

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 800**

51 Int. Cl.:

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 235/24 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 31/4523 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2014** **PCT/PT2014/000049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015** **WO15012708**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2014** **E 14752676 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017** **EP 3024825**

54 Título: **Imidazolcarboxamidas y su uso como inhibidores de la FAAH**

30 Prioridad:

24.07.2013 GB 201313202

24.07.2013 GB 201313203

24.07.2013 GB 201313204

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
06.11.2017

73 Titular/es:

BIAL - PORTELA & C^a, S.A. (100.0%)

Á Av. Da Siderurgia Nacional

P-4745-457 S Mamede do Coronado, PT

72 Inventor/es:

ROSA, CARLA PATRÍCIA DA COSTA PEREIRA;

GUSMÃO DE NORONHA, RITA y

KISS, LASZLO ERNO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 800 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

Imidazolcarboxamidas y su uso como inhibidores de la FAAH

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un compuesto y a su uso, y en particular a un compuesto y su uso terapéutico en el tratamiento o prevención de afecciones que tienen una asociación con sustratos, tales como el neurotransmisor anandamida, que se descomponen por la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

Antecedentes de la invención

- 10 La enzima FAAH descompone las amidas de ácidos grasos, tales como la anandamida (*N*-araquidonoiletanolamina), *N*-oleoiletanolamina (OEA), *N*-palmitoiletanolamina (PEA) y oleamida. La anandamida, conocida también como *N*-araquidonoiletanolamina o AEA, es un neurotransmisor cannabinoide endógeno que se encuentra en los órganos de animales y seres humanos, especialmente en el cerebro. Se ha encontrado también que la anandamida se une al receptor vainilloide. La anandamida es degradada por la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) a etanolamina y ácido araquidónico. Por consiguiente, los inhibidores de FAAH llevan a niveles elevados de anandamida.

- 15 La anandamida es un neurotransmisor en el sistema endocannabinoide y estimula los receptores cannabinoides. Los receptores cannabinoides, tales como CB1 y CB2, son receptores acoplados a la proteína G. El CB1 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central mientras que el CB2 se encuentra principalmente en el tejido periférico. El sistema endocannabinoide ha sido implicado en un número creciente de funciones fisiológicas, tanto en los sistemas nerviosos central y periférico como en los órganos periféricos. La modulación de la actividad del sistema endocannabinoide se ha demostrado que tiene un efecto potencialmente terapéutico en una amplia gama de enfermedades y afecciones patológicas dispares. Por lo tanto, el sistema endocannabinoide, y la enzima FAAH, en particular, se han convertido en una diana terapéutica para el desarrollo de tratamientos potenciales para muchas enfermedades. El sistema endocannabinoide ha sido implicado en la regulación del apetito, en la obesidad, trastornos metabólicos, caquexia, anorexia, dolor, inflamación, neurotoxicidad, neurotraumatismo, ictus, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, discinesia inducida por levodopa, enfermedad de Huntington, síndrome de Gilles de la Tourette, discinesia tardía, distonía, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, esquizofrenia, ansiedad, depresión, insomnio, náusea, emesis, trastornos por consumo de alcohol, adicción a las drogas tales como opiáceos, nicotina, cocaína, alcohol y psicoestimulantes, hipertensión, choque circulatorio, lesión por reperfusión del miocardio, aterosclerosis, asma, glaucoma, retinopatía, cáncer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad hepática aguda y crónica tal como hepatitis y cirrosis hepática, artritis y osteoporosis. El sistema endocannabinoide y las afecciones con las que se asocia se exponen en detalle en Pacher et al. (2006) Pharmacol. Rev. 58: 389-462.

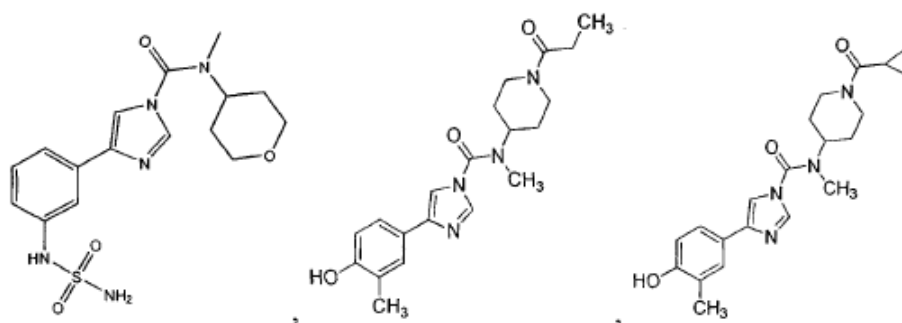
- 35 Con el fin de modular el nivel de sustratos endógenos de FAAH, tales como la anandamida, que a su vez modulan el sistema endocannabinoide, se han desarrollado inhibidores de la enzima FAAH. Esto permite que las afecciones y enfermedades asociadas con el sistema endocannabinoide sean tratadas o evitadas al menos parcialmente.

Puesto que los sustratos de FAAH se unen a otros receptores, por ejemplo, el receptor vainilloide, y/o están implicados en otras rutas de señalización, los inhibidores de FAAH también pueden permitir que las afecciones o enfermedades asociadas con otras rutas o sistemas, por ejemplo, el sistema vainilloide, sean tratadas o evitadas al menos parcialmente.

- 40 El documento WO 2010/074588 da a conocer compuestos que son inhibidores de FAAH. Käsänen et al. (Heikki Käsänen, Mikko J. Myllymäki, Anna Minkkilä, Antti O. Kataja, Susanna M. Saario, Tapio Nevalainen, Ari M. P. Koskinen, and Antti Poso. Chem Med Chem 2010, 5(2), 213 - 231) describe compuestos de carbamato que son inhibidores de FAAH. En particular, el compuesto 6b es un inhibidor de FAAH que contiene una estructura de imidazol. Sin embargo, este compuesto es un inhibidor de FAAH débil en comparación con muchos de los otros compuestos de carbamato descritos en este documento y que no contienen una estructura de imidazol.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura seleccionada de las siguientes:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se ha encontrado que los compuestos de la invención modulan la actividad de la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Además, se ha demostrado que son relativamente potentes, para tener selectividad periférica relativamente alta (es decir, inhiben la FAAH en mayor medida en el tejido periférico en comparación con el tejido del sistema nervioso central) y que son relativamente estables metabólicamente. Se ha demostrado también que los compuestos de la invención dan mejores resultados en relación con una o más propiedades en comparación con los compuestos descritos en el documento WO 2010/074588.

Las 'sales farmacéuticamente aceptables' de los compuestos de la presente invención incluyen sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas, sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos y sales con aminoácidos básicos o ácidos. Las sales con ácidos, en particular, se pueden emplear en algunos casos. Los ejemplos de sales incluyen la sal hidrocloreto, sal acetato, sal trifluoroacetato, sal metanosulfonato, sal 2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxilato, sal (2R,3R)-2,3-dihidroxisuccinato, sal fosfato, sal sulfato, sal benzoato, sal 2-hidroxi-benzoato, sal S-(+)-mandelato, sal S-(-)-malato, sal S-(-)-piroglutamato, sal piruvato, sal p-toluenosulfonato, sal 1-R-(-)-canforsulfonato, sal fumarato, sal maleato y sal oxalato. Los compuestos de la presente invención pueden estar en cualquiera de las formas, solvato (por ejemplo, hidrato) o no solvato (por ejemplo, no hidrato). Cuando están en una forma de solvato, los disolventes adicionales pueden ser alcoholes tal como propan-2-ol.

Los métodos generales para la preparación de sales son bien conocidos por los expertos en la técnica. La aceptabilidad farmacéutica de las sales dependerá de una variedad de factores, incluyendo las características de preparación de la formulación y el comportamiento *in vivo*, y los expertos podrán evaluar fácilmente tales factores teniendo en cuenta la presente descripción.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto según el primer aspecto de la invención, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden el compuesto del primer aspecto de la presente invención con cualquier excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de esta invención son aquellos empleados convencionalmente en el campo de la formulación farmacéutica, e incluyen, pero no se limitan a, azúcares, alcoholes de azúcares, almidones, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicerina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno o polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, por pulverización por inhalación, por vía rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado. Se prefiere la administración oral. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier vehículo excipiente, adyuvante o vehículo convencional, no tóxico, farmacéuticamente aceptable. El término parenteral tal como se utiliza en la presente memoria incluye técnicas de inyección o perfusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una preparación estéril inyectable, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosas estéril inyectable. Esta suspensión puede ser formulada según métodos conocidos en la técnica utilizando agentes de dispersión o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación estéril inyectable puede ser también una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o disolvente no tóxico, parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando incluyendo

monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas pueden contener también un diluyente o dispersante alcohol de cadena larga tal como el que se describe en la Ph. Helv o un alcohol similar.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por vía oral en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y suspensiones y soluciones acuosas. Estas formas farmacéuticas se preparan según métodos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En el caso de comprimidos para uso oral, los excipientes que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones acuosas se administran oralmente, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar también en la forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de esta invención con un excipiente adecuado no irritante que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por aerosol o inhalación nasal. Tales composiciones se preparan según métodos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una dosis de alrededor de 1 a alrededor de 20.000 µg/kg por dosis, por ejemplo, alrededor de 1 a alrededor de 10.000 µg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 5000 mg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 3000 mg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 2000 µg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 1500 µg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 1000 µg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 500 µg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 250 µg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 100 µg/kg, alrededor de 1 a alrededor de 50 µg/kg o alrededor de 1 a alrededor de 25 µg/kg por dosis dependiendo de la afección a tratar o prevenir, y de las características del sujeto al que se administra el compuesto. En muchos casos, la dosis puede ser alrededor de 1 a alrededor de 10 µg/kg por dosis. En realizaciones particulares, la dosis puede ser de alrededor de 250 µg/kg por dosis, alrededor de 100 µg/kg, alrededor de 50 µg/kg o alrededor de 10 µg/kg por dosis. La pauta de dosificación para un compuesto dado puede ser determinada fácilmente por los expertos en la técnica que tienen acceso a esta descripción.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende adicionalmente uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales. El compuesto de la invención se puede administrar con uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales, tales como anandamida, oleoil-etanolamida o palmitoil-etanolamida. Esto puede ser en la forma de una única composición que comprende el compuesto de la invención y uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales. Alternativamente, esto puede ser en dos o más composiciones separadas en donde el compuesto de la invención está contenido en una composición y el uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales están contenidos en una o más composiciones separadas.

La administración de los compuestos de la presente invención puede por lo tanto ser simultánea con, o escalonada con respecto a, el uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto según el primer aspecto de la invención, o una composición según el segundo aspecto, para uso en terapia.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un compuesto según el primer aspecto de la invención, o una composición según el segundo aspecto, para su uso en el tratamiento o prevención de una afección cuyo desarrollo o síntomas están vinculados a un sustrato de la enzima FAAH.

La invención proporciona también el uso de un compuesto según el primer aspecto de la invención, o una composición según el segundo aspecto, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección cuyo desarrollo o síntomas están vinculados a un sustrato de la enzima FAAH.

Una serie de afecciones cuyo desarrollo o síntomas están vinculados a un sustrato de la enzima FAAH son conocidos por los expertos. Algunos de éstos se han expuesto antes.

En un quinto aspecto, la invención proporciona también compuestos para su uso en un método de tratamiento o prevención de una afección cuyo desarrollo o síntomas están vinculados a un sustrato de la enzima FAAH, comprendiendo el método la administración, a un sujeto que necesite dicho tratamiento o prevención, de una

cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según el primer aspecto de la invención, o una composición según el segundo aspecto.

Un compuesto según el cuarto aspecto, o compuestos para su uso en un método según el quinto aspecto, en donde la afección es un trastorno asociado con el sistema endocannabinoide.

5 En ciertas realizaciones, la afección a tratar se puede seleccionar de:

- (i) dolor, en particular dolor neurogénico agudo o crónico, tal como la migraña y el dolor neuropático (por ejemplo dolor neuropático diabético, neuralgia post-herpética, neuralgia del trigémino); migraña; dolor inflamatorio agudo o crónico, tal como el asociado con enfermedades inflamatorias tales como artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, osteoporosis, espondilitis, gota, vasculitis, enfermedad de Crohn, y
10 síndrome del intestino irritable; dolor periférico agudo o crónico; dolor de cáncer;
- (ii) mareos, vómitos y náuseas, en particular, resultantes de la quimioterapia;
- (iii) trastornos de la alimentación, en particular trastornos del apetito, trastornos metabólicos, anorexia y caquexia de diversas naturalezas;
- (iv) patologías neurológicas y psiquiátricas tales como temblores, discinesias, distonías, náuseas, emesis, trastornos adictivos (tales como la adicción a drogas o a alcohol), espasticidad, comportamiento obsesivo-compulsivo, síndrome de Tourette, todas las formas de depresión y ansiedad de cualquier naturaleza y
15 origen, insomnio, trastornos del estado de ánimo, y psicosis tal como la esquizofrenia;
- (v) enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas tales como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, corea de Huntington, lesiones relacionadas con la isquemia cerebral y con traumatismos craneales y medulares;
- (vi) epilepsia;
- (vii) trastornos del sueño, incluyendo la apnea del sueño;
- (viii) enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardíaca, hipertensión, choque circulatorio, lesión por reperfusión del miocardio, arritmias cardíacas, arterioesclerosis/ateroesclerosis, infarto de
25 miocardio, isquemia cardíaca, vasculitis e isquemia renal;
- (ix) cánceres, por ejemplo, tumores de piel benignos, tumores cerebrales y papilomas, tumores de próstata y tumores cerebrales (glioblastomas, meduloepiteliomas, meduloblastomas, neuroblastomas, tumores de origen embrionario, astrocitomas, astroblastomas, ependimomas, oligodendrogliomas, tumor del plexo, neuroepiteliomas, tumor epifiseal, ependimoblastomas, meningiomas malignos, sarcomatosis, melanomas malignos, y schwannomas);
- (x) trastornos del sistema inmunitario, en particular las enfermedades autoinmunes, tales como psoriasis, lupus eritematoso sistémico, enfermedades del tejido conjuntivo o enfermedades del colágeno, síndrome de Sjögren, espondilitis anquilosante, espondilitis no diferenciada, enfermedad de Behcet, anemia hemolítica autoinmune, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, amiloidosis, rechazo de injertos, enfermedades que afectan a la línea plasmocitaria, enfermedades alérgicas; hipersensibilidad inmediata o retardada, rinitis o conjuntivitis alérgicas, dermatitis de contacto;
- (xi) enfermedades infecciosas parasitarias, virales o bacterianas, tales como SIDA y meningitis;
- (xii) enfermedades inflamatorias, en particular las enfermedades de las articulaciones tales como artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis, gota, vasculitis, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino
40 inflamatorio/irritable, asma;
- (xiii) osteoporosis;
- (xiv) afecciones de los ojos tales como la hipertensión ocular, retinopatía y glaucoma;
- (xv) afecciones pulmonares incluyendo enfermedades de las vías respiratorias, broncoespasmos, tos, asma, bronquitis crónica, obstrucción crónica de las vías respiratorias y enfisema;
- (xvi) enfermedades gastrointestinales tales como el síndrome del intestino inflamatorio/irritable, trastornos intestinales inflamatorios, úlceras, diarrea, incontinencia urinaria y la inflamación de la vejiga;
- (xvii) enfermedades agudas y crónicas del hígado tales como hepatitis y cirrosis;
- (xviii) trastornos neurológicos tales como neurotraumatismo, ictus, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, discinesia inducida por levodopa, enfermedad/corea de Huntington,

Gilles de la Tourette, discinesia tardía, distonía, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y epilepsia.

Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora en más detalle a modo de ejemplo solamente:

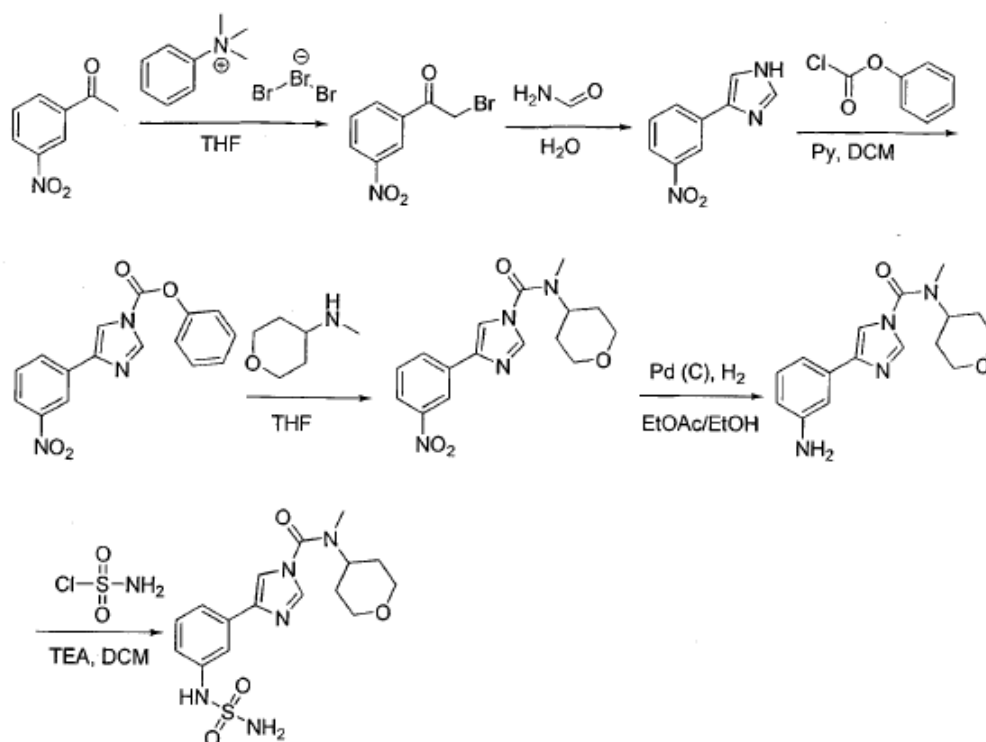
5 1. Metodologías sintéticas

Los métodos utilizados para la síntesis de los compuestos de la invención se ilustran mediante los esquemas generales y las síntesis específicas que siguen. Todos los compuestos e intermedios se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (NMR). Los materiales de partida y reactivos utilizados en la preparación de estos compuestos están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos esquemas generales y síntesis específicas son meramente ilustrativos de los métodos por los cuales se pueden sintetizar los compuestos de esta invención, y diversas modificaciones a estos esquemas y síntesis pueden ser hechas y serán sugeridas por los expertos en la técnica que se refieran a esta descripción.

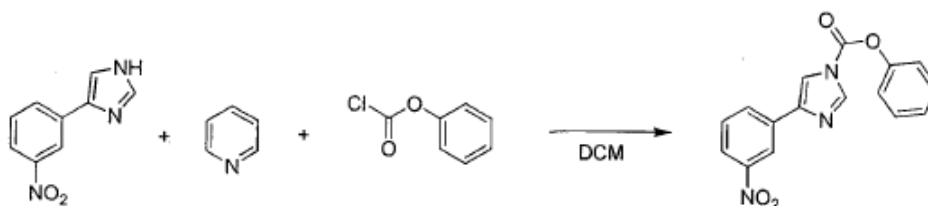
Los compuestos de la invención se caracterizaron por el punto de fusión y la NMR. Los espectros de NMR se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III a 600 MHz con disolvente utilizado como estándar interno. Los espectros ^{13}C se registraron a 150 MHz y los espectros ^1H se registraron a 600 MHz. Los datos se presentan en el siguiente orden: desplazamiento químico aproximado (ppm), número de protones, multiplicidad (br, ancho; d, doblete; m, multiplete; s, singlete, t, triplete) y constante de acoplamiento (Hz).

Temperatura ambiente en los siguientes esquemas significa la temperatura que varía de 20 °C a 25 °C.

20 1.1. Esquema general para la síntesis de *N*-Metil-4-(3-(sulfamoilamino)fenil)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Compuesto 1)



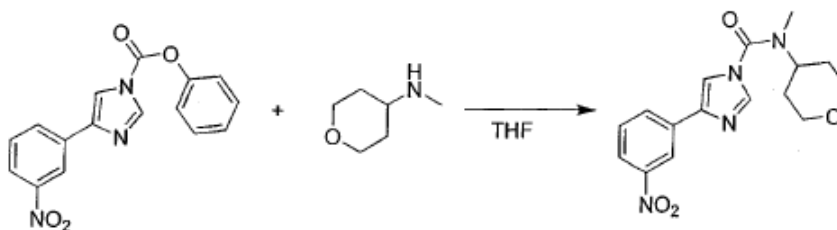
4-(3-Nitrofenil)-1*H*-imidazol-1-carboxilato de fenilo



Se añadió clorocarbonato de fenilo (3,2 mL, 25,4 mmol) a una solución en agitación de 4-(3-nitrofenil)-1*H*-imidazol (4 g, 21,1 mmol) y piridina (2,0 mL, 25,4 mmol) en DCM (diclorometano) (100 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se

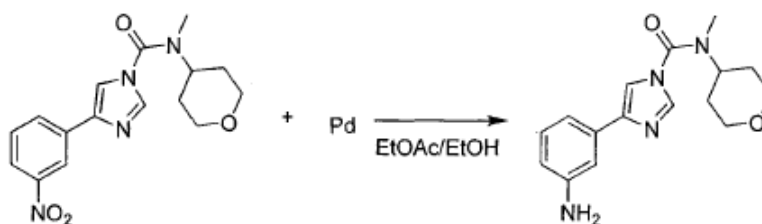
dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió agua y la capa orgánica se separó, se secó (MgSO_4) y se evaporó a vacío para dar un sólido beige. Después, se recrystalizó el sólido en una mezcla de propan-2-ol y DCM y el producto se aisló como un sólido beige. 4-(3-Nitrofenil)-1*H*-imidazol-1-carboxilato de fenilo (2,89 g, rendimiento 44 %).

5 *N*-Metil-4-(3-nitrofenil)-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida



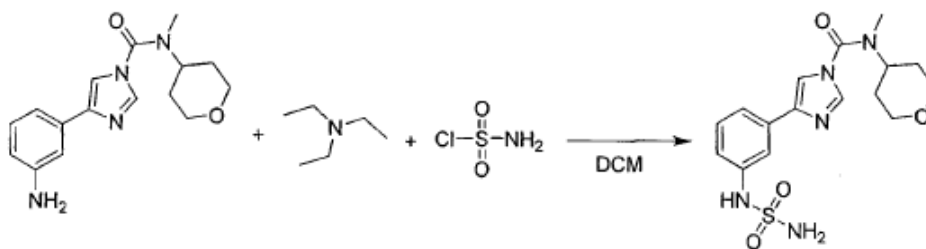
Se añadió una solución de *N*-metiltetrahydro-2*H*-piran-4-amina (2,15 g, 18,7 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (6 mL) a una solución en agitación de 4-(3-nitrofenil)-1*H*-imidazol-1-carboxilato de fenilo (2,89 g, 9,3 mmol) en THF (40 mL) a temperatura ambiente. La solución amarilla se dejó en agitación a reflujo durante la noche. El disolvente se evaporó a vacío y el producto se recrystalizó en propan-2-ol. *N*-metil-4-(3-nitrofenil)-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,938 g, rendimiento 30 %).

4-(3-Aminofenil)-*N*-metil-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida



Se añadió una mezcla de etanol (30,0 mL) y acetato de etilo (30 mL) a paladio húmedo (0,151 g, 0,142 mmol, al 10 % sobre carbón activo) en una atmósfera de argón. Se añadió a esta mezcla *N*-metil-4-(3-nitrofenil)-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,938 g, 2,84 mmol) y la suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de hidrógeno. La suspensión gris resultante se filtró a través de celita y se lavó la celita con DCM. Se evaporó el filtrado a vacío y el producto incoloro se recrystalizó en propan-2-ol. 4-(3-Aminofenil)-*N*-metil-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,695 g, rendimiento 81 %).

20 *N*-Metil-4-(3-(sulfamoilamino)fenil)-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Compuesto 1)



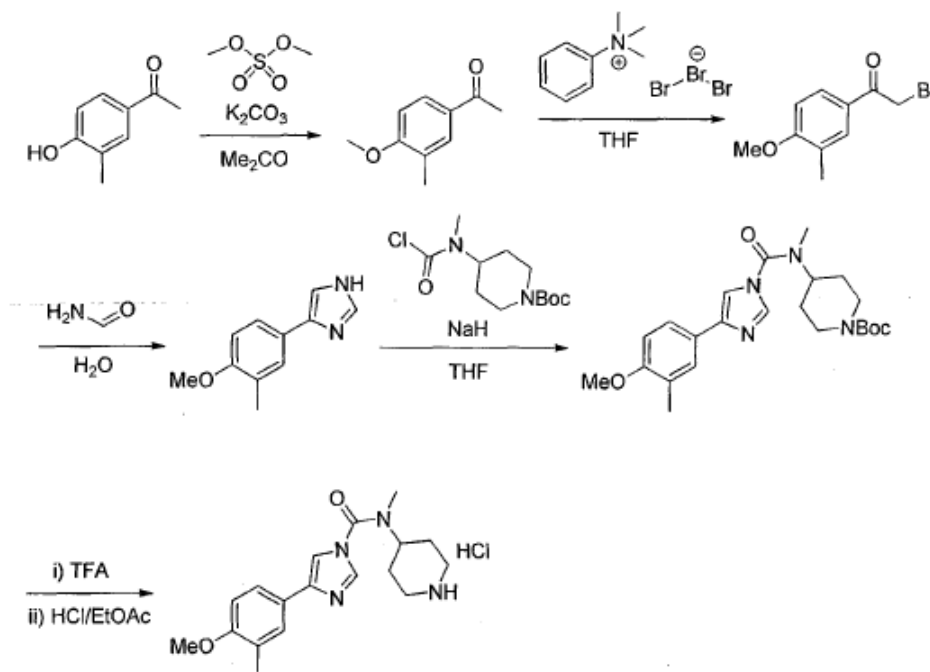
Se añadió cloruro de sulfamoilo (0,321 g, 2,78 mmol) a una suspensión en agitación de 4-(3-aminofenil)-*N*-metil-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,695 g, 2,314 mmol) y trietilamina (0,481 mL, 3,47 mmol) en DCM (12 mL) a temperatura ambiente. La suspensión blanca se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua y la capa orgánica se diluyó con una mezcla de DCM/propan-2-ol 7:3. Se separó la capa orgánica y se volvió a extraer la capa acuosa. La capa orgánica reunida se secó (MgSO_4) y se evaporó a vacío para dar un aceite límpido. Se separó el producto por cromatografía en columna (sílice, DCM/MeOH al 2 %, 5 %, 10 %) y se aisló como un sólido incoloro. El sólido se trituró con mezcla de propan-2-ol/DCM. Se recrystalizó el sólido dos veces a partir de EtOH y el producto se secó en alto vacío a 60 °C durante la noche. *N*-Metil-4-(3-(sulfamoilamino)fenil)-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,160 g, rendimiento 18 %). Punto de fusión: 128 °C.

NMR ($\text{DMSO}-d_6$):

^1H : 9,54 (1H, s), 8,14 (1H, s), 7,94 (1H, s), 7,64 (1H, s), 7,44 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,27 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,15 (2H, s), 7,05 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 4,10 (1H, m), 3,93 (2H, dd, $J = 4,0, 11,3$ Hz), 3,36 (2H, m), 2,95 (3H, s), 1,86 (2H, dq, $J = 4,1, 12,3$ Hz), 1,70 (2H, d, $J = 12,0$ Hz).

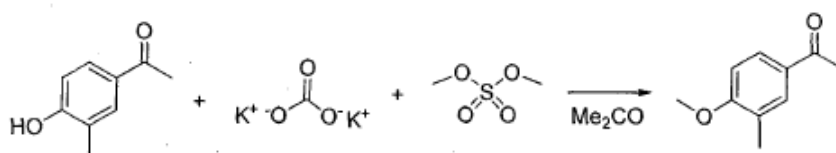
^{13}C : 151, 140,6, 139,9, 137,5, 134, 129, 118,6, 116,9, 114,6, 114,4, 66,3, 54,2, 31,6, 29,1.

- 5 1.2. Esquema general para la síntesis de hidrocloreto de 4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(piperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Intermedio 1)



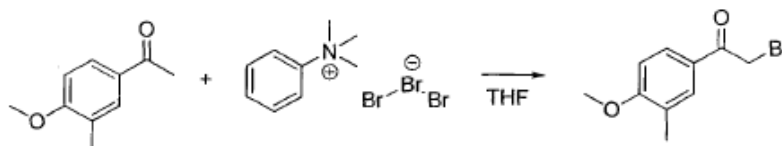
Intermedio 1

1-(4-Metoxi-3-metilfenil)etanona

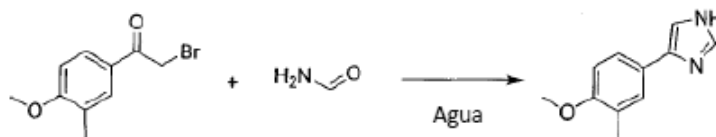


- 10 Se añadió sulfato de dimetilo (17,50 mL, 183 mmol) a una suspensión en agitación de 1-(4-hidroxi-3-metilfenil)etanona (25 g, 166 mmol) y carbonato de potasio (28,8 g, 208 mmol) en acetona (277 mL) a temperatura ambiente. Se dejó la suspensión en agitación a reflujo durante la noche. Se separó el sólido por filtración y se lavó con acetona y el filtrado se evaporó al vacío. El residuo orgánico se disolvió en EtOAc (acetato de etilo) y se lavó con agua. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO_4) y se evaporó a vacío para dar un aceite amarillo. Se utilizó sin purificación adicional. 1-(4-Metoxi-3-metilfenil)etanona (28,7 g).
- 15

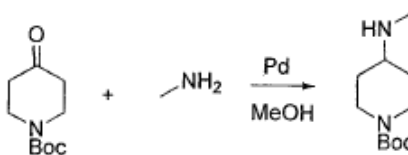
2-Bromo-1-(4-metoxi-3-metilfenil)etanona



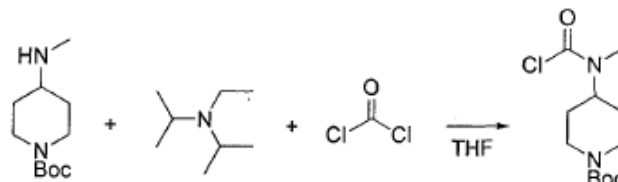
- 20 Se añadió una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio (30,2 g, 80 mmol) en THF (122 mL) gota a gota a una solución en agitación de 1-(4-metoxi-3-metilfenil)etanona (12 g, 73,1 mmol) en THF (122 mL) a temperatura ambiente. La suspensión amarilla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se separó el sólido por filtración y se lavó con THF. El filtrado se evaporó a vacío y el residuo orgánico se disolvió en EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se secó (MgSO_4) y se evaporó a vacío para dar un aceite violeta. Se utilizó sin purificación adicional. 2-Bromo-1-(4-metoxi-3-metilfenil)etanona (27,9 g).

4-(4-Metoxi-3-metilfenil)-1*H*-imidazol

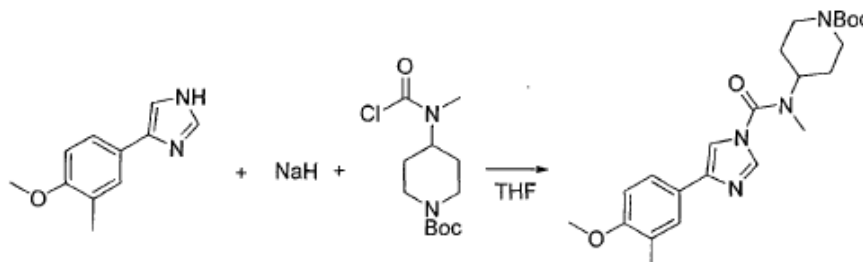
Se añadió agua (4 mL) a una suspensión en agitación de 2-bromo-1-(4-metoxi-3-metilfenil)etanona (27,9 g, 115 mmol) y formamida (56,7 mL, 1,423 mmol) a temperatura ambiente. La suspensión se dejó en agitación a 140 °C durante 5 h. La mezcla se vertió sobre 200 mL de agua para dar un aceite marrón oscuro denso. Se separó el aceite por filtración y se lavó con HCl 1 N y el filtrado se basificó con NaOH al 50 % para dar un sólido beige. El sólido se separó por filtración y se lavó con éter dietílico (5 x) para dar un sólido de color blanquecino. 4-(4-Metoxi-3-metilfenil)-1*H*-imidazol (5,2 g, rendimiento 24 %).

4-(Metilamino)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo

Se añadió una solución de metanamina (38,0 mL, 442 mmol, solución acuosa al 40 %) en metanol (100 mL) a paladio húmedo (1,602 g, 1,506 mmol, al 10 % sobre carbón activo) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. A esta mezcla se añadió 4-oxopiperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (20 g, 100 mmol) en porciones y se dejó la mezcla en agitación a 50 °C, 20 bares durante 1 h. Se purgó la suspensión con argón y se filtró a través de celita y se lavó la celita con DCM. El filtrado se evaporó a vacío para dar el producto como un aceite límpido. Se disolvió el aceite en EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío para dar un aceite límpido. Se utilizó sin purificación adicional. 4-(Metilamino)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (20 g, rendimiento 93 %).

4-(Clorocarbonil(metil)amino)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo

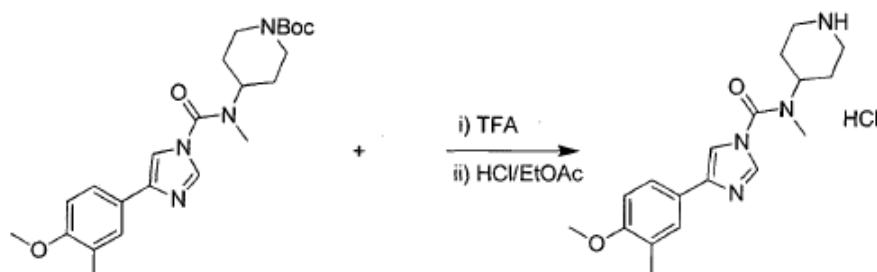
Se añadió una solución de 4-(metilamino)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (20 g, 93 mmol) y base de Hunig (35,9 mL, 205 mmol) en THF (133 mL) gota a gota a fosgeno en agitación (53,3 mL, 112 mmol, solución al 20 % en tolueno) a 0 °C para dar una suspensión blanca. La mezcla se dejó en agitación a 0 °C durante 10 min y a temperatura ambiente durante 2 h. La suspensión se vertió en hielo/agua y el residuo orgánico se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó y se lavó con solución de HCl 1 N. La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío para dar un aceite amarillo. El aceite se trituroó con una mezcla de polietileno (PE) y unas gotas de éter dietílico para dar un sólido incoloro. El sólido se separó por filtración y se lavó con éter de petróleo. 4-(Clorocarbonil(metil)amino)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (17,4 g, rendimiento 67 %).

4-(4-(4-Metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamido)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo

Se añadió hidruro de sodio (1,313 g, 32,8 mmol, dispersión al 60 % en aceite) en porciones a una suspensión en agitación de 4-(4-metoxi-3-metilfenil)-1*H*-imidazol (5,15 g, 27,4 mmol) en THF (137 mL) a 0 °C. La solución de color azul oscuro se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 min y luego se añadió 4-

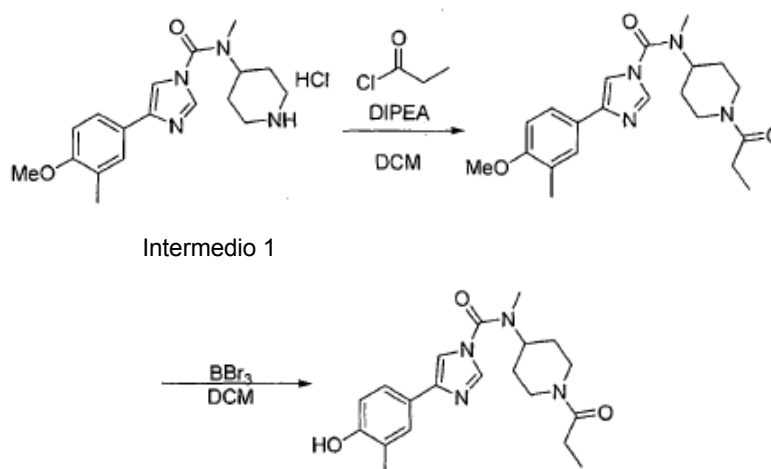
(clorocarbonil(metil)amino)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (11,36 g, 41,0 mmol) a 0 °C para dar una solución oscura. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió agua a 0 °C y la capa orgánica se diluyó con una mezcla de DCM/propan-2-ol 7:3. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío para dar un sólido beige. El sólido se recrystalizó en propan-2-ol. 4-(4-(4-Metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamido)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (9,39 g, rendimiento 80 %).

Hidrocloreto de 4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(piperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida

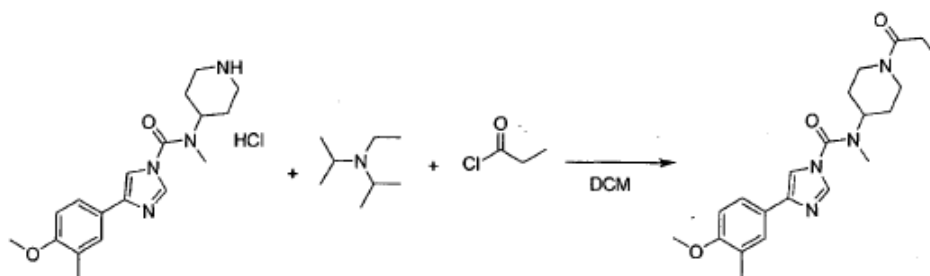


Se añadió cuidadosamente ácido trifluoroacético (TFA) (30 mL) al residuo de 4-(4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamido)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (9,39 g, 21,91 mmol) a temperatura ambiente. La solución amarilla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1,5 h. El TFA se evaporó al vacío y después se destiló azeotrópicamente dos veces con tolueno. Después, el residuo amarillo se disolvió en acetato de etilo (30 mL) y se añadió gota a gota una solución 2 M de cloruro de hidrógeno (32,9 mL, 65,7 mmol) en éter dietílico a 0 °C para dar una suspensión blanca. Se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se separó el sólido por filtración y se lavó con EtOAc. Hidrocloreto de 4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(piperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (11,06 g).

1.3. Esquema general para la síntesis de 4-(4-hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(1-propionilpiperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Compuesto 2)



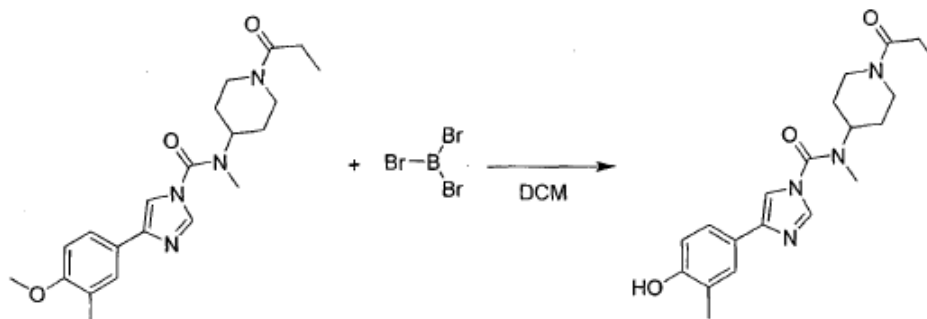
4-(4-Metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(1-propionilpiperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida



Se añadió cloruro de propionilo (0,287 mL, 3,29 mmol) a una suspensión en agitación de hidrocloreto de 4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(piperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Intermedio 1) (1 g, 2,74 mmol) y base de Hünig (0,957 mL, 5,48 mmol) en DCM (14 mL) a temperatura ambiente. La solución de color rosa se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua y la capa orgánica se diluyó con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío para dar un sólido de color blanquecino. Se recrystalizó el

sólido en propan-2-ol. 4-(4-Metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(1-propionilpiperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,496 g, rendimiento 45 %).

4-(4-Hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(1-propionilpiperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Compuesto 2)

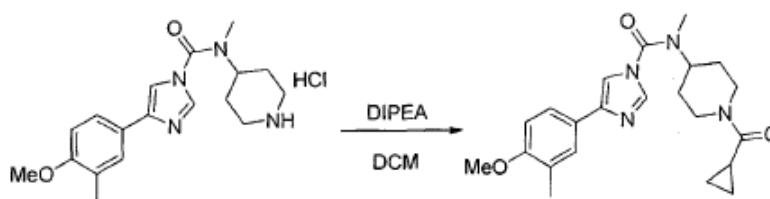


- 5 Se añadió tribromuro de boro (0,354 mL, 3,75 mmol) a una suspensión en agitación de 4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(1-propionilpiperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,480 g, 1,248 mmol) en DCM anhidro (4 mL) a -78 °C. La suspensión se dejó en agitación a -78 °C durante 15 min y a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió agua a -50 °C y después la capa orgánica se diluyó con una mezcla de DCM/propan-2-ol 7:3. La capa orgánica se separó; la capa acuosa se saturó con NaCl y se extrajo de nuevo. La capa orgánica reunida se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío para dar un aceite límpido. El producto se separó por cromatografía en columna (sílice, DCM/MeOH al 2 %, 5 %, 10 %) y se aisló como un sólido incoloro. El sólido se recrystalizó en propan-2-ol. 4-(4-Hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(1-propionilpiperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,22 g, rendimiento 45 %). Punto de fusión: 232 °C.

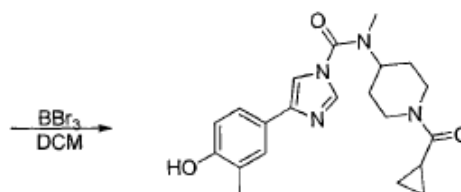
NMR (DMSO-*d*₆):

- 15 ¹H: 9,34 (1H, s), 8,06 (1H, d, *J* = 1,2 Hz), 7,77 (1H, d, *J* = 1,2 Hz), 7,55 (1H, d, *J* = 1,6 Hz), 7,47 (1H, dd, *J* = 2, 8,3 Hz), 6,77 (1H, d, *J* = 8,3 Hz), 4,53 (1H, d, *J* = 12,5 Hz), 4,10 (1H, m), 3,95 (1H, d, *J* = 13,5 Hz), 3,06 (1H, mt, *J* = 13,0 Hz), 2,91 (3H, s), 2,56 (1H, mt, *J* = 12,8 Hz), 2,34 (2H, q, *J* = 7,5 Hz), 2,14 (3H, s), 1,76 (3H, m), 1,60 (1H, dq, *J* = 4,3, 12,3 Hz), 0,98 (3H, t, *J* = 7,5 Hz).
- ¹³C: 171,1, 154,8, 151,1, 141,1, 137,3, 127,3, 124,2, 123,8, 123,4, 114,6, 112,3, 55,1, 43,9, 40,3, 31,6, 28,6, 28, 25,5, 16,1, 9,5.

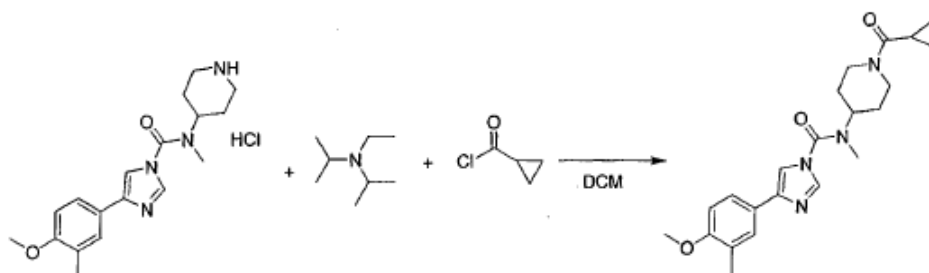
- 20 1.4 Esquema general para la síntesis de *N*-(1-(ciclopropanocarbonil)piperidin-4-il)-4-(4-hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Compuesto 3)



Intermedio 1

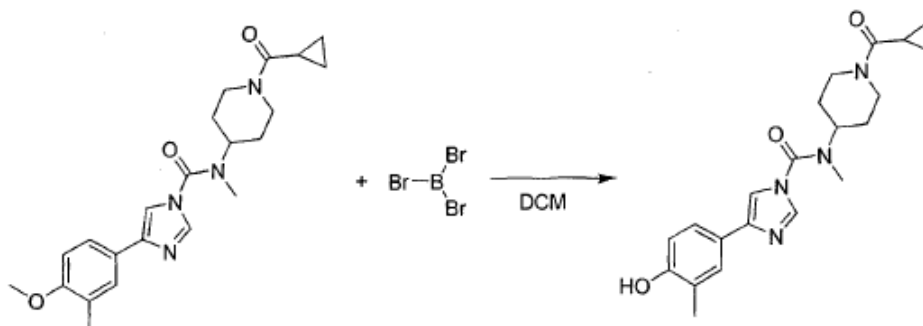


- 25 *N*-(1-(Ciclopropanocarbonil)piperidin-4-il)-4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamida



Se añadió cloruro de ciclopropanocarbonilo (1,5 mL, 16,44 mmol) a una suspensión en agitación de hidrocloreto de 4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(piperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Intermedio 1) (5 g, 13,70 mmol) y base de Hunig (4,8 mL, 27,4 mmol) en DCM (70 mL) a temperatura ambiente. La solución de color rosa se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche para dar una suspensión de color rosa. Se añadió agua y la capa orgánica se diluyó con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío para dar un aceite límpido que se solidificó en un sólido de color blanquecino. El sólido se recrystalizó en propan-2-ol. *N*-(1-(Ciclopropanocarbonil)piperidin-4-il)-4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamida (2,96 g, rendimiento 55 %).

N-(1-(Ciclopropanocarbonil)piperidin-4-il)-4-(4-hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamida (Compuesto 3)



Se añadió tribromuro de boro (0,358 mL, 3,78 mmol) a una suspensión en agitación de *N*-(1-(ciclopropanocarbonil)piperidin-4-il)-4-(4-metoxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,500 g, 1,261 mmol) en DCM anhidro (4,20 mL) a -78 °C. La suspensión se dejó en agitación a -78 °C durante 15 min y a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió agua a -50 °C y después la capa orgánica se diluyó con una mezcla de DCM/propan-2-ol 7:3. La capa orgánica se separó; la capa acuosa se saturó con NaCl y se extrajo de nuevo. La capa orgánica reunida se secó (MgSO₄) y se evaporó a vacío para dar un aceite límpido. El producto se separó por cromatografía en columna (sílice, DCM/MeOH al 2 %, 5 %, 10 %) y se aisló como un sólido incoloro. El sólido se recrystalizó en una mezcla de propan-2-ol y DCM. *N*-(1-(Ciclopropanocarbonil)piperidin-4-il)-4-(4-hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamida (0,289 g, rendimiento 57 %). Punto de fusión: 204 °C.

NMR (DMSO-*d*₆):

¹H: 9,32 (1H, s), 8,06 (1H, d, *J* = 1,2 Hz), 7,76 (1H, d, *J* = 1,2 Hz), 7,55 (1H, d, *J* = 1,6 Hz), 7,47 (1H, dd, *J* = 2, 8,2 Hz), 6,77 (1H, d, *J* = 8,2 Hz), 4,51 (1H, d, *J* = 12,0 Hz), 4,37 (1H, d, *J* = 13,0 Hz), 4,13 (1H, m), 3,15 (1H, t, *J* = 13,0 Hz), 2,92 (3H, s), 2,61 (1H, mt, *J* = 13,0 Hz), 2,14 (3H, s), 2,0 (1H, m), 1,85 (1H, md), 1,77 (2H, m), 1,63 (1H, mq), 0,8-0,66 (4H, m).

¹³C: 170,8, 154,8, 151,2, 141,1, 137,3, 127,3, 124,2, 123,8, 123,4, 114,6, 112,4, 55,2, 44, 40,8, 31,7, 28,9, 28, 16,1, 10,3, 7, 6,9.

2. Eficacia biológica

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo con estricto cumplimiento de la Directiva Europea para la Protección de los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609CEE) y la legislación portuguesa (Decreto-Lei 129/92, Portarias 1005-1092 y 1131-1197). El número de animales utilizado fue el mínimo posible, en cumplimiento con la normativa vigente y la integridad científica.

El ensayo *in vivo* se realizó según el protocolo descrito a continuación. BRh (homogeneizado de cerebro) indica inhibición en el tejido nervioso central, en este caso, en el cerebro y LVh (homogeneizado de hígado) indica inhibición en el tejido periférico, en este caso, en el hígado. Los controles fueron la mezcla de reacción menos los compuestos de ensayo. Por lo tanto, un valor bajo para el compuesto de ensayo indica un inhibidor fuerte. Un valor de 100 indica que no ha tenido lugar ninguna inhibición que se pueda medir.

Protocolos *in vivo*

Experimentos en ratones

Tratamiento de los animales

- 5 Los animales utilizados para los experimentos fueron ratones NMRI machos (con un peso de 27-44 g) obtenidos de Interfauna Ibérica (España). Los ratones se mantuvieron 5 por jaula, en condiciones ambientales controladas (ciclo de 12 h de luz/oscuridad y temperatura ambiente de 22 ± 1 °C). Los alimentos y el agua del grifo fueron permitidos *ad libitum* y los experimentos se realizaron todos durante las horas del día.

Los animales se mantuvieron siempre en ayunas durante la noche antes de la administración de los compuestos.

- 10 Se administró a los animales la dosis apropiada del compuesto de la invención por vía oral (8 mL/kg; compuesto suspendido en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5 % o solubilizado en agua) o vehículo (testigos) utilizando agujas curvas de acero inoxidable para alimentación animal (Perfectum, Estados Unidos). Quince minutos antes del sacrificio, los animales fueron anestesiados con pentobarbital 60 mg/kg administrados por vía intraperitoneal. Se retiraron un fragmento de hígado y de cerebro sin cerebelo y se pusieron en viales de plástico que contenían tampón de membrana (MgCl_2 3 mM, EDTA 1 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,4). Los tejidos se conservaron a -30 °C hasta su análisis.

Reactivos y Soluciones

La anandamida [etanolamina-1- ^3H] (40-60 Ci/mmol) se obtuvo de American Radiochemicals. Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Optiphas Supermix se obtuvo de Perkin Elmer y el carbón activado se obtuvo de Sigma-Aldrich.

- 20 Preparación del tejido

Los tejidos se descongelaron en hielo y se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón de membrana (MgCl_2 3 mM, EDTA 1 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,4), con Potter-Elvehjem (cerebros - 8 golpes a 500 rpm) o con Heidolph Diap (hígados - 2 golpes en la posición 5 durante 20 segundos con pausas de 30 s).

- 25 Se determinó la proteína total en los tejidos con el BioRad Protein Assay (BioRad) utilizando una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) (50-250 µg/ml).

Ensayo enzimático

- 30 La mezcla de reacción (volumen total de 200 µl) contenía: AEA 2 µM (AEA 2 µM + ^3H -AEA 5 nM), BSA libre de ácido graso al 0,1 %, 15 µg de proteína (cerebro) o 5 µg de proteína (hígado), en EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH 7,6. Después de un periodo de pre-incubación de 15 min a 37 °C, se empezó la reacción por la adición de la solución sustrato (AEA fría + AEA radiomarcada + BSA). Se llevó a cabo la reacción durante 10 min (cerebro) o 7 min (hígado) antes de terminar por la adición de 400 µl de suspensión de carbón vegetal activado (8 g de carbón vegetal en 32 mL de HCl 0,5 M en agitación continua). Después de un periodo de incubación de 30 min a temperatura ambiente con agitación, se sedimentó el carbón por centrifugación en microcentrífuga (10 min a 13.000 rpm). Se añadieron 200 µl del sobrenadante a 800 µl de cóctel de centelleo Optiphas Supermix distribuido previamente en placas de 24 pocillos. Se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo MicrobetaTriLux.

En cada ensayo se prepararon blancos (sin proteína).

El porcentaje de actividad enzimática restante se calculó con respecto a los testigos y después de restar el blanco.

Experimentos en ratas

Tratamiento de los animales

- 40 Se obtuvieron ratas Wistar machos (intervalo de peso corporal: 190-230 g) de Harlan (España). Las ratas se mantuvieron 5 por jaula, en condiciones ambientales controladas (ciclo de 12 h de luz/oscuridad y temperatura ambiente de 22 ± 1 °C). Los alimentos y el agua del grifo fueron permitidos *ad libitum* y los experimentos fueron realizados durante las horas del día.

- 45 Se administró a las ratas la dosis apropiada de compuesto de la invención a través de una sonda gástrica (volumen de administración = 4 mL/kg de peso corporal) utilizando agujas curvas de acero inoxidable para alimentación animal (Perfectum, Estados Unidos). El vehículo era CMC al 0,5 % en agua Milli Q. Las ratas se mantuvieron en ayunas al menos 15 h antes de los experimentos.

Quince minutos antes del sacrificio, los animales fueron anestesiados con pentobarbital i.p. 60 mg/kg de peso corporal. Se recogieron biopsias de hígado y muestras de cerebro (sin cerebelo) y se pusieron en un vial de plástico

que contenía tampón de membrana (MgCl₂ 3 mM, EDTA 1 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,4) y, en el caso de muestras de hígado, perlas de vidrio (2,5 mm BioSpec Products). Los tejidos se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Reactivos y soluciones

- 5 La anandamida [etanolamina-1-³H-] se obtuvo de American Radiochemicals (actividad específica de 60 Ci/mmol). Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Optiphase Supermix se obtuvo de Perkin Elmer.

Preparación del tejido

- 10 Los tejidos se descongelaron en hielo; los hígados se homogeneizaron en un Homogeneizador de tejido Precellys 24 Dual (Bertin Technologies) durante 2 ciclos de 5 segundos con un intervalo de 5 min en hielo y los cerebros se homogeneizaron con Heidolph Silent Crusher M (sonda 8 F/M) durante aproximadamente 45 segundos a máxima velocidad. La proteína total en los homogeneizados se determinó con el BioRad Protein Assay (BioRad) utilizando una curva estándar de BSA (50-250 µg/ml).

Ensayo enzimático

- 15 La mezcla de reacción (volumen total de 200 µl) contenía: AEA 2 µM (AEA 2 µM + ³H-AEA 5 nM), BSA libre de ácido graso al 0,1 %, 15 µg de proteína (cerebro) o 1,5 µg de proteína (hígado), en EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH 7,6. Después de un periodo de pre-incubación de 15 min a 37 °C, se empezó la reacción por la adición de la solución sustrato (AEA fría + AEA radiomarcada + BSA). Se llevó a cabo la reacción durante 7 minutos para las muestras de hígado y durante 10 min para las muestras de cerebro y se terminó por adición de 400 µL de solución de cloroformo:metanol (1:1, v/v). Las muestras de reacción se agitaron en vórtice dos veces, se dejaron sobre hielo durante 5 minutos y después se centrifugaron en microcentrífuga (7 minutos, 7000 rpm). Se añadieron 200 µl de los sobrenadantes a 800 µl de cóctel de centelleo Optiphase Supermix distribuido previamente en placas de 24 pocillos. Se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo MicrobetaTriLux. En cada ensayo se prepararon blancos (sin proteína). El porcentaje de actividad enzimática restante se calculó con respecto a los testigos y después de restar el blanco.

Ensayo de estabilidad metabólica CYPs

- 25 La estabilidad de los compuestos de ensayo se determinó en MLM (microsomas de hígado de ratón) o HLM (microsomas hepáticos humanos) en presencia y en ausencia de NADPH.

- 30 La estabilidad se midió utilizando la mezcla de incubación (volumen total de 100 µl) que contenía 1 mg/ml de proteínas totales, MgCl₂ 5 mM y tampón de fosfato de potasio 50 mM. Las muestras se incubaron en presencia y en ausencia de NADPH 1 mM. Las reacciones se pre-incubaron 5 min y la reacción se inició con el compuesto de ensayo (5 µM para HLM y 50 µM para MLM). Las muestras se incubaron durante 60 min en un baño de agua con agitación a 37 °C. La reacción se paró añadiendo 100 µl de acetonitrilo. Se centrifugaron entonces las muestras, se filtraron y el sobrenadante se inyectó en HPLC-MSD. Los compuestos de ensayo se disolvieron en DMSO y la concentración final de DMSO en la reacción estaba por debajo de 0,5 % (v/v). En el tiempo cero se añadió acetonitrilo antes de añadir el compuesto. Todos los experimentos se realizaron con muestras por duplicado.

- 35 Compuestos ensayados:

Compuesto 1 = (*N*-metil-4-(3-(sulfamiloilamino)fenil)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida).

Compuesto 2 = ((4-(4-hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-*N*-(1-propionilpiperidin-4-il)-1*H*-imidazol-1-carboxamida).

Compuesto 3 = ((*N*-(1-(ciclopropanocarbonil)piperidin-4-il)-4-(4-hidroxi-3-metilfenil)-*N*-metil-1*H*-imidazol-1-carboxamida).

	Actividad de FAAH (%) Homogeneizado de cerebro 3 mg/kg 8 h p.o.	Actividad de FAAH (%) Homogeneizado de hígado 3 mg/kg 8 h p.o.
Compuesto 1	117	4,9
Compuesto 2	81,7	1,5
Compuesto 3	91,7	1,8

- 40 Como se puede ver en la tabla anterior, los compuestos 1, 2 y 3 son todos compuestos relativamente potentes en términos de inhibición de la FAAH en el hígado.

La selectividad periférica se puede calcular dividiendo la actividad de la FAAH en el hígado por la actividad de la FAAH en el cerebro. Al hacer esto, un número más bajo indica un compuesto que es periféricamente más selectivo. Los resultados se dan en la siguiente tabla:

	Selectividad periférica
Compuesto 1	0,042
Compuesto 2	0,018
Compuesto 3	0,020

Estos resultados demuestran que los compuestos 2 y 3 son los compuestos más periféricamente selectivos, pero que todos los compuestos muestran selectividad periférica relativamente alta.

Datos adicionales relativos a la actividad de FAAH a diferentes concentraciones de los compuestos se dan en la siguiente tabla:

	Actividad de FAAH (%) en hígado de ratón					
	1 h		8 h			
	1 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	0,1 mg/kg	0,03 mg/kg	0,01 mg/kg
Compuesto 1	8,5		36,1			
Compuesto 2	2,3	21,9	5,6	6,7	42,9	48,2
Compuesto 3		37,9	7,2	10,7	53,0	56,3

- 5 Como se puede ver más arriba, los compuestos 2 y 3 son los más potentes ya que inhiben la actividad de FAAH incluso a una dosis relativamente baja. Sin embargo, todos los compuestos son relativamente potentes.

Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos similares en ratas que dieron los siguientes resultados:

	Actividad de FAAH (%) en hígado de rata				
	Dosis: 0,1 mg/kg		Dosis: 1 mg/kg		
	1 h	8 h	1 h	8 h	24 h
Compuesto 1			9,8	4,8	22,7
Compuesto 2	78,2	59,1	25,7	18,2	17,8
Compuesto 3	83,5	62,5			

Como se puede ver más arriba, todos los compuestos muestran una inhibición relativamente buena en hígado de rata y son relativamente potentes.

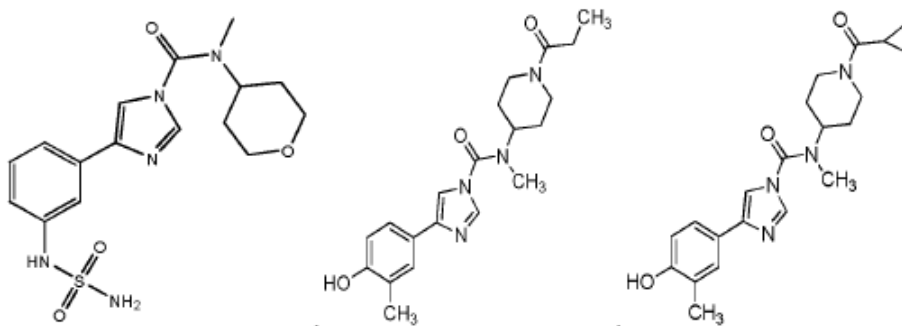
10 Estabilidad metabólica

- 15 La siguiente tabla muestra la estabilidad metabólica de los compuestos. Los datos de estabilidad se dan como % de compuesto que queda después de 1 h de exposición a MLM o HLM. 100 % significa que no hay reacción metabólica en absoluto y 0 % corresponde a la degradación enzimática completa. "CYP-" se refiere a la ausencia de cofactor (NADPH), que es esencial para las reacciones metabólicas de CYP. Por lo tanto "CYP-" puede ser considerado como valor de control. "CYP+" se refiere a la presencia de cofactor y la degradación enzimática puede tener lugar según la estabilidad del compuesto de ensayo. Como se puede ver, todos los compuestos son metabólicamente estables.

	Estabilidad metabólica (% del restante)			
	Ratón		Ser humano	
	CYP +	CYP-	CYP +	CYP-
Compuesto 1	93	100	96	102
Compuesto 2	86	83	100	94
Compuesto 3	98	91	99	102

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura seleccionada de las siguientes:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal hidrocloreto, sal acetato, sal trifluoroacetato, sal metanosulfonato, sal 2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxilato, sal (2R,3R)-2,3-dihidroxisuccinato, sal fosfato, sal sulfato, sal benzoato, sal 2-hidroxi-benzoato, sal S-(+)-mandelato, sal S-(-)-malato, sal S-(-)-piroglutamato, sal piruvato, sal p-toluenosulfonato, sal 1-R-(-)-canforsulfonato, sal fumarato, sal maleato o sal oxalato.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, que comprende además uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales.
- 15 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en donde el uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales se seleccionan de anandamida, oleoil-etanolamida y palmitoil-etanolamida.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la composición es para administración oral.
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la composición está en la forma de una preparación estéril inyectable.
- 20 8. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, para uso en terapia.
9. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento o prevención de una afección cuyo desarrollo o síntomas están vinculados a un sustrato de la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).
- 25 10. Un compuesto para uso según la reivindicación 9, en donde la afección es un trastorno asociado con el sistema endocannabinoide.
11. Un compuesto para uso según la reivindicación 10, en donde el trastorno se selecciona de la regulación del apetito, la obesidad, trastornos metabólicos, caquexia, anorexia, dolor, inflamación, neurotoxicidad, neurotraumatismo, ictus, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, discinesia inducida por levodopa, enfermedad de Huntington, síndrome de Gilles de la Tourette, discinesia tardía, distonía, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, esquizofrenia, ansiedad, depresión, insomnio, náuseas, vómitos, trastornos por consumo de alcohol, adicción a las drogas tal como los opiáceos, nicotina, cocaína, alcohol y psicoestimulantes, hipertensión, choque circulatorio, lesión por reperfusión del miocardio, aterosclerosis, asma, hipertensión ocular, glaucoma, retinopatía, cáncer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad
- 30 hepática aguda y crónica tal como hepatitis y cirrosis hepática, artritis y osteoporosis.
12. Un compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el compuesto es para administración simultáneamente con, o escalonada con respecto a, uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales.
- 40 13. Un compuesto para uso según la reivindicación 12, en donde el uno o más ingredientes farmacéuticos activos adicionales se seleccionan de anandamida, oleoil-etanolamida y palmitoil-etanolamida.