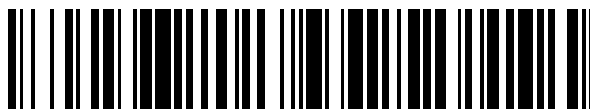


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 954**

51 Int. Cl.:

A61K 8/00 (2006.01)

A61K 8/18 (2006.01)

A61Q 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008** **E 08838096 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** **EP 2200564**

54 Título: **Composiciones y métodos de inhibición de la amidasa ácida hidrolizante de la N-aciletanolamina**

30 Prioridad:

11.10.2007 US 979304 P

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

04.07.2016

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (33.3%)

1111 Franklin Street, 12th Floor

Oakland, CA 94607, US;

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA (33.3%) y

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI URBINO "CARLO BO" (33.3%)

72 Inventor/es:

PIOMELLI, DANIELE;

TARZIA, GIORGIO;

MOR, MARCO;

DURANTI, ANDREA y

TONTINI, ANDREA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 575 954 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

Composiciones y métodos de inhibición de la amidasa ácida hidrolizante de la N-aciletanolamina

5 Esta solicitud reivindica la prioridad a nuestra solicitud provisional de Estados Unidos en trámite junto con la presente con el número de serie 60/979304, que fue presentada el 11 de octubre de 2007.

Esta invención se realizó con apoyo del gobierno según los términos de la subvención n.º DA-12413 concedida por los INH (Institutos Nacionales de Salud). El Gobierno puede tener ciertos derechos sobre la invención.

10 Campo de la invención

El campo de la invención son las composiciones y métodos relacionados con la inhibición de la amidasa ácida hidrolizante de la *N-aciletanolamina* (NAAA) y especialmente en lo que se refiere al tratamiento y la prevención del dolor, la inflamación y otros trastornos en los que la modulación de la etanolamida de ácido graso es clínicamente relevante.

Antecedentes de la invención

20 Si bien existen numerosas composiciones y métodos conocidos en la técnica para tratar el dolor y/o la inflamación, siguen existiendo numerosas dificultades. Más significativamente, los efectos secundarios asociados a periodos largos de administración y/o dosis más altas a menudo impiden el uso exitoso de tales fármacos. Por ejemplo, recientemente se ha asociado a ciertos inhibidores de la COX-2 con acontecimientos cardiovasculares adversos, mientras que los medicamentos para el dolor de tipo aspirina aumentan frecuentemente el riesgo de hemorragia intestinal. En otros ejemplos, el ibuprofeno y el acetaminofeno tienden a afectar negativamente a la función hepática, especialmente en dosis altas.

Las etanolamidas de ácidos grasos de cadena larga (*N-aciletanolaminas* (NAE)) están presentes en numerosos organismos inferiores, organismos superiores y mamíferos con una amplia variedad de funciones. Por ejemplo, se ha demostrado que la anandamida (una NAE de tipo ácido graso poliinsaturado) tiene actividad canabimimética y se ha demostrado que actúa como un ligando de TRPV1 (receptor de potencial transitorio vainilloide tipo 1). Por el contrario, las NAE saturadas y monoinsaturadas son inactivas como ligandos de receptores de cannabinoides. Sin embargo, se ha informado que tales compuestos poseen una variedad de otras actividades biológicas. Por ejemplo, la *N-palmitoiletanolamina* (PEA) tiene actividad anti-inflamatoria, anti-nociceptiva, inmunosupresora, neuroprotectora y también actividad antioxidante. Curiosamente, la acción anti-inflamatoria de la *N-palmitoiletanolamina* podría estar mediada por la activación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR-alfa). En otros ejemplos, se ha visto que la *N-oleoiletanolamina* es anoréxica a través del PPAR-alfa (véase, por ejemplo, The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics (2006), Vol. 318, n.º 2, páginas 563-570) y la *N-estearoiletanolamina* es pro-apoptótica y anoréxica.

40 Las NAE son un sustrato de la NAAA que hidroliza catalíticamente la NAE en etanolamina y en el ácido graso correspondiente. Sorprendentemente, la actividad catalítica de las NAAA es significativamente diferente a la de una enzima similar, la FAAH (hidrolasa de amida de ácido graso). Entre otras diferencias, un rasgo característico de la NAAA es su óptima actividad a un pH de aproximadamente 5,0. La NAAA también exhibe una preferencia sustancial por la *N-palmitoiletanolamina* (PEA) sobre otras NAE, se activa por TRITON X-100™ (marca comercial registrada de Union Carbide; 4-octilfenol polietoxilado) y ditiotreitól (DTT). Sorprendentemente, la NAAA tiene una menor sensibilidad a la inhibición con fluoruro de fenilmetilsulfonilo y fluorofosfonato de metilaraquidonilo. Aunque se ha clonado el gen de la NAAA y el polipéptido correspondiente está relativamente bien caracterizado (véase, por ejemplo, J Biol Chem (2005), vol. 280, n.º 12, páginas 11082-11092), las propiedades funcionales de la NAAA en mamíferos no se conocen bien.

Si bien se han identificado numerosos inhibidores de la FAAH en la literatura (véase, por ejemplo, Eur J Pharmacol (2007), 565 (1-3); páginas 26-36; J Enz Inhib and Med Chem (2003), 18 (1), páginas 55-58; Arco Biochem Biophys (1999), 362 (2), páginas 191-196), actualmente no se han descrito inhibidores de la NAAA. Por otra parte, como la FAAH y la NAAA no están estrechamente relacionadas estructuralmente, no se espera que los inhibidores de la FAAH proporcionen una inhibición significativa de la NAAA.

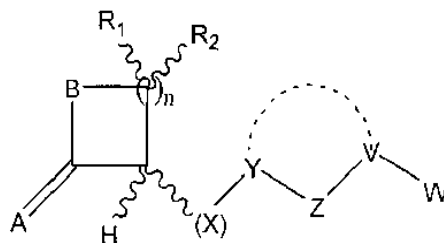
Por lo tanto, aunque en la técnica se conocen numerosas composiciones y métodos de tratamiento y de prevención del dolor y de la inflamación, todos o casi todos ellos tienen una o más desventajas. En consecuencia, todavía hay una necesidad de proporcionar una mejor composición y los métodos para tratar y prevenir el dolor y la inflamación.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para inhibir la NAAA utilizando diversos compuestos contemplados e identificados por los inventores. Lo más ventajosamente, dichos compuestos y composiciones serán útiles en el tratamiento de afecciones asociadas con un nivel reducido de palmitoiletanolamida y especialmente

enfermedades inflamatorias.

En un aspecto preferido de la materia objeto de la invención, una composición farmacéutica para el tratamiento de una afección asociada con un nivel reducido de palmitoiletanolamida comprende un compuesto según la Fórmula I y un vehículo farmacéuticamente aceptable



Fórmula 1

en la que A es O o S; B es O, S o NR^a; R₁ y R₂ son independientemente H, halógeno o alquilo inferior opcionalmente sustituido; n es un número entero entre 0 y 3; X es O, S, C(O), NR^b, CHR^b o cero; Y es C(O), C(S) o CHR^c; Z es O, S, NR^d o CHR^d; V es alquilo inferior opcionalmente sustituido o alqueno inferior; W es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, o C(R₃R₄R₅), cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; en algunos aspectos, Y y V pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros; más generalmente, R^a, R^b, R^c y R^d se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo inferior opcionalmente sustituido o tioalquilo inferior opcionalmente sustituido y R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo inferior opcionalmente sustituido, arilo inferior opcionalmente sustituido, cicloheteroalquilo inferior opcionalmente sustituido y heteroarilo inferior opcionalmente sustituido.

Los compuestos particularmente contemplados incluyen aquellos en los que A y B son O, en los que X es NR^b e Y es C(O) o C(S) y/o en el que Z es O o CHR^d, V es alquilo inferior, y en el que W es arilo o alquilo inferior. Lo más preferiblemente, n es 1, R₁ es H y R₂ es alquilo inferior y/o W es arilo o alquilo inferior. Otros compuestos preferidos incluyen aquellos en los que A es O, B es O o NR^a, X es NR^b e Y es C(O) o C(S).

Por lo tanto, un método para tratar un paciente que tiene una afección asociada con niveles reducidos de palmitoiletanolamida en una célula, órgano o compartimento corporal incluirá una etapa de administrar una composición farmacéutica que incluye un compuesto de acuerdo con la Fórmula I anterior. Más generalmente, la afección incluye un componente inflamatorio (por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis o asma).

La administración de la composición se lleva a cabo a continuación, en un protocolo y en una dosificación suficiente para reducir la inflamación en el paciente. Visto desde una perspectiva diferente, los métodos contemplados incluirán, por lo tanto, también aquellos métodos en los que se utilicen los compuestos de acuerdo con la Fórmula I anterior para inhibir la NAAA. En aspectos preferidos, se realiza la etapa de poner en contacto la NAAA *in vivo* y/o el compuesto inhibe la NAAA a una CI₅₀ de menos de 20 microM.

Objetos diversos, características, aspectos y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1C son ejemplos de compuestos de acuerdo con el contenido de la invención y sus respectivos valores CI₅₀.

Las figuras 2A-2C son gráficos que ilustran el efecto de la inflamación sobre el número de neutrófilos infiltrantes (A), los niveles de PEA celular endógena (B) y el transcurso temporal del efecto de la inflamación sobre la PEA (C).

Las figuras 3A-3B son gráficos que ilustran el efecto de la PEA exógena sobre el número de neutrófilos infiltrantes como una función de la concentración de PEA (A) y el número de neutrófilos infiltrantes en ratones de tipo silvestre y ratones mutantes nulos con PPAR-alfa (B).

La Figura 4 es una vista detallada de un modelo de ordenador del sitio activo de NAAA.

La Figura 5 es un gráfico que representa la inhibición de NAAA por compuestos seleccionados de acuerdo con el contenido de la invención.

Las figuras 6A-6C son gráficos que ilustran el efecto de un ejemplo de un inhibidor de la NAAA sobre el número de neutrófilos infiltrantes (A) y la cantidad de PEA endógena (B) y el número de neutrófilos infiltrantes en ratones de tipo silvestre y ratones mutantes nulos con PPAR-alfa (C).

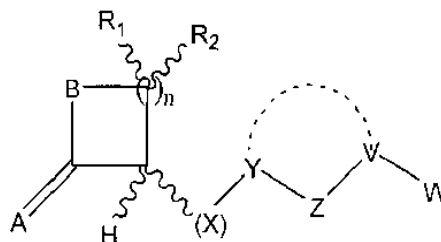
- 5 La Figura 7 representa fotomicrografías de cortes de tejido después de la lesión de la médula espinal teñida con marcadores seleccionados de los animales tratados con y sin inhibidor de la NAAA y un control.

Descripción detallada

- 10 La presente invención se refiere a compuestos, composiciones y métodos de inhibición de la NAAA, y especialmente a compuestos, composiciones y métodos adecuados para el tratamiento de diversas enfermedades asociadas con niveles reducidos de PEA en una célula, órgano, u otra estructura corporal (o incluso el todo el cuerpo). Lo más preferiblemente, dicha modulación tendrá como resultado el tratamiento y/o prevención del dolor, la inflamación y otros trastornos en los que niveles anormales de NAE están asociados con un trastorno. En otros aspectos
15 adicionales, los inhibidores y métodos de acuerdo con el objeto de la materia de la invención también se consideran útiles para la investigación de los mecanismos y las vías en las que la PEA desempeña un papel regulador o modulador.

Compuestos contemplados

- 20 Los compuestos generalmente contemplados en la presente memoria tendrán una estructura que es eficaz para inhibir la NAAA de manera competitiva, no competitiva, alostérica o de otra manera. Lo más preferiblemente, los compuestos de acuerdo con el contenido de la invención inhibirán la NAAA a concentraciones relativamente bajas (por ejemplo, Cl_{50} igual o menor que 50 μ M). Entre otras opciones adecuadas, los compuestos especialmente
25 preferidos tienen una estructura de acuerdo con la Fórmula I

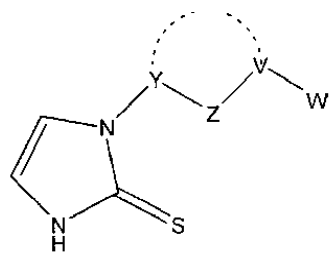


Fórmula 1

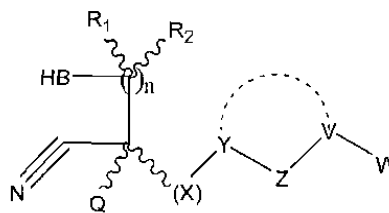
- 30 en la que A es O o S; B es O, S, o NR^a , siendo R^a H, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, halo, nitro, hidroxilo, alcoxi, alquenoilo, ciano, carboxi, alcoxycarbonilo, carboxialquilo, amino, acilamino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, *N*-alquilo, *N*-cicloalquilo, amino, tio, alquiltio y haloalquilo (todos los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos); n es un número entero entre 0 y 3, en el que el C1-3 saturado o insaturado así
35 formado puede estar opcionalmente y en lugares independientes sustituido con R_1 y R_2 y en la que R_1 y R_2 son independientemente R^a como se define anteriormente; Q es como R^a se ha definido anteriormente; X es O, S, C(O), NR^b o CHR^b siendo R^b como se ha definido anteriormente R^a o cero; Y es C(O), C(S) o CHR^c siendo R^c como se ha definido anteriormente R^a o cero; Z es O, S, NR^d o CHR^d siendo R^d como se ha definido anteriormente R^a o cero; V es un alquilo inferior opcionalmente sustituido o un alqueno inferior opcionalmente sustituido; W es H, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo o $C(R_3R_4R_5)$, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente
40 sustituido, en la que R_3 , R_4 y R_5 son independientemente R^a como se ha definido anteriormente y en la que Y y V pueden formar opcionalmente un anillo opcionalmente sustituido de 5, 6, o 7 miembros.

- En aspectos especialmente preferidos, A y B son O, y/o X es NR^b e Y es C(O) o C(S). Además, o como alternativa, se contempla que Z sea O o CHR^d , V sea alquilo inferior y en la que W sea arilo o alquilo inferior y/o que n sea 1, R_1 sea H y R_2 sea alquilo inferior. Los compuestos aún más preferidos incluyen aquellos en los que A es O, B es O o NR^a , X es NR^b e Y es C(O) o C(S). En otros aspectos de la materia objeto de la invención se contempla que X-Y
45 puedan formar juntos $-CH=CH-$ o $CH=CJ$, donde J es halógeno, especialmente donde Z = $-CHR^d-$ o cero. Todavía se contempla además que Y-Z-V se conviertan en Y-V mediante la eliminación de Z, o Y, mediante la eliminación de Z y V. De manera similar, Z-V-W pueden convertirse en Z-W mediante la eliminación de V. Los compuestos contemplados adicionalmente incluyen todos los productos de escisión hidrolítica (por ejemplo, ácidos o alcalinos)
50 del enlace A=C-B.

Otros compuestos contemplados adicionalmente incluyen aquellos de acuerdo con las Fórmulas II y II como se representa a continuación



Fórmula II



Fórmula III

en las cuales B es O, S o NR^a, siendo R^a H, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, halo, nitro, hidroxilo, alcoxi, alquenoilo, ciano, carboxi, alcocarbonilo, carboxialquilo, amino, acilamino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, N-alquilo, N-cicloalquilo, amino, tio, alquilitio y haloalquilo (todos los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos); n es un número entero entre 0 y 3, en el que el C1-3 saturado o insaturado así formado puede estar opcionalmente y en lugares independientes sustituido con R₁ y R₂, y en la que R₁ y R₂ son independientemente como se ha definido anteriormente R^a; Q es como se ha definido anteriormente R^a; X es O, S, C(O), NR^b o CHR^b siendo R^b como se ha definido anteriormente R^a o cero; Y es C(O), C(S) o CHR^c, siendo R^c como se ha definido anteriormente R^a o cero; Z es O, S, NR^d o CHR^d siendo R^d como se ha definido anteriormente R^a o cero; V es un alquilo inferior opcionalmente sustituido o un alqueno inferior opcionalmente sustituido; W es H, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo o C(R₃R₄R₅), cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido, en la que R₃, R₄ y R₅ son independientemente R^a como se ha definido anteriormente y en la que Y y V pueden formar opcionalmente un anillo opcionalmente sustituido de 5, 6, o 7 miembros.

Además, debe apreciarse que cuando están presentes estereocentros, se contemplan todos los isómeros y mezclas de los mismos. Asimismo, cuando está presente un doble enlace, la orientación de los radicales en cada lado del doble enlace puede ser *cis* o *trans*. Las Figuras 1A-1D representan ejemplos de diversos compuestos preferidos de acuerdo con el contenido de la invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "halógeno" se refiere a un átomo de flúor, bromo, cloro o yodo, que normalmente está unido covalentemente a otro átomo (por ejemplo, de carbono). Tal como se utiliza adicionalmente en la presente memoria, el término "hidroxilo" se refiere a un grupo OH. Como se utiliza adicionalmente en la presente memoria, el término "átomo de carbonilo" se refiere a un átomo de carbono al que están unidos covalentemente tres átomos, mientras que uno de los tres átomos está unido al átomo de carbono a través de un doble enlace (que puede estar parcialmente deslocalizado). Por lo tanto, los átomos de carbonilo particularmente contemplados incluyen átomos de carbono en un grupo oxo, un grupo aldehído, un grupo carboxamida, un grupo carboxamida y un grupo tiocarboxamida.

El término "alquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un hidrocarburo cíclico, ramificado o lineal en el que todos los enlaces carbono-carbono son enlaces sencillos y el término "alquilo inferior" se refiere a un alquilo cíclico, ramificado o de cadena lineal de uno a diez átomos de carbono (por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *i*-butilo (o 2-metilpropilo), ciclopropilmetilo, *i*-amilo, *n*-amilo, hexilo, etc.). El término "alqueno" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un alquilo que tiene dos átomos de hidrógeno menos que el alcano correspondiente (es decir, C_nH_{2n}). Por ejemplo, alquenos adecuados incluyen grupos metileno, grupos etileno, grupos propileno, etc. El término "cicloalquilo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo alquilo cíclico o policíclico que contiene de 3 a 15 átomos de carbono. Para los grupos policíclicos, éstos pueden ser anillos múltiples condensados en los que uno de los anillos distales puede ser aromático (por ejemplo, indanilo, tetrahidronaftaleno, etc.). El término "alcarilo" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un alquilo que está acoplado de forma covalente a un resto arilo. Por ejemplo, un radical bencilo se considera un alcarilo según la definición establecida en la presente memoria.

Del mismo modo, el término "alqueno" como se usa en la presente memoria se refiere a un alquilo en el que al menos un enlace carbono-carbono es un doble enlace. Por lo tanto, el término "alqueno inferior" incluye todos los alquenos con uno a diez átomos de carbono. El término "cicloalqueno", como se usa aquí, se refiere a un grupo cíclico o policíclico que contiene 3 a 15 carbonos y al menos un doble enlace. Asimismo, el término "alquino" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un alquilo o alqueno en el que al menos un enlace carbono-carbono es un triple enlace. Por lo tanto, el término "alquino inferior" incluye todos los alquinos con uno a diez átomos de carbono.

Como se utiliza adicionalmente en la presente memoria, el término "alcoxi" se refiere a un grupo OR, en el que R es alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, acilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, o cicloheteroalquilo sustituido. Del mismo modo, el término "arilo" se refiere a un grupo OAr, en el que Ar es un arilo, arilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido.

Además, el término “arilo” se refiere a un grupo carbocíclico aromático que tiene al menos un anillo aromático (por ejemplo, fenilo o bifenilo) o múltiples anillos condensados en los que al menos un anillo es aromático, (por ejemplo, 1,2, 3,4-tetrahidronaftilo, naftilo, antrilo o fenantrilo). El término “heteroátomo” como se usa en la presente memoria, se refiere a un átomo distinto al carbono (por ejemplo, S, O, o N), que opcionalmente puede estar sustituido con, por

Adicionalmente, el término “sustituido” como se usa en la presente memoria significa que un átomo de hidrógeno que está unido covalentemente a un grupo o átomo (o un par de electrones libres o par de electrones libres de un doble enlace de un átomo) se sustituye por un sustituyente no hidrógeno unido covalentemente, incluyendo hidroxilo, tiol, alquiltiol, halógeno, alcoxi, amino, amido, nitro, carboxilo, cicloalquilo, heterociclo, cicloheteroalquilo, acilo, carboxilo, arilo, ariloxi, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alquilo, alquenilo, alquinilo y ciano.

El término “profármaco” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una modificación de los compuestos contemplados, en el que el compuesto modificado exhibe menos actividad farmacológica (en comparación con el compuesto modificado) y en el que el compuesto modificado se convierte de nuevo dentro de una célula diana (por ejemplo, linfocito B) u órgano/estructura anatómica diana (por ejemplo, las articulaciones) en la forma modificada. Por ejemplo, la conversión de los compuestos contemplados en profármacos puede ser útil cuando el fármaco activo es demasiado tóxico para la administración sistémica segura o cuando el compuesto contemplado se absorbe mal por el tracto digestivo o por otro compartimento o célula o cuando el cuerpo descompone el compuesto contemplado antes de alcanzar su diana. Por lo tanto, se debe reconocer que los compuestos de acuerdo con la materia objeto de la invención pueden ser modificados de numerosas maneras y las modificaciones especialmente preferidas incluyen aquellas que mejoran uno o más parámetros farmacocinéticos y/o farmacodinámicos. Por ejemplo, uno o más sustituyentes pueden ser añadidos o reemplazados para lograr un AUC más alta en el suero.

Por otra parte, y especialmente cuando se desea una mayor solubilidad, se pueden añadir grupos hidrófilos. Aún más, cuando los compuestos contemplados contienen uno o más enlaces que pueden ser hidrolizados (o de otra manera escindidos), los productos de reacción también se contemplan expresamente. Ejemplos de protocolos adecuados para la conversión de los compuestos contemplados en la forma de profármaco correspondiente se pueden encontrar en “Prodrugs (Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs)” por Kenneth B. Sloan (ISBN: 0824786297) e “Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry and Enzymology” por Bernard Testa, Joachim M. Mayer (ISBN: 390639025X), los cuales se incorporan por referencia en la presente memoria. Además, especialmente cuando los compuestos contemplados tienen una mayor actividad cuando se metaboliza el compuesto (por ejemplo, se hidroliza, hidroxila, glucuroniza, etc.), debe apreciarse que los metabolitos de los compuestos contemplados también se contemplan expresamente en la presente memoria.

Dependiendo de la finalidad particular (por ejemplo, analgésico, anti-inflamatorio), se debe reconocer que los compuestos contemplados pueden ser combinados (*in vivo* o en una formulación farmacéutica o régimen de administración) con al menos un otro principio farmacéuticamente activo, y otros principios activos especialmente contemplados incluyen varios analgésicos (por ejemplo, opioides, fármacos de tipo ibuprofeno, fármacos de tipo paracetamol, fármacos de tipo aspirina, etc.), diferentes fármacos inmunosupresores y/o antiinflamatorios (por ejemplo, esteroides y AINE), etc. Las concentraciones de segundos principios farmacéuticamente activos están generalmente o preferiblemente por debajo de las recomendadas para la administración independiente, sin embargo, concentraciones más altas también se consideran adecuadas para su uso en la presente memoria.

Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas contempladas especialmente incluirán aquellas en las que los compuestos contemplados (y principios farmacéuticamente activos adicionales) se proporcionan con un vehículo adecuado, en las que los compuestos contemplados están presentes preferiblemente en una concentración eficaz para modular la concentración de etanolamida de ácidos grasos en un organismo y/u órgano diana en un grado eficaz para reducir y más preferiblemente para tratar los signos y síntomas de una enfermedad asociada con un nivel anormal en etanolamida de ácido graso. Visto desde una perspectiva diferente, compuestos contemplados están presentes en una composición en una cantidad eficaz para reducir el dolor y/o la inflamación.

Dependiendo del uso y estructura particular, por lo tanto, se contempla que los compuestos de acuerdo con el objeto de la invención estén presentes en la composición en una cantidad entre 1 microgramo a 1000 mg, más generalmente entre 10 microgramos a 500 miligramos y lo más generalmente entre 50 microgramos a 500 miligramos por unidad de dosificación única. Por lo tanto, las concentraciones preferidas de los compuestos contemplados *in vivo* o *in vitro* generalmente serán de entre 0,1 nM y 500 microM, más generalmente entre 50 nM y 400 microM y lo más generalmente entre 100 nM y 200 microM.

Además, se debe reconocer que todas las formulaciones se consideran adecuadas para su uso en la presente memoria y especialmente incluyen formulaciones orales y parenterales. Por ejemplo, para la administración oral, las composiciones contempladas pueden estar en la forma de un comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se elabora preferiblemente en forma de una unidad farmacéutica que contiene una cantidad particular del principio activo. Ejemplos de tales unidades de dosificación son comprimidos o cápsulas. El

principio activo también puede administrarse por inyección como una composición en la que, por ejemplo, se puede usar solución salina, dextrosa o agua como un vehículo adecuado. En aspectos especialmente preferidos, se contempla que la formulación sea adecuada para administración tópica, administración a través de aerosol y para la administración intratecal. En consecuencia, formulaciones especialmente adecuadas pueden ser soluciones acuosas estériles para pulverización tópica o administración en gotas o la aplicación como una tintura. Como alternativa, las formulaciones tópicas adecuadas incluyen cremas, pomadas, espumas, lociones, emulsiones, etc. Además, cuando se formula el compuesto para la administración intratecal (por ejemplo, en el tratamiento de la lesión de la médula espinal), se prefiere que el compuesto se prepare como una solución inyectable, suspensión, o emulsión. En otras formulaciones adicionales, los compuestos contemplados pueden ser formulados para la administración en aerosol (por ejemplo, micropolvo, recubierto sobre un vehículo dispersable, disuelto en disolvente atomizable, etc.)

Se debe apreciar que la elección de la formulación y del vehículo en particular dependerá al menos en parte del uso específico y del tipo de compuesto. Hay numerosas maneras de formulación del fármaco conocidas en la técnica y todas se consideran adecuadas para su uso en la presente memoria (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form by Mark Gibson; Informa HealthCare, ISBN: 1574911201; or Advanced Drug Formulation Design to Optimize Therapeutic Outcomes by Robert O. Williams, David R. Taft, and Jason T. McConville; Informa HealthCare; ISBN: 1420043870).

La cantidad de compuesto terapéuticamente activo que se administra y el régimen de dosificación para tratar un estado patológico con los compuestos y/o composiciones de esta invención depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo y estado de salud del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la ruta y frecuencia de administración y el compuesto particular empleado y, por lo tanto, puede variar ampliamente. Sin embargo, se proporcionan más arriba cantidades especialmente adecuadas, y por lo tanto, se permite una dosis diaria de aproximadamente 0,001 (o incluso menos) a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal. Generalmente, una dosis diaria puede administrarse en una a cuatro dosis por día.

Para fines terapéuticos o profilácticos, los compuestos contemplados se combinan normalmente con uno o más excipientes apropiados para la ruta de administración indicada. Si se administra por vía oral, los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ésteres de alquilo de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y/o alcohol polivinílico, y después comprimirse o encapsularse para la administración conveniente. Tales cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada que puede proporcionarse en una dispersión de compuesto activo en hidroxipropilmetilcelulosa. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para inyección estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas. Estas soluciones y las suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles que tienen uno o más de los vehículos o diluyentes mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral. Los compuestos pueden disolverse en agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, cloruro de sodio y/o diversos tampones. Otros excipientes y modos de administración son bien y ampliamente conocidos en la técnica farmacéutica.

Usos contemplados

En general, se contempla que los compuestos y composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención se puedan emplear para tratar cualquier afección y/o enfermedad asociados con niveles anormales (por ejemplo, desviación de al menos 10 % con respecto al nivel de PEA promedio en una persona sana en el correspondiente sitio de ensayo) de las NAE o cuando se desea la modulación de los niveles normales de tales compuestos para un propósito particular. Por lo tanto y visto desde una perspectiva diferente, los compuestos contemplados pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades o afecciones donde la elevación de los niveles de palmitoiletanolamida son terapéuticamente deseables. Por lo tanto, afecciones y enfermedades particularmente contempladas incluyen aquellas sensibles a los cambios de las NAE. Por ejemplo, los compuestos y composiciones contempladas pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento del dolor, la inflamación, el cáncer y enfermedades metabólicas. Otras enfermedades contempladas incluyen trastornos del sistema nervioso, y especialmente relacionadas con la neuroinflamación, la enfermedad de Alzheimer, el asma, la dermatitis, el síndrome del intestino irritable (SII), enfermedad de Crohn y trastornos del apetito.

Por lo tanto, afecciones y enfermedades para ser tratadas con los compuestos y composiciones contempladas incluyen especialmente el dolor, la inflamación y las enfermedades neurodegenerativas. Entre otros ejemplos, tales enfermedades pueden incluir artritis reumatoide, psoriasis y asma.

Otros usos contemplados adicionales incluyen aquellos en los que los compuestos y composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención se usan para estudios de inhibición *in vitro* e *in vivo* para determinar la relación estructura-función de un compuesto con respecto a la inhibición de NAAA. Como alternativa o adicionalmente, se debe apreciar también que los compuestos y composiciones contemplados se pueden emplear en diversos métodos

de inhibición de NAAA y/o en la activación o modulación de la señalización en una vía en la que el PPAR-alfa es un miembro en la transducción de la señal u otro procesamiento.

Ejemplos de síntesis de los compuestos contemplados

URB783 se preparó a partir de *N*-Boc-L-serina (1), la cual se cicló en una reacción de Mitsunobu para dar 2, cuya desprotección y salificación proporcionó el tosilato 3. El último compuesto se hizo reaccionar con cloruro de 3-fenilpropionilo para proporcionar URB783. URB894 fue el resultado de la reacción entre el cloruro 3 y 4-bifenilcarbonilo, que a su vez se obtuvo por tratamiento de ácido 4-fenilbenzoico con cloruro de oxalilo.

Éster *terc*-butilico del ácido (S)-(2-oxooxetan-3-il) carbámico: A una solución agitada de PPh_3 seca (72 h al vacío en presencia de P_2O_5) (5 mmol) en CH_3CN seco (31 ml), mantenida a -50°C bajo N_2 , se añadieron gota a gota dimetilazodicarboxilato (5 mmol) y después de 20 min una solución de 1 (4,47 mmol) en CH_3CN (10,4 ml). La mezcla se agitó durante 1,5 horas a $-50/-35^\circ\text{C}$ y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (ciclohexano/EtOAc 8:2 a 6:4) dio 2 bruto, que finalmente se lavó y se trituró para dar un sólido blanco. Pf $120-122^\circ\text{C}$ (Et_2O). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -27^\circ$ (c 0.1, CH_3CN). La RMN de ^1H está de acuerdo con la literatura (Arnold, et al., 1985).

(S)-2-oxooxetan-3-il-amonio-4-toluenosulfonato (3): A una mezcla agitada de 2 (1,34 mmol) y ácido *p*-toluenosulfónico anhidro (72 h al vacío en presencia de P_2O_5) (1,43 mmol), mantenido a 0°C en N_2 , se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (3 ml) a lo largo de 10 min. La solución se hizo reaccionar bajo agitación a 0°C durante 15 min, se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se concentró a una temperatura por debajo de 30°C . El residuo oleoso se mantuvo en vacío durante 1 h y el sólido blanco resultante se trituró y se lavó con éter dietílico seco, después se mantuvo a vacío durante 24 h. Rendimiento 81 %. El pf y la RMN de ^1H están de acuerdo con la literatura (Arnold, et al., 1988).

(S)-*N*-(2-oxooxetan-3-il)-3-fenilpropionamida (URB783): A una mezcla agitada de 3 (0,4 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 ml), mantenida a 0°C bajo N_2 , se añadieron gota a gota Et_3N (1,59 mmol) y cloruro de 3-fenilpropionilo (0,6 mmol). La mezcla se hizo reaccionar a 0°C durante 30 min y a temperatura ambiente durante 2 h, después se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (ciclohexano/EtOAc 1:1 a 3:7) y la recristalización dio URB783 como un sólido blanco. Rendimiento 60 %. Pf $104-106^\circ\text{C}$ (acetona/éter de petróleo). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13^\circ$ (c 0,5, MeOH). MS (EI): m/z 219 (M^+), 91 (100). IR (Nujol) 3333, 1832, 1625, 1541 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 2,57 (sa, 1H), 2,99 (t, 2H), 4,34 (t, 1H, $J = 5$ Hz), 4,43 (dd, 1H, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 6,5$), 5,14 (m, 1H), 5,96 (sa, 1H), 7,18-7,36 (m, 5H) ppm. RMN de ^{13}C (CDCl_3): δ 31,2 (CH_2), 37,7 (CH_2), 58,4 (CH), 66,1 (CH_2), 126,5 (CH), 128,3 (2CH), 128,7 (2CH), 140,2, 168,4 (C=O), 172,5 (C=O) ppm.

(S)-*N*-(2-oxooxetan-3-il)bifenil-4-carboxamida (URB 894): A una solución de ácido bifenil-4-carboxílico (2,1 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5,3 ml) y DMF seco (1 ml), mantenida a 0°C bajo N_2 , se añadió cloruro de oxalilo (0,3 ml, 3,13 mmol). La mezcla se hizo reaccionar durante 20 min a 0°C y 2 horas a temperatura ambiente, después se concentró para dar cloruro de bifenil-4-carbonilo en bruto como un sólido de color amarillo claro. Una cantidad de esta muestra (2 mmol) se disolvió en THF seco (20 ml) y se añadió gota a gota la solución resultante, a 0°C , a una suspensión obtenida mezclando 3 (1,3 mmol), Et_3N (1,143 ml, 8,2 mmol) y THF seco (3 ml) a 0°C bajo N_2 . Se hizo reaccionar la mezcla resultante a 0°C durante 30 min y a temperatura ambiente durante 3 h, después se evaporó. La purificación por cromatografía ultrarrápida (ciclohexano/EtOAc 1:1) y la recristalización dio URB894 puro como un sólido de color marfil. Rendimiento 46 %. Pf $218-220^\circ\text{C}$ (acetona/éter de petróleo; tubo capilar sellado; se observó descomposición de la muestra con cambio de color y reducción de la masa a partir de 146°C); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20^\circ$ (c 0.55, CH_3CN). MS (EI): m/z 267 (M^+), 222, 181, 167 (100). IR (Nujol) 3270, 1827, 1641, 1540 cm^{-1} ; RMN de ^1H (d_6 -acetona) δ 4,53-4,65 (m, 2H), 4,50-4,59 (m, 1H), 7,38-7,55 (m, 3H), 7,70-7,84 (m, 4H), 8,00-8,07 (m, 2H), 8,68 (d a, 1H, $J = 7$ Hz) ppm. RMN de ^{13}C (d_6 -acetona): δ 58,8, 65,1, 126,9, 127,0, 128,0, 128,1, 129,0, 131,9, 139,7, 144,4, 166,4, 169,2 ppm.

Ejemplos

Los estudios previos realizados por los inventores y otros han demostrado que la PEA produce efectos analgésicos rápidos de amplio espectro mediante la activación del receptor activado por el proliferador de peroxisomas del receptor nuclear (PPAR- α) en ambos modelos de dolor inflamatorio y neuropático. Un trabajo más reciente ha mostrado que los niveles de PEA están reducidos en los tejidos inflamados (por ejemplo, el líquido sinovial de la artritis reumatoide y los pacientes con artrosis), lo que sugiere que este lípido bioactivo puede participar en la modulación de la respuesta inflamatoria y/o contribuir a los estados inflamatorios crónicos.

Como apoyo de esta posibilidad, los inventores han encontrado que la restauración de los niveles de PEA durante la inflamación alivia fuertemente la inflamación. Estos resultados sugieren una estrategia novedosa mecanicista para reducir la inflamación y el dolor por inhibición de la degradación de la PEA para restaurar los niveles normales de PEA en los tejidos inflamados. En la presente solicitud los inventores han desarrollado una clase de inhibidores potentes y selectivos de la amidasa ácida hidrolizante de la *N*-aciletanolamina (NAAA), la enzima responsable de la degradación de la PEA.

La inflamación reduce los niveles de PEA endógena.

La contribución de la PEA endógena a los procesos inflamatorios permanece en gran medida sin definir. Sin embargo, varias líneas de evidencia sugieren que la PEA endógena puede participar en la inflamación. Los inventores han demostrado anteriormente que el éster de forbol proinflamatorio, el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), disminuye los niveles de PEA dérmicos después de la inflamación de la piel. Estos resultados plantean la posibilidad de que niveles de PEA reducidos durante la inflamación puedan permitir la progresión del proceso inflamatorio. Para explorar más esta idea, los inventores evaluaron los efectos de la inflamación inducida por carragenina sobre los niveles de PEA en el ratón. Se implantaron quirúrgicamente bajo la piel dorsal de ratones esponjas de polietileno inyectadas con vehículo (DMSO al 10 % en solución salina) o carragenina (1 %). Después de 3 días, los ratones fueron sacrificados y las esponjas se extrajeron y se analizaron para determinar la infiltración de las células inflamatorias y el contenido de PEA celular. En los animales tratados con carragenina, el número de células infiltrantes (principalmente neutrófilos) aumentó en aproximadamente 3 veces como se puede observar de la Figura 2. En este caso, la implantación quirúrgica de esponjas empapadas del vehículo (v) o carragenina (c) bajo la piel dorsal de ratones Swiss durante 3 días (A) aumentó el número de neutrófilos infiltrantes y (B) disminuyó los niveles de PEA celular endógeno. (C) El transcurso temporal de los efectos del vehículo (símbolos abiertos) o carragenina (símbolos cerrados) sobre los niveles de PEA **P <0,01 o ***P <0,001 frente a V, prueba t o ANOVA, seguido de análisis post-hoc de Dunnett según corresponda (n = 6).

Estudios adicionales revelaron (datos no mostrados) que la reducción de PEA en el tejido inflamado era en parte debida al menos a la supresión de la expresión de leucocitos de la fosfolipasa D específica de N-acilfosfatidil-etanolamina (NAPE-PLD). Los ratones deficientes en NAPE-PLD, que producen PEA a través de una ruta enzimática compensatoria, no pueden reducir los niveles de PEA en respuesta a un desafío inflamatorio y muestran una reactividad amortiguada a tal exposición. Los inhibidores de la amidasa ácida hidrolizante de la N-aciletanolamina (NAAA) evita la disminución de los niveles de PEA y de esta manera amortigua las respuestas inducidas por estímulos inflamatorios. Los efectos antiinflamatorios de este agente son imitados por la PEA exógena y abolidos por la eliminación de PPAR-alfa. Por lo tanto, hay que señalar que los resultados indican claramente que la activación de PPAR PEA-alfa en los leucocitos sirve como una señal de parada temprana que impide o incluso inhibe el progreso de la inflamación.

La restauración de los niveles de PEA con PEA exógena reduce la inflamación

Como un primer paso en la determinación de la función de la PEA endógena en la inflamación, los inventores examinaron los efectos de la aplicación local de PEA sobre las respuestas inflamatorias. Se implantaron quirúrgicamente bajo la piel dorsal de ratones esponjas de polietileno inyectadas con vehículo o carragenina (1 %) y vehículo (DMSO 10 % en solución salina) o diversas dosis de PEA (0,1 a 50 µg). Después de 3 días, se sacrificaron los ratones y las esponjas se extrajeron y se analizaron para determinar la infiltración de células. La PEA redujo de forma dependiente de la dosis el número de células infiltrantes como se muestra en la Figura 3 y el edema (datos no mostrados) en los ratones de tipo silvestre, pero no tuvo ningún efecto en los animales de PPAR-alfa-nulo. Aquí los paneles (A-B) muestran el efecto del vehículo (barras blancas), carragenina (barras rellenas) o PEA (0,1-50 µg) en ratones Swiss, barras negras; PEA (50 µg en ratones PPAR-α -/-), puntuado como el número de células inflamatorias infiltrantes en una esponja de polietileno (tamaño) inyectada con vehículo, carragenina (1 %) o PEA, implantada bajo la piel dorsal de (A) ratones Swiss o (B) ratones C57BL6 de tipo silvestre (+/+) o ratones PPAR-α/- durante 3 días. **P < 0,01 o *** P <0,001 frente a V, ## P <0,01 frente a control de carragenina. ANOVA, seguido de análisis post-hoc de Tukey o análisis post-hoc de Dunnett según corresponda (n = 6). Por lo tanto, se debe apreciar que la inflamación periférica se asocia con la síntesis de PEA disminuida en células infiltrantes y que la restauración de los niveles de PEA por la administración exógena PEA reduce las respuestas inflamatorias.

Diseño de inhibidores de la NAAA

La NAAA pertenece a la familia de la coloiglicina hidrolasa, que es un subgrupo de la superfamilia de las Ntn (nucleófilo N-terminal) amino hidrolasas. Estas enzimas se especializan en la escisión de amidas lineales y tienen una cisteína, serina o treonina en la primera posición de su secuencia aminoacídica, que actúa como el agente nucleófilo responsable del ataque catalítico. En el caso de la NAAA, el residuo nucleófilo es probablemente Cis131. La evidencia experimental sugiere que la proteína nativa NAAA sufre un proceso de maduración que implica la escisión proteolítica de los 130 primeros residuos, que da una proteína de 232 aminoácidos, donde Cis131 se convierte en el extremo N-terminal, un hecho comúnmente observado con otras Ntn hidrolasas.

Recientemente, la estructura del conjugado ácido biliar hidrolasa (CBAH), un miembro de la familia Ntn, se resolvió por cristalografía de rayos X. Un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NAAA y CBAH reveló un alto grado de homología de secuencia entre los sitios de unión de dos enzimas. Usando las coordenadas de CBAH como molde, se construyó un modelo de NAAA por modelado comparativo. De acuerdo con este modelo, como se ilustra en la Figura 4, el intermedio tetraédrico formado por el ataque de la cisteína 131 nucleófila catalítica sobre la PEA se estabilizó mediante interacciones electrostáticas entre el oxígeno del carbonilo de la PEA y el agujero del oxianión de la enzima, que se forma parcialmente por la amida de la cadena lateral de la asparagina 292 y la amida de la cadena principal de la asparagina 209. Además, un bolsillo hidrófobo revestido por tirosina 151, entre otros residuos, puede dar cabida a la cadena de acilo flexible de la PEA.

Estas predicciones se confirmaron mediante mutagénesis dirigida al sitio de estos aminoácidos que recubren el lado catalítico. Por ejemplo, la sustitución de Cis131, Ser133, Asp150, Tir151 o Asn292 con alanina, abolió completamente la actividad de NAAA *in vitro*, mientras que las mutaciones de los residuos periféricos no tenían tal efecto (datos no mostrados). Basándose en estos resultados, los inventores diseñaron una primera serie de inhibidores de la NAAA que incluía una cadena principal hidrófoba (para imitar el resto ácido graso alifático de PEA) unido a un grupo de cabeza lactona (para dirigir el resto de cisteína activo). Los inventores sintetizaron y probaron a continuación una serie de compuestos, algunos de los cuales inhiben la NAAA recombinante con potencias sub-micromolares (Figuras 1A-C, Figura 5). Los dos compuestos más potentes (URB783 y URB894) inhibieron la NAAA con valores de CI_{50} de 420 ± 20 nM y 115 ± 13 nM, respectivamente (Figuras 1A-C, Figura 5).

Los niveles de PEA restauran la inhibición de NAAA y reducen la inflamación

Los inventores evaluaron los efectos del inhibidor de la NAAA URB783 sobre la inflamación, utilizando el modelo de carragenina en ratón. Como se indicó anteriormente, la exposición a carragenina estimuló el edema producido por la infiltración de células (Figura 6A) (datos no mostrados), y redujo significativamente los niveles endógenos de PEA (Figura 6B). La inclusión del compuesto URB783 en la esponja restauró la PEA hasta los niveles basales (Figura 6B) y redujo significativamente el número de células infiltrantes (Figura 6A) y el volumen de exudados (datos no mostrados). Cabe destacar que el inhibidor selectivo de la FAAH URB597 no tuvo ningún efecto antiinflamatorio en este modelo, lo que sugiere que la FAAH no participaba en la regulación de la PEA durante la inflamación. Los efectos del compuesto URB783 es probable que ocurran a través de la activación de PPAR- α por la PEA endógena, ya que estos efectos estaban ausentes en ratones nulos para PPAR-alfa (Figura 6C) y no se reprodujeron por el compuesto URB818, un análogo quirál de URB783 que no inhibe NAAA (datos no mostrados).

Más específicamente, los paneles (A, C) ilustran el recuento de células inflamatorias mientras que el panel (B) muestra los niveles de PEA en esponjas retiradas de ratones después de 3 días de la implantación quirúrgica bajo la piel dorsal de ratones Swiss (A-B) o (C) ratones C57BL6 (+/+) de tipo silvestre o ratones con PPAR- α desactivado (-/-). Las esponjas de polietileno (1 cm^3) fueron inyectadas con vehículo (100 μ l de agua: DMSO (9:1), V, barras abiertas), carragenina (1 %, barras rellenas), URB597 (30 μ g) y URB783 (30 μ g) como se indica. ** $P < 0,01$ o *** $P < 0,001$ frente a V, ### $p < 0,01$ frente a control de carragenina. ANOVA, seguido de análisis post-hoc de Tukey o de análisis post-hoc de Dunnett según corresponda ($n = 5-7$).

Ensayo de NAAA

NAAA recombinante o NAAA de pulmón de rata nativa se incubó a 37°C durante 30 min en 0,2 ml de tampón de hidrógeno fosfato de sodio (50 mM, pH 5,0) que contiene Triton X-100 0,1 %, ditioneitol (DTT) 3 mM) y heptadecenoiletanolamida 50 mM como sustrato. La reacción se terminó por la adición de 0,2 ml de metanol frío que contenía 1 nmol de ácido heptadecanoico (HDA, NuChek Prep, Elysian, MN). Las muestras se analizaron por LC/MS (cromatografía líquida/espectrometría de masas). El ácido heptadecanoico se eluyó en una columna Eclipse XDB C18 isocrática a 2,2 ml/min durante 1 min con una mezcla disolvente de metanol 95 % y agua 5 %, conteniendo ambos ácido acético 0,25 % y acetato de amonio 5 mM. La temperatura de la columna fue de 50°C . ESI estaba en el modo negativo, el voltaje capilar era 4 kV y el voltaje del fragmentador fue 100 V. N_2 se utilizó como gas de secado a un caudal de 13 litros/min y una temperatura de 350°C . La presión del nebulizador se fijó en 60 psi. [M-H]⁻ se controló en el modo de SIM usando ácido heptadecanoico como patrón interno. Las curvas de calibración se generaron utilizando ácido heptadecanoico comercial (Nu-Chek Prep, $m/z = 267$).

Lesión de la médula espinal

En el modelo de lesión de la médula espinal (LME), la compresión extradural de un corte de médula espinal expuesta a través de una laminectomía T5-T8 de cuatro niveles, causó un aumento sustancial en la expresión de iNOS en las células inflamatorias, así como en los núcleos de las células de Schwann en la materia blanca y gris de los tejidos de la médula espinal extraídos de ratones 24 horas después de la lesión. No se detectó tinción de iNOS en la médula espinal obtenida de ratones simulados. La administración del inhibidor de la NAAA URB783 tras la SCI condujo a una reducción significativa en la expresión de iNOS, así como otros marcadores de la inflamación y apoptosis celular inducida por este modelo, incluyendo el receptor activado por proteasa (PAR), nitrotirosina, ligando de Fas, Bax, Bcl-2 y marcado de final de corte de UTP terminal mediado por la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL). A continuación se describe un protocolo experimental típico.

Los ratones fueron aleatorizados en 4 grupos ($n = 40$ animales/grupo). Los animales simulados se sometieron al procedimiento quirúrgico excepto que la pinza de aneurisma no se aplicó y se trató localmente en la médula espinal a nivel T5-T8 de la médula con vehículo (solución salina) o 3 (30 μ g/ratón) 1 h y 6 h después de la intervención quirúrgica. Los ratones restantes se sometieron a la LME (como se describe a continuación) y se trataron localmente a nivel T5-T8 de la médula espinal con vehículo (solución salina) o 3 (30 μ g/ratón) 1 h y 6 h después de la lesión. Los ratones de cada grupo fueron sacrificados a las 24 horas después de la lesión con el fin de recoger muestras para la evaluación de los parámetros tal como se describe a continuación.

Los ratones fueron anestesiados utilizando hidrato de cloral (400 mg/kg de peso corporal). Se utilizó el modelo de la

compresión con pinza descrito por Rivlin y Tator (Rivlin y Tator, 1978) y se produjo la LME por la compresión extradural de una sección de la SC expuesta a través de una laminectomía a nivel de T5-T8, en el que se usó el proceso espinoso prominente de T5 como una guía quirúrgica. Se eligió una laminectomía a nivel seis para acelerar la cosecha oportuna y para obtener suficiente tejido SC para el examen bioquímico. Con el aplicador de pinzas de aneurisma orientada en la dirección bilateral, se aplicó una pinza de aneurisma con una fuerza de cierre de 24 g extraduralmente a nivel T5-T8. A continuación, la pinza fue liberada rápidamente con el aplicador de la pinza, lo que causó la compresión SC. En los grupos de lesionados, la médula se comprimió durante 1 min. Después de la cirugía, se administró 1,0 ml de solución salina por vía subcutánea con el fin de reemplazar el volumen de sangre perdida durante la cirugía. Durante la recuperación de la anestesia, los ratones fueron colocados en una almohadilla térmica y se cubrieron con una toalla caliente. Los ratones fueron alojados individualmente en una habitación de temperatura controlada a 27 °C durante un período de supervivencia de 10 días. La comida y el agua se proporcionaron a los ratones *ad libitum*. Durante este período de tiempo, las vejigas de los animales se vaciaron manualmente dos veces al día hasta que los ratones fueron capaces de recuperar la función normal de la vejiga. Los animales con lesiones simuladas solamente fueron sometidos a laminectomía.

Localización inmunohistoquímica de PAR, nitrotirosina, ligando de Fas, Bax, Bcl-2 e iNOS. Veinticuatro horas después de la LME, se midió la nitrotirosina, un marcador específico de estrés nitrosativo, mediante análisis inmunohistoquímico en los cortes de la médula espinal para determinar la localización de "formación de peroxinitrito" y/u otros derivados de nitrógeno producidos durante la LME. A las 24h después de la LME, los tejidos se fijaron en formaldehído tamponado con PBS (p/v) al 10 % y se prepararon cortes de 8 mm a partir de tejidos embebidos en parafina. Después de la desparafinación, la peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno 0,3 % (v/v) en metanol 60 % (v/v) durante 30 min. Los cortes se permeabilizaron con Triton X-100 0,1 % (p/v) en PBS durante 20 min. La adsorción no específica se minimizó mediante la incubación del corte en suero de cabra normal 2 % (v/v) en PBS durante 20 min. La biotina endógena o los sitios de unión de avidina se bloquearon por incubación secuencial durante 15 minutos con biotina y avidina (DBA), respectivamente. Los cortes se incubaron durante la noche con anti-PAR (Alexis; 1:500 en PBS, v/v), anticuerpo anti-iNOS (1:500 en PBS, v/v), anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina de conejo (Upstate, 1: 500 en PBS, v/v), con anticuerpo anti-FAS-ligando (Abcam, 1 /: 500 en PBS, v/v), anticuerpo anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, 1:500 en PBS, v/v) o con anticuerpo policlonal anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:500 en PBS, v/v). Los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario. El marcado específico se detectó con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con biotina y un complejo avidina-biotina peroxidasa (DBA). Para verificar la especificidad de unión para la nitrotirosina, PAR, iNOS, Bax y Bcl-2, algunos cortes también se incubaron solo con el anticuerpo primario (no secundario) o solo con el anticuerpo secundario (no primario). En estas situaciones no se encontró tinción positiva en cortes que indiquen que las inmunorreacciones eran positivas en todos los experimentos llevados a cabo.

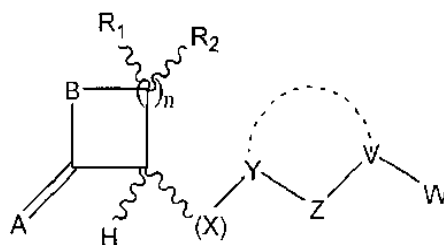
El ensayo marcado de final de corte de UTP terminal mediado por la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL) se realizó utilizando un kit de detección de TUNEL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Apotag, kit de HRP DBA, Milán, Italia). Brevemente, los cortes se incubaron con 15 mcg/ml de proteinasa K durante 15 min a temperatura ambiente y después se lavaron con PBS. La peroxidasa endógena se inactivó mediante H₂O₂ al 3 % durante 5 min a temperatura ambiente y después se lavó con PBS. Los cortes se sumergieron en tampón de desoxinucleotidiltransferasa (TdT) terminal que contiene desoxinucleotidil transferasa y dUTP biotinilado en tampón TdT, se incubaron en una atmósfera húmeda a 37 °C durante 90 min y después se lavaron con PBS. Los cortes se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con anticuerpo anti-conjugado de peroxidasa de rábano picante y las señales se visualizaron con diaminobencidina. El número de células TUNEL positivo/campo de alta potencia se contó en 5 a 10 campos de cada portaobjetos codificados.

Microscopía de luz. Se extrajeron tejidos de médula espinal a las 24 h siguientes al traumatismo. Los segmentos de tejido que contiene la lesión (1 cm a cada lado de la lesión) fueron embebidos en parafina y se cortaron en cortes de 5 µm de grosor. Las muestras de tejido (espesor de 5 µm) se deaparafinizaron con xileno, se tiñeron con hematoxilina/eosina (H y E), con tinción de metilo pironina verde (utilizados simultáneamente para ADN y ARN) y se estudiaron mediante microscopía óptica (Dialux 22 Leitz).

Los segmentos de cada médula espinal fueron evaluados por un histopatólogo experimentado. Las neuronas dañadas se contaron y se anotaron los cambios histopatológicos de la sustancia gris en una escala de 6 puntos (Sirin et al, 2002): 0, sin lesión observada, 1, sustancia gris contenía 1 a 5 neuronas eosinófilas; 2, la sustancia gris contenía 5 a 10 neuronas eosinófilas; 3, la sustancia gris contenía más de 10 neuronas eosinófilas; 4, pequeño infarto (menos de un tercio del área de la sustancia gris); 5, infarto moderado; (un tercio a la mitad del área de la sustancia gris); 6, infarto grande (más de la mitad del área de la sustancia gris). Las puntuaciones de todos los cortes de cada médula espinal se promediaron para dar una puntuación final para ratones individuales. Se realizaron todos los estudios histológicos de una manera ciega. La Figura 7 representa ejemplos de resultados ejemplares de los experimentos descritos anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en el tratamiento de inflamación, artritis reumatoide, artrosis, asma, dermatitis, psoriasis, enfermedad del intestino irritable o una lesión de la médula espinal, teniendo dicho compuesto una estructura de acuerdo con la Fórmula I



Fórmula 1

en la que

A es O o S;

B es O, S o NR^a;

R₁ y R₂ son independientemente H, halógeno, o alquilo opcionalmente sustituido de uno a diez carbonos;

X es O, S, C(O), NR^b, CHR^b o cero;

Y es C(O), C(S) o CHR^c;

Z es O, S, NR^d o CHR^d;

V es alquilo opcionalmente sustituido de uno a diez carbonos o alqueno opcionalmente sustituido de uno a diez carbonos, siendo V opcionalmente metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, 1-butilo, *i*-butilo, 2-metilpropilo, ciclopropilmetilo, *i*-amilo, *n*-amilo o hexilo en la que W es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo o C(R₃R₄R₅), cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

en la que R^a, R^b, R^c y R^d son independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido de uno a diez carbonos o tioalquilo opcionalmente sustituido de uno a diez carbonos; y

en la que R₃, R₄ y R₅ son independientemente H, alquilo opcionalmente sustituido de uno a diez carbonos, arilo opcionalmente sustituido, cicloheteroalquilo opcionalmente sustituido de uno a diez carbonos o heteroarilo opcionalmente sustituido.

2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que A y B son O.

3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que X es NR^b e Y es C(O) o C(S).

4. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que Z es O o CHR^d, V es alquilo de uno a diez carbonos y en el que W es arilo o alquilo de uno a diez carbonos.

5. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R₁ es H y R₂ es alquilo de uno a diez carbonos.

6. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que A es O, B es O o NR^a, X es NR^b e Y es C(O) o C(S) y W es arilo o alquilo de uno a diez carbonos.

7. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, con la condición de que cuando V es metilo y W es fenilo, entonces Z es CHR^d o NR^d.

8. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 4, en el que X es NR^b e Y es C(O) o C(S).

9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que A es O, B es O o NR^a, X es NR^b e Y es C(O) o C(S).

10. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de inflamación, artritis reumatoide, artrosis, asma, dermatitis, psoriasis, enfermedad del intestino irritable o una lesión en la médula espinal que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

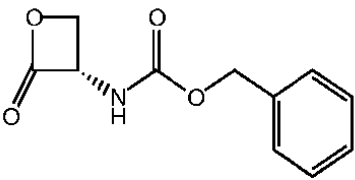
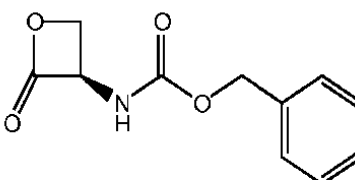
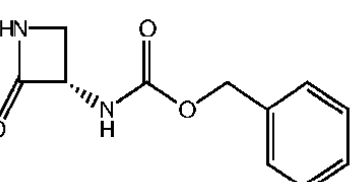
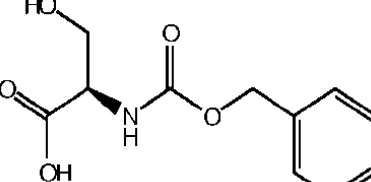
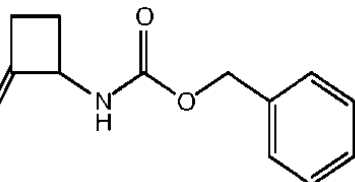
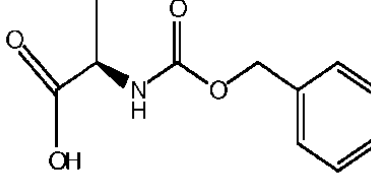
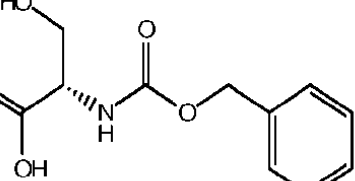
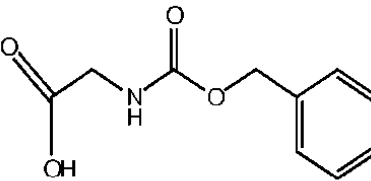
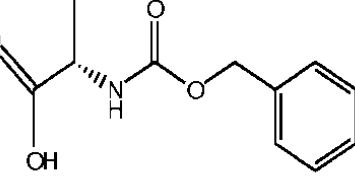
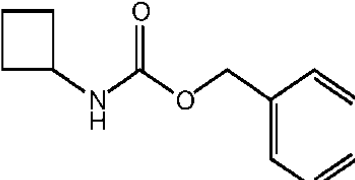
Cl ₅₀	SD41	Cl ₅₀ (uM)	URB785	Cl ₅₀ (uM)
		2,96 ± 0,3		0,70 ± 0,1
	URB788	Cl ₅₀ (uM)	Cbz-D-Ser	Cl ₅₀ (uM)
		16 ± 4,8		>100
	URB786 (rac. +/-)	Cl ₅₀ (uM)	Cbz-D-Ala	Cl ₅₀ (uM)
		>100		>100
	Cbz-L-Ser	IC ₅₀ (uM)	Cbz-gly	IC ₅₀ (uM)
		>100		>100
	Cbz-L-Ala	Cl ₅₀ (uM)	URB787	Cl ₅₀ (uM)
		>100		>100

Figura 1A

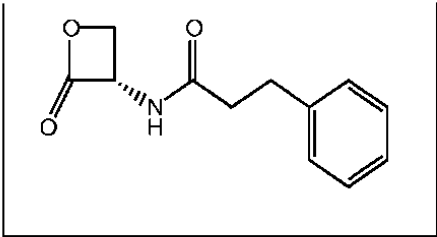
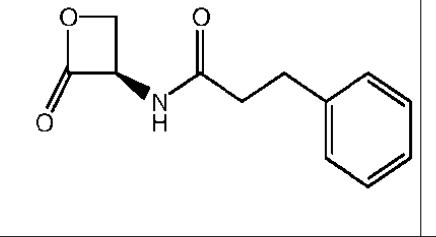
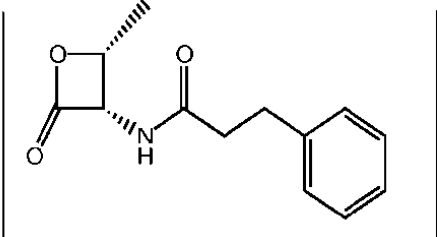
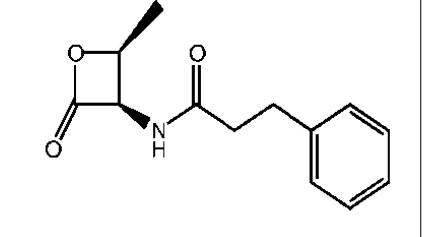
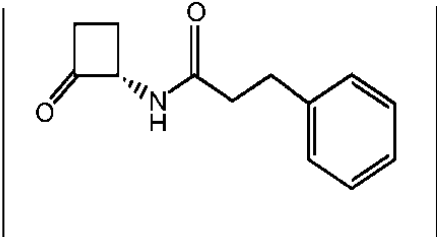
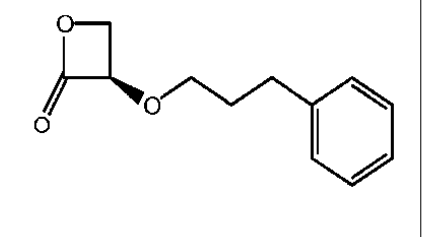
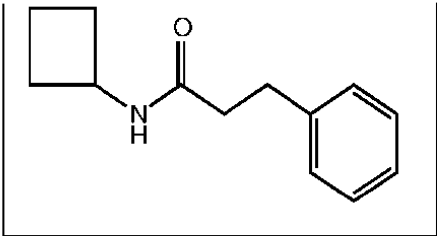
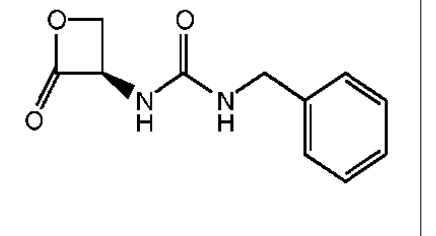
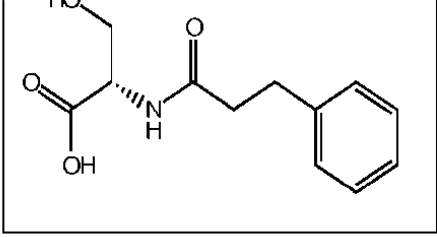
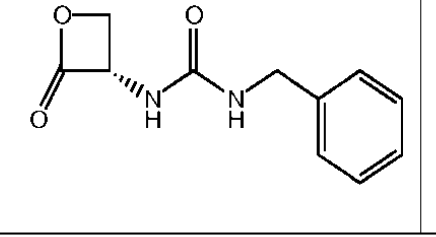
URB783	Cl ₅₀ (uM)	URB818	Cl ₅₀ (uM)
	0,42 ± 0,02		6,0 ± 0,6
URB820	Cl ₅₀ (uM)	URB819	Cl ₅₀ (uM)
	100uM		3,2 ± 0,4
URB868 (Racémico)	Cl ₅₀ (uM)	URB822	Cl ₅₀ (uM)
	>100		>100
URB828	Cl ₅₀ (uM)	URB863	Cl ₅₀ (uM)
	>100		49,2 ± 15
URB827	Cl ₅₀ (uM)	URB784	Cl ₅₀ (uM)
	>100		15 ± 4,7

Figura 1B

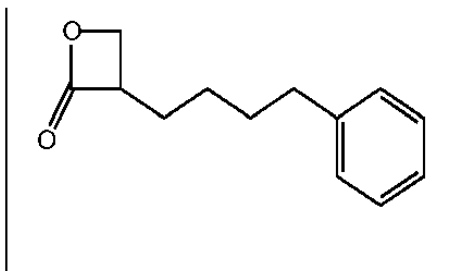
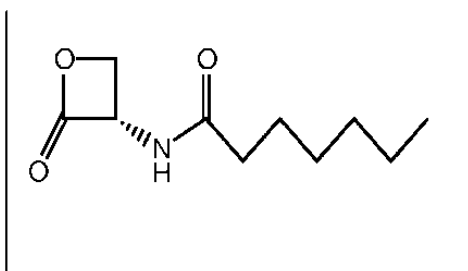
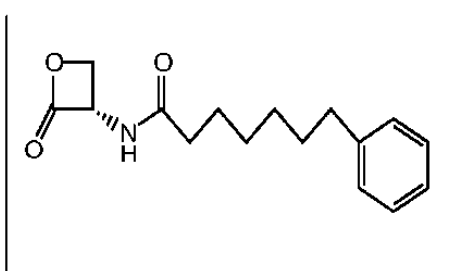
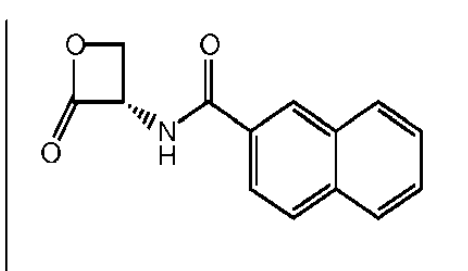
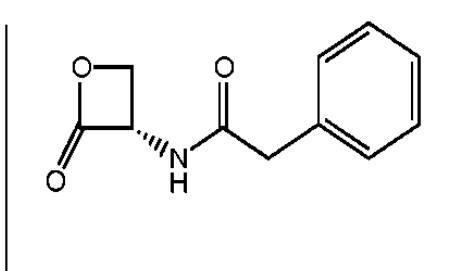
URB821 (Rac. +/-)		Cl ₅₀ (uM)
		11 ± 2,2
URB864		Cl ₅₀ (uM)
		0,46 ± 0,1
URB865		Cl ₅₀ (uM)
		1,5 ± 0,1
URB866		Cl ₅₀ (uM)
		0,16 ± 0,04
URB867		Cl ₅₀ (uM)
		1,85 ± 0,2

Figura 1C

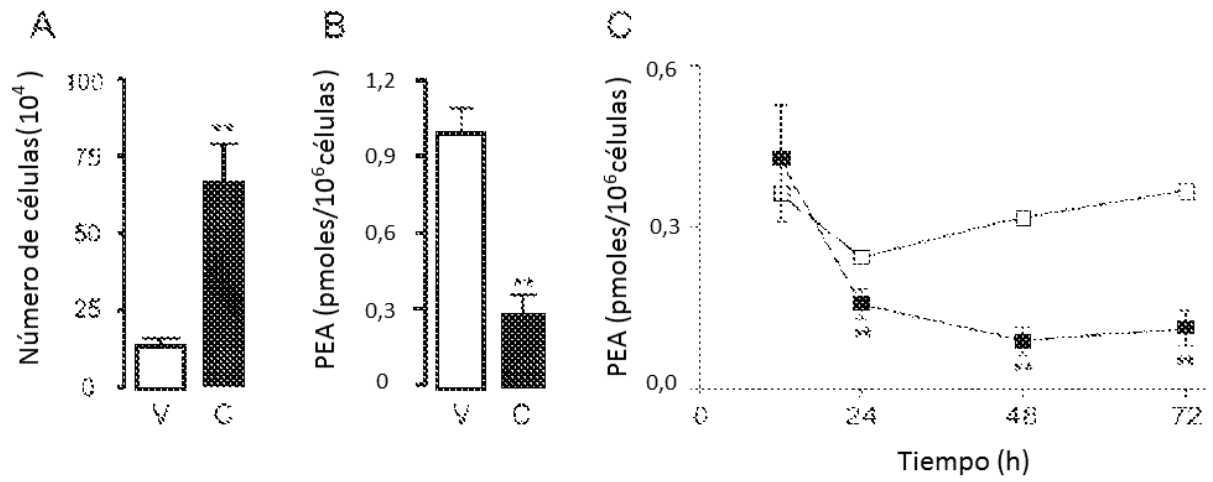


Figura 2

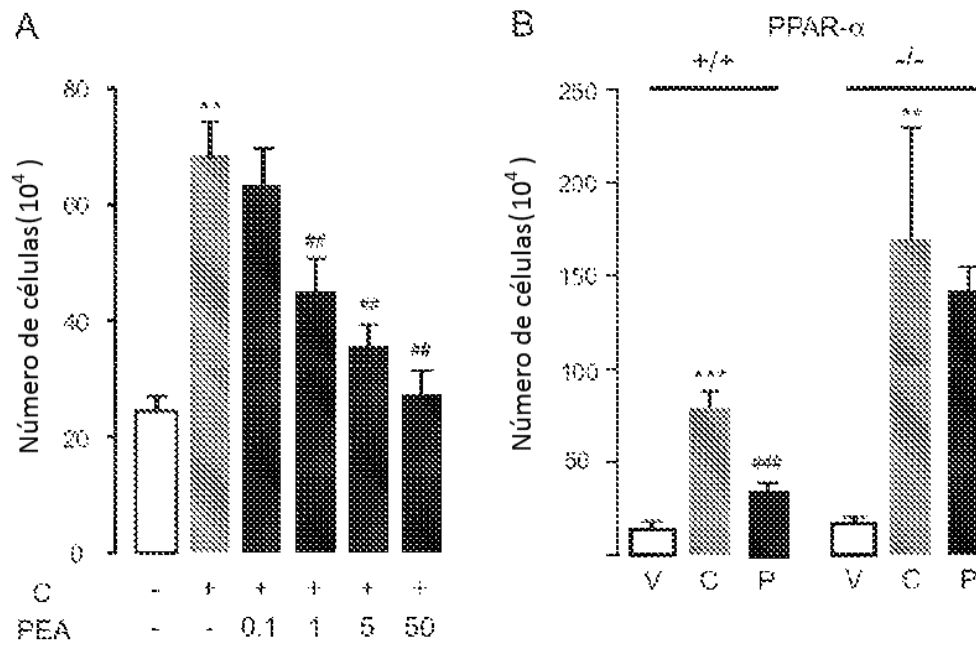


Figura 3

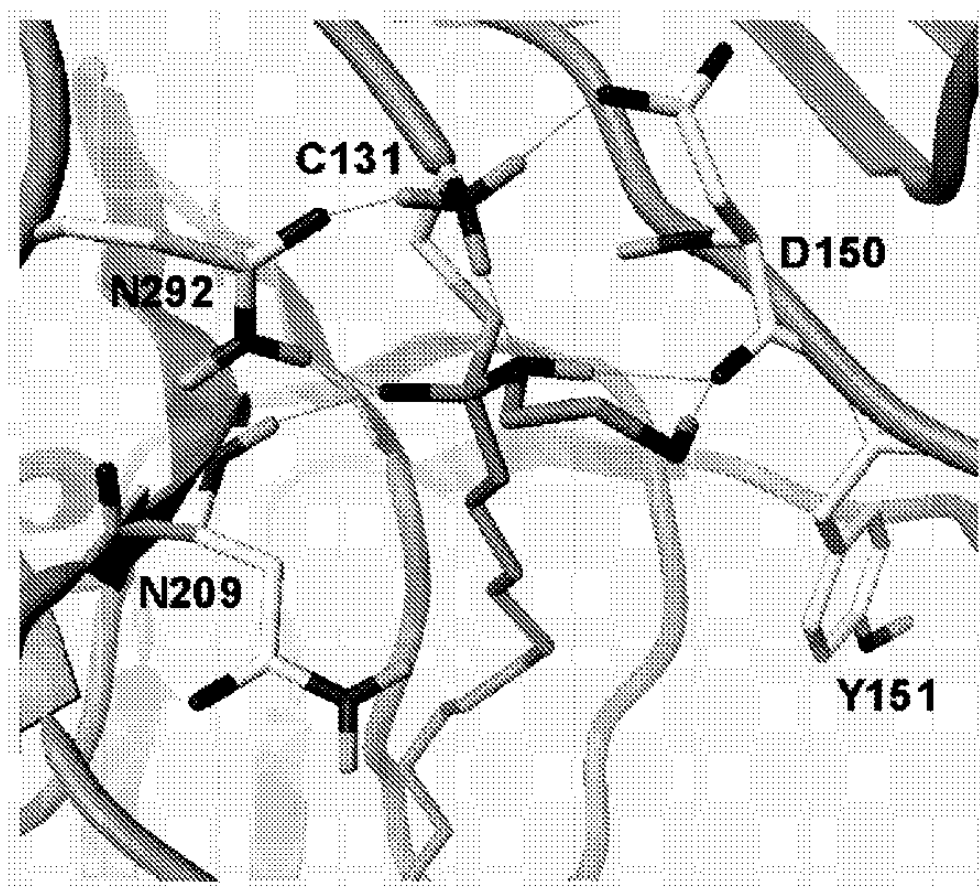


Figura 4

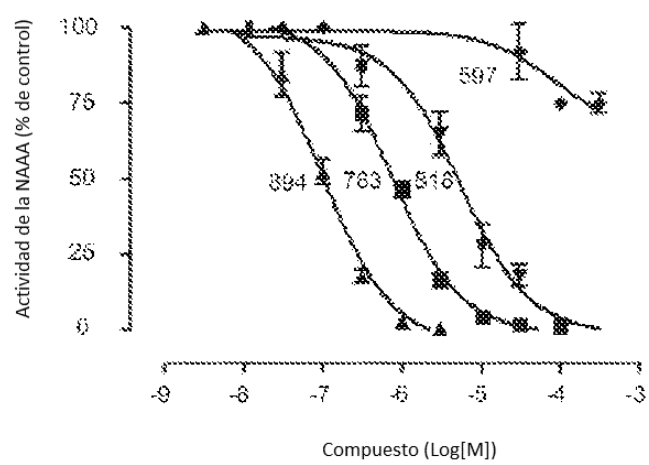


Figura 5

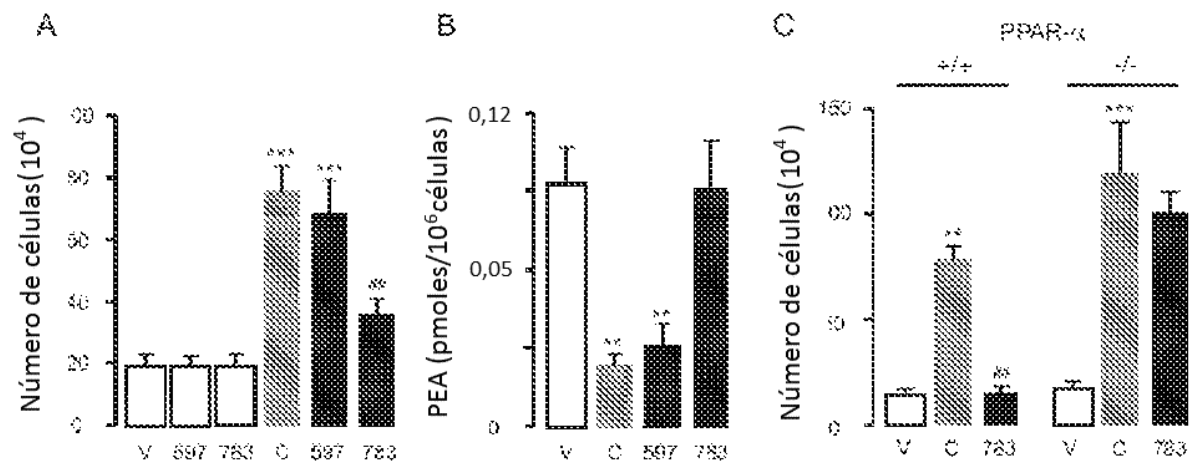


Figura 6

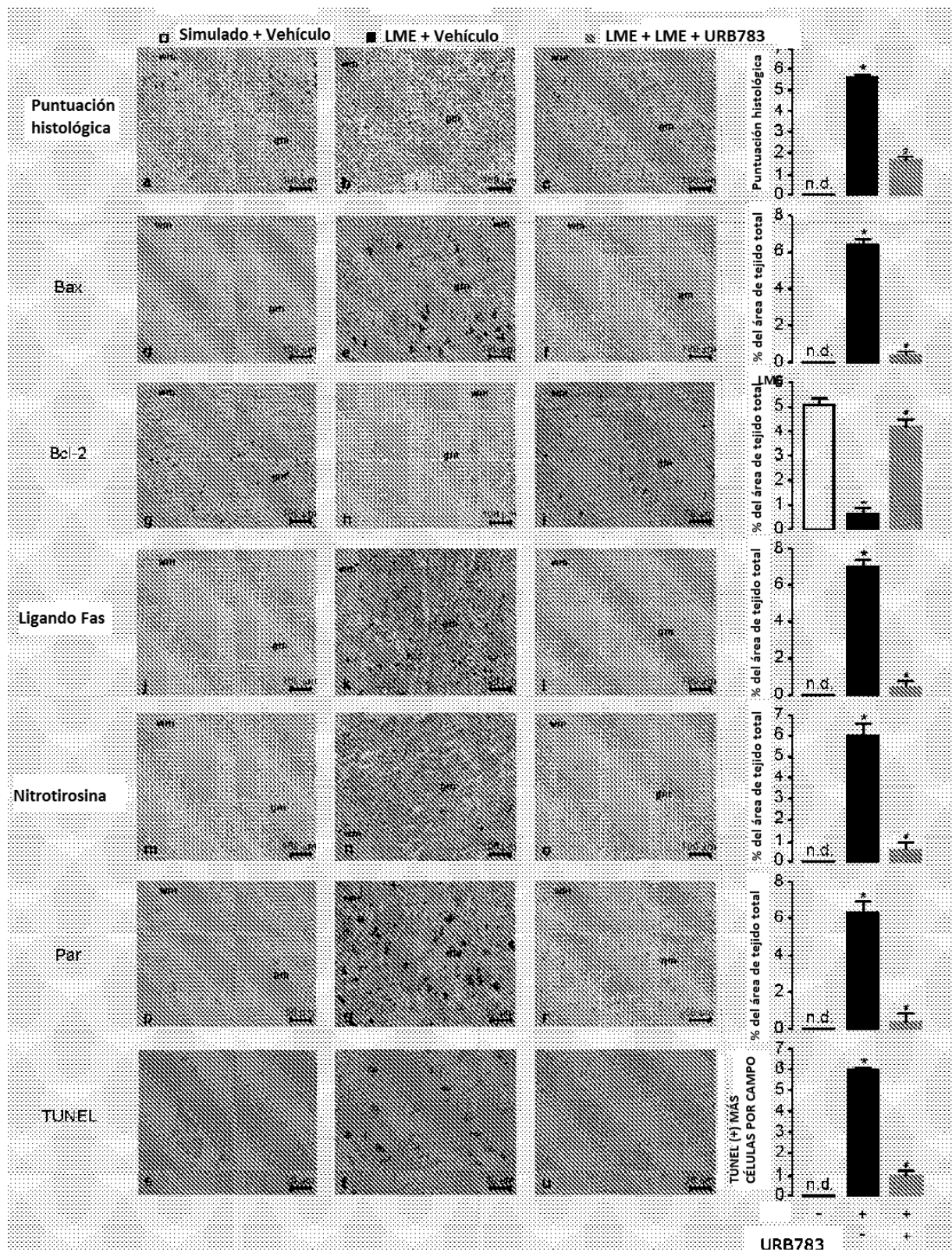


Figura 7