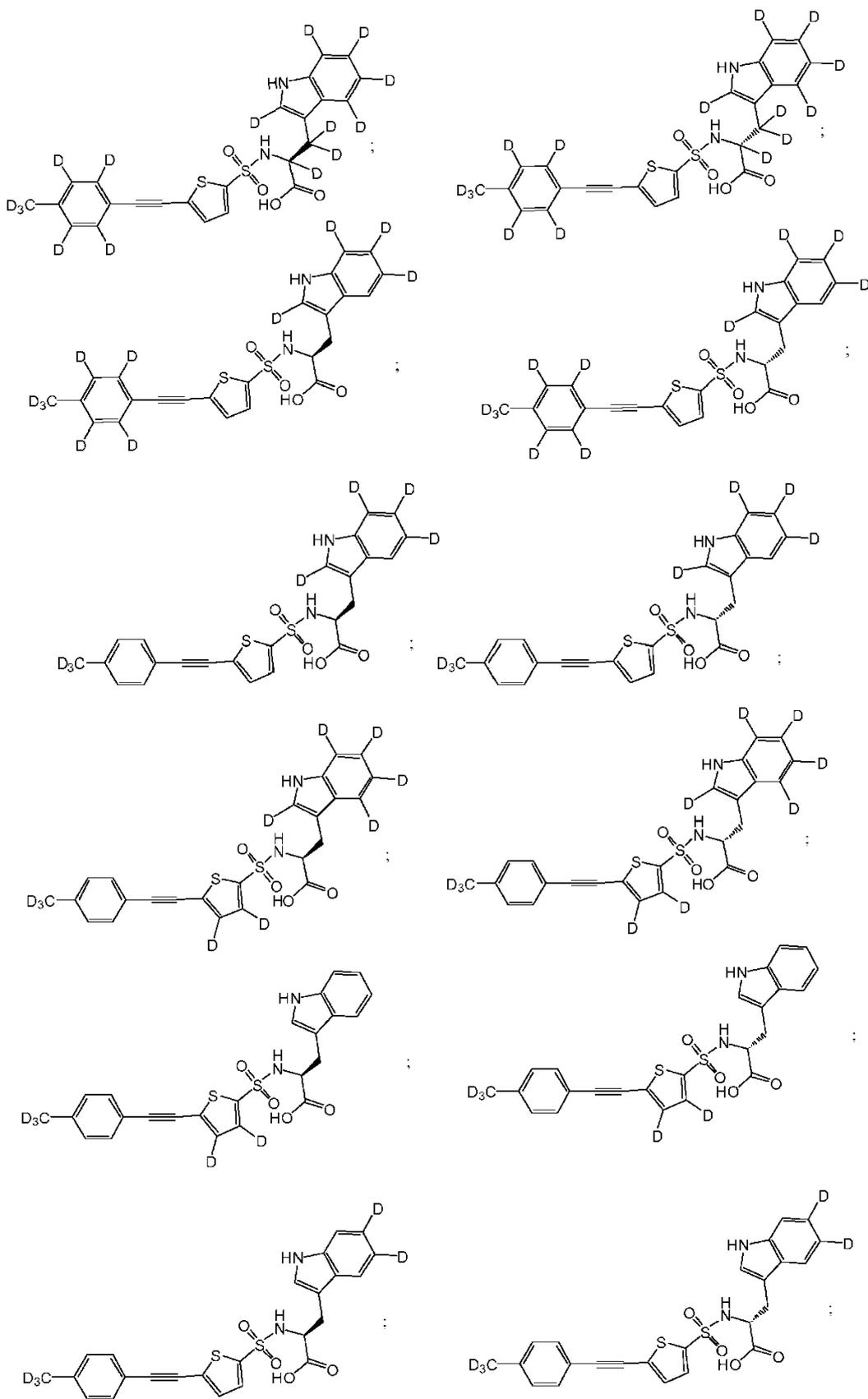
- 20 Las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas de compuestos de la invención pueden resolverse en sus componentes enantiómeros o estereoisómeros por métodos muy conocidos. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, la formación de sales quirales y el uso de cromatografía líquida quiral o de alta resolución "HPLC" y la formación y cristalización de sales quirales. Véase, por ejemplo, Jacques, J., et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, Nueva York, 1981); Wilen, S. H., et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E. L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind., 1972); *Stereochemistry of Organic Compounds*, Ernest L. Eliel, Samuel H. Wilen y Lewis N. Manda (1994 John Wiley & Sons, Inc.), y *Stereoselective Synthesis A Practical Approach*, Mihaly Nogradi (1995 VCH Publishers, Inc., NY, N.Y.). Los enantiómeros y estereoisómeros también pueden obtenerse a partir de intermedios, reactivos, y catalizadores estereoméricamente o enantioméricamente puros, por métodos sintéticos asimétricos muy conocidos.

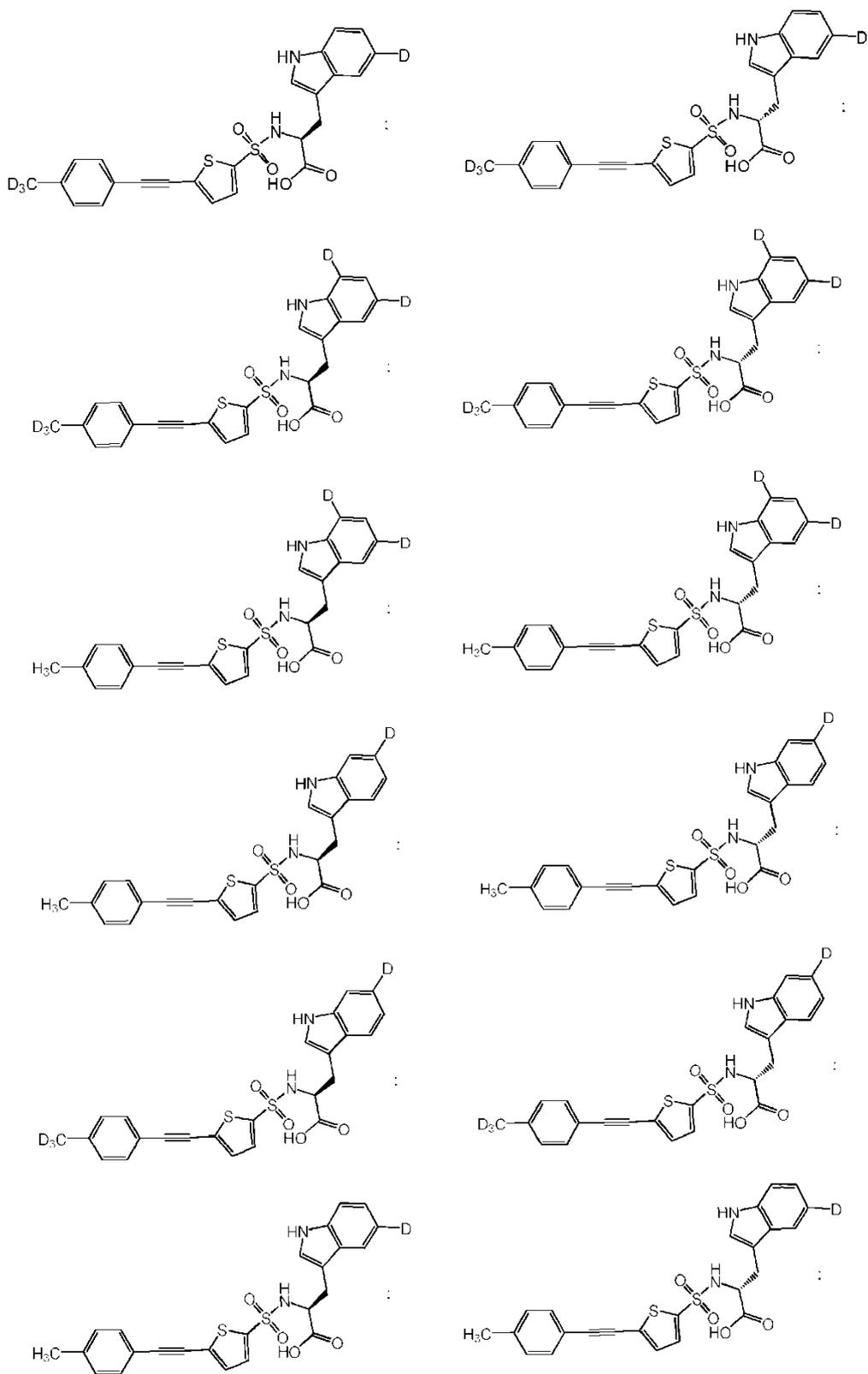
Se contempla que los compuestos usados en la presente invención representados por la Fórmula descrita anteriormente incluyan todos los diastereómeros y enantiómeros, así como mezclas racémicas. Las mezclas racémicas pueden separarse por resolución de sal quiral o por cromatografía HPLC en columna quiral.

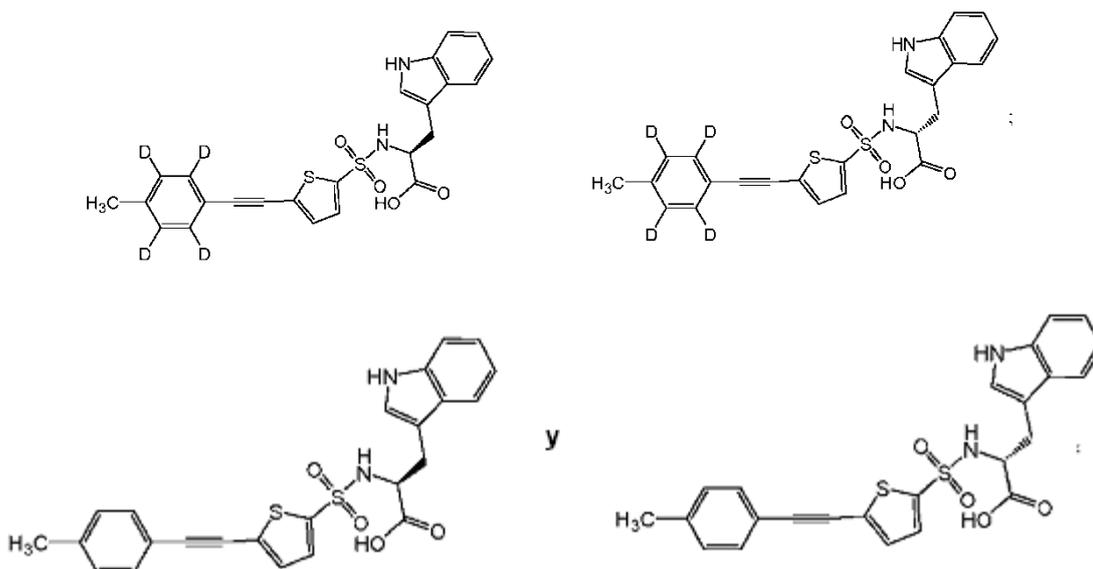
- 35 Más específicamente, los compuestos de Fórmula (II) pueden seleccionarse de, pero no están limitados a, los siguientes:











La presente invención también está dirigida a los compuestos según las reivindicaciones 10 y 11 y composiciones farmacéuticas que incluyen los mismos. Según esto, algunas realizaciones de la presente invención proporcionan una composición farmacéutica que puede incluir una cantidad efectiva de un compuesto que inhibe MMP de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en métodos para inhibir MMP-2 y/o MMP-9 y métodos para tratar enfermedades o síntomas mediados por una enzima MMP-2 y/o MMP-9. Dichos métodos incluyen administrar un compuesto que inhibe MMP-2 y/o MMP-9 de la presente invención como se ha definido anteriormente, o un N-óxido, sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero de éste. Los ejemplos de enfermedades o síntomas mediados por una enzima MMP-2 y/o MMP-9 incluyen, pero no están limitados a sensibilidad exagerada al dolor, tal como hiperalgesia, causalgia y alodinia; dolor agudo; dolor por quemadura; dolor inducido mecánicamente; dolor facial atípico; dolor neuropático; dolor de espalda; síndromes de dolor regional complejo I y II; dolor articular artrítico; dolor por lesión deportiva; dolor relacionado con infección viral, y neuralgia post-herpética; dolor de la extremidad fantasma; dolor de parto; dolor de cáncer; dolor post-quimioterapia; dolor post-ictus; dolor post-operatorio; dolor fisiológico; dolor inflamatorio; afecciones inflamatorias agudas/dolor visceral, angina, síndrome del intestino irritable (IBS), y enfermedad inflamatoria del intestino; dolor neuropático; neuralgia; neuropatía diabética dolorosa; lesión nerviosa traumática; lesión en la médula espinal; y tolerancia a narcóticos o abandono de narcóticos.

En algunas realizaciones de la presente invención, los compuestos que inhiben MMP-2 y/o MMP-9 definidos anteriormente se usan en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por una MMP-2 y/o MMP-9.

En algunas realizaciones, los compuestos que inhiben MMP-2 definidos anteriormente pueden usarse en combinación con un fármaco, agente o terapéutico tal como, pero no limitado a: (a) un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad; (b) un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; (c) un inhibidor selectivo de COX-2; (d) un inhibidor de COX-1; (e) un inmunosupresor; (f) un esteroide; (g) un modificador de la respuesta biológica; o (h) otros agentes o terapéuticos anti-inflamatorios útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por quimioquinas.

Los ejemplos de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad incluyen, pero no están limitados a, metotrexato, azatioprina, leflunomida, penicilamina, sales de oro, micofenolato, mofetil y ciclofosfamida.

Los ejemplos de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos incluyen, pero no están limitados a, piroxicam, quetoprofeno, naproxeno, indometacina, e ibuprofeno.

Los ejemplos de inhibidores selectivos de COX-2 incluyen, pero no están limitados a, rofecoxib, celecoxib, y valdecoxib.

Un ejemplo de un inhibidor de COX-1 incluye, pero no está limitado a, piroxicam.

Los ejemplos de inmunosupresores incluyen, pero no están limitados a, metotrexato, ciclosporina, leflunimida, tacrolimus, rapamicina y sulfasalazina.

Los ejemplos de esteroides incluyen, pero no están limitados a, p-metasona, prednisona, cortisona, prednisolona y dexametasona.

Los ejemplos de modificadores de la respuesta biológica incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos anti-TNF, antagonistas de TNF- α , antagonistas de IL-1, anti-CD40, anti-CD28, IL-10 y moléculas anti-adhesión.

5 Los ejemplos de agentes o terapéuticos anti-inflamatorios incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de la quinasa p38, inhibidores de PDE4, inhibidores de TACE, antagonistas del receptor de quimioquinas, talidomida, inhibidores de leucotrieno y otros inhibidores de molécula pequeña de la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

10 Según otra realización de la presente invención, una composición farmacéutica puede incluir una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable y un fármaco, agente o terapéutico seleccionado de: (a) un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad; (b) un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; (c) un inhibidor selectivo de COX-2; (d) un inhibidor de COX-1; (e) un inmunosupresor; (f) un esteroide; (g) un modificador de la respuesta biológica; o (h) otros agentes o terapéuticos anti-inflamatorios útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por quimioquinas.

15 La actividad inhibidora de MMP de los compuestos que inhiben MMP de la presente invención puede medirse usando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. Un ensayo estándar *in vitro* para la actividad inhibidora de MMP-2 se describe en el Ejemplo 130 y para MMP-9 se describe en el Ejemplo 131. Adicionalmente, ensayos estándar *in vitro* para medir MMP-1, MMP-7, MMP-3, MMP-12 y MMP-13 se describen en los Ejemplos 132-136. Los ensayos estándar *in vitro* para medir la estabilidad en microsomas humanos y de ratón se presentan en el Ejemplo 105. Las propiedades de inhibición del dolor *in vivo* de los compuestos que inhiben MMP de la presente invención pueden medirse usando cualquier modelo animal adecuado conocido en la técnica. Un ensayo estándar *in vivo* para medir la inhibición del dolor neuropático se describe en los Ejemplos 110 y 111 y un ensayo para medir el dolor inflamatorio se describe en el Ejemplo 120.

20 Los compuestos que inhiben MMP de la invención pueden tener una actividad de inhibición (CI_{50} MMP-2 y/o MMP-9) que varía de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 20 μ M, y típicamente, de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 2 μ M. La síntesis de los compuestos que inhiben MMP de la presente invención y su ensayo biológico se describen en los ejemplos siguientes que no se pretende que sean limitantes de ninguna manera.

25 Ejemplos y métodos

Sólo los compuestos que se encuentran dentro del alcance de la fórmula II como se define en la reivindicación 1 forman parte de la presente invención. Los demás compuestos a los que se hace referencia más adelante son bien compuestos intermedios o compuestos de referencia.

30 Los reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin más purificación a no ser que se afirme otra cosa. Todas las reacciones se realizaron usando material de vidrio que se secó en horno toda la noche (100°C). Todos los disolventes son de grado reactivo. Todas las reacciones se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno a no ser que se afirme otra cosa. Las mezclas de reacción orgánicas se concentraron usando un evaporador giratorio Buchi. Los espectros de RMN de protón se registraron en un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Varian a 300 MHz.

35 La columna SAX se obtuvo en Luknova Inc (Manfield, MA). Procedimiento para Purificación: la columna SAX se acondicionó por la adición de diclorometano: MeOH (1:1). El eluante se disolvió en diclorometano y se cargó en la columna SAX. La columna se lavó con diclorometano: MeOH (1:1) (3 x 50 mL) para eliminar las impurezas no ácidas. El compuesto se eluyó pasando ácido acético 2N en metanol. El disolvente se evaporó y el compuesto diana se purificó adicionalmente por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase inversa.

40 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS): Se usaron el instrumento y las especificaciones siguientes para analizar los distintos compuestos.

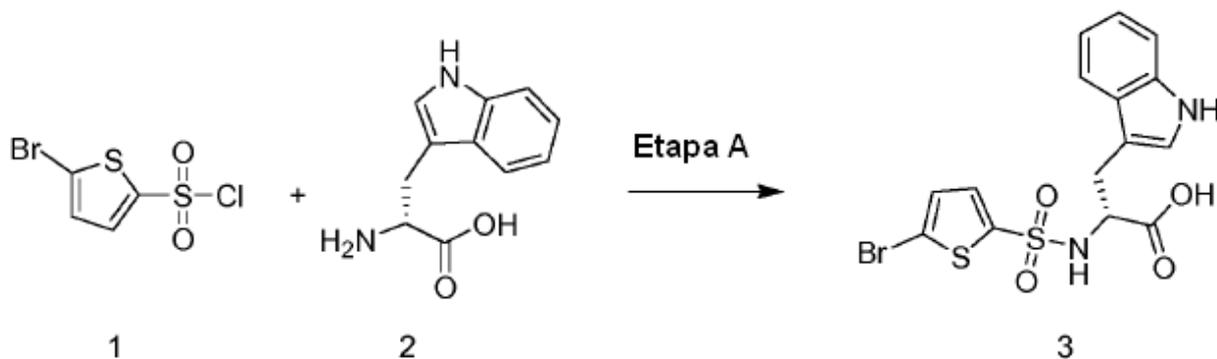
Cromatografía líquida:	
Instrumento:	Shimadzu LC-10AD VP
Columna:	Agilent Zobax 3,5 \square \square \square \square \square SB-C18
Diámetro interno de la columna (ID):	4,6 mm
Longitud de la columna:	50 mm
Gradiente:	5% a 100% Acetonitrilo y agua ambos conteniendo 0,1% ácido fórmico.

Tiempo de operación:	5 minutos
Caudal:	1,5 ml/minuto
Presión alta:	4.000 psi
Presión baja:	0 psi
Temperatura de ajuste:	0°C
Límite de temperatura:	25°C
Espec LC-Masa:	Waters Micromass Quatro Ultima LC/MS (MS triple-cuad), auto muestreador CTC Analytics PAL

Cromatografía Líquida de Alta Presión, Preparativa (HPLC Prep.): La condición de purificación por fase inversa preparativa es como sigue:

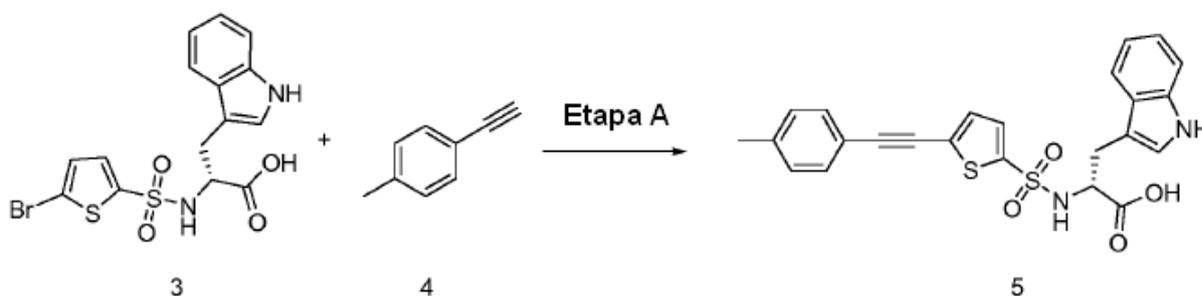
Instrumento:	Sistema Waters UPLC
Columna:	Waters Sunfire Columna C18
Diámetro interno de la columna (ID):	19 mm
Longitud de la columna:	100 mm
Inyección:	1 mL/DMSO
Gradiente:	30% a 70% Metanol y agua ambos conteniendo 0,1% TFA.
Tiempo de operación:	4 minutos
Caudal:	40 ml/minuto

5 Ejemplo 1



Etapa A

- 5 A una suspensión de ácido (R)-2-Amino-3-(1H-indol-3-il)-propiónico **2** (0,23 g, 1,12 mmoles) (Alfa-Aesar, A-18426) en acetona (3 mL) se añadió 2M carbonato de sodio (1 mL) para agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta mezcla se añadió cloruro de bromosulfonilo **1** (0,13g, 0,5 mmoles) (Alfa-Aesar, A-14677) a 0°C para agitar durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó más durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de vertir en agua (20 mL), la disolución se lavó con éter (x3). La capa acuosa se acidificó con 1M HCl, seguido de extracción con acetato de etilo (x3). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con disolución salina concentrada y se secaron (Na₂SO₄) para proporcionar el producto ácido (R)-2-(5-Bromo-tiofeno-2-sulfonilamino)-3-(1H-indol-3-il)-propiónico crudo (**3**) (0,16g, 74%). LC-MS (ES+) 429, 431; (ES-) 427, 429.
- 10 Una parte del producto ácido (R)-2-(5-Bromo-tiofeno-2-sulfonilamino)-3-(1H-indol-3-il)-propiónico crudo (**3**) se llevó a la etapa siguiente sin más purificación.

Ejemplo 2**Etapa A**

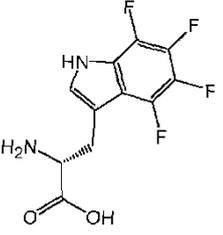
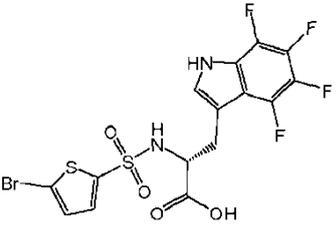
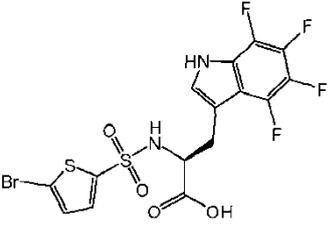
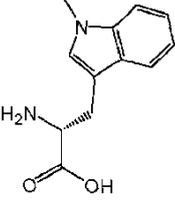
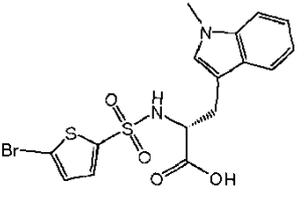
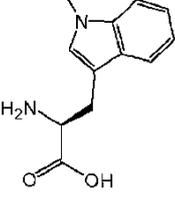
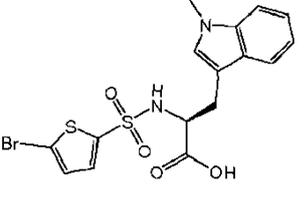
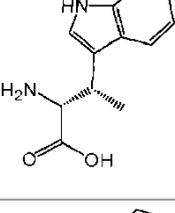
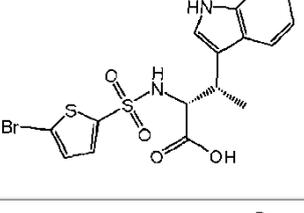
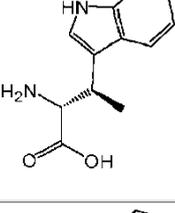
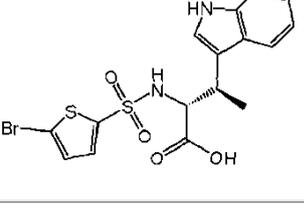
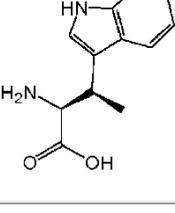
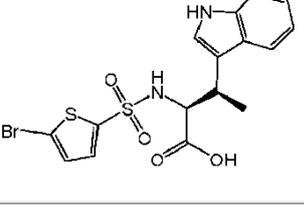
- 15 En un matraz de fondo redondo se añadió ácido (R)-2-(5-Bromo-tiofeno-2-sulfonilamino)-3-(1H-indol-3-il)-propiónico crudo (**3**) (60mg, 0,14 mmoles), *p*-tolil acetileno **4** (480mg, 0,41 mmoles), PdCl₂P(PPh₃)₂ (10mg, 0,015 mmoles), yoduro de cobre(I) (2 mg, 0,01 mmoles) y trietilamina (0,025 g, 0,25 mmoles) y se disolvió en DMF seco (2 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 50°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una disolución compuesta por NaCl/NaHCO₃/(NH₄)₂CO₃/agua (1:1:1:1) (x3), agua, y se secó sobre sulfato de sodio (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó usando una columna SAX para proporcionar el ácido (R)-3-(1H-Indol-3-il)-2-(5-*p*-tolil-etil-tiofeno-2-sulfonilamino)-propiónico deseado **5** (0,036g, 55%).
- 20

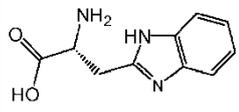
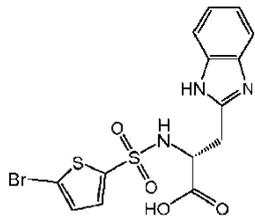
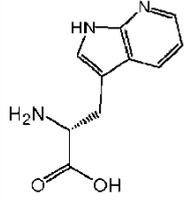
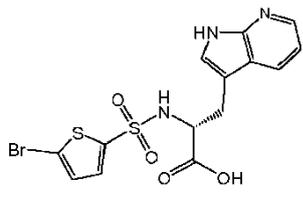
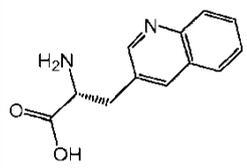
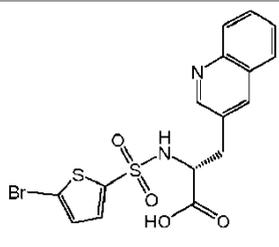
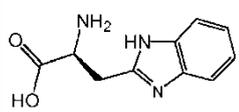
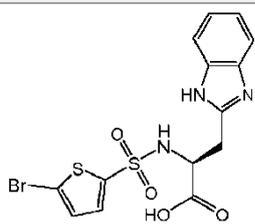
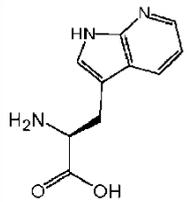
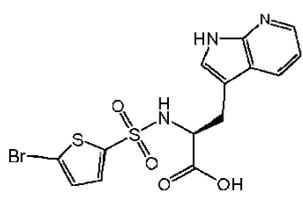
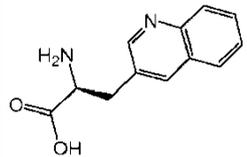
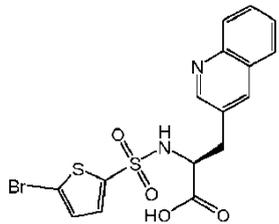
- El Ejemplo 2, Reacción A se repitió con la misma escala que anteriormente y se combinó con el lote previo. Los productos combinados se purificaron adicionalmente usando HPLC de fase inversa preparativa para proporcionar ácido (R)-3-(1H-Indol-3-il)-2-(5-*p*-tolil-etil-tiofeno-2-sulfonilamino)-propiónico **5** que tiene una pureza de >95% por HPLC. LC-MS (ES+) 465; (ES-) 463; ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,35 (s, 3H), 2,86-2,94 (m, 1H), 3,08-3,16 (m, 1H), 3,96-4,40 (m, 1H), 6,93-7,50 (m, 11H), 8,67 (d, 1H, *J*=8,7 Hz), 10,83 (s, 1H).
- 25

Ejemplo 3-15

- 30 Si se siguiera un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, excepto por el uso de los aminoácidos comercialmente disponibles (es decir, aminoácidos RSP, Chembridge, Sigma Aldrich, et al.) indicados en la Tabla 1 siguiente, se podrían preparar los compuestos siguientes.

TABLA 1

Ej. #	Aminoácido	Producto sulfonamida
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

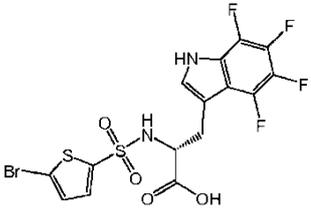
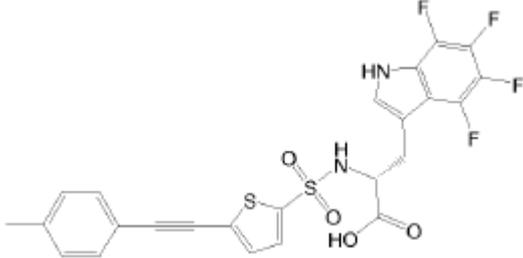
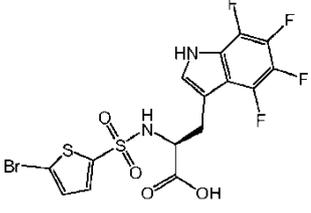
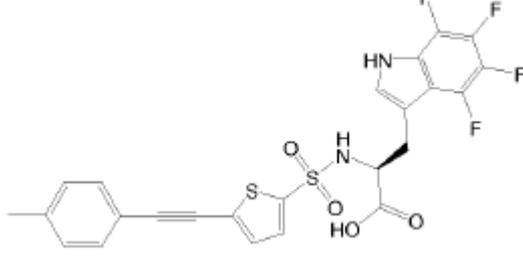
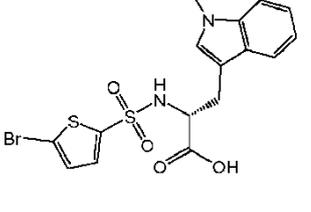
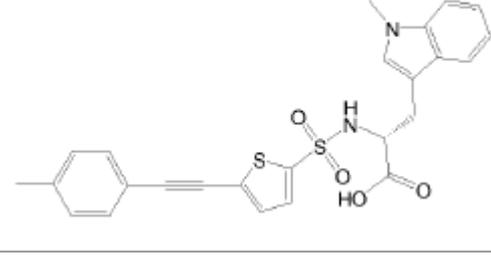
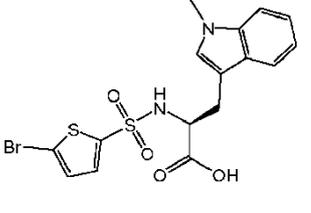
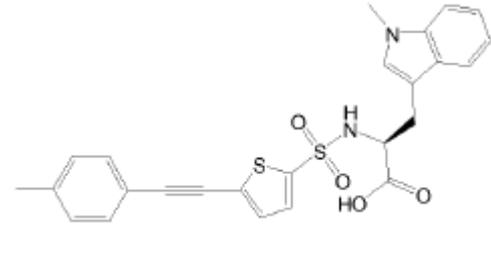
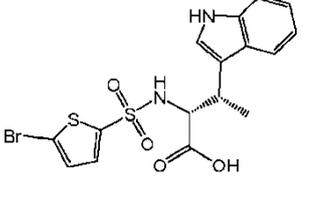
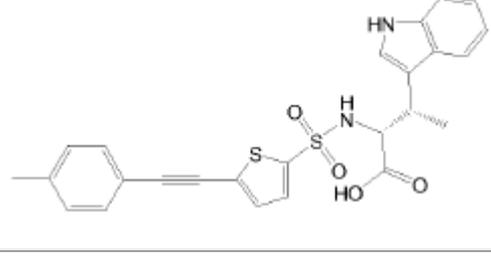
Ej. #	Aminoácido	Producto sulfonamida
10		
11		
12		
13		
14		
15		

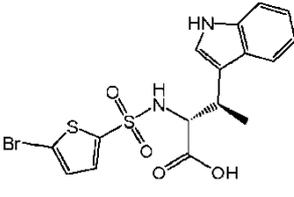
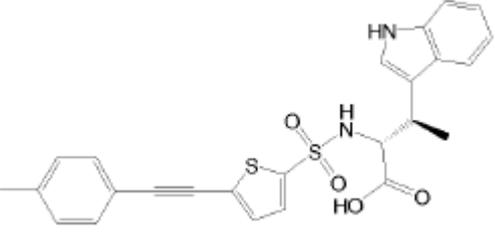
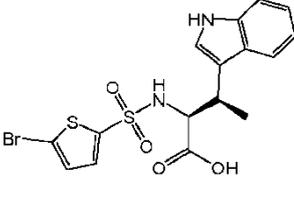
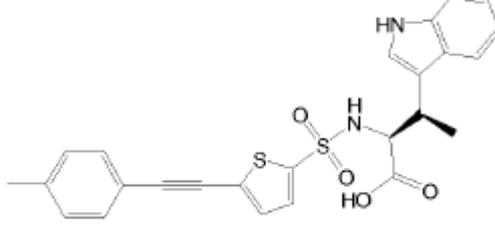
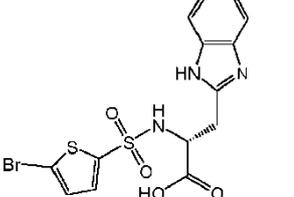
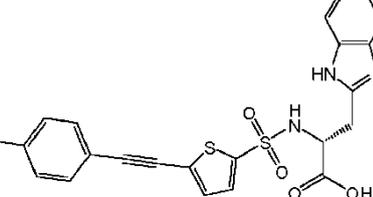
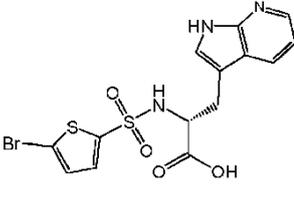
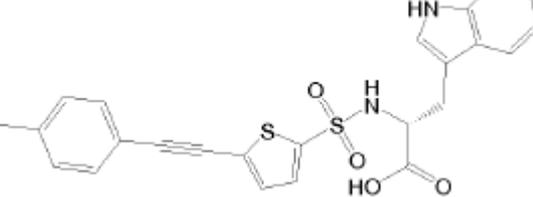
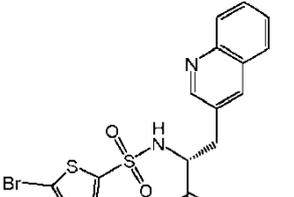
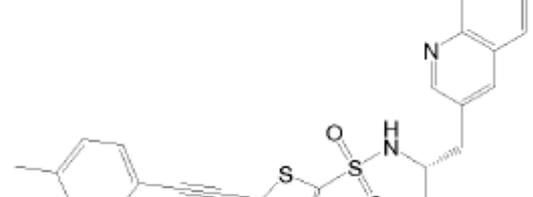
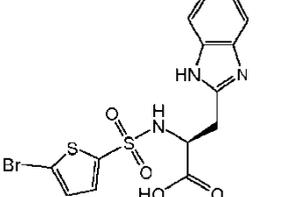
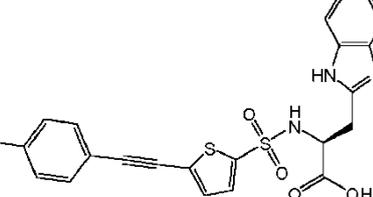
Ejemplo 16-28

Si se siguiera un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 2, excepto por el uso de p-tolilacetileno disponible comercialmente (Sigma Aldrich) y las sulfonamidas (Ejemplo 3-15, Tabla 1) indicadas en la Tabla 2 siguiente, se podrían preparar los compuestos siguientes.

5

TABLA 2

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
16		
17		
18		
19		
20		

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiemo
21		
22		
23		
24		
25		
26		

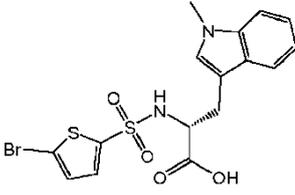
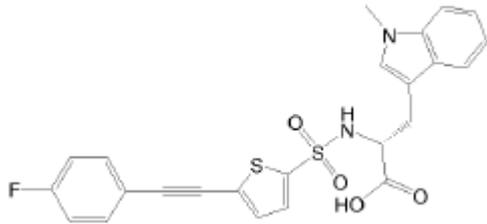
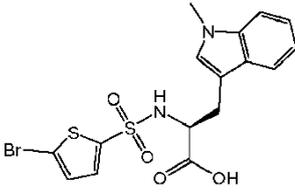
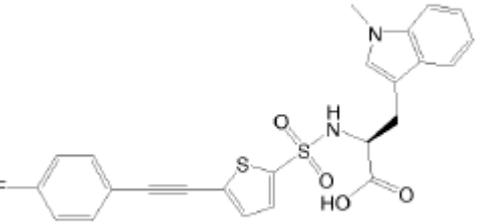
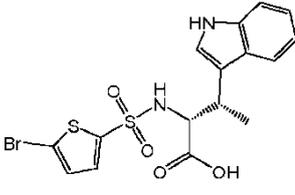
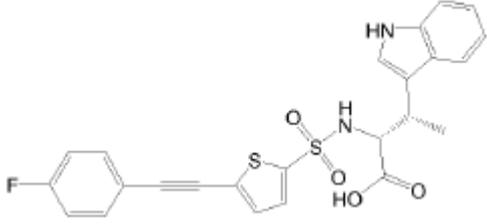
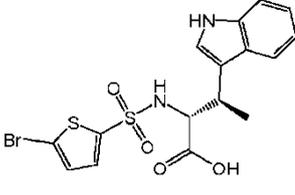
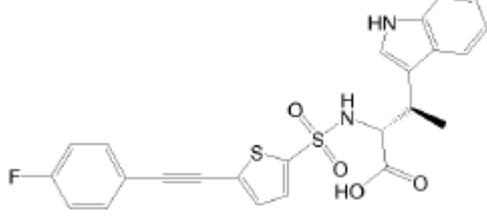
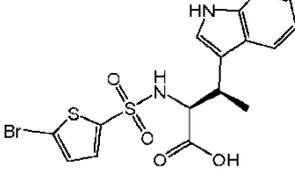
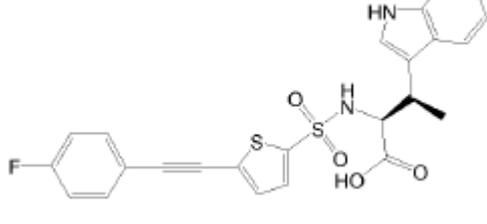
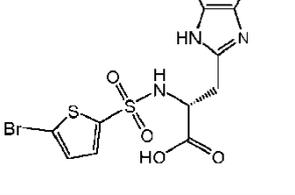
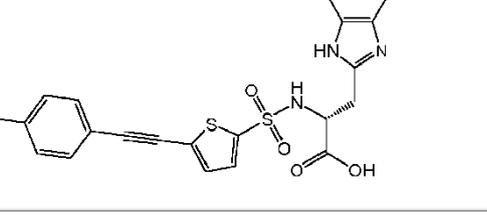
Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
27		
28		

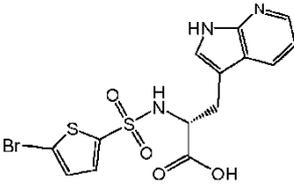
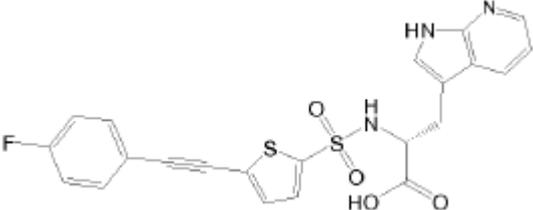
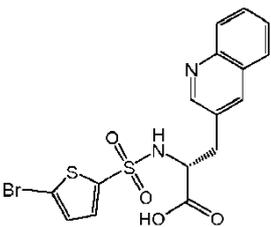
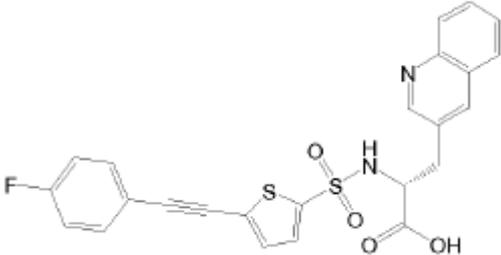
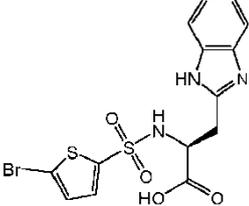
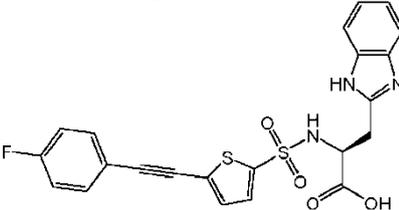
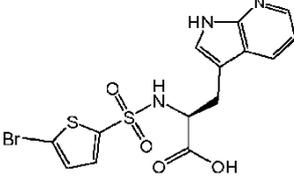
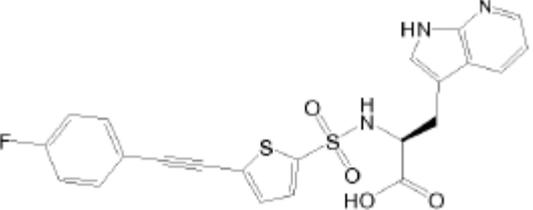
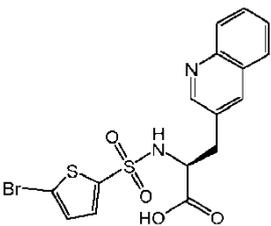
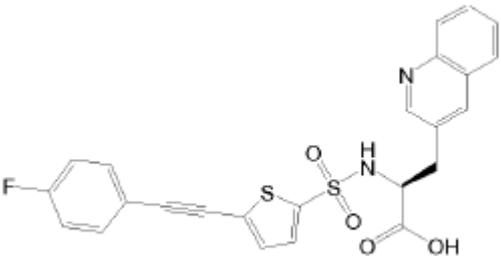
Ejemplo 29-41

Si se siguiera un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 2, excepto por el uso de p-fluorofenilacetileno disponible comercialmente (Sigma Aldrich, cat. # 404330) y las sulfonamidas sintetizadas (Ejemplo 3-15, Tabla 1) indicadas en la Tabla 3 siguiente, se podrían preparar los compuestos siguientes.

TABLA 3

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
29		
30		

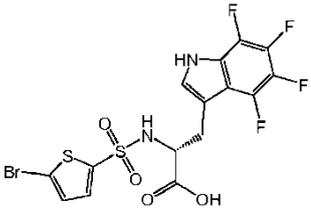
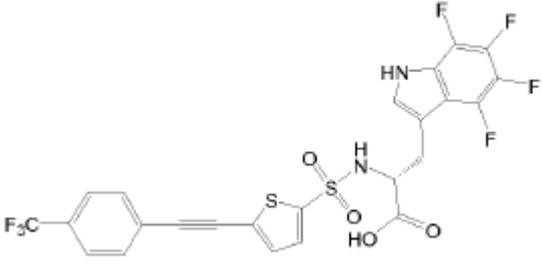
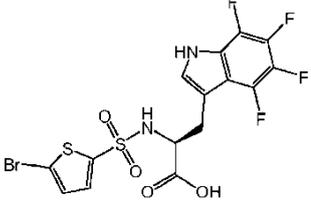
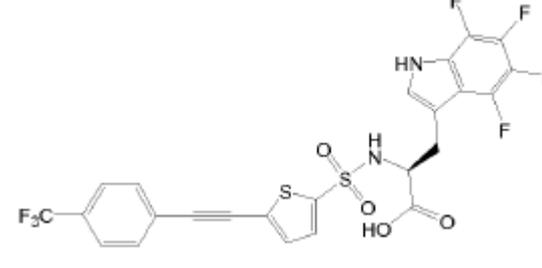
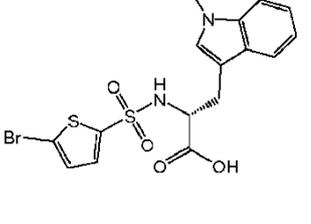
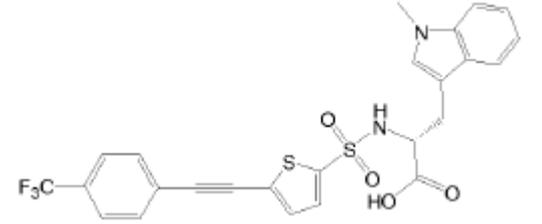
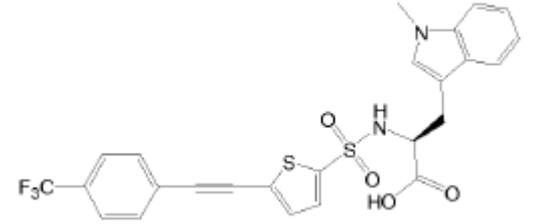
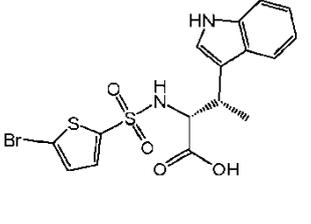
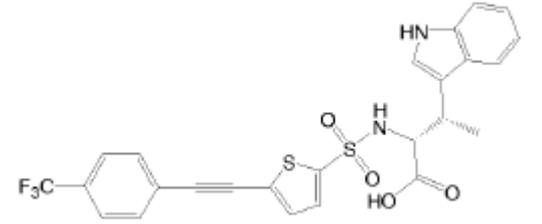
Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
31		
32		
33		
34		
35		
36		

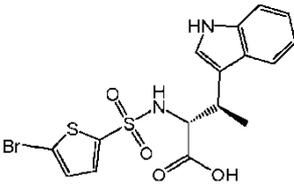
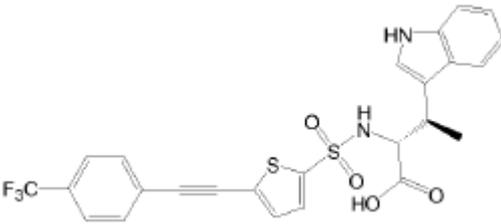
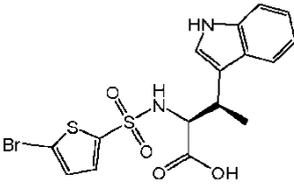
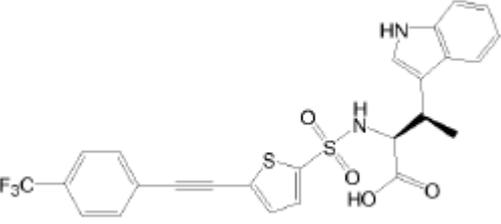
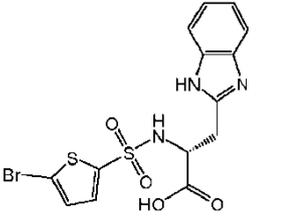
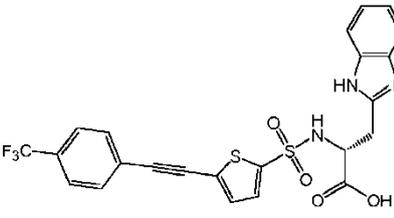
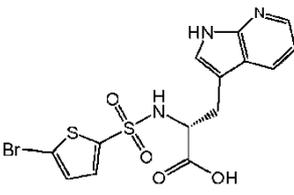
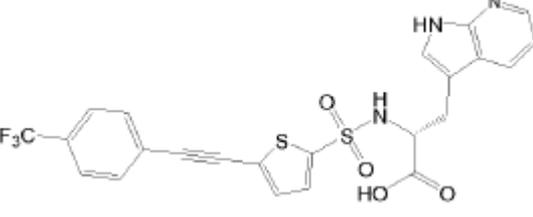
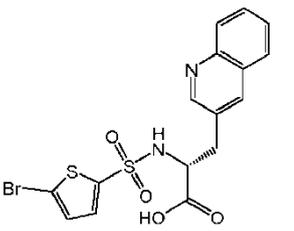
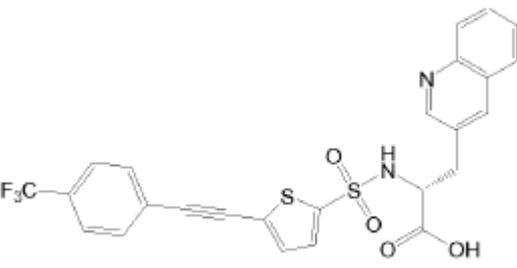
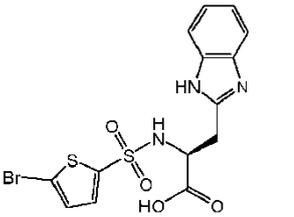
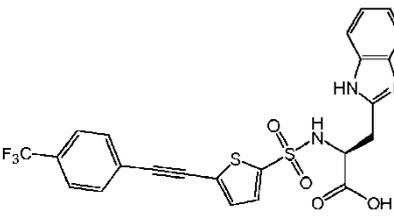
Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
37		
38		
39		
		
40		
41		

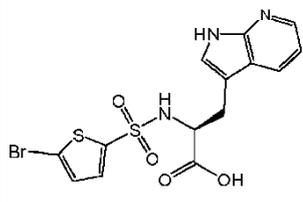
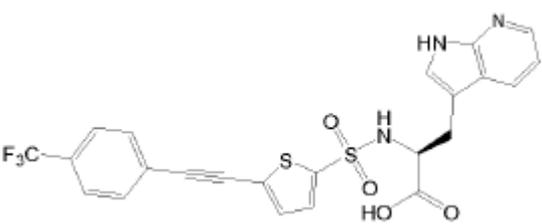
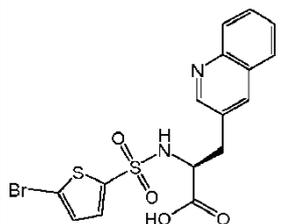
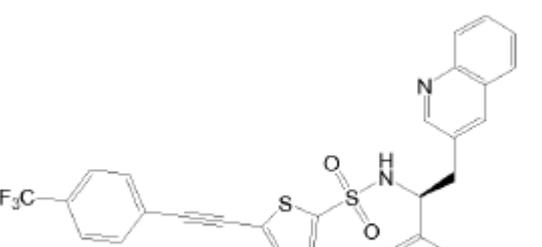
Ejemplo 42-54

Si se siguiera un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 2, excepto por el uso de p-trifluorometilfenilacetileno disponible comercialmente (Sigma Aldrich, cat. # 556432) y las sulfonamidas sintetizadas (Ejemplo 3-15, Tabla 1) indicadas en la Tabla 4 siguiente, se podrían preparar los compuestos siguientes.

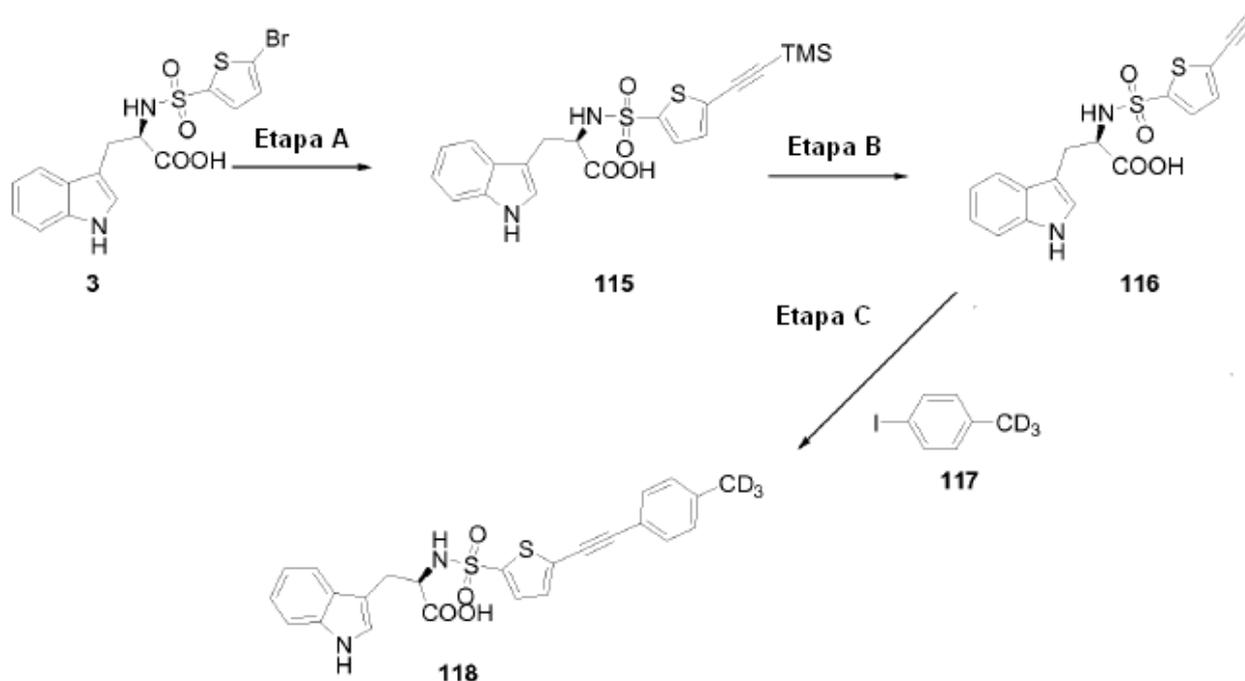
5 TABLA 4

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiemo
42		
43		
44		
45		
46		

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
47		
48		
49		
50		
51		
52		

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiéfeno
53		
54		

Ejemplo 55



Etapa A

- 5 En un matraz de fondo redondo se añadió compuesto producto ácido (R)-2-(5-Bromo-tiéfeno-2-sulfonilamino)-3-(1H-indol-3-il)-propiónico crudo (**3**) (0,25 g, 0,584 mmoles) (sintetizado mediante el Ejemplo 1, Etapa A), etiniltrimetilsilano disponible comercialmente (0,17 g, 1,73 mmoles), PdCl₂P(PPh₃)₂ (0,041g, 0,061 mmoles), yoduro de cobre(I) (0,006g, 0,0315 mmoles), y trietilamina (0,177 g, 1,75 mmoles) disuelto en DMF seco (3 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno y la mezcla se calentó a 50°C durante dos horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una disolución compuesta por NaCl/NaHCO₃/(NH₄)₂CO/agua (1:1:1:1) (x3), agua, disolución salina concentrada, y se secó (Na₂SO₄) para proporcionar el ácido (R)-3-(1H-Indol-3-il)-2-(5-trimetilsilaniletinil-tiéfeno-2-sulfonilamino)-propiónico crudo deseado **115** (185 mg, 71%). LC-MS (ES+) 447; (ES-) 445.

Etapa B

5 A una disolución de ácido (R)-3-(1H-Indol-3-il)-2-(5-trimetilsilaniletinil-tiofeno-2-sulfonilamino)-propiónico crudo **115** (0,126 g, 0,282mmoles) en una mezcla diclorometano/metanol (1:1, 10 mL) se añadió K₂CO₃ (0,047g, 0,34 mmoles) y se dejó con agitación durante 60 minutos. La mezcla de reacción se filtró y la fracción retenida se lavó con una mezcla diclorometano-metanol. El filtrado combinado se concentró bajo presión reducida y se purificó usando una columna SAX para obtener ácido (R)-2-(5-Etinil-tiofeno-2-sulfonilamino)-3-(1H-indol-3-il)-propiónico **116** (52 mg, 49%). LC-MS (ES+) 375; (ES-) 373.

Etapa C

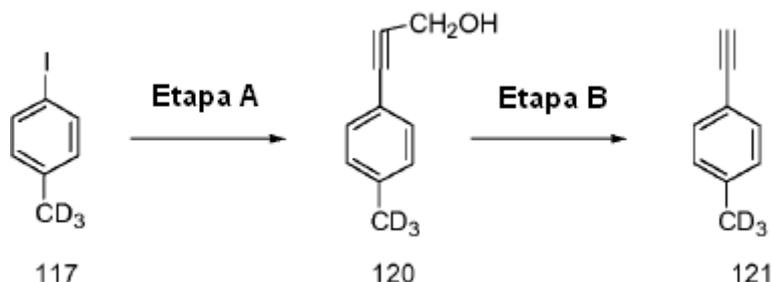
10 En un matraz de fondo redondo se añadió ácido (R)-2-(5-Etinil-tiofeno-2-sulfonilamino)-3-(1H-indol-3-il)-propiónico **116** (0,052 g, 0,139 mmoles), yodotolueno-(D₃, 98%) **117** (0,061 g, 0,28 mmoles) (obtenido de 4-aminotolueno disponible comercialmente (D₃, 98%) mediante una reacción de Sandmeyer indicada en el Ejemplo 56), PdCl₂P[(PPh₃)₂] (0,01g, 0,015 mmoles), yoduro de cobre(I) (0,002g, 0,0105 mmoles) y trietilamina (0,025 g, 0,247 mmoles) y se disolvió en DMF seco (3 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno y la mezcla se calentó a 50°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una disolución compuesta por NaCl/NaHCO₃/(NH₄)₂CO₃/agua (1:1:1:1) (x3), agua, disolución salina concentrada, y se secó sobre sulfato de sodio (Na₂SO₄). La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó bajo presión reducida para proporcionar **118** crudo que se purificó mediante cromatografía en una columna SAX para proporcionar **118** purificado (0,025g, 38%). El producto se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa preparativa para obtener el producto **118** deseado ácido (R)-3-(1H-Indol-3-il)-2-[5-(4-trideuterometil-feniletinil)-tiofeno-2-sulfonilamino]-propiónico-(D₃, 98%) con una pureza de >95% por HPLC. LC-MS (ES+) 468; (ES-) 466.

¹H RMN (300 MHz, MeOH-*d*₄) δ 3,17-3,25 (m), 4,32-4,35 (m), 5,60-5,66 (m), 7,05-7,68 (m), 10,4 (br s).

Ejemplo 56: Síntesis de Material de Partida 4-yodotolueno (D₃, 98%)**Etapa A**

25 Siguiendo el método clásico de Griess (Practical Organic Chemistry, Richard Clay & Sons, página 144, Preparación #60, (1900)) en el que se combinan 0,2 gramos (1,8 mmoles) de toluidina (D₃, 98%), disponible comercialmente en C/D/N Isotopes (Quebec, Canadá) (**119**) con 0,4 ml D₂SO₄ (obtenido comercialmente de Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) y la mezcla resultante se enfría hasta que la temperatura de la mezcla agitada alcanza 0°C y se añaden lentamente en tres partes 160 mg (2,32 mmoles) de nitrito de sodio durante 10 minutos asegurándose que la temperatura no sube por encima de 10°C. Después de haber añadido el nitrito de sodio, se añadió una disolución compuesta por 48 mg (2,9 mmoles) de KI en 1ml D₂O (obtenido comercialmente de Cambridge Isotope Laboratories) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con D₂O (10 mL) y se extrajo con éter (x2). La capa de éter se lavó con 10% Na₂S₂O₃ en D₂O (x2) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El producto crudo (**117**) se purificó por cromatografía en columna usando hexano como el eluyente para obtener el producto 4-Yodotolueno (D₃, 98%) puro deseado (**117**) (0,16 g, 40%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ, 6,93 (d, 2H, J=7,8 Hz), 7,56 (d, 2H, J=7,8 Hz).

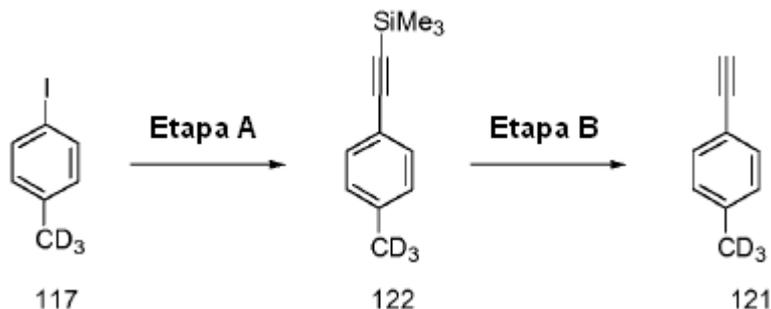
35 Cuando el D₂SO₄ se reemplazó por DCl (obtenido comercialmente en Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) sólo se obtuvo un rendimiento del 20% de **117**.

Ejemplo 57: Síntesis de 1-Etínil-4-metil-benceno (D3, 98%)(Método 1)**Etapa A**

5 Si se siguiera el método de Godt (Godt, A.; J. Org. Chem. 62(21), 7471-7472 y sección suplementaria), entonces si a una mezcla enfriada (0°C) y agitada compuesta por 4-Yodotolueno(D3) (**117**) (obtenido del Ejemplo 56), se añadieran Pd(PPh₃)₂Cl₂ (2,2 mmoles), CuI (3,5 mmoles) en tetrahidrofurano (150 ml) y piperidina (70ml) a Prop-2-in-1-ol disponible comercialmente (252 mmoles) durante el curso de 30 minutos bajo nitrógeno se obtendría el producto acoplado acetileno crudo (**120**). El producto crudo (**120**) podría purificarse mediante cromatografía en columna (éter-hexano) para proporcionar 3-p-Tolil-prop-2-in-1-ol (D3) puro (**120**)

Etapa B

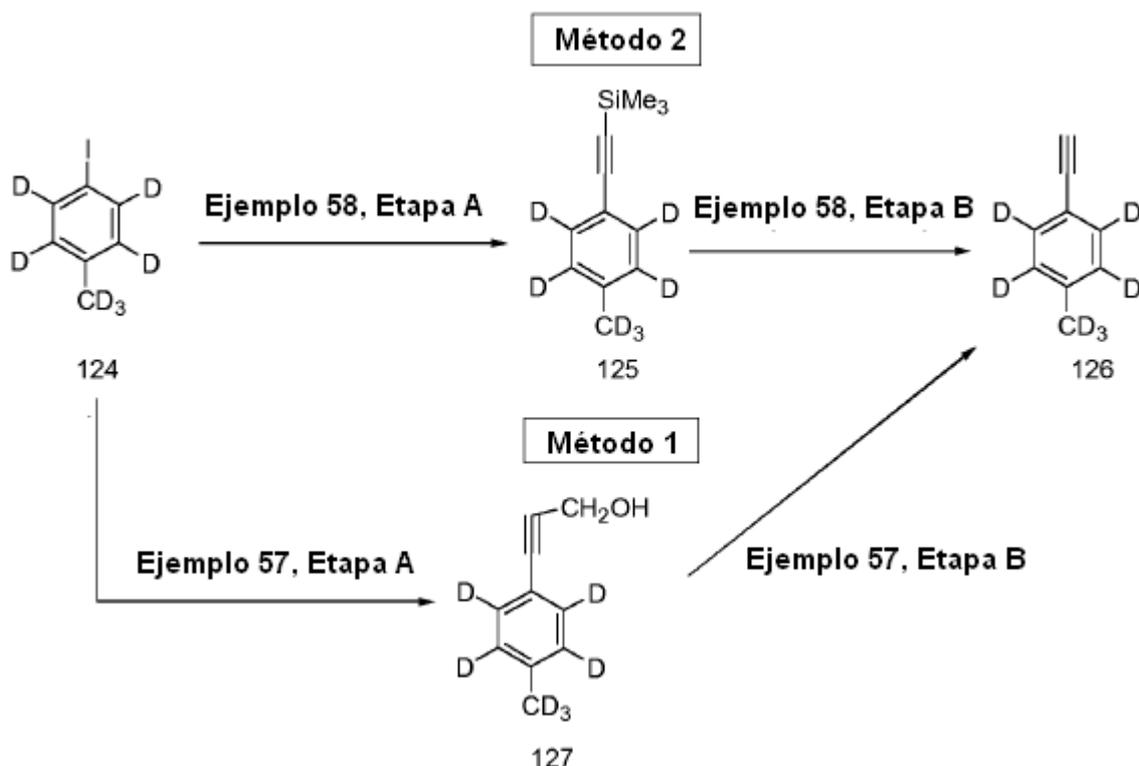
10 Si se continuara siguiendo con el método de Godt y se añadieran 535 mmoles de KOH en polvo y 1,0 Moles de MnO₂ a una disolución agitada compuesta por el 3-p-Tolil-prop-2-in-1-ol (D3) (**120**) (109 mmoles) en dietil éter (500 ml) se obtendría después de 5 horas, el 1-Etínil-4-metil-benceno (D3) crudo resultante (**121**) que podría purificarse por destilación bajo presión reducida para proporcionar el producto 1-Etínil-4-metil-benceno (D3) puro (**121**).

Ejemplo 58: Síntesis alternativa de 1-Etínil-4-metil-benceno (D3, 98%)(Método 2)**Etapa A**

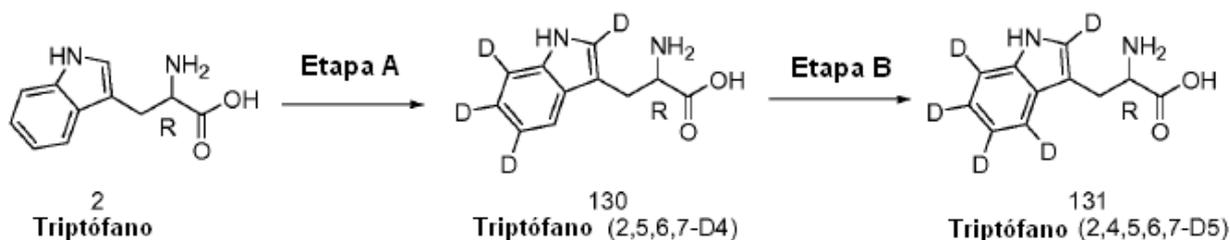
20 Si se siguiera el método de Zhang y Colaboradores (Zhang, W.; et al. Org. Synth. 84, 177-191, (2007)) se podrían coger 38 mmoles del producto Yodotolueno (D3) (**117**) (obtenido mediante el Experimento 56) y añadirlo a un matraz de fondo redondo que contiene CuI (0,77 mmoles), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1,9 mmoles) y ponerlo en vacío y después nitrógeno. Al sólido se pueden añadir tetrahidrofurano (90 ml) y piperidina (55 ml) y a la mezcla resultante se puede añadir en dos partes durante 5 minutos, 1-trimetilsililacetileno (380 mmoles) disponible comercialmente y la mezcla dejarse con agitación bajo nitrógeno durante 24 horas, que después de filtrar a través de un embudo de vidrio fritado con porosidad media y concentrar la disolución resultante se obtendría el producto acetileno acoplado crudo (**122**) que puede purificarse mediante cromatografía en columna para proporcionar producto acoplado acetileno puro (**122**).

Etapa B

30 El compuesto **122** de la Etapa A anterior podría tratarse con NaOD/D₂O y Etanol(D) (todos obtenidos de Cambridge Isotope laboratories) para proporcionar el producto acetileno desprotegido (**117**) que podría purificarse mediante cromatografía en columna para proporcionar el producto 1-Etínil-4-metil-benceno (D3, 98%) resultante (**117**).

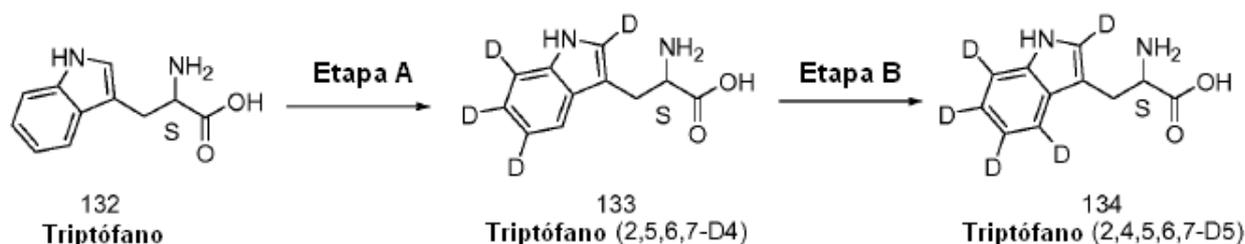
Ejemplo 59: Síntesis de 1-Etiniil-4-metil-benceno (D7, 98%)

5 Para preparar 1-Etiniil-4-metil-benceno (D7, 98%) **126** se podría empezar con 4-yodotolueno disponible comercialmente (D7, 98%) (C/D/N/ Isotopes, Inc. Quebec Canadá, cat# D-6325) siguiendo el Método 1 como se representa en el Ejemplo 57 o se podría seguir el Método 2 como se representa en el Ejemplo 58 para producir después de purificación en columna 1-Etiniil-4-metil-benceno (D7, 98%) (**126**).

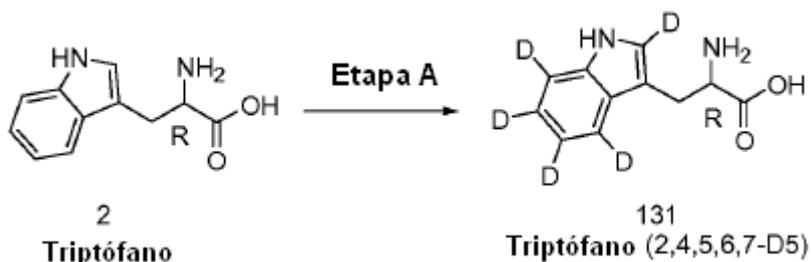
Ejemplo 60: Método 1, Síntesis de (R)-triptófano (2,3,5,6,7-D5)

10 Para preparar el triptófano con indol totalmente deuterado **131** se podría seguir el método de Wishart y Colaboradores (Wishart, D.S.; et al. Biochemica et Biophysica Acta., 1164, 34-46, (1993) empezando con 0,5 gramos de catalizador reducido de Adams (Pt°, preparado según Wishart et al.) en un matraz de fondo redondo de 250 ml que contiene 2,0 gramos de triptófano (con el carbono alfa teniendo quiralidad (R) y obtenido de Alfa-Aesar o Sigma Aldrich). A la mezcla se podrían añadir 30 ml de 99,9% D₂O y después 1,2 ml de una disolución al 40% de NaOD (ambos obtenidos de Cambridge Isotope Laboratories) y la mezcla ponerse a reflujo bajo nitrógeno y en la oscuridad durante 24 horas para obtener el Triptófano parcialmente deuterado crudo (2,5,6,7-D4) (**130**) que podría aislarse y purificarse en esta etapa por la adición de HCl y procesamiento. Si se requiere que el indol esté totalmente deuterado se podría tomar el producto Triptófano crudo (2,5,6,7-D4) (**130**) y añadir otros 100 ml de D₂O con 2,0 ml de 40% NaOD y ponerse de nuevo a reflujo durante otras 24 horas para aislar el producto Triptófano (2,4,5,6, 7-D5) resultante (**131**) que podría purificarse por recristalización de agua o alcohol después de acidificación con HCl.

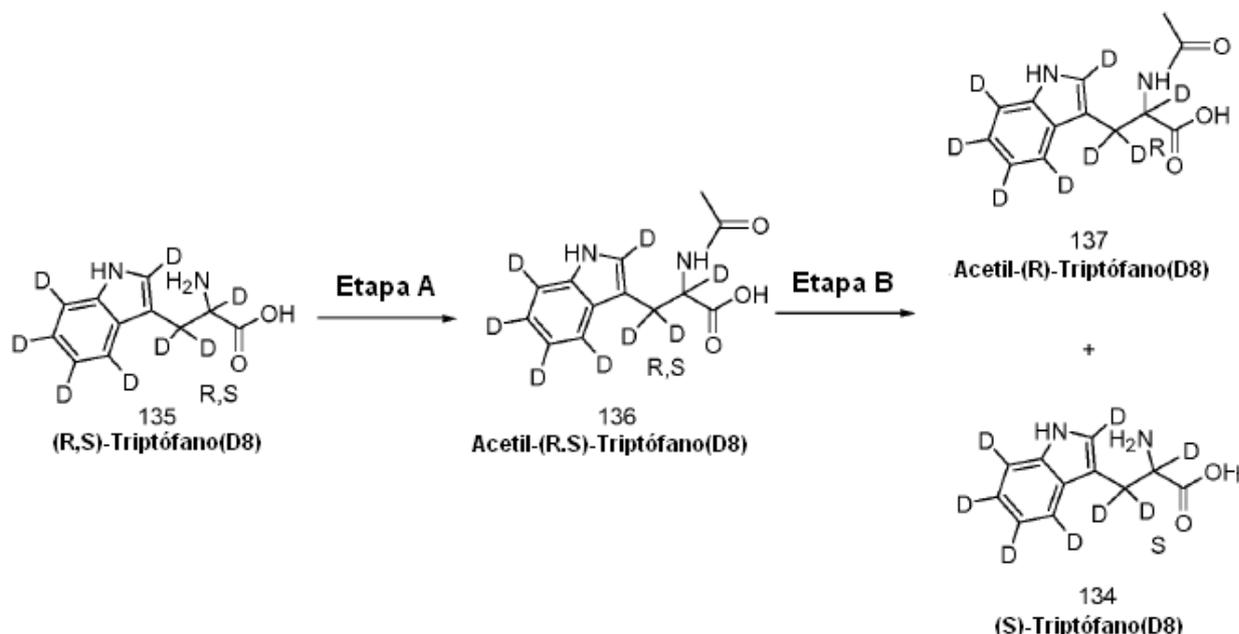
20

Ejemplo 61: Método 1, Síntesis de (S)-triptófano (2,3,5,6,7-D5)

Para preparar el Triptófano con indol totalmente deuterado que tiene una configuración quiral S se podría seguir el método como se indica en el Experimento 60, Método 1 (Wishart, D.S.; et al. Biochemica et Biophysica Acta., 1164, 34-46, (1993)) empezando con 0,5 gramos de catalizador reducido de Adams (Pt^o, preparado según Wishart et al.) en un matraz de fondo redondo de 250 ml que contiene 2,0 gramos de Triptófano (con el carbono alfa teniendo quiralidad (S) y obtenido de Sigma Aldrich o Alfa-Aesar) (132). A la mezcla se podrían añadir 30 ml de 99,9% D₂O y después 1,2 ml de una disolución al 40% de NaOD (ambos obtenidos de Cambridge Isotope Laboratories) y la mezcla ponerse a reflujo bajo nitrógeno y en la oscuridad durante 24 horas para obtener el Triptófano parcialmente deuterado crudo (2,5,6,7-D4) (133) que podría aislarse y purificarse en esta etapa por la adición de HCl y procesamiento. Si se requiere que el indol esté totalmente deuterado se podría tomar el producto Triptófano crudo (2,5,6,7-D4) (133) y añadir otros 100 ml de D₂O con 2,0 ml de 40% NaOD y ponerse de nuevo a reflujo durante otras 24 horas para aislar el producto Triptófano (2,4,5,6, 7-D5) resultante (134) que podría purificarse por recristalización de agua o alcohol después de acidificación con HCl.

Ejemplo 62: Método 2, Síntesis de (R)-triptófano (2,3,5,6,7-D5)

Otra ruta para preparar el Triptófano con indol totalmente deuterado es mediante reacción de intercambio de deuterio con catálisis ácida usando Níquel de Raney. Antes de usar el Níquel de Raney se deben eliminar en primer lugar los hidrógenos y esto puede hacerse siguiendo el método de Pathak y colaboradores (Pathak, et al. Tetrahedron Letters, 43(18), 4227-4234, (1987)). Pueden lavarse 100 ml (volumen depositado) de Níquel de Raney obtenido comercialmente (Sigma-Aldrich) (20 x 30 ml) con D₂O (99,9%) (Cambridge Isotope Laboratories) asegurándose que el catalizador se deja permanecer en agua durante al menos 30 minutos entre cada lavado. También se podría incluir un lavado con Dioxano anhidro en el comienzo para aumentar la eliminación del H₂O inicial. El método de Badenock-Jones (Badenock-Jones, J.; et al. Journal of Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals-Vol. XX, No. 12, 1325-1330, (1983)) podría usarse para realizar el intercambio real de los hidrógenos del indol. Se podrían tomar 0,5 gramos de (R)-Triptófano (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin o de Alfa-Aesar) y disolverlos en 500 ml de D₂O (Obtenido de Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) y 100 ml de DCl (obtenido de Cambridge Isotope Laboratories) y 50 ml (volumen depositado) de Níquel de Raney y la mezcla calentarse a 100°C con agitación durante 10 días. El D₂O puede eliminarse bajo presión reducida y el procedimiento repetirse una vez más para asegurar una incorporación máxima de deuterio. El producto podría purificarse por cromatografía en columna de intercambio iónico o HPLC en fase inversa para proporcionar (R)-triptófano purificado (D5) (131). Este procedimiento también puede hacerse en el (S)-triptófano (132) para proporcionar el compuesto (S)-triptófano (D5) resultante (134).

Ejemplo 63: Síntesis de (R) y (S)-triptófano (D8)

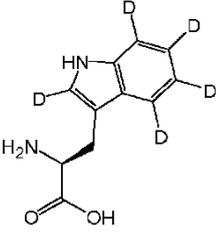
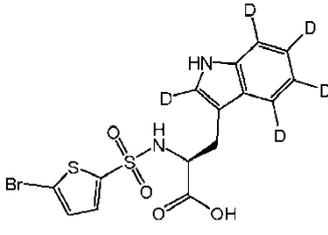
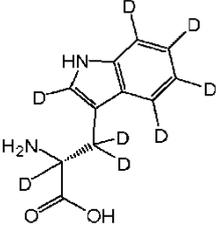
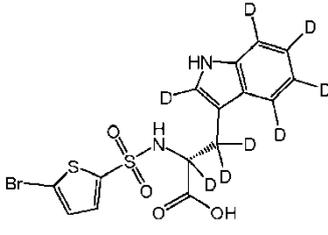
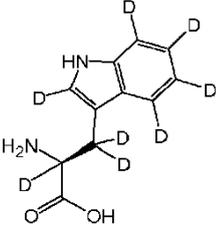
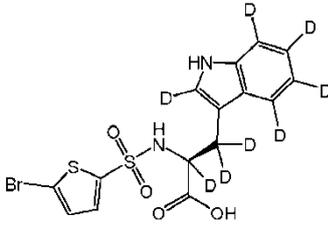
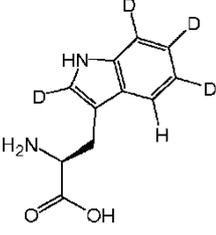
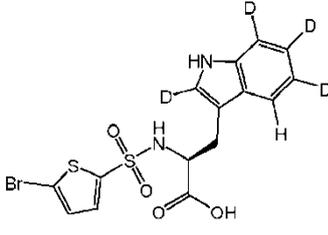
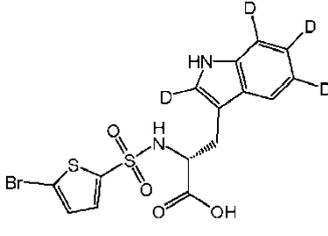
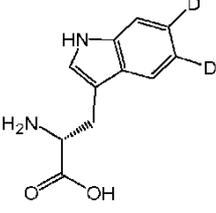
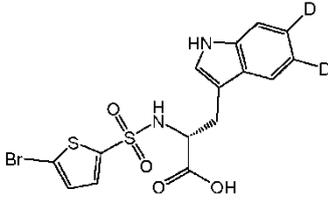
Si se tuviera interés en sintetizar el Triptófano totalmente deuterado (D8) se podría adquirir Triptófano deuterado racémico (R,S), (D8) disponible comercialmente (De C/D/N, Quebec, Canadá, cat# D-1648) (**135**). Se tendrían que separar los dos enantiómeros. Se podría seguir entonces el método de Bommarium y colaboradores (Bommarium, A.S.; et al. Tetrahedron Asymmetry, 8(19), 3197-3200, (1997)) mediante el cual se podría tomar un gramo de la mezcla racémica deuterada (**135**) y ponerlo en un matraz de fondo redondo de 100 ml que contiene 25 ml de dimetilformamida y se podrían añadir 1,2 equivalentes de anhídrido acético y 1,5 equivalentes de piridina y agitar la mezcla toda la noche. Después de eliminar los componentes volátiles de la mezcla de reacción bajo presión reducida, se podría purificar la mezcla de Triptófano acetilado (D8) resultante por cromatografía en columna. Se podría tomar la mezcla racémica de triptófano Acetilado (**136**) e hidrolizar enzimáticamente el (S)-Triptófano Acetilado selectivamente usando la Acilasa de *Aspergillus oryzae* (adquirida en Amano Enzymes, Inc. y usando sus protocolos proporcionados) a una concentración de 30g/l y usando una disolución de 0,3M mezcla racémica acetilada (**136**) a pH= 7, temp. 37°C para proporcionar (S)-Triptófano desacetilado (D8) (**134**). El (R)-Triptófano Acetilado (D8) (**137**) podría bien hidrolizarse químicamente o enzimáticamente (es decir, mediante una Lipasa) para proporcionar la amina libre resultante.

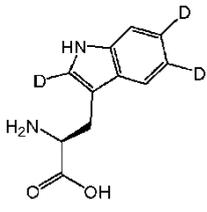
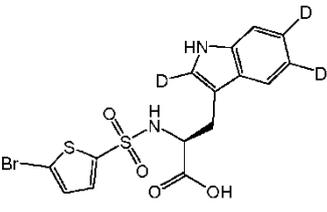
Ejemplo 70-77

Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, excepto por el uso de Triptófanos deuterados de Exp. 60-63 (y/o derivados de Triptófano disponibles comercialmente obtenidos de Cambridge Isotope Laboratories, C/D/N y Sigma-Aldrich) indicados en la Tabla 5 siguiente y cloruro de bromosulfonilo **1**, podrían prepararse los compuestos siguientes.

TABLA 5

Ej. #	Aminoácido	Producto sulfonamida
70		

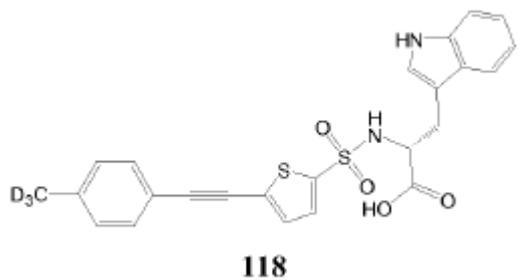
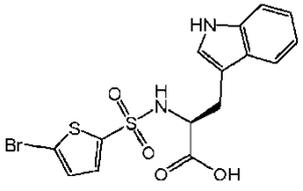
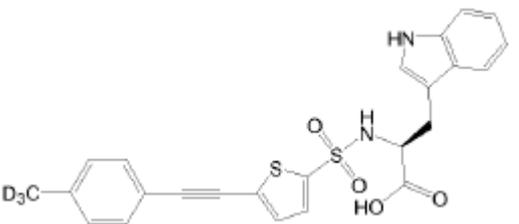
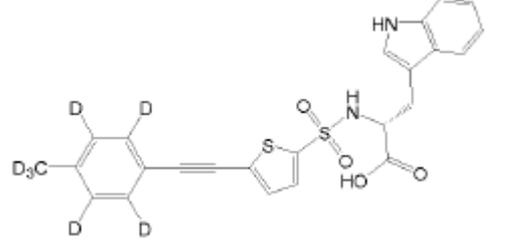
Ej. #	Aminoácido	Producto sulfonamida
71		
72		
73		
74		
75		
76		

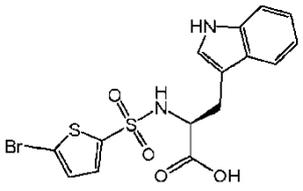
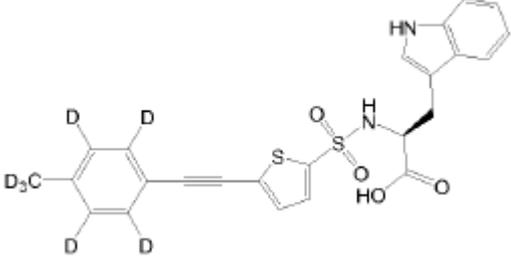
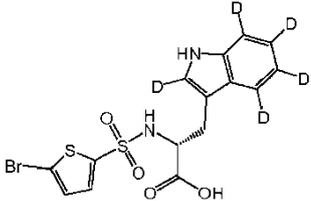
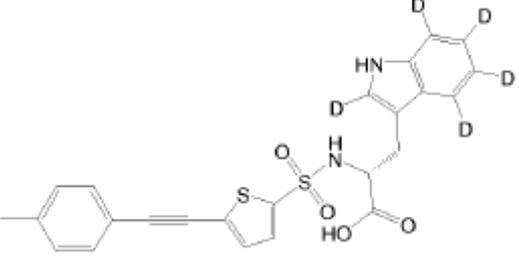
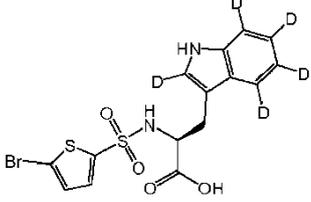
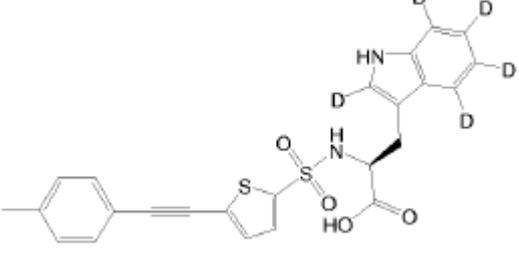
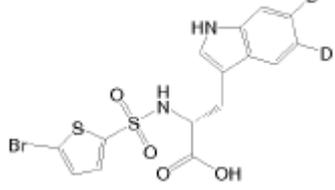
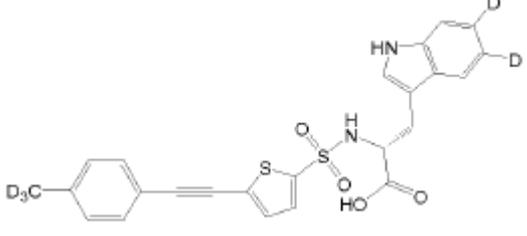
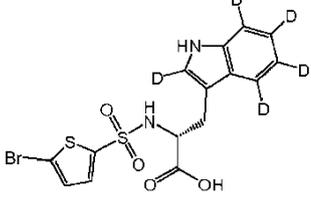
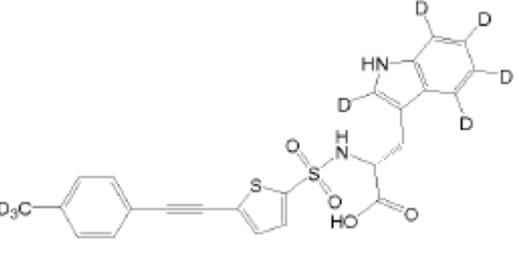
Ej. #	Aminoácido	Producto sulfonamida
77		

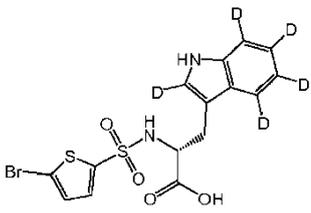
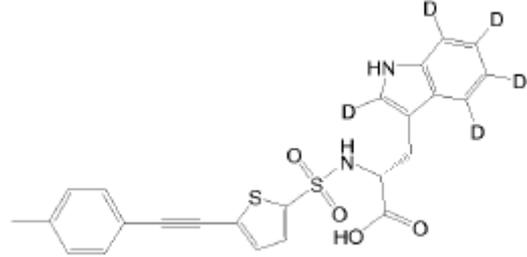
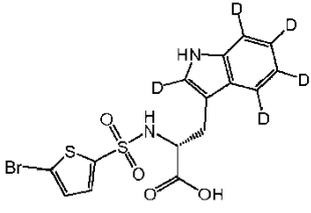
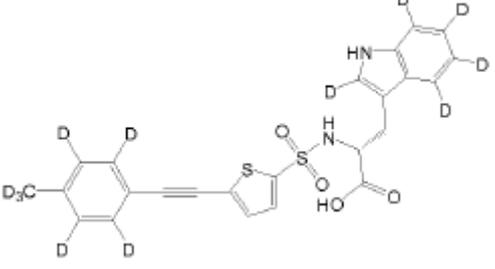
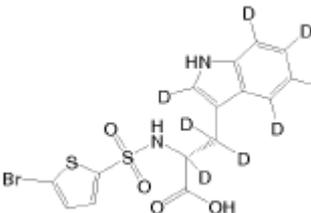
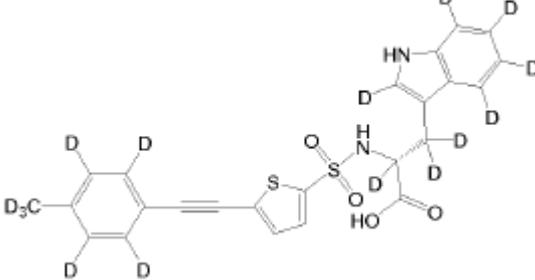
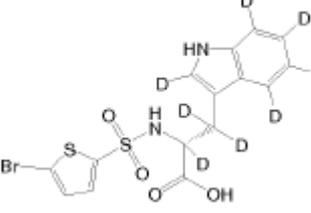
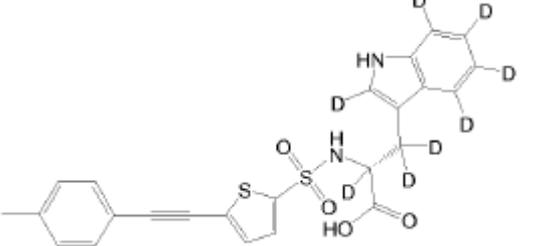
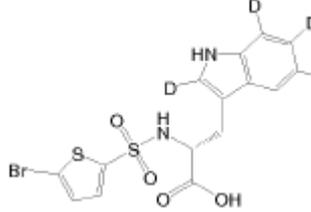
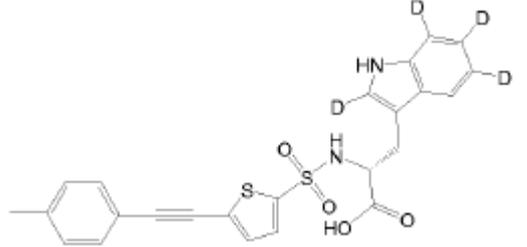
Ejemplo 78-91

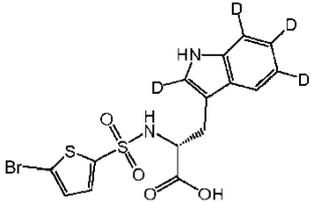
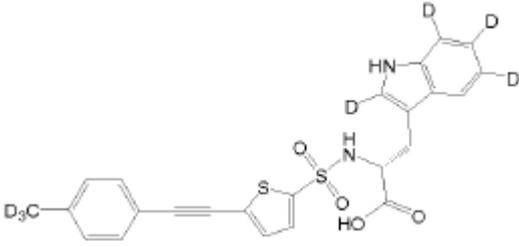
5 Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 2, excepto por el uso de los p-tolilacetilenos preparados previamente (Ejemplo 57-59) y las sulfonamidas sintetizadas (Ejemplo 1 y Ejemplos 70-77, Tabla 1) indicados en la Tabla 6 siguiente, podrían prepararse los compuestos siguientes. (El Ejemplo 78 es una ruta alternativa a la síntesis del compuesto 118 que se sintetizó mediante la ruta en el Ejemplo 55).

TABLA 6

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiéfeno
78		 118
79		
80		

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
81		
82		
83		
84		
85		

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
86		
87		
88		
89		
90		

Ej. #	Sulfonamida	Producto acoplado feniletinil-tiofeno
91		

Ejemplo 105

Ensayo in-vitro para determinar la estabilidad microsomal de compuestos seleccionados en microsomas humanos y de ratón.

- 5 La estabilidad en microsomas humanos y de ratón se determinó para compuestos seleccionados siguiendo el método de Houston (Houston, JB; Biochem. Pharmacol. 47, (1994),1469).

Se usó una concentración 1 μ M de compuesto y microsomas humanos y de ratón separados (0,3 mg/mL, BD bioscience) en el ensayo in-vitro. Para asegurar un suministro de energía apropiado para la degradación microsomal del compuesto, se añade un sistema regenerador de energía comprendido por 100 mM fosfato de potasio, 2mM NADPH, 3mM MgCl₂, pH = 7,4. y la proteína microsomal a cada muestra y la suspensión resultante se incubó en duplicado durante 60 min a 37°C. en un agitador giratorio. Se corre un control para cada agente de ensayo en duplicado omitiendo NADPH para detectar la degradación sin NADPH. A T=0 y T= 60 min., se retira una alícuota de cada reacción experimental y control y se mezcla con un volumen igual de Disolución de Parada enfriada en hielo (que consiste en 0,3% ácido acético en acetonitrilo que contiene haloperidol y diclofenac como estándares internos).
 10 Las reacciones paradas se incuban durante al menos diez minutos a -20°C, y se añade un volumen adicional de agua. Las muestras se centrifugan para eliminar las proteínas precipitadas, y los sobrenadantes se analizan por LC-MS/MS para determinar el porcentaje de compuesto remanente. El sistema LC-MS/MS usado fue un espectrómetro de masa Agilent 6410 acoplado con un Agilent 1200 HPLC y un automuestreador enfriado CTC PAL, todos controlados por software MassHunter (Agilent), o un espectrómetro de masa ABI2000 acoplado con un Agilent 1100 HPLC y un automuestreador enfriado CTC PAL, todos controlados por software Analyst (ABI). Después de la separación en una columna de HPLC de fase inversa C18 (Agilent, Waters, o equivalente) usando un sistema de gradiente acetonitrilo-agua, los picos se analizaron por espectrometría de masa (MS) usando ionización ESI en modo MRM.

25 La Tabla 7 y 8 siguientes muestran la estabilidad microsomal de compuestos seleccionados tanto en microsomas humanos como de ratón.

Tabla 7 Estabilidad en microsomas humanos in-vitro de compuestos seleccionados

Compuesto ID #	Concentración del compuesto (microMoles)	Especie de ensayo	Media de parental remanente con NADPH (%) ¹	Media de parental remanente sin NADPH (%) ¹
5	1	Humana	86	89
118	1	Humana	88	97

¹ a T = 60 minutos

Tabla 8 Estabilidad en microsomas de ratón in-vitro de compuestos seleccionados

Compuesto ID #	Concentración del compuesto (microMoles)	Especie de ensayo	%Media de parental remanente con NADPH (%) ¹	%Media de parental remanente sin NADPH (%) ¹
5	1	Ratón	83	88
118	1	Ratón	85	91

¹ a T = 60 minutos

Medición de inhibición de dolor neuropático -(SNL)-Modelo animal en ratón:.

Antecedentes y descripción del modelo animal

5 Para medir los efectos inhibidores del dolor neuropático de los inhibidores de MMP de la presente invención, se usó el modelo de ligadura de nervio espinal (SNL) en ratón en un número seleccionado de compuestos. Este modelo que empezó con el trabajo de Bennet y colaboradores (Bennet, G.J. et al. Pain, 33, (1988), 87-107) y fue optimizado por Kim y Chung (Kim, S.H.; Chung, J.M. Pain, 50, (1992), 355-363) engloba en primer lugar, bajo aumento, la eliminación de un tercio del proceso transversal y la identificación y disección del nervio espinal L5 libre del nervio espinal adyacente L4 en el ratón. El nervio espinal L5 se liga fuertemente usando sutura de seda 6.0. La lesión nerviosa da lugar a hiperalgesia que se manifiesta en sí misma por respuestas aumentadas a estímulos mecánicos, de calor y/o enfriamiento. En este caso, la hiperalgesia mecánica se ensaya mediante monofilamentos de Von Frey en el que filamentos de varios espesores y fuerza de flexión se aplican individualmente a la superficie plantar del pie del ratón. La fuerza umbral necesaria para la retirada de la pata disminuye dramáticamente después de la cirugía nerviosa. Los inhibidores del dolor potentes revertirán este efecto resultando en la necesidad de aplicar una fuerza mayor para causar la retirada de la pata del roedor.

Ejemplo 110: Administración intratecal (i.t.) de inhibidores de MMP en el modelo de dolor en ratón (SNL).

20 Después de la medición de umbral de línea base de la pata preoperatorio (Día -2), se sometieron ratones macho FVB a lesión por SNL (Día -1). Al día siguiente (Día 0) después de cirugía SNL, los animales se ensayaron para mediciones de umbral de línea base post-operatorio para alodinia mecánica; y los animales se asignaron aleatoriamente a uno de 3 grupos de tratamiento (véase la Tabla 9). Durante el curso del estudio, se midió el umbral de retirada de la pata de estos animales en respuesta a estimulación mecánica usando el Ensayo de Monofilamentos de von Frey.

25 Para evitar efectos sistémicos de los inhibidores de MMP, los inhibidores de MMP de la presente invención se administraron en el espacio del fluido cerebroespinal (CSF) alrededor de la médula espinal lumbosacra mediante administración intratecal (i.t.), con la idea de tomar como diana las MMP en el DRG, médula espinal, y CSF espinal. La administración intratecal de inhibidores de MMP podría tener como diana no sólo las células de la médula espinal sino también células DRG. Cada inyección intratecal (i.t.) se llevó a cabo según la técnica de Hylden y Wilcox (Hylden JL, Wilcox GL. Eur. J Pharmacol., 67, (1980), 313-6) se disolvieron en primer lugar 5,2 mg de cada uno de los inhibidores de MMP en 140 microlitros de DMSO y después se pusieron en 1.260 microlitros de 0,5% hidroxipropil celulosa (HPC) en agua para preparar una suspensión fina compuesta por el compuesto en 10%DMSO-0,5% hidroxipropil celulosa. Se inyectaron 10 microlitros de la mezcla en el espacio intratecal de ratones macho FVB (que pesaban 22-25 gramos cada uno y obtenidos de Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me), por punción lumbar en un volumen de 10 µl/ratón usando una microjeringa Hamilton mediante una aguja de calibre 30 insertada entre las vértebras lumbares 5 y 6. Brevemente, cada animal se sostuvo firmemente por la cintura pélvica en una mano, mientras se insertaba la aguja en el tejido en el lado derecho del proceso espinoso L5 o L6. La aguja se movió hacia delante y se deslizó en el surco entre el proceso espinoso y el proceso transversal y se movió suavemente hacia delante hacia el espacio intervertebral a un ángulo de ~10°. Al insertarse la aguja (~0,5 cm) en la columna vertebral fue evidente un movimiento rápido de la cola, y se inyectó la disolución. La Tabla 9 resume los distintos grupos de tratamiento y la frecuencia de la administración.

Tabla 9. Grupos de tratamiento i.t. de animales y compuestos ensayados

Tratamiento	# de Ratonos	Dosis	Ruta de administración y frecuencia
Vehículo	8	Grupo 1, 10 µl/ratón	i.t, inyecciones diarias, desde el día 1-6, empezando el día 1
Compuesto # 5	4	Grupo 2, 10 µl/ratón	i.t, inyecciones diarias, desde el día 1-6, empezando el día 1
Compuesto # 118	5	Grupo 3, 10 µl/ratón	i.t, inyecciones diarias, desde el día 1-6, empezando el día 1

*Vehículo = 10% DMSO, 0,5% hidroxipropil celulosa en agua

5 Ensayo de alodinia táctil. La alodinia mecánica se midió usando los filamentos calibrados de von Frey (monofilamentos Semmes-Weinstein; Stoelting, Wood Dale, IL, EEUU.). La superficie plantar de la pata izquierda lesionada de cada animal se ensayó como se describe por Chaplan et al. (Journal of Neuroscience Methods, 53, (1994), 55-63). La respuesta del cincuenta por ciento del umbral de retirada de la pata se determinó incrementando o disminuyendo secuencialmente la fuerza del estímulo según el "método arriba-abajo" de Dixon (Annual Review Pharmacology Toxicology, 20, (1980), 441-462). Para los ratones, se usaron ocho filamentos de von Frey, con
10 fuerzas de flexión con incrementos logarítmicos aproximadamente iguales (número von Frey: 1,65, 2,36, 2,44, 2,83, 3,22, 3,61, 3,84, 4,08, y 4,17; equivalente a fuerza de 0,005, 0,02, 0,03, 0,07, 0,17, 0,41, 0,69, 1,20, y 1,48g, respectivamente).

15 Antes del ensayo, cada animal se puso en una cámara de plástico transparente suspendida con un fondo de tela metálica y se aclimataron durante 15 minutos. El ensayo se inició con el 0,07 g (marca en el asa de 2,83) aplicado perpendicularmente a la superficie plantar de la pata trasera afectada; cada filamento se aplicó con una presión suficiente para causar un efecto de flexión. La ausencia de respuesta de subida/retirada de la pata después de 6 s indujo el uso del filamento de peso superior siguiente. La retirada de la pata, que indica una respuesta positiva, indujo el uso de un filamento más débil. Después de una respuesta inicial positiva (es decir, retirada de la pata), el
20 ensayo continuó durante cuatro medidas adicionales, y se usó para calcular el umbral de respuesta. Cuatro respuestas positivas consecutivas recibieron una puntuación de 0,001 g, y cinco respuestas negativas consecutivas (es decir, sin retirada de la pata) recibieron una puntuación de 1,5 g.

Análisis para el ensayo de alodinia táctil. Se calculó el 50% del umbral de retirada de la pata (PWT; Luo y Calcutt, J. Pharmacology Experimental Therapeutics, 303(3), (2002), 1199-1205; Chaplan et al. Journal of Neuroscience Methods, 53, (1994), 55-63) usando la fórmula:

$$10 (Xf + \kappa\delta)/10,000$$

25 en la que Xf es el filamento de von Frey final usado (unidades log), κ es un valor que analiza el patrón de respuesta (tomado de la tabla publicada por Chaplan et al., 1994), y δ es la diferencia media entre estímulos (unidades log).

Control de sesgo. Para evitar el sesgo en los resultados del estudio, el personal técnico desconocía el historial de tratamiento de cada animal mientras evaluaba las respuestas de comportamiento de los animales.

30 Los resultados del ensayo de comportamiento que se presentan en la Tabla 10 muestran claramente la reversión casi completa de la alodinia por el compuesto #118 comparado con el vehículo y el compuesto #5. Esto se observa más fácilmente en la Figura 1 que muestra una representación de los días de inyección/ensayo de von Frey (tiempo) frente al umbral de retirada de la pata (g) para cada uno de los grupos de tratamiento.

Tabla 10. (i.t.)-SNL-Resultados del ensayo de comportamiento en ratones para vehículo, compuestos #5 y #118 (unidades en gramos).

Grupo 1: Vehículo	Día(-2) Línea base pre-operatoria ¹	Día 0 Línea base postoperatoria ²	Día 1 ³	Día 5	Día 7
Media	1,130	0,068	0,110	0,026	0,071
Desv. Estd.	0,418	0,112	0,102	0,025	0,056
Grupo 2: Compuesto #5	Día(-2) Línea base pre-operatoria ¹	Día 0 Línea base postoperatoria ²	Día 1 ³	Día 5	Día 7
Media	1,265	0,050	0,098	0,079	0,190
Desv. Estd.	0,271	0,048	0,100	0,055	0,230
Grupo 3: Compuesto #118	Día(-2) Línea base pre-operatoria ¹	Día 0 Línea base postoperatoria ²	Día 1 ³	Día 5	Día 7
Media	1,268	0,077	0,321	0,320	1,024
Desv. Estd.	0,327	0,072	0,660	0,297	0,521

¹ Ensayo antes de lesión SNL (línea base pre-operatoria)² Ensayo 2 días después de lesión SNL (línea base de lesión post operatoria)³ Ensayo realizado 2hr después de la primera inyección i.t.

Ejemplo 111: Administración intraperitoneal (i.p.) de inhibidores de MMP en el modelo de dolor en ratón (SNL).

5 Con el fin de averiguar mejor la biodisponibilidad de los compuestos MMP de la presente invención cuando el compuesto se administra fuera del área de la médula espinal, el modelo SNL en ratón se repitió con los compuestos #5 y #118 mediante administración intraperitoneal. Excepto por el modo de administración, el número de ratones/grupo y el número de inyecciones y cantidad de compuesto por inyección, el resto del estudio se hizo de la misma manera (respecto a las cirugías y ensayo y análisis de la alodinia táctil) que el Experimento 110. Se disolvieron 3,2 mg de cada uno de los inhibidores de MMP #5 y #118 en 320 microlitros de DMSO. A la disolución se añadieron 32 microlitros de Tween 80, seguido de 2.850 microlitros de disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Esto proporcionó una concentración final de 10% DMSO, 1% Tween y 1mg/ml compuesto. Se inyectaron 0,1ml de esta disolución por ratón/día (durante cinco días consecutivos) para proporcionar una dosis aproximada de 3,3mg/Kg. Los grupos de tratamiento se indican en la Tabla 11. Los resultados de los ensayos de comportamiento pueden observarse en la Tabla 12. Está claro que el compuesto # 118 muestra una reversión completa de la alodinia mecánica sobre el día 5. La Figura 2 muestra una representación de los días de inyección/ensayo de von Frey (tiempo) frente al umbral de retirada de la pata (g) para cada uno de los grupos de tratamiento. Es interesante resaltar el efecto bastante prolongado ejercido por el compuesto #118 incluso después de 48 horas (día 6) desde la última inyección (día 4).

Tabla 11. Grupos de tratamiento de animales IP

Tratamiento	# de Ratones	Dosis	Ruta de administración y frecuencia
Vehículo	3	Grupo 1, 100 µl/ratón	IP inyecciones diarias día 1-5
Compuesto # 5	3	Grupo 2, 100 µl/ratón	IP inyecciones diarias día 1-5, empezando el día 1
Compuesto #118	3	Grupo 3, 100 µl/ratón	IP inyecciones diarias día 1-5, empezando el día 1

*Vehículo = 10% DMSO, 1% Tween 80, en PBS.

Tabla 12. (i.p.)-SNL-Resultados del ensayo de comportamiento en ratones para vehículo, compuestos #5 y #118 (unidades en gramos).

Grupo 1: Vehículo	Día 0 Línea base postoperatoria	Día 1	Día 2	Día 5	Día 6	Día 7
Media	0,112	0,167	0,137	0,130	0,065	0,056
Desv. Estd.	0,078	0,098	0,142	0,056	0,048	0,019
Grupo 2: Compuesto #5	Día 0 Línea base postoperatoria	Día 1	Día 2	Día 5	Día 6	Día 7
Media	0,046	0,078	0,117	0,238	0,099	0,128
Desv. Estd.	0,065	0,046	0,127	0,246	0,113	0,098
Grupo 3: Compuesto #118	Día 0 Línea base postoperatoria	Día 1	Día 2	Día 5	Día 6	Día 7
Media	0,096	0,170	0,350	1,470	0,867	0,250
Desv. Estd.	0,059	0,192	0,226	0,052	0,553	0,118

5 Ejemplo 120**Medición de la inhibición del dolor inflamatorio - inflamación inducida por carragenano (CARR) en ratas.**

Si se midieran los efectos inhibidores del dolor inflamatorio de los inhibidores de MMP de la presente invención, se podría usar el modelo de carragenano para medir el dolor neuropático como se presenta en LaBuda, C.J., y Fuchs, P.N. Neuroscience Letters, 304, (2001), 137-140.

- 10 Modelo agudo: inyección subcutánea en la pata trasera de una rata: Se produce una afección inflamatoria aguda mediante una inyección subcutánea de 3% carragenano lambda (0,12 ml) en la superficie plantar de una pata trasera bajo anestesia suave con isoflurano. Habitualmente, hay un grupo control adicional que recibe un volumen igual de disolución salina. Los animales recibirían entonces los inhibidores de MMP de la presente invención 3 ½ horas después de la inyección de CARR, La cuantificación del comportamiento de dolor podría realizarse mediante el modelo animal de retirada de la pata usando los mismos procedimientos como se indica en el Ejemplo 110 y 111.

- 15 Modelo crónico: Inyección intra-articular. Se produce un estado de inflamación más duradero realizando una inyección intra-articular de CARR (0,1 ml, 3%) en la articulación tibial bajo anestesia con isoflurano. Esta ruta de administración induce una afección inflamatoria que puede durar hasta 7 días después de la inyección y es un modelo establecido de dolor inflamatorio artrítico. La cuantificación del comportamiento de dolor podría realizarse usando los mismos procedimientos como se indica en los Experimentos 110 y 111.

Ejemplo 130. Ensayo para determinar la inhibición de MMP-2

- 25 La actividad inhibidora de MMP-2 se llevó a cabo mediante el método de Knight (Knight, C.G. et. al, FEBS LETT. 296 (3), (1992), 263-266), usando un tampón de ensayo comprendido por 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 5mM CaCl₂ y 1 μM ZnSO₄. Se ensayó una concentración de inhibidor de MMP de la presente invención (1 nanoMolar) en operaciones en duplicado. El dominio catalítico de la enzima MMP-2 (recombinante humana) (10 nanoMolar) se añadió a la disolución de compuesto. La mezcla de enzima y compuesto en tampón de ensayo se mezcló concienzudamente y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Después de la finalización de la incubación, el ensayo se empezó por la adición de 10 μM de sustrato fluorescente Mca-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH₂ (K_d ~ 8 microMolar). El producto fluorescente, McaPLG, se midió a una excitación de 355 nm y emisión de 405 nm por un multilector de placas automático a 37°C. Se corrió separadamente un control positivo usando el inhibidor de MMP de amplio espectro GM6001 como un compuesto control (MMP-2 CI50 = 0,5 nanoMolar). La Tabla 13 resume los resultados del estudio de inhibición.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de MMP-2

Compuesto ID #	Concentración de compuesto	de Sustrato	Concentración de sustrato	de	Promedio del porcentaje de inhibición
----------------	----------------------------	-------------	---------------------------	----	---------------------------------------

Compuesto ID #	Concentración de compuesto	de Sustrato	Concentración de sustrato	Promedio del porcentaje de inhibición
5	1 microMolar	Mca-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH ₂	10 microMolar	97%
118	1 microMolar	Mca-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH ₂	10 microMolar	96%

Ejemplo 131. Ensayo para determinar la inhibición de MMP-9

La actividad inhibidora de MMP-9 se llevó a cabo mediante el método de Bickett, D.M.; (Bickett, D.M., et al Analytical Biochemistry 212, (1993), 58-64), usando un tampón de ensayo comprendido por 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 5mM CaCl₂ y 1 μM ZnSO₄. Se ensayó una concentración de inhibidor de MMP de la presente invención (1 microMolar) en operaciones en duplicado. El dominio catalítico de la enzima MMP-9 (recombinante humana) (10 nanoMolar) se añadió a la disolución de compuesto. La mezcla de enzima y compuesto en tampón de ensayo se mezcló concienzudamente y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Después de la finalización de la incubación, el ensayo se empezó por la adición de 10 μM de sustrato fluorescente DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂ [Cha = β-ciclohexilalanil; Abz = 2-aminobenzoil (antraniloil)] (K_d ~ 7 microMolar). El producto fluorescente, DnpPChaG, se midió a una excitación de 365 nm y emisión de 450 nm por un multilector de placas automático a 37°C. Se corrió separadamente un control positivo usando el inhibidor de MMP de amplio espectro GM6001 como un compuesto control (MMP-9 CI50 = 0,2 nanoMolar). La Tabla 14 resume los resultados del estudio de inhibición.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de MMP-9

Compuesto ID #	Concentración de compuesto	Sustrato	Concentración de sustrato	Promedio del porcentaje de inhibición
5	1 microMolar	DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH ₂	10 microMolar	82%
118	1 microMolar	DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH ₂	10 microMolar	78%

Ejemplo 132. Ensayo para determinar la inhibición de MMP-1

Si se estuviera interesado en medir la actividad inhibidora de MMP-1 de los inhibidores de MMP de la presente invención se podría usar el método de Knight (Knight, C.G. et. al, , FEBS LETT. 296 (3), (1992), 263-266), en el que se usa un tampón de ensayo comprendido por 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 5mM CaCl₂ y 1 μM ZnSO₄. Podría ensayarse una única concentración (es decir, 1 microMolar) en operaciones en duplicado. El dominio catalítico de la enzima MMP-1 (recombinante humana) podría añadirse a la disolución de compuesto. La mezcla de enzima y compuesto en tampón de ensayo se mezclaría concienzudamente y se incubaría durante 60 minutos a 37°C. Después de la finalización de la incubación, el ensayo se empezaría por la adición de 10 μM de sustrato fluorescente DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂ [Cha = β-ciclohexilalanil; Abz = 2-aminobenzoil (antraniloil)] (10 μM). El producto fluorescente, DnpPChaG, podría medirse a una longitud de onda de excitación de 365nm y longitud de onda de emisión de 450 nm usando un multilector de placas automático a 37°C. También podría correrse separadamente un control positivo usando el inhibidor de MMP de amplio espectro Tyr-ácido hidroxámico como un compuesto control.

Ejemplo 133. Ensayo para determinar la inhibición de MMP-7

Si se estuviera interesado en medir la actividad inhibidora de MMP-7 de los inhibidores de MMP de la presente invención se podría usar el método de Knight (Knight, C.G. et. al, , FEBS LETT. 296 (3), (1992), 263-266), en el que se usa un tampón de ensayo comprendido por 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 5mM CaCl₂ y 1 μM ZnSO₄. Podría ensayarse una única concentración (es decir, 1 microMolar) en operaciones en duplicado. El dominio catalítico de la enzima MMP-7 (recombinante humana) podría añadirse a la disolución de compuesto. La mezcla de enzima y compuesto en tampón de ensayo se mezclaría concienzudamente y se incubaría durante 60 minutos a 37°C. Después de la finalización de la incubación, el ensayo se empezaría por la adición de 10 μM de sustrato fluorescente Mca-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH₂. El producto fluorescente, McaPLG, podría medirse a una longitud de onda de excitación de 355nm y longitud de onda de emisión de 405 nm usando un multilector de placas automático a

37°C. También podría correrse separadamente un control positivo usando el inhibidor de MMP de amplio espectro Tyr-ácido hidroxámico como un compuesto control.

Ejemplo 134. Ensayo para determinar la inhibición de MMP-3

5 Si se estuviera interesado en medir la actividad inhibidora de MMP-3 de los inhibidores de MMP de la presente invención se podría usar el método de Knight (Knight, C.G. et. al, , FEBS LETT. 296 (3), (1992), 263-266), en el que se usa un tampón de ensayo comprendido por 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 5mM CaCl₂ y 1 μM ZnSO₄. Podría ensayarse una única concentración (es decir, 1 microMolar) en operaciones en duplicado. El dominio catalítico de la enzima MMP-3 (recombinante humana) podría añadirse a la disolución de compuesto. La mezcla de enzima y compuesto en tampón de ensayo se mezclaría concienzudamente y se incubaría durante 60 minutos a 10 37°C. Después de la finalización de la incubación, el ensayo se empezaría por la adición de 10 μM de sustrato fluorescente McaRKPVENvalWRK(Dnp)NH₂. El producto fluorescente, McaRPK, podría medirse a una longitud de onda de excitación de 355nm y longitud de onda de emisión de 405 nm usando un multilector de placas automático a 37°C. También podría correrse separadamente un control positivo usando el inhibidor de MMP de amplio espectro Tyr-ácido hidroxámico como un compuesto control.

Ejemplo 135. Ensayo para determinar la inhibición de MMP-12

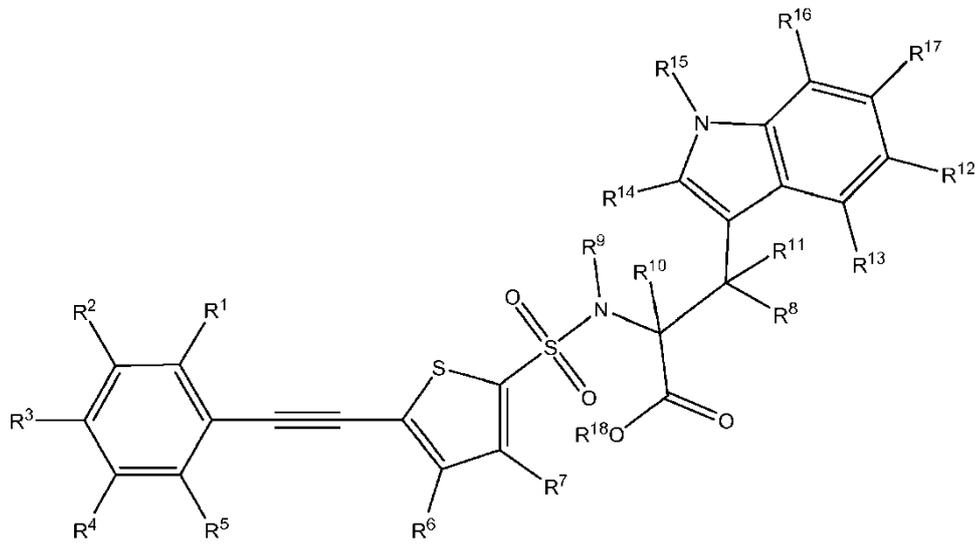
La actividad inhibidora de MMP-12 puede llevarse a cabo separando en primer lugar los sustratos escindido y no escindido por carga mediante desplazamiento en la movilidad electroforética y midiendo la fluorescencia de los productos separados y comparándolos con reacciones control para determinar la inhibición de la actividad enzimática. Se podría correr el ensayo de MMP-12 usando un tampón de ensayo comprendido por 100 mM HEPES, 20 pH 7,5, 0,01% Brij-35, 1,5 mM NaCl y 2 mM CaCl₂. Podría ensayarse una única concentración de inhibidor (es decir, 1 microMolar) en operaciones en duplicado. La reacción podría empezarse por la adición en primer lugar de sustrato e incubando la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción podría terminarse mediante la adición de un tampón de parada que consiste en 100mM HEPES (pH 7,5), 30 mM EDTA, 0,015% Brij-35, y 5% DMSO. Podría correrse separadamente un control positivo usando el inhibidor de MMP de amplio espectro GM6001 25 como un compuesto control.

Ejemplo 136. Ensayo para determinar la inhibición de MMP-13

Si se estuviera interesado en medir la actividad inhibidora de MMP-13 de los inhibidores de MMP de la presente invención se podría usar el método de Knight (Knight, C.G. et. al, , FEBS LETT. 296 (3), (1992), 263-266), en el que se usa un tampón de ensayo comprendido por 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 5mM CaCl₂ y 1 μM ZnSO₄. Podría ensayarse una única concentración (es decir, 1 microMolar) en operaciones en duplicado. El dominio catalítico de la enzima MMP-13 (recombinante humana) podría añadirse a la disolución de compuesto. La mezcla de enzima y compuesto en tampón de ensayo se mezclaría concienzudamente y se incubaría durante 60 minutos a 30 37°C. Después de la finalización de la incubación, el ensayo se empezaría por la adición de 10 μM de sustrato fluorescente Mca-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH₂. El producto fluorescente, McaPLG, podría medirse a una longitud de onda de excitación de 355nm y longitud de onda de emisión de 405 nm usando un multilector de placas automático a 35 37°C. También podría correrse separadamente un control positivo usando el inhibidor de MMP de amplio espectro Tyr-ácido hidroxámico como un compuesto control.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la Fórmula (II):



(II)

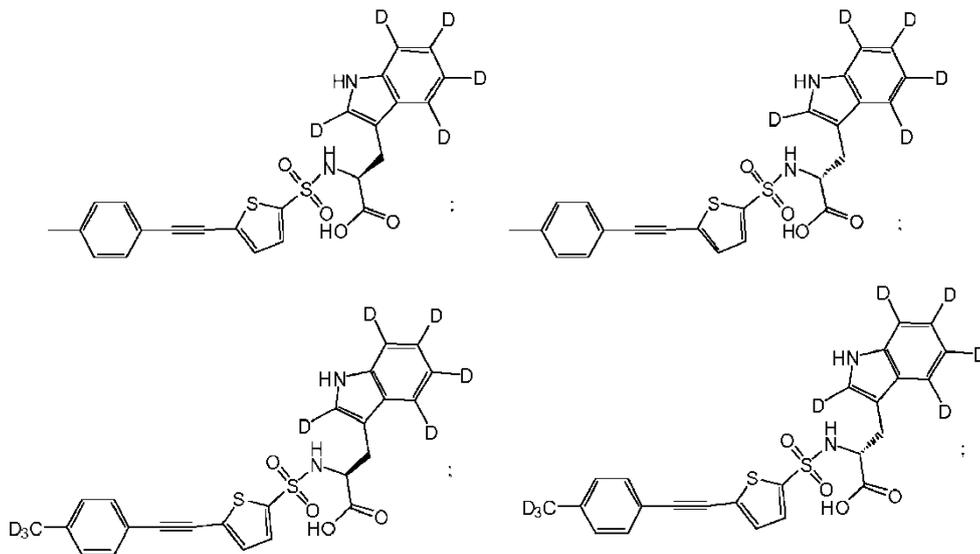
en la que:

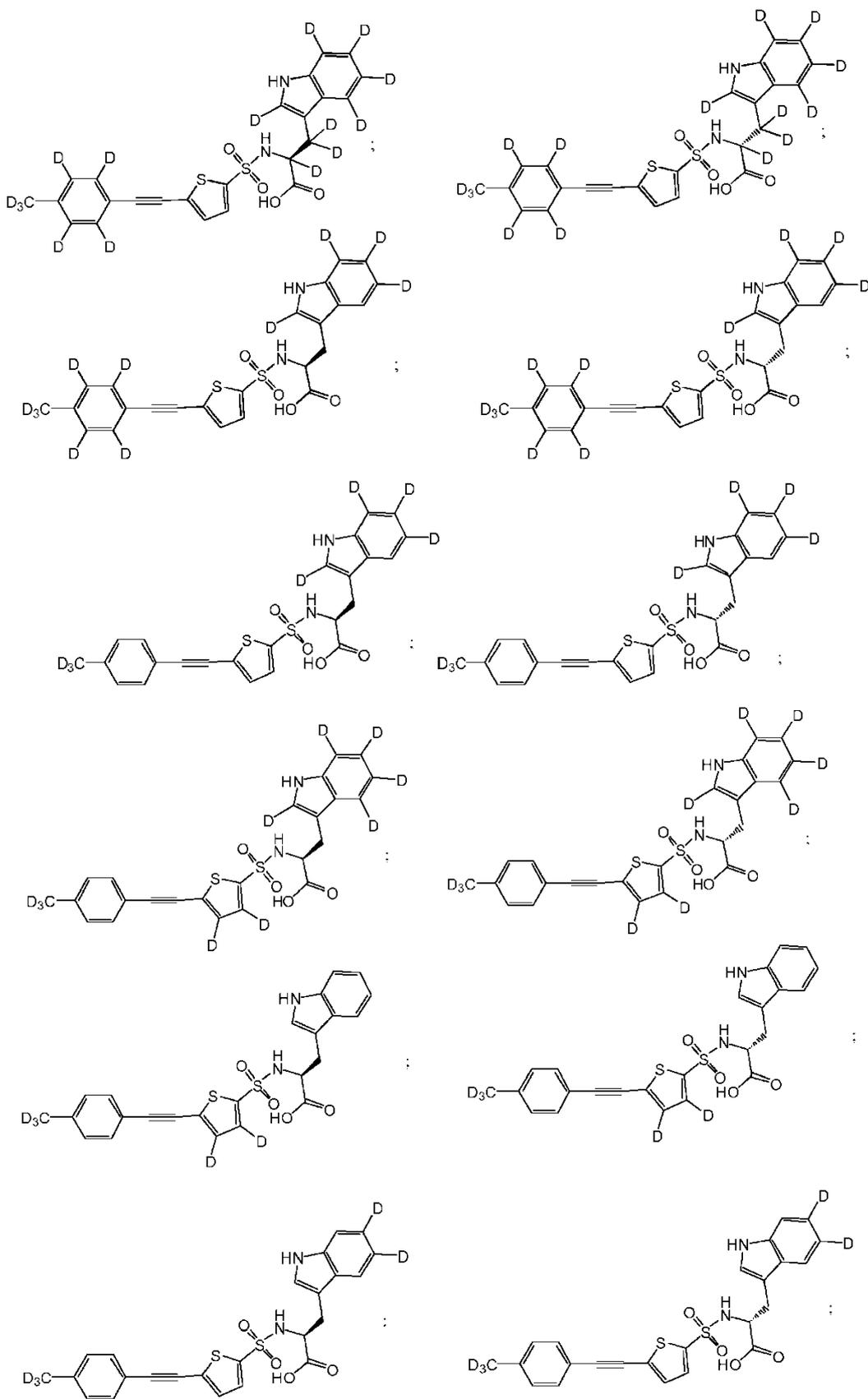
5 cada uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, y R¹⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en deuterio, hidrógeno, alquilo y deuteroalquilo; y

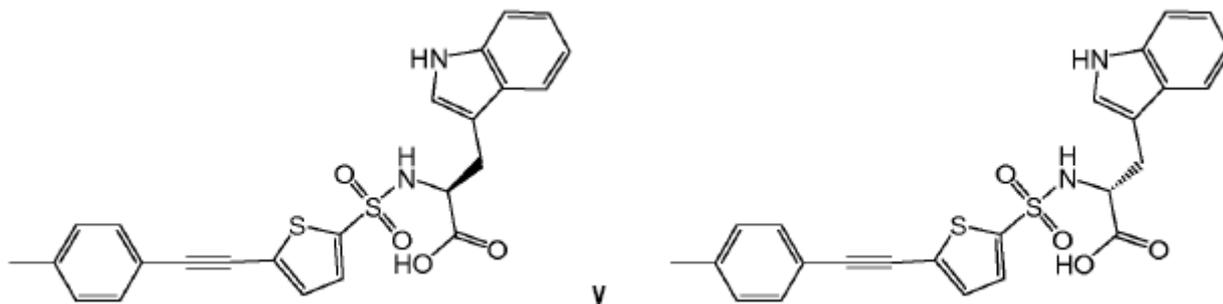
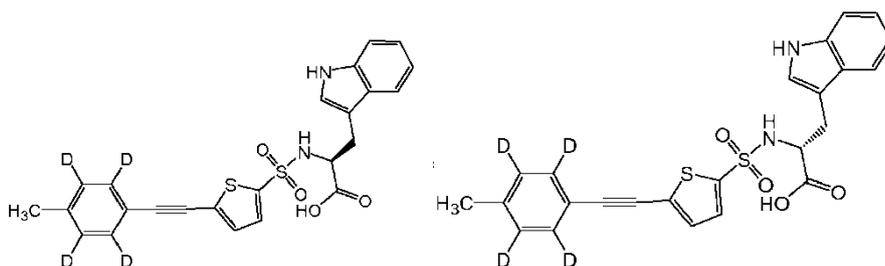
R¹⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, deuterio, alquilo, deuteroalquilo, sodio, potasio; o

10 N-óxidos, sales farmacéuticamente aceptables, formulaciones, polimorfos, tautómeros, mezclas racémicas o estereoisómeros de éstos, para uso en el tratamiento del dolor.

2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

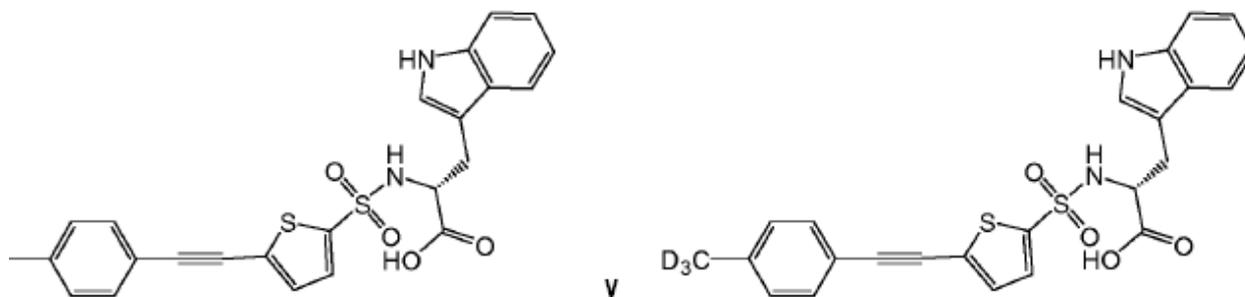






o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

3. El compuesto para uso según la reivindicación 2 seleccionado del grupo que consiste en



5

5

118

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

4. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el tratamiento de una afección mediada por MMP seleccionada del grupo que consiste en sensibilidad aumentada o exagerada al dolor; dolor agudo; dolor por quemadura; dolor facial atípico; dolor neuropático; dolor de espalda; síndromes de dolor regional complejo I y II; dolor artrítico; dolor por lesión deportiva; dolor relacionado con infección viral; dolor de la extremidad fantasma; dolor de parto; dolor de cáncer; dolor post-quimioterapia; dolor post-ictus; dolor post-operatorio; dolor fisiológico; dolor inflamatorio; afecciones inflamatorias agudas; dolor visceral; dolor neuropático; neuralgia; neuropatía diabética dolorosa; lesión nerviosa traumática; lesión en la médula espinal; parálisis; envejecimiento; lesión por reperfusión; trauma; dolor osteoartrítico; exposición química o daño oxidativo a tejidos; cicatrización de heridas; embellecimiento de la piel; y tolerancia a narcóticos o abandono de narcóticos.

10

15

5. El compuesto para uso según la reivindicación 4, en el que dicha sensibilidad aumentada o exagerada al dolor se selecciona del grupo que consiste en hiperalgesia, causalgia y alodinia.

6. El compuesto para uso según la reivindicación 4, en el que dicho dolor relacionado con infección viral se selecciona del grupo que consiste en dolor por VIH, síndrome post-polio y neuralgia post-herpética.

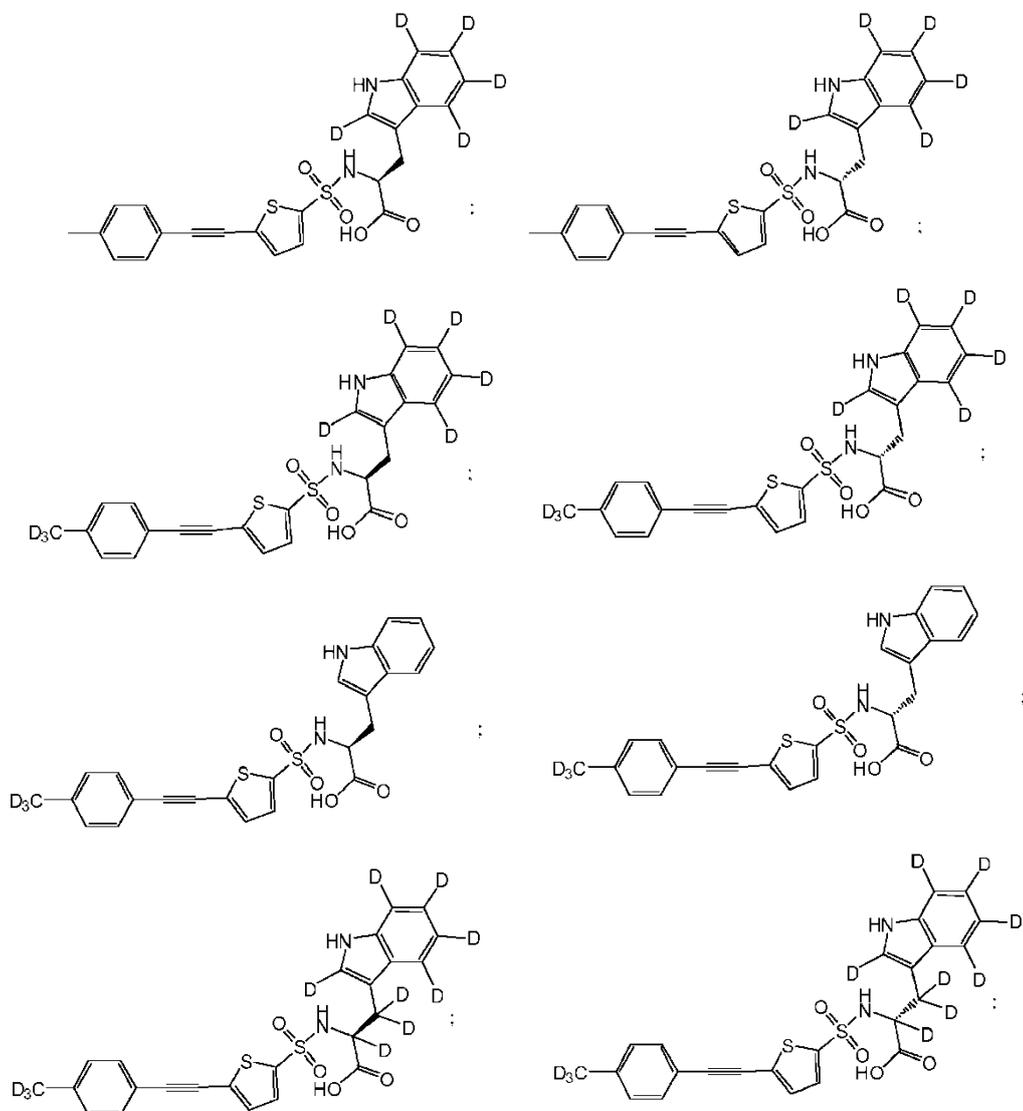
20

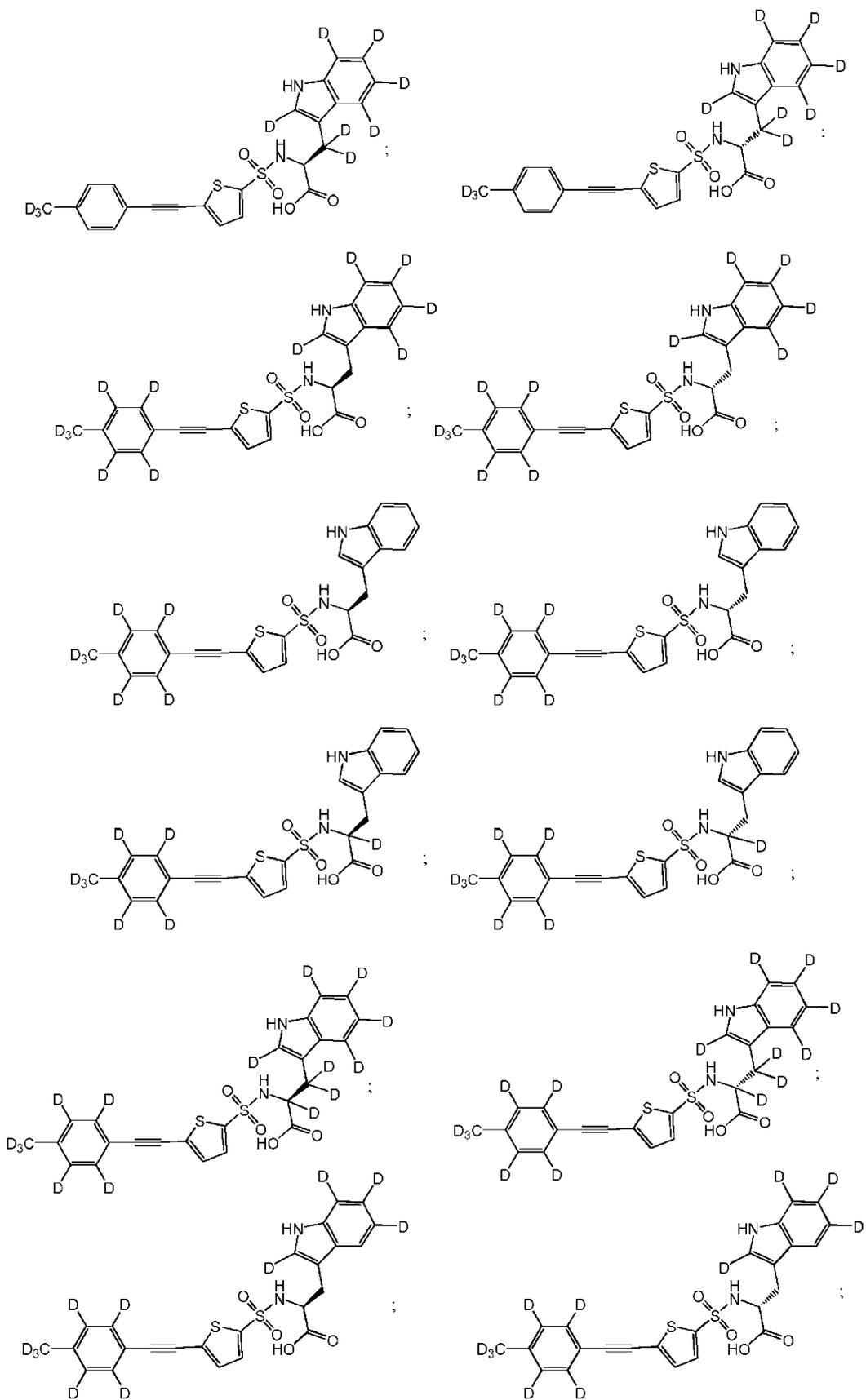
7. El compuesto para uso según la reivindicación 4, en el que dicho dolor visceral se selecciona del grupo que consiste en angina, síndrome del intestino irritable (IBS) y enfermedad inflamatoria del intestino.

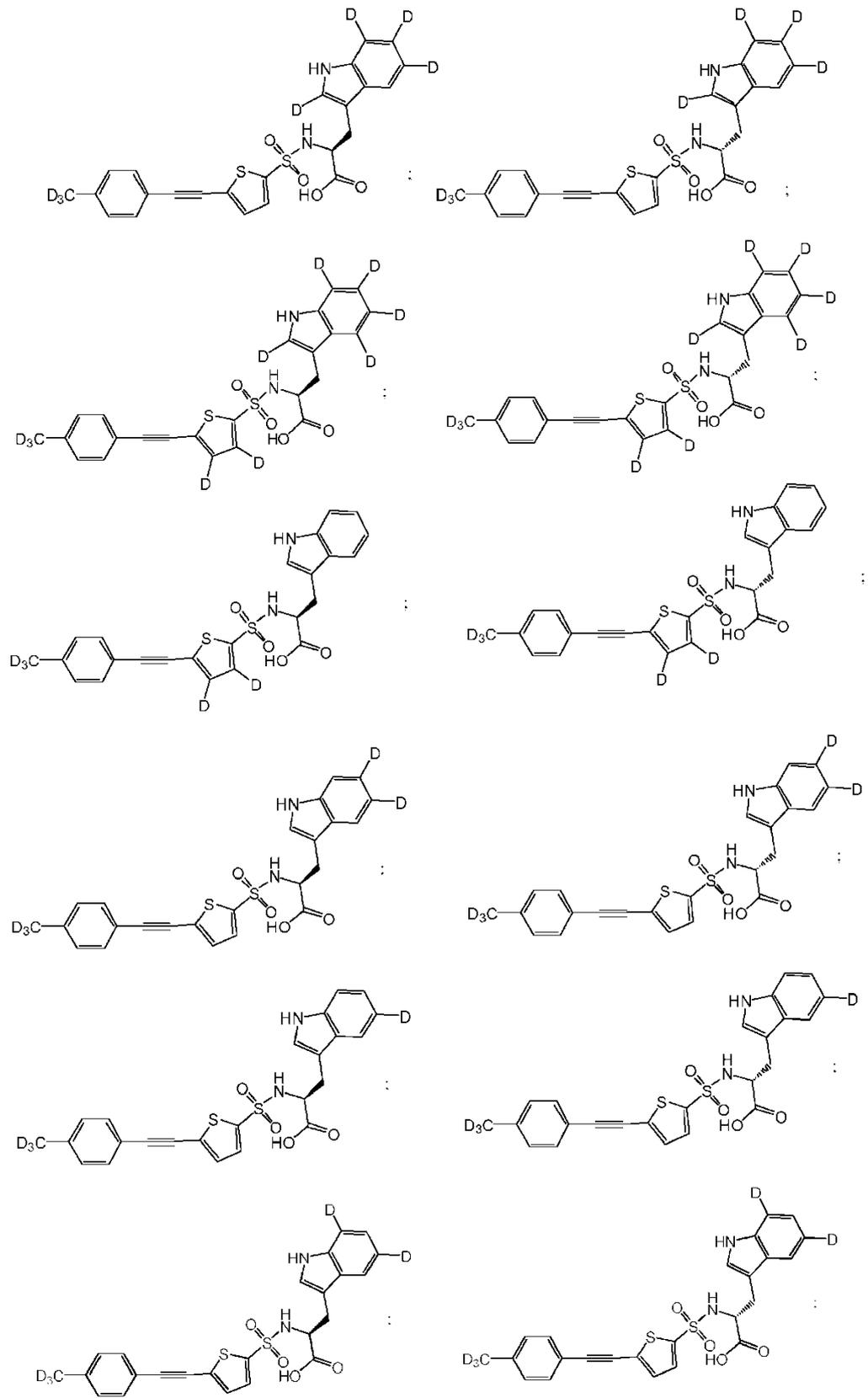
8. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el tratamiento de una enfermedad mediada por MMP seleccionada del grupo que consiste en: artritis reumatoide, osteoartritis, aneurisma aórtico

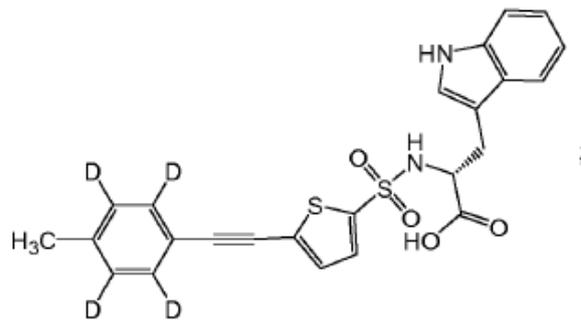
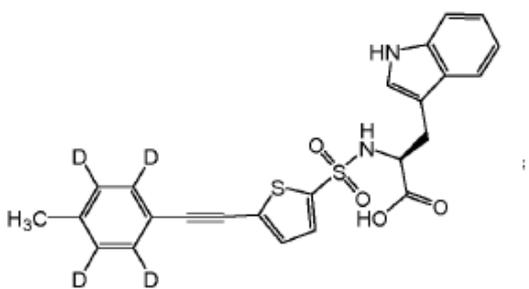
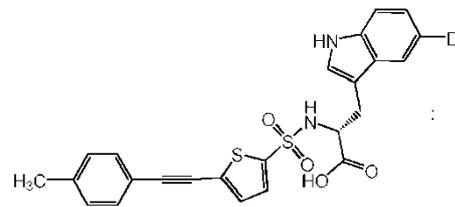
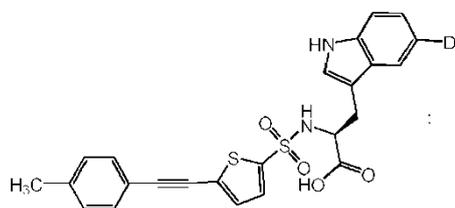
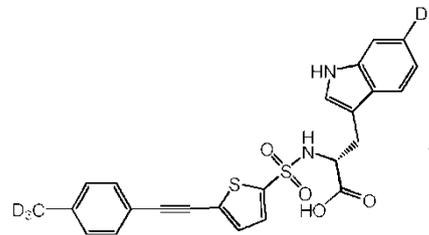
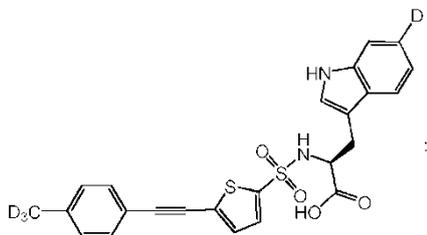
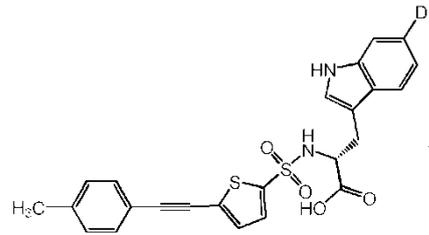
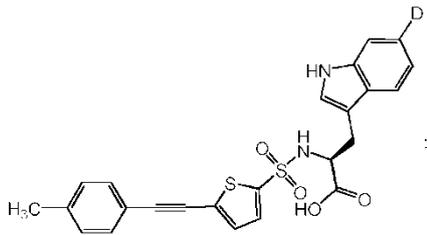
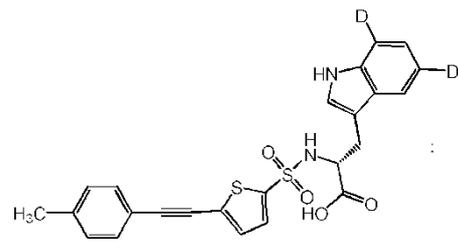
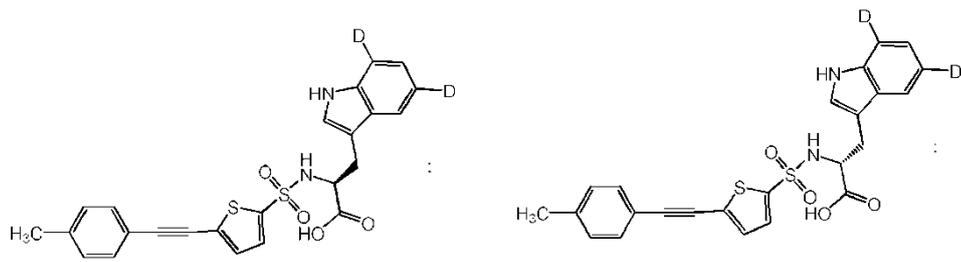
abdominal, cáncer, inflamación, aterosclerosis, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades oculares, enfermedades neurológicas, enfermedades psiquiátricas, trombosis, infección bacteriana, enfermedad de Parkinson, fatiga, temblor, retinopatía diabética, neuropatía diabética, enfermedades vasculares de la retina, demencia, cardiomiopatía, alteración tubular renal, diabetes, psicosis, disquinesia, anomalías pigmentarias, sordera, síndromes inflamatorios y fibróticos, síndrome inflamatorio del intestino, alergias, enfermedad de Alzheimer, formación de placas arteriales, enfermedad periodontal, infección viral, herpes zóster, ictus, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, hemorroides, y enfermedad que causa dolor.

- 5 9. Una composición farmacéutica que comprende:
- A) una cantidad efectiva de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
- 10 B) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- C) un miembro seleccionado del grupo que consiste en: (a) un fármaco anti-reumático modificador de la enfermedad; (b) un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; (c) un inhibidor selectivo de COX-2; (d) un inhibidor de COX-1; (e) un inmunosupresor; (f) un esteroide; (g) un modificador de la respuesta biológica; y (h) un inhibidor que es una molécula pequeña de la producción de citoquinas pro-inflamatorias.
- 15 10. Un compuesto de Fórmula (II) en la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:







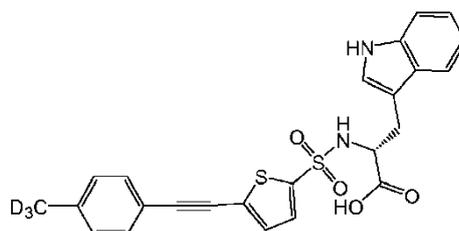


5

y

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

11. El compuesto según la reivindicación 10 que es



118

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto como se reivindica en la reivindicación 10 u 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12 que comprende además un miembro seleccionado del grupo que consiste en: (a) un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad; (b) un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo; (c) un inhibidor selectivo de COX-2; (d) un inhibidor de COX-1; (e) un inmunosupresor; (f) un esteroide; (g) un modificador de la respuesta biológica; y (h) un inhibidor que es una molécula pequeña de la producción de citoquinas pro-inflamatorias.