(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 655 646**

(51) Int. CI.:

C07D 211/58 (2006.01)
A61K 31/4468 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2012 PCT/EP2012/066071**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13026787**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2012 E 12753447 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2744781**

(54) Título: **Derivados de fentanilo como agonistas de receptores opioides dependientes del PH**

(30) Prioridad:

19.08.2011 EP 11178122

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

(73) Titular/es:

CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN (50.0%)
Charitéplatz 1
10117 Berlin, DE y
KONRAD-ZUSE-INSTITUT (50.0%)

(72) Inventor/es:

STEIN, CHRISTOPH;
WEBER, MARCUS;
ZÖLLNER, CHRISTIAN y
PEREPELICA, OLGA

(74) Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E INVENCIONES, SLP

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).

DERIVADOS DE FENTANILO COMO AGONISTAS DE RECEPTORES OPIOIDES DEPENDIENTES DEL PH

Descripción

La invención se refiere a compuestos (derivados de fentanilo) que funcionan como agonistas de receptores opioides, que activan receptores opioides objetivo de forma dependiente del pH, usos de los mismos y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos.

Antecedentes de la invención

El uso de analgésicos opioides actualmente disponibles está limitado por los principales efectos secundarios adversos tales como somnolencia, depresión respiratoria, estreñimiento, tolerancia o adicción. Después de una dolorosa inflamación y lesión del tejido periférico, los receptores opioides en los terminales periféricos de las neuronas sensoriales primarias se regulan positivamente, se potencia su acoplamiento, señalización y reciclaje de la proteína G, y su activación produce una potente inhibición de la excitabilidad y analgesia neuronal. La señalización intracelular aumentada sugiere alteraciones conformacionales de los receptores opioides o ligandos en el entorno inflamado. Los agonistas opioides convencionales aplicados sistémicamente (por ejemplo, morfina) activan tanto los receptores opioides centrales como los periféricos. Los agonistas en los receptores opiáceos centrales conducen principalmente a efectos secundarios graves, dejando una necesidad significativa en el campo del tratamiento del dolor para los compuestos que funcionan preferiblemente de forma selectiva en los receptores periféricos.

La inflamación, acompañada de acidosis tisular, es un componente esencial de un gran grupo de síndromes dolorosos (Stein, C. et al., Brain Res Rev 60, 90-113 (2009)), que incluyen artritis, inflamación de la piel, dolor de espalda inflamatorio, dolor de cabeza (ciertos tipos de migraña neurogénica), lesiones inflamatorias del sistema nervioso central y periférico (dolor neuropático), dolor por cáncer, trastornos del sistema inmune (VIH / SIDA, esclerosis múltiple), dolor traumático y postoperatorio. Actualmente los fármacos analgésicos disponibles están limitados por los efectos secundarios inaceptables, tales como las acciones centrales de los opioides (por ejemplo, sedación, depresión respiratoria, náuseas, adicción, tolerancia), los efectos intestinales de opioides (estreñimiento, íleo), los efectos gastrointestinales y de los inhibidores de ciclooxigenasa (COX) (p. ej., hemorragia, úlceras, complicaciones tromboembolicas) y los efectos adversos de los anticonvulsivos y antidepresivos (por ejemplo, sedación, ataxia, arritmias, vasoconstricción coronaria). Por lo tanto, existe la necesidad del desarrollo de nuevas generaciones y formulaciones de opioides que están desprovistos de estos efectos secundarios pero conservan la eficacia clínica.

Esto se puede lograr por la orientación de receptores opioides en los terminales periféricos del ganglio de la raíz dorsal (GRD), las neuronas (también llamadas nociceptores o las neuronas sensoriales primarias) a través de la aplicación local de exógena, o la liberación de opioides endógenos en el tejido lesionado. Por otra parte, una proporción grande (50 - 100%) de los efectos antinociceptivos producidos por los opioides administrados por vía sistémica puede ser mediada por dichos receptores opioides periféricos, y agonistas de opioides que no entran fácilmente en el sistema nervioso central (SNC) pueden tener la misma eficacia analgésica como opioides convencionales (Stein, C. et al., Pharmacol Rev 2011; 63: 860 - 881), Craft, R.M., et al., J Pharmacol Exp Ther 1995; 275: 1535-42, entre otros). Además, se ha demostrado que los opioides de acción periférica reducen la inflamación al modular mediadores proinflamatorios, edema, extravasación de plasma y otros parámetros (Stein, C. et al., Curr Pharm Design 2012, PMID: 22747536). Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado que los opioides de acción periférica reducen la inflamación, lo que conduce a un posible éxito en las estrategias de alivio del dolor con respecto a la modulación de los receptores periféricos, se han divulgado pocos métodos para dirigirse eficazmente a receptores opioides selectivamente periféricos sin efectos sobre el intestino o el SNC.

La farmacología opioide comanda un gran arsenal de ligandos de receptores opioides peptídicos y no peptídicos. Los más estudiados incluyen el alcaloide morfina, el fentanilo de piperidina y el derivado encefalina (DAla^2, N-MePhe^4, Gly^5-ol)-encefalina (DAMGO). Todos estos se unen al receptor-mu, el tipo de receptor más importante para la mediación de efectos analgésicos en animales y humanos (Zöllner, C. y Stein, C. Handbook of Experimental Pharmacology 2007; Vol. 177 Analgesia). La modificación química de tales compuestos se ha logrado colectivamente y ha producido ligandos altamente selectivos para cada tipo de receptor así como también agonistas que no ingresan en el SNC. Si bien este último puede inducir una antinocicepción potente sin efectos secundarios centrales, es probable que active los receptores opioides en el intestino (cuando se aplican por vía oral o sistémica), lo que generalmente resulta en la aparición de estreñimiento o vómitos. Por lo tanto, es necesario desarrollar ligandos del receptor opioide con un enfoque particular en la actividad específica alrededor del tejido dañado (inflamado).

El fentanilo es un potente analgésico sintético opioide ("narcótico") con un inicio rápido y una acción de corta duración. Es un agonista potente en receptores opiáceos mu. Históricamente se ha usado para tratar el dolor crónico y avanzado y se usa comúnmente antes, durante y después de los procedimientos como analgésico y anestésico. Sin embargo, el fentanilo puede presentar efectos secundarios significativos, como náuseas, vómitos, estreñimiento, boca seca, somnolencia, confusión, hipoventilación, apnea, tolerancia y adicción, además de dolor abdominal, dolor de cabeza, fatiga, pérdida de peso, mareos, nerviosismo, alucinación, ansiedad, depresión, síntomas parecidos a la gripe, dispepsia (indigestión) y retención urinaria, lo que hace que el fentanilo en muchos casos no se pueda usar, especialmente cuando se administra sistémicamente a un sujeto que sufre dolor.

Los derivados estructurales del fentanilo se han descrito en la técnica anterior. Maryanoff et al. (Journal of Medicinal Chemistry, 25: 8, 913 - 919) y Riley y col. (Documento US 3.923.992) describen derivados de metil-fentanilo que exhiben un grupo metilo en la llamada "posición 3" de fentanilo. La modificación de fentanilo con el sustituyente metilo conduce a una unión mejorada a receptores opioides, lo que permite, según la técnica anterior, la posibilidad de aislamiento de receptores opioides unidos a un ligando mediante métodos de marcaje de afinidad (Maryanoff et al) además del uso farmacéutico del derivado como analgésico (Riley et al). Además, en la técnica anterior se han descrito derivados de fluor-fentanilo destinados a ser utilizados en estudios sobre receptores opioides usando tomografía de emisión de positrones (Hwang et al., Journal of Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals, 23: 3, 277-293). Los derivados de fluor-fentanilo descritos en este documento exhiben un átomo de F unido al anillo de fenilo (no adyacente al grupo amida) de fentanilo. Hwang et al. reportan una reducción en la fuerza de unión a un receptor opioide y una reducción en el efecto analgésico del derivado fluor-fentanilo en comparación con el fentanilo mismo. Es importante destacar que ninguno de estos derivados apunta a o generó compuestos que se unen selectivamente y activan los receptores opioides periféricos en un medio inflamado (ácido), en contraste con la presente solicitud (véase a continuación).

A pesar de los intentos de generar derivados de fentanilo que demuestran una unión mejorada a receptores opioides (en medio no ácido normal) y mejoras asociadas al efecto analgésico, sigue existiendo una necesidad significativa en la técnica de desarrollar derivados de fentanilo que no exhiban los efectos secundarios comúnmente asociado con fentanilo y otros compuestos opioides convencionales (por ejemplo, morfina). Se sabe que muchos de estos efectos secundarios están asociados con el efecto de dichos compuestos en el SNC.

Los mecanismos subyacentes a los efectos antinociceptivos periféricos de los opioides se han investigado en animales y humanos (Stein, C., et al., Nat Med 9, 1003-8 (2003); Pharmacol Rev 2011; 63: 860-881). Con este fin, se ha estudiado la inflamación de la pata trasera inducida por el adyuvante de Freund (CFA) en roedores, además de la aplicación periférica de pequeñas dosis sistémicamente inactivas de morfina en pacientes sometidos a cirugía o que sufren de artritis crónica. En varios estudios clínicos controlados, los inventores y otros han demostrado que la morfina intraarticular produce alivio del dolor de eficacia similar a los anestésicos locales o esteroides sin efectos secundarios sistémicos o locales. Tales efectos son aparentemente mediados por receptores opioides localizados en terminales periféricos de neuronas GRD. La activación de estos receptores reduce la excitabilidad neuronal, la propagación de impulsos nociceptivos y la liberación de neuropéptidos proinflamatorios. En particular, se ha demostrado que los agonistas opioides inhiben el canal iónico TRPV1, que se expresa preferentemente en las neuronas GRD y se activa mediante el compuesto pungente de capsaicina, protones y otros estímulos. La inhibición se produce a través de proteínas $G_{i/o}$ acopladas al receptor opioide y la ruta de cAMP. Además, se ha demostrado que la antinocicepción opioide mediada por vía periférica es particularmente prominente dentro del tejido inflamado, y que su eficacia aumenta con la duración del proceso inflamatorio. Los mecanismos subyacentes incluyen la regulación positiva de la síntesis, el transporte axonal dirigido periféricamente y el acoplamiento de proteína G de los receptores opioides en las neuronas GRD.

De manera importante, se han medido valores de pH tan bajos como 4-5 en la inflamación dolorosa (Reeh, PW & Steen, KH, Prog Brain Res 113, 143-51 (1996), Woo, YC, et al., Anesthesiology 101 , 468-75 (2004). Este cambio significativo en el pH en el tejido inflamado proporciona un mecanismo potencial según el cual los agentes activos específicos de la inflamación pueden ser desarrollados, que solo exhiben una función agonística del receptor opioide en el área de daño, inflamación y / o dolor. La presente invención se refiere a la influencia de un entorno inflamado (ácido) sobre las interacciones entre el receptor opioide y el ligando y proporciona ligandos que activan selectivamente los receptores opioides en el tejido lesionado (ácido, pH bajo). Se ha demostrado que los agonistas proporcionados en este documento exhiben actividad analgésica en modelos animales de dolor inflamatorio in vivo. Los compuestos descritos en este documento y los métodos de aplicación farmacéutica trascienden los conceptos y métodos tradicionales de tratamiento del dolor relacionados con la activación específica de receptores opioides periféricos. La presente invención, por lo

tanto, se refiere a la influencia de un entorno inflamado (ácido) en las interacciones entre receptor opioide y ligando y proporciona ligandos que activan selectivamente los receptores opioides en el tejido lesionado.

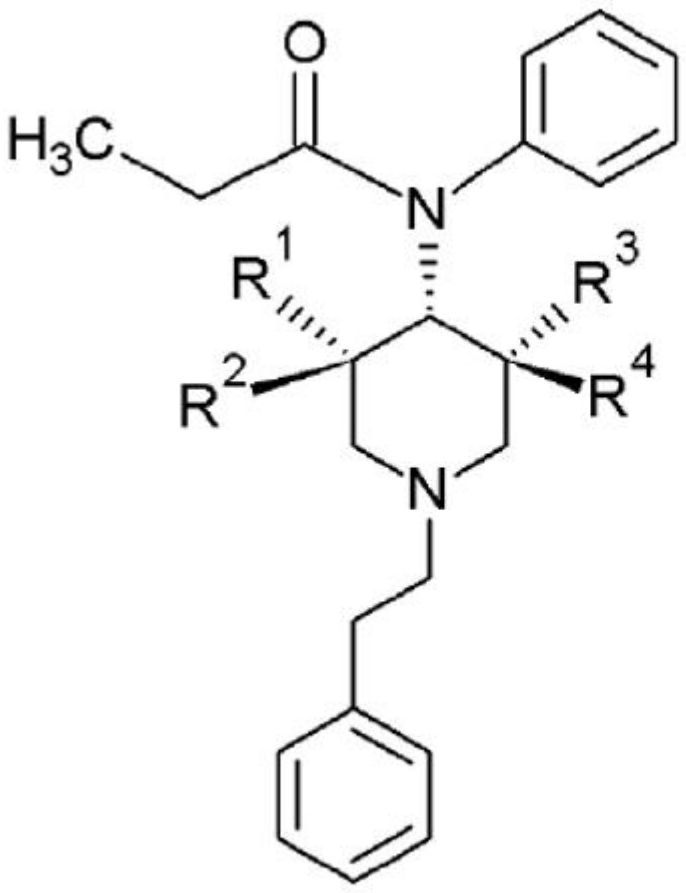
Los derivados de fentanilo son conocidos en la técnica, tales como 3-metil-fentanilo (Maryanoff et al., J. med. Chem., 1982; 25: 8, 913-919), aunque no es evidente la selectividad en los tejidos inflamados. El fluor se conoce como un sustituyente para reemplazar, por ejemplo, grupos metilo (Patani et al., Chem. Rev., 1996, 96, 3147-3176), sin embargo, no se encuentra en la técnica ninguna indicación de que el F-fentanilo conduzca a la selectividad en tejidos inflamados.

Sumario de la invención

A la luz de la técnica anterior, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar compuestos o sustancias que activan selectivamente los receptores opioides en el tejido lesionado, evitando así los efectos secundarios comunes asociados con la activación de receptores opioides en el SNC o el intestino.

Este problema se resuelve mediante las características de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la presente invención se proporcionan mediante las reivindicaciones dependientes.

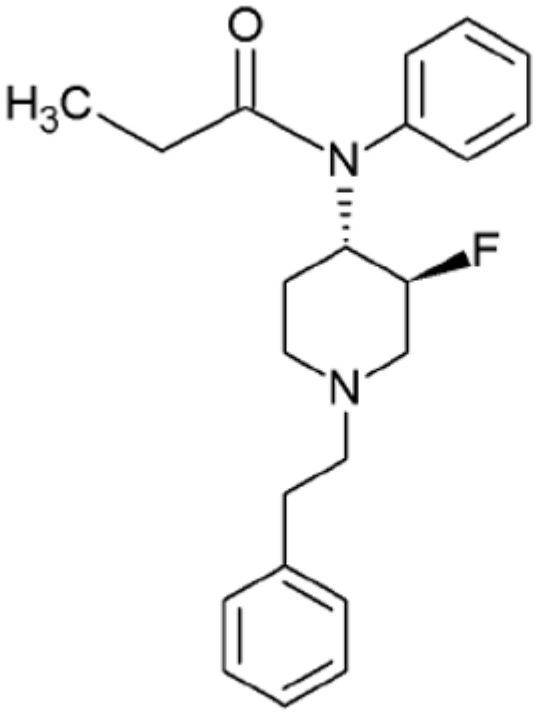
Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar compuestos de la Fórmula I general



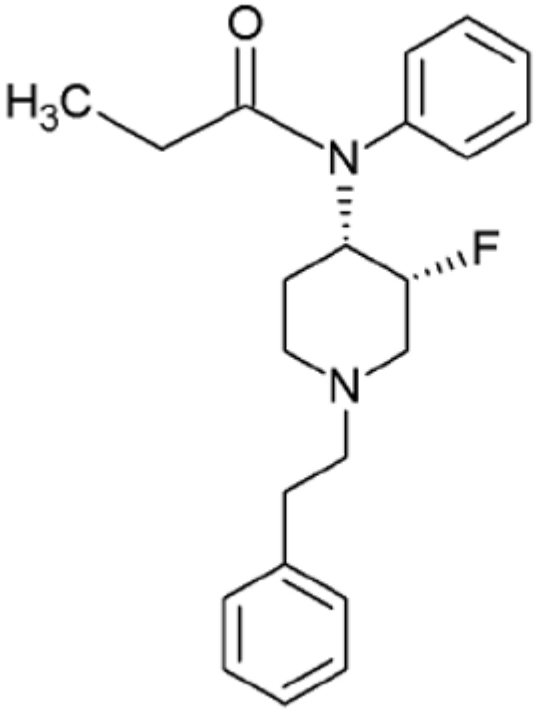
Fórmula I

en la cual uno de R1, R2, R3, R4 es F (fluor), y los residuos restantes en las posiciones R1, R2, R3, R4 son H (hidrógeno)……..

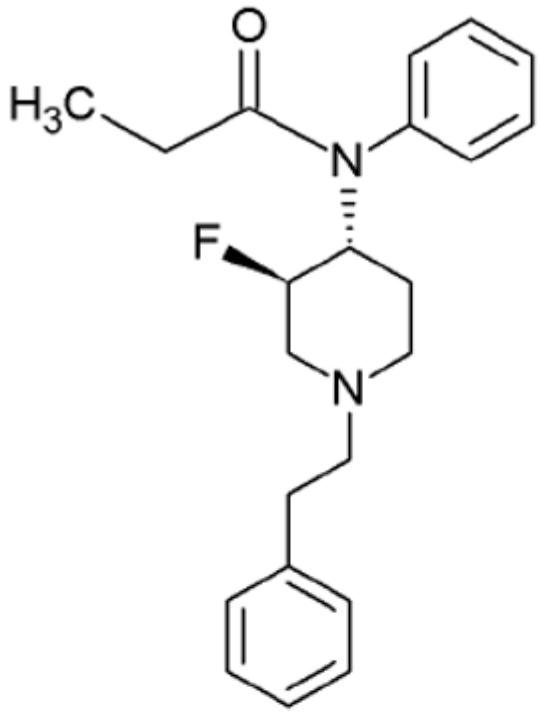
En las realizaciones preferidas de la presente invención, el compuesto como se describe en la presente memoria se selecciona de:



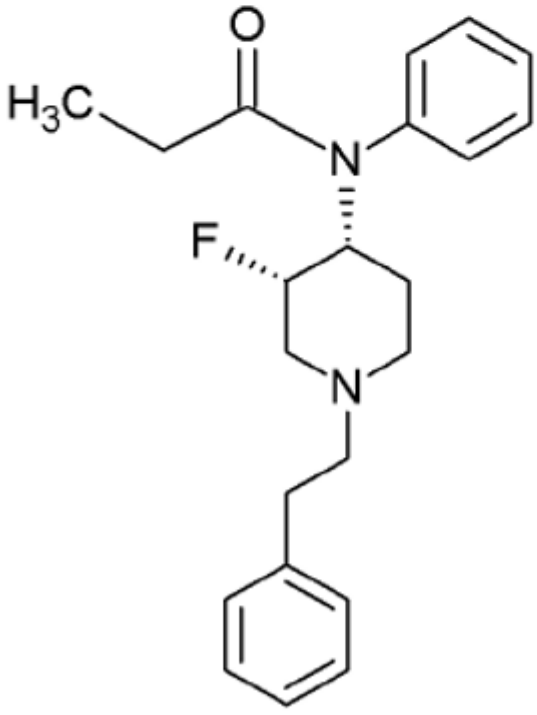
Fórmula II



Fórmula III



Fórmula IV



Fórmula V

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en este documento se caracteriza porque dicho compuesto es un agonista del receptor opioide que activa el receptor opioide objetivo de forma dependiente del pH.

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en este documento se caracteriza porque la activación de dicho receptor por el compuesto ocurre selectivamente a valores de pH de 4, 4,5, 5, 5,5, 6 o 6,5, o cualquier otro valor de pH inferior a 7.

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en la presente memoria se caracteriza porque dicho compuesto exhibe un valor de pKa entre 4 y 7, preferiblemente entre 4,5 y 6,5, más preferiblemente entre 5 y 6. Una realización preferida adicional se refiere a un F-fentanilo derivado como se describe en la presente memoria con un valor de pKa entre 5,5 y 6,5, por ejemplo 6, o más preferiblemente 6,2.

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en la presente memoria se caracteriza porque dicho compuesto comprende un grupo N protonado. En una realización preferida, el compuesto se caracteriza porque el compuesto candidato muestra un grupo N que puede estar protonado o no protonado, por lo que un grupo protonado de N ocurre en compuestos candidatos de pKa <7 cuando en condiciones de pH <7, y el compuesto que exhibe un grupo N protonado activa dicho receptor opioide objetivo.

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en este documento se caracteriza porque dicho receptor opioide objetivo se selecciona del grupo que comprende el receptor mu, receptor delta y receptor kappa. Los receptores opioides mu (m), delta (δ) y kappa (κ) son parcialmente redundantes en su función y están destinados a receptores opioides objetivo de acuerdo con la presente invención. Esto incluye los subtipos de los receptores μ_1, μ_2, μ_3, δ_1, δ_2, κ_1, κ_2 y κ_3.

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en la presente memoria se caracteriza porque el compuesto activa el receptor opioide objetivo en condiciones de pH asociado a la inflamación, preferiblemente pH bajo, o preferiblemente valores bajos de pH fisiológico en tejido inflamado, preferiblemente a valores de pH de 4, 4,5, 5, 5,5, 6 o 6,5, o cualquier otro valor de pH por debajo de 7.

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en este documento se caracteriza porque el compuesto activa receptores opioides en los terminales de las neuronas sensoriales periféricas.

En una realización de la presente invención, el compuesto como se describe en este documento se caracteriza porque el compuesto exhibe una función analgésica periférica específica de la inflamación en tejidos inflamados o lesionados sin causar efectos centrales o intestinales.

La invención se refiere además al compuesto como se describe en este documento para uso como medicamento.

En una realización preferida, el compuesto de la presente invención está destinado para su uso como un medicamento en el tratamiento del dolor asociado a la inflamación, preferiblemente artritis, inflamación de la piel, dolor de espalda inflamatorio, dolor de cabeza (incluyendo migraña neurogénica), lesiones inflamatorias del sistema nervioso central y periférico (dolor neuropático), dolor por cáncer, trastornos del sistema inmune (VIH / SIDA, esclerosis múltiple), dolor traumático, dolor postoperatorio, articulaciones inflamadas, cirugía dental, dolor visceral, dolor de huesos, quemaduras y / o lesiones en los ojos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al compuesto como se describe en el presente documento para uso como medicamento en la activación de receptores opioides periféricos en el tratamiento del dolor en tejido lesionado o inflamado.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención, y/o sus sales, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la composición farmacéutica como se describe en el presente documento comprende una mezcla de al menos 2 compuestos de acuerdo con las fórmulas II, III, IV y / o V, y / o sales de los mismos, que comprenden preferiblemente una mezcla estereoisomérica de compuestos según fórmulas II, III, IV y / o V.

La composición farmacéutica de la presente invención se prepara preferiblemente para aplicación sistémica, oral y / o local, preferiblemente en forma de tableta o en una forma adecuada para inyección.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para el tratamiento del dolor inflamatorio que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente relevante del compuesto y / o la composición farmacéutica como se describe aquí a un sujeto humano. La invención abarca además el uso de los compuestos de la presente invención en un método de tratamiento, además del uso de los compuestos para

lograr los efectos biológicos obtenidos aquí, ya sea en vivo o in vitro, tal como la activación del receptor opioide objetivio en condiciones de pH bajo, preferiblemente a valores de pH asociados con la inflamación.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a derivados de fentanilo que funcionan como agonistas del receptor opioide, que activan receptores opioides objetivo de forma dependiente del pH. Los compuestos como se describen en la presente memoria se refieren a derivados mejorados y / o alternativos a los compuestos de fentanilo conocidos en la técnica. Los fluor-sustituyentes en las posiciones R1, R2, R3, R4 exhiben una electronegatividad potenciada en comparación con el hidrógeno y por lo tanto conducen a una electronegatividad mejorada de la molécula de derivado de fentanilo, proporcionando así los compuestos reivindicados con sus propiedades inventivas como se describe. A través de la modificación específica de fluor de la cadena principal de fentanilo descrita en este documento, la conformación global o estructura tridimensional de las moléculas permanece sin cambios, o solo cambiada en un grado menor.

De manera importante, los derivados de fentanilo descritos en la técnica anterior no exhiben la combinación deseada de características estructurales y físicas requeridas para la eficacia (dependiente del pH) mostrada por los compuestos de la presente invención. Los derivados de metilo como se describen en la técnica no producen la reducción requerida en pKa del compuesto de fentanilo para permitir la actividad específica de pH relacionada con la inflamación. La electronegatividad de F en comparación con C es significativamente mayor, proporcionando una diferencia significativa en pKa de la molécula. Los derivados de fluor-fentanilo previamente divulgados no reducen significativamente el pKa de los compuestos ni / o conducen a una modificación estructural desventajosa, de modo que no se produce la actividad analgésica deseada. Los compuestos de la presente invención, por lo tanto, demuestran una combinación única de características ni sugeridas ni descritas en la técnica anterior.

Para ser activado, el receptor mu opioide generalmente requiere un agonista opioide con un grupo N protonado (Li et al., Life Sciences, volumen 65, 2, 175-185, 1999). El valor de pKa del grupo N de los opioides más convencionales es aproximadamente 8 (por ejemplo, 8,2 para morfina, 8,4 para fentanilo). Por lo tanto, el grupo N está protonado tanto en tejido inflamado (pH 5-6) como en tejido sano (pH 7,4) y los receptores opioides se activan en ambos entornos. Si el valor de pKa del grupo N de un agonista podría ser disminuido a aproximadamente 6, estaría protonado en inflamado pero desprotonado en tejido normal y, por lo tanto, sería activo solo en tejido inflamado. Por lo tanto, la sustitución de hidrógeno por átomos de fluor, que no debería tener mayor influencia en el comportamiento dinámico del agonista opioide, proporciona una solución elegante al problema subyacente de la presente invención. El fluor es muy electronegativo y, por lo tanto, atrae protones y disminuye el valor pKa.

La "activación dependiente del pH" entre los compuestos como se describe en la presente memoria y el receptor opioide se refiere a una activación del receptor potenciada a valores de pH menores que 7, en comparación con los valores superiores a 7. En una realización preferida la activación del receptor por el compuesto se mejora proporcionalmente con la disminución de los valores de pH. Obviamente, a valores de pH muy bajos, la proteína receptora puede sufrir un cambio y / o desnaturalización conformacional significativo, de modo que la activación del receptor ya no ocurre de una manera mejorada. Por lo tanto, la activación del receptor por F-fentanilo ocurre preferiblemente a valores de pH de 4, 4,5, 5, 5,5, 6 o 6,5, o cualquier otro valor de pH por debajo de 7, por lo que la activación del receptor ocurre más preferentemente a valores de pH entre 5 y 6. Aunque puede producirse cierta activación del receptor a valores de pH más altos o más bajos como se indica explícitamente en este documento, la activación del receptor (y el alivio del dolor asociado in vivo) ocurre más preferentemente a niveles de pH, que se reducen naturalmente a aproximadamente 4, 4,5, 5, 5,5, 6 o 6,5, o cualquier otro valor de pH por debajo de 7, después de una lesión o inflamación de tejido de mamífero.

La activación del receptor se produce en una realización preferida a través de la unión del agonista al receptor. Sin embargo, la unión del agonista al receptor puede ser un evento estable o transitorio, de interacción fuerte o débil, de manera que el receptor se activa preferiblemente por interacción física del receptor agonista.

La activación de receptores opioides por compuestos como se describe en la presente memoria se refiere preferiblemente a la activación del receptor por compuestos de acuerdo con la fórmula I y el receptor mu. Sin embargo, debido a las similitudes estructurales y / o funcionales entre varios receptores opioides y / o vías de señalización implicadas en el efecto analgésico, la activación del receptor por los compuestos reivindicados también puede ocurrir con receptores opioides además del receptor mu, como el delta -receptor, receptor kappa u otros receptores opioides relacionados.

Los términos "dolor inflamatorio" y "dolor asociado a la inflamación" se usan indistintamente. Dicho dolor asociado a la inflamación se relaciona con cualquier tipo de dolor experimentado por un sujeto cuando hay

inflamación involucrada. Los compuestos de la presente invención están destinados para su uso en el tratamiento de artritis, inflamación de la piel, dolor de espalda inflamatorio, dolor de cabeza (incluida la migraña neurogénica), lesiones inflamatorias del sistema nervioso central y periférico (dolor neuropático), dolor por cáncer, trastornos del sistema inmune (VIH / SIDA, esclerosis múltiple), dolor traumático, dolor postoperatorio, articulaciones inflamadas, cirugía dental, dolor visceral, dolor de huesos, quemaduras, lesiones oculares. Estos trastornos pretenden ser ejemplos de afecciones que están asociadas con dolor inflamatorio y no pretenden ser una divulgación limitante.

Los compuestos de la presente invención exhiben la sorprendente ventaja de que se evitan los efectos secundarios inaceptables de los tratamientos analgésicos tradicionales, tales como las acciones centrales de los opioides (por ejemplo, sedación, depresión respiratoria, náuseas, adicción, tolerancia), los efectos intestinales de los opioides (estreñimiento, íleo), los efectos gastrointestinales y cardiovasculares de los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) (por ejemplo, hemorragia, úlceras, complicaciones tromboembólicas) y los efectos adversos de los anticonvulsivos y antidepresivos (por ejemplo, sedación, ataxia, arritmias, vasoconstricción coronaria). Los propios compuestos y su actividad específica de inflamación no han sido sugeridos ni divulgados en la técnica anterior.

En la presente invención, "tratamiento" generalmente significa obtener un efecto farmacológico deseado y / o efecto fisiológico. El efecto puede ser profiláctico con vistas a prevenir completa o parcialmente una enfermedad y / o un síntoma, o puede ser terapéutico en vista de curar parcial o completamente una enfermedad y / o efecto adverso de la enfermedad. En la presente especificación, "tratamiento" incluye tratamientos arbitrarios de enfermedades en mamíferos, en particular, humanos, por ejemplo, los siguientes tratamientos (a) a (c): (a) Prevención del inicio de una enfermedad o síntoma en un paciente que puede tener una predisposición de la enfermedad o síntoma, pero aún no se ha diagnosticado que tenga la predisposición; (b) Inhibición de un síntoma de una enfermedad, es decir, prevención de la progresión del síntoma; (c) Mejoría de un síntoma de una enfermedad, es decir, inducción de regresión de la enfermedad o síntoma.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una combinación del agente como se describe en este documento con un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica grave o una reacción adversa similar cuando se administran a un ser humano. Tal como se usa en la presente memoria, "portador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, tampones, soluciones de vehículo, suspensiones, polímeros, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. Una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en la misma. La composición farmacéutica que contiene el ingrediente activo puede estar en una forma adecuada para uso tópico u oral, por ejemplo, como tabletas, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, nanoprtadores, liposomas, geles, piruletas, adhesivos mucosos, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para uso tópico u oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones. Las tabletas contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de tabletas. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Los compuestos de la presente invención también se pueden usar en formas farmacéuticamente aceptables adecuadas para inyección, que conducen a la administración local o sistémica del compuesto.

Los niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kilogramo de peso corporal por día son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente. Por ejemplo, el dolor relacionado con la inflamación puede tratarse eficazmente mediante la administración de aproximadamente 0,01 a 50 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal por día (aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 3,5 g por paciente por día). La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales del portador para producir la forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación destinada a la administración oral en humanos puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95% de la composición total.

Las formas de unidades de dosificación generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de ingrediente activo. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluida la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, el tiempo de

administración de la dieta, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia. La cantidad eficaz de dosificación de los compuestos de acuerdo con la invención variará dependiendo de factores que incluyen el compuesto particular, la toxicidad y la actividad inhibidora, la afección tratada, y si el compuesto se administra solo o con otras terapias. Típicamente, una cantidad efectiva de dosificación variará de aproximadamente 0,0001 mg / kg a 1500 mg / kg, más preferiblemente de 1 a 1000 mg / kg, más preferiblemente de aproximadamente 1 a 150 mg / kg de peso corporal, y lo más preferiblemente de aproximadamente 50 a 100 mg / kg de peso corporal. La invención se refiere también a un proceso o un método para el tratamiento de las afecciones patológicas mencionadas anteriormente. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar profiláctica o terapéuticamente, preferiblemente en una cantidad que es efectiva contra los trastornos mencionados, a un animal de sangre caliente, por ejemplo un humano, que requiere dicho tratamiento, los compuestos preferiblemente se usan en forma de composiciones farmacéuticas.

Figuras

La invención se describe adicionalmente mediante las figuras. Estas no pretenden limitar el alcance de la invención.

Figura 1. Experimentos de unión competitiva que miden la afinidad de los agonistas-mu de control por el receptor mu.

Figura 2. Supresión de acumulación de cAMP estimulada por FSK / IBMX por F-fentanilo (blanco) y fentanilo (gris).

Figura 3. El flúor-fentanilo reduce la sensibilidad mecánica al dolor (hiperalgesia) después de la inyección intraplantar en ratas.

Figura 4. Curso temporal de la analgesia inducida por flúor-fentanilo intraplantar.

Figura 5. Flúor-fentanilo reduce la hiperalgesia mecánica después de la inyección intravenosa en ratas. No tiene efecto sobre las patas no inflamadas contralaterales, no produce depresión respiratoria o sedación (incluso a dosis altas de 16-32 mg / kg), lo que indica una falta de acciones centrales.

Figura 6. Curso de tiempo de analgesia inducida por flúor-fentanilo intravenoso.

Figura 7. El efecto analgésico del flúor-fentanilo está bloqueado por la naloxona metiodida (NLXM). Fluor-fentanilo produce analgesia solo en las patas inflamadas. Este efecto está mediado por receptores opioides periféricos (es decir, bloqueados por el antagonista del receptor opioide periféricamente restringido NLXM).

Figura 8. Síntesis química de fluor-fentanilo (F-fentanilo; (±) -N- (3-Fluor-1-fenetil-piperin-4-il) -N-fenilpropionamida). Se proporciona un esquema del esquema de síntesis además de los diagramas de las separaciones cromatográficas tanto del precursor como de los compuestos finales usados y / u obtenidos durante la síntesis química.

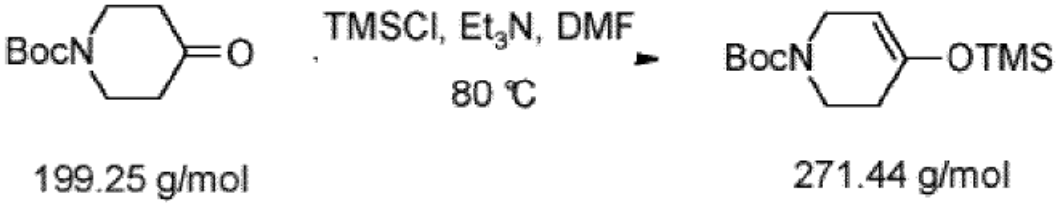
Ejemplos

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos no pretenden limitar el alcance de la invención. Los ejemplos experimentales se refieren a diversos experimentos in vitro que usan cultivo celular, además del tratamiento de ratas usando inflamación unilateral de la pata trasera inducida por inyección intraplantar (i.pl.) además de inyección intravenosa (i.v.). Las ratas representan un modelo de mamífero, usado para demostrar la invención a modo de ejemplo. Otros mamíferos, preferiblemente seres humanos, también se pueden tratar mediante el método de la presente invención.

Ejemplo 1: Síntesis de F-Fentanilo

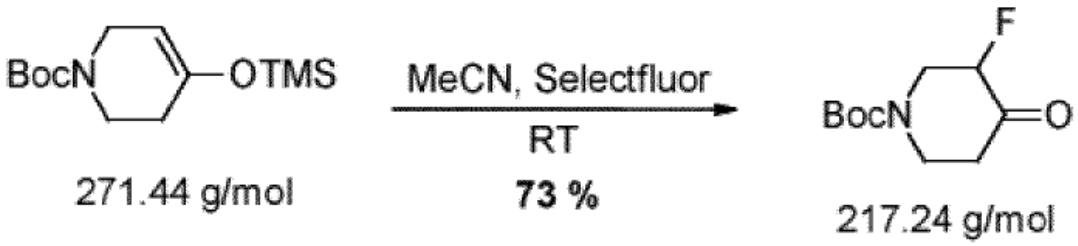
La síntesis de fluor-fentanilo (F-fentanilo; (±)-N-(3-Fluor-1-fenetilpiperin-4-il)-N fenilpropionamida) se llevó a cabo de acuerdo con lo siguiente:

Paso 1: Producción de un éter de enililo de sililo



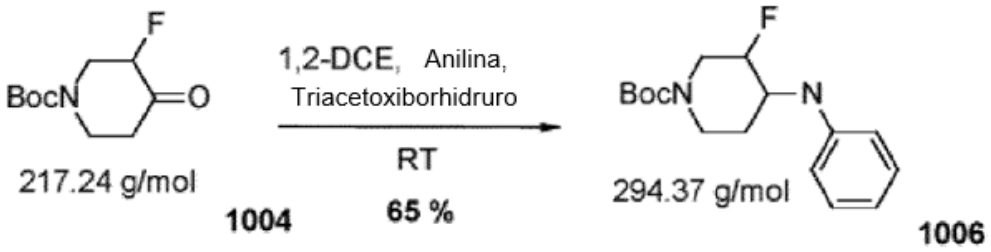
El reactivo (3 g; 15,086 mmol; 1 eq) se disolvió en DMF seco bajo argón y posteriormente se mezcló con trietilamina (1953 mg; 18,079 mmol; 2,4 eq) y clortrimetilsilano (5 ml; 36,134 mmol; 1,2 eq), uno después del otro. La reacción se desarrolló durante 16 horas a 80 ºC. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación con ciclohexano (100 ml) y se lavó 3 veces con una solución de hidrogenocarbonato de sodio (3x40 ml). Después de secar sobre sulfato de magnesio y concentrar al vacío, el producto se enjuagó 4 veces con tolueno para eliminar completamente el DMF. Se obtuvo un aceite amarillo pardo.

Paso 2: Fluoración



El producto bruto del paso 1 (2566 mg; 9,453 mmol; 1 eq) se disolvió en argón en acetonitrilo seco y se mezcló con Selectfluor (un donador de fluor disponible comercialmente (1-clorometil-4-fluoro-1,4 diazoniabiciclo [2.2.2]octano bis (tetrafluoroborato))) (3681 mg; 10,397 mmol; 1,1 eq). Después de agitar durante 60 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se transfirió con acetato de etilo (250 ml) a un embudo de decantación y se lavó primero con solución diluida (2x75 ml) y luego con solución saturada de NaCl (80 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y a continuación se concentró al vacío. El producto obtenido es limpio sin requerir más pasos de purificación. Se obtuvo una resina de color marrón claro.

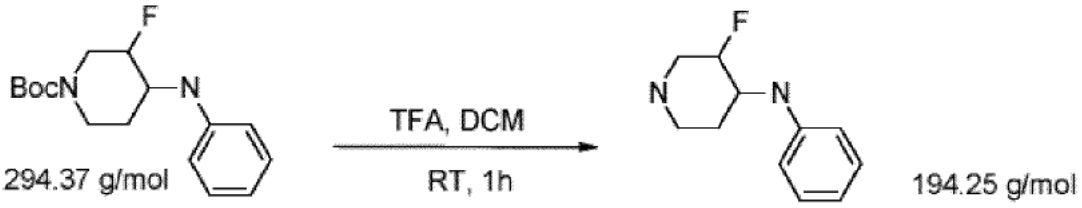
Paso 3: Aminación reductiva



El compuesto fluorado (1410 mg; 6,491 mmol; 1 eq) se presentó con Anilin (0,65 ml; 7,140 mmol; 1,1 eq) y triacetoxiborhidruro sódico (2064 mg; 9,773 mmol; 1,5 eq) y se disolvió en argón en 1,2- dicloroetano seco. La reacción duró 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se transfirió con hidrogenocarbonato de sodio solución (70 ml) a un embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo (2x70 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron. Posteriormente, el producto

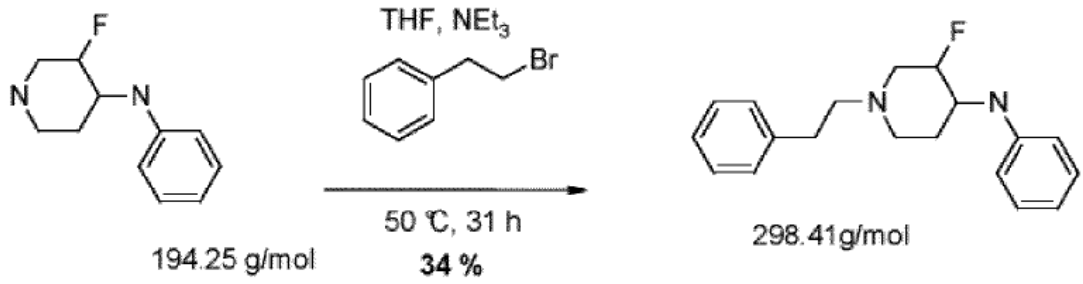
se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60, ciclohexano / acetato de etilo 19: 1 (1500 ml), 15: 1 (800 ml), 10: 1 (2200 ml)). Se obtuvo un producto sólido incoloro.

Paso 4: eliminación del grupo protector



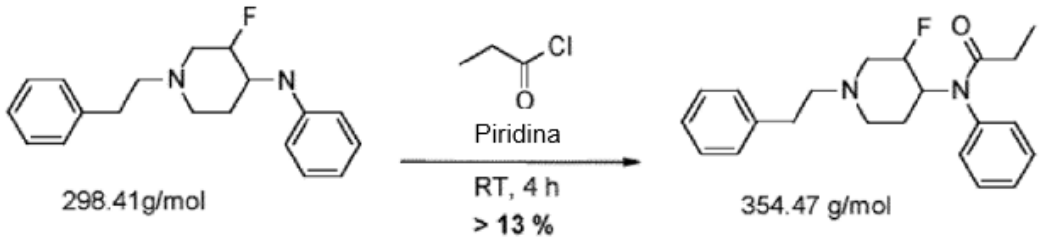
El producto (824 mg, 2,799 mmol, 1 eq) se disolvió en una mezcla de diclorometano y ácido trifluoroacético (relación de 2: 1, 9 ml) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, todo el líquido se eliminó al vacío, de modo que se obtuvo un aceite marrón. El aceite se transfirió con metanol (2x20 ml) a un embudo de separación. Se añadieron agua destilada (40 ml), sosa cáustica 5 N (8 ml) y solución saturada de cloruro sódico (30 ml). Posteriormente, el producto se extrajo con acetato de etilo (2x100 ml). Se añadieron agua y éter dietílico durante el tiempo necesario hasta que se produjo una separación de fases. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y posteriormente se secaron al vacío, de modo que se obtuvo una resina marrón.

Paso 5: alquilación



La resina del paso 5 (1198 mg, 6,167 mmol, 1 eq) se disolvió en argón en THF seco (80 ml). Posteriormente, se añadieron trietilamina (1,71 ml; 12,335 mmol; 2 eq) y bromuro de fenetilo (2,50 ml; 18,501 ml; 3 eq). La reacción tardó 30 horas a 50ºC. Después, la mezcla de reacción se transfirió con acetato de etilo (250 ml) a un embudo de separación y se lavó con una solución de hidrogenocarbonato de sodio (2x100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío, de modo que se obtuvo un aceite marrón. El producto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60, ciclohexano / acetato de etilo 10: 1 (1320 ml), 5: 1 (300 ml), 3: 1 (2100 ml). Después de la purificación, se obtuvo un sólido incoloro.

Paso 6: acilación



El producto (661 mg, 2.215 mmol, 1 eq) se disolvió en piridina (35 ml) y mientras se agitaba se mezcló con cloruro de propionilo (0,59 ml, 6,756 mmol, 3 eq). La reacción tardó 4 horas a temperatura ambiente y posteriormente la mezcla de reacción se transfirió con cloroformo (2 x 50 ml) a un embudo de separación y se

lavó con agua destilada (60 ml). Precipitó un sólido incoloro que se separó con una frita y se descartó. La fase orgánica se lavó de nuevo con agua destilada (50 ml). El producto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60, ciclohexano / acetato de etilo 4: 1 (2650 ml), 3: 1 (800 ml), 1: 1 (400 ml), acetato de etilo (250 ml). Las fracciones, que solo contenían producto, eran concentrado, por lo que se obtuvo un aceite amarillo. El aceite se resuspendió en dietiléter y mediante la adición de n-pentano se precipitó un producto sólido amarillo claro.

Se muestra un esquema de la síntesis y los resultados de la separación del compuesto en la Figura 5.

En una realización preferida, la síntesis de F-fentanilo como se describe en este documento conduce a una mezcla estereoisomérica de los derivados de fluor-fentanilo descritos por la Fórmula I, en particular cualquier combinación dada de dos o más de los derivados descritos por las Fórmulas II a V, que exhiben las propiedades inventivas de la presente invención.

También está dentro de las capacidades de un experto en la técnica producir un derivado de fluor-fentanilo con más de un átomo de F unido a una o más de las posiciones derivatizadas de la cadena principal de fentanilo de acuerdo con la fórmula general I.

Se conocen procedimientos para la fluoración adicional, por ejemplo en metaposiciones, y una persona experta está suficientemente equipada a través de su conocimiento de técnicas de síntesis comunes para producir los compuestos reivindicados.

Ejemplo 2: características estructurales y físicas del F-fentanilo

El compuesto sintetizado tenía una fórmula de $C_{22}H_{27}FN_2O$, con un peso molecular de 354,47 g / mol y una temperatura de fusión de 110-114 grados C.

La estructura del compuesto fluor-fentanilo (F-fentanilo, (±) -N- (3-Fluor-1-fenetilpiperin-4-il) -N-fenilpropionamida) sintetizada como se describió anteriormente se determinó usando cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas (LCMS), y se obtuvieron los espectros ^{1}H, ^{13}C y ^{19}F usando NMR para el producto deseado.
^{1}H RMN (CDCl3): δ 7.433, 7.366, 7.354, 7.296, 7.275, 7.260, 7.213, 7.188, 7.167, 7.049, 5.270, 5.146, 4.635, 4.602, 4.553, 4.527, 3.343, 3.018, 2.991, 2.767, 2.626, 2.464 , 2.429, 2.370, 2.336, 2.225, 1.996, 1.605, 1.583, 1.529, 1.511, 1.444, 1.416, 1.214, 1.035 ppm.
^{13}C NMR (CDCl3): δ 174.404, 139.978, 139.323, 131.231, 131.151, 130.157, 129.381, 128.626, 128.529, 128.392, 128.193, 126.073, 88.831, 87.064, 59.968, 56.060, 55.881, 55.060, 55.881, 55.061, 54.879, 52.505 , 33.408, 28.552, 25.548, 9.464 ppm.
^{19}F NMR (CDCl3): δ 197.809 ppm.

Ejemplo 3: función del receptor opioide mu in vitro:

Se usaron células HEK-293 transfectadas y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) cultivadas para examinar la unión mu-agonista, la unión de GTPγS, la formación de cAMP y la modulación de las corrientes de TRPV1 por mu-agonistas. La incubación de células HEK-293 a diferentes valores de pH se inició después de que la expresión de los receptores opioides mu en la superficie de la membrana se completara y fuera estable. La afinidad y el número de sitios de unión del mu-ligando (3H-DAMGO) fueron ligeramente (no significativos) inferiores a pH 5,5 en comparación con pH 7,5 (Tabla 1). La preincubación con adenilil ciclasa activante forskolina (FSK; 10 mM) y el inhibidor de fosfodiesterasa 3-isobotyl-1-methylxanthin (IBMX; 2 mM) (grupos de control que representan 100% de acumulación de cAMP en comparación con células no estimuladas) no produjo diferencias significativas entre los valores de pH de 5,0, 6,0, 7,0 y 7,5 (Fig. 1). Sin embargo, la supresión de la formación de cAMP estimulada por FSK / IBMX por DAMGO y morfina fue notablemente más fuerte a pH 5,0 que a pH 7,5 (Tabla 1), indicando una mayor eficacia de la inhibición inducida por mu agonista de la actividad adenilil ciclasa en condiciones ácidas.

Tabla 1. Receptores-mu de tipo salvaje: unión agonista-mu e inhibición de cAMP

	3H-DAMGO	3H-DAMGO		10 µM DAMGO	10 µM Morfina
pH	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg)	pH	cAMP (% línea base)	
5.5	5,561	14,04	5,0	43 ± 6	46 ± 11
6.5	2,101	15,50	6,5	68 ± 9	64 ± 13
7.5	1,149	23,95	7,5	82 ± 7	80 ± 10

Usando fluor-fentanilo (F-fentanilo, tal como se sintetizó en los métodos proporcionados en este documento) o fentanilo como ligandos del receptor mu opioide se obtuvieron los siguientes resultados: Se realizaron experimentos de unión competitiva usando una concentración fija de ^{3}H-DAMGO (4 nM) en el se calculó la presencia de concentraciones crecientes (10^{-6}-1 µM) de F-fentanilo no marcado y la concentración inhibidora mitad máxima (IC50). Los valores IC50 resultantes fueron 1,03 nM (pH 5,5), 4.78 nM (pH 6.5) y 139.7 nM (pH 7.5), lo que indica que F-fentanilo mostró una afinidad creciente por los receptores mu con valores de pH decrecientes. Por lo tanto, cuanto menor es la IC50, mayor es la afinidad del F-fentanilo por el receptor mu (véase también la Fig. 1).

Tanto F-fentanilo como fentanilo produjeron reducciones significativamente más fuertes de cAMP estimulado por FSK / IBMX a pH 5,0 y 6,0 en comparación con pH 7,5 (Figura 2). La diferencia entre los valores de cAMP a pH 5,0 y pH 7,5 parecía ser más pronunciado para F-fentanilo que para fentanilo (F-fentanilo: ** p = 0,0011; fentanilo: * p = 0,0118; ANOVA; Fig. 2). Esto demuestra que el F-fentanilo activa receptores mu-opioides predominantemente durante condiciones ácidas y es más efectivo que el fentanilo.

También evaluamos la activación de la proteína G después de la activación del receptor mu mediante la unión de 35S-GTPγS. F-fentanilo produjo la mitad de las concentraciones efectivas (EC50) de 0,25 nM (pH 5,5) y 4,14 nM (pH 7,5). Los valores correspondientes para el fentanilo fueron 53,37 nM (pH 5.5) y 41,91 nM (pH 7,5). Por lo tanto, F-fentanilo fue más potente a pH 5,5 que a pH 7,5, y fue más potente que el fentanilo en todos los valores de pH.

Ejemplo 4: efectos antinociceptivos de los ligandos opioides in vivo

En ratas con inflamación unilateral de la pata trasera inducida por coadyuvante completo de Freund intraplantar (i.pl.), fentanilo y F-fentanilo se inyectaron i.pl. En la pata inflamada o por vía intravenosa (iv) se usó el umbral de presión de la pata (PPT) como medida cuantitativa, basándose en la determinación del umbral de respuesta del animal para retirar la extremidad por dolor inducido por la aplicación de una presión uniformemente creciente a la pata

A dosis de hasta 1 mg, ambos fármacos produjeron elevaciones de PPT dependientes de la dosis (efectos antinociceptivos) en la pata no inflamada contralateral, pero no en la contralateral. Los efectos del F-fentanilo fueron ligeramente más fuertes (Fig. 3). De acuerdo con nuestros estudios previos, esto indica que ambos fármacos activan receptores opioides periféricos en tejido inflamado pero no en tejido no inflamado (Fig. 3). A dosis más altas (1,5 - 2 mg) el fentanilo produjo efectos también sobre la pata contralateral, lo que sugiere que el fármaco se absorbió en la circulación y produjo efectos antinociceptivos mediados en el SNC (Fig. 3). Este no fue el caso del F-fentanilo (Fig. 3), lo que indica que, incluso si el fármaco llegaba al SNC después de la absorción en la circulación, no activaba los receptores opioides centrales. Experimentos de curso de tiempo con i.pl. la administración revela antinocicepción selectiva en la pata inflamada para F-fentanilo, lo que demuestra el efecto dependiente de la inflamación de los derivados F-fentanilo (Fig. 4).

La inyección intravenosa (i.v.) de altas dosis (32 mg / kg) fue letal en el caso de fentanilo (debido a la depresión respiratoria central). Lo mismo i.v. la dosis de F-fentanilo no provocó ningún efecto central perceptible sino que produjo antinocicepción selectiva en la pata inflamada (Fig. 5). Esto indica que los receptores opioides periféricos en el tejido lesionado pero no se activaron los receptores centrales. Experimentos de curso de tiempo con i.v. la administración también revela antinocicepción selectiva en la pata inflamada para F-fentanilo, demostrando el efecto dependiente de la inflamación de los derivados de F-fentanilo (Fig. 6).

La experimentación adicional usando el bloqueador de receptor opioide periféricamente restringido naloxona metiodide (NLXM), que no permea la barrera hematoencefálica y por lo tanto no ingresa al SNC, muestra que el F-fentanilo, que produce analgesia solo en las patas inflamadas, está mediado por receptores opioides periféricos (Fig. 7).

La experimentación adicional puede demostrar que los compuestos de fluor-fentanilo de la presente invención exhiben los efectos anteriormente mostrados en comparación directa con derivados de fentanilo conocidos de la técnica anterior, por ejemplo metil-fentanilo, que debido a sus valores de pKa desventajosos no son apropiado para producir efectos específicos del pH. Las claras diferencias en electronegatividad entre metilo y fluor conducen a los expertos en la técnica a reconocer que los derivados de metil-fentanilo no producirán el efecto deseado descrito en este documento.

Métodos utilizados en los ejemplos de la presente invención

Cultivo celular y transfección: las células HEK293 se mantienen en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de estreptomicina-penicilina, en 5% de CO^2 a 37 ° C. Las células se pasaron cada 2-4 días y no se usaron antes del pasaje número 30. Las células HEK293 se plaquearon en placas de 96 pocillos

revestidas con poli-L-lisina para ELISA y en placas de cultivo de plástico de 100 mm de diámetro para estudios de unión. Después de 2 días, las células HEK293 se transfectan transitoriamente con 12 µg (experimentos de unión) y 0,1 µg (experimentos ELISA) de ADNc de tipo salvaje de rata o receptor mu opioide mutante usando Reactivo de Transfección FuGENE 6 (Roche Diagnostics). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se preincubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos a valores de pH variables (5,5-7,4) y luego se procesaron para otros experimentos.

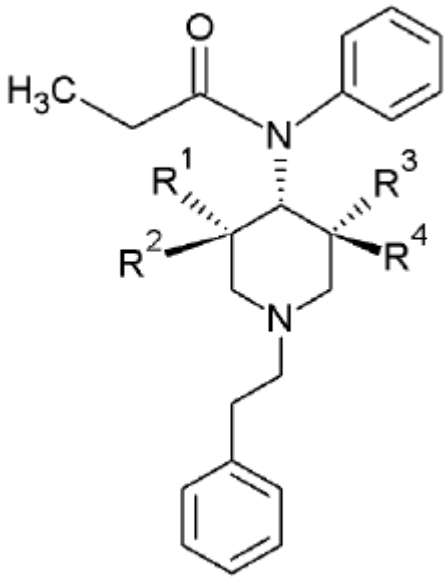
Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima AMP cíclica (ELISA): las células transfectadas se cultivan en una placa de 96 pocillos y se incuban con forskolina 10 mM, 3-isobutil-1-metil-xantina 2 mM (IBMX) en ausencia o presencia de morfina / DAMGO bajo diferentes condiciones de pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,4) durante min 20 min a 37 ° C. Las mediciones de cAMP se realizan utilizando el protocolo de sistema de inmunoensayo enzimático Biotrak de cAMP (Amersham Biosciences) siguiendo el protocolo Instrucciones del fabricante. La peroxidasa de cAMP no ligada oxida tetrametilbenzidina a un derivado azul. La reacción se detiene aplicando ácido sulfúrico dando como resultado la acumulación de un colorante amarillo. La intensidad del color es detectado con un fotómetro ELISA a 450 nm.

Unión del ligando: las membranas de las células HEK 293 que expresan los receptores opioides mu se lavan dos veces con 10 ml de tampón Tris (Trizma Preset Crystals pH 7,4; Sigma), se recogen con un raspador, se homogeneizan y se centrifugan a 42000 g y 4 ° C durante 20 min. El sedimento se homogeneiza en 10 ml de Tris y se centrifuga a 42000 g y 4 ° C durante 20 min. La concentración de proteína se determina usando el método de Bradford. Las concentraciones apropiadas de membranas celulares (200 mg) se incuban en un volumen final de 400 ml de tampón Tris (pH 5,5, 6,5 o 7,4) con concentraciones crecientes de, p. ej. 3H-DAMGO (0,5 nM - 16 nM) (51 Ci / mmol; Amersham) (u otros ligandos) en ausencia y presencia de naloxona 10 µM no marcada. La presencia de naloxona define la unión no específica, que típicamente representa del 15 al 35% de la unión total. Los filtros se empapan en una solución de polietilenimina al 0,1% (p / v) durante 15 minutos antes de su uso. El ligando ligado y libre están separados por filtración rápida al vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF / B, seguido de cuatro lavados con tampón Tris frío. La radioactividad unida se determina por espectrofotometría de centelleo líquido a una eficacia de conteo del 69% para 3H después de la extracción durante la noche de los filtros en 3 ml de fluido de centelleo.

Unión de Guanosina-5'-O- (3-35S-tio) -trifosfato (35S-GTPγS): Después de la preincubación durante 20 minutos a valores de pH variables (5,5-7,4), células HEK 293 que expresan el tipo salvaje o el mutante Los receptores mu-opioides se lavan dos veces con 10 ml de PBS, se recolectan con un raspador en 10 ml de tampón de ensayo ^{35}S-GT-PyS (Tris-HCL 50 mM, MgCl2 5 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 100 mM y ditiotreitol 1 mM).), se homogeneizó y se centrifugó a 42000 g y a 4 ° C durante 10 min. Los pellets celulares son resuspendido en 10 ml de tampón de ensayo 35S-GTPγS, homogeneizado y centrifugado de nuevo. La concentración de proteína se mide usando el método de Bradford. Se incuban concentraciones adecuadas de proteína (10-50 µg), concentraciones variables de DAMGO (10^{-12} -10^{-4} M) (u otros ligandos), GDP 50 µM y ^{35}S-GTPγS 0.05 nM en un volumen total de 800 ml para 2 h para generar curvas de concentración-efecto. La unión basal se detecta en ausencia de agonista y unión no específica en la presencia de 10 µM de GTPγS frío. Los ^{35}S-GTPγS unidos y libres se separan por filtración al vacío a través de filtros GF / B. La cuantificación del ^{35}S-GTPγS unido se consigue mediante un contador de centelleo líquido. De forma similar a nuestros estudios previos, el análisis de saturación de la unión de GTPγS estimulada por mu agonistas se realiza para determinar la K_d de GTPγS y la cantidad total (B_{max}) de unión de la proteína G al receptor mu. Se realizan experimentos similares en membranas de GRD obtenidas a partir de las extremidades inflamadas o no inflamadas de animales tratados con CFA intraplantar, como se lleva a cabo comúnmente en la técnica.

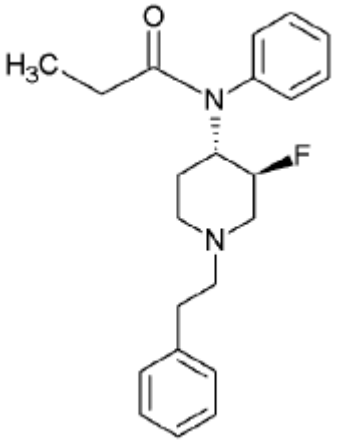
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la Fórmula I general

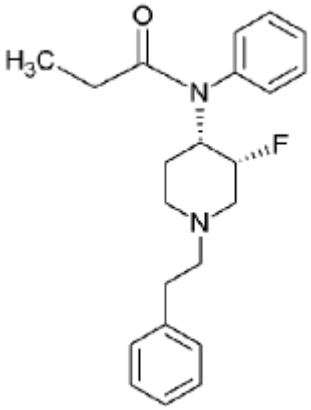


en la cual uno de R1, R2, R3, R4 es F, y
los residuos restantes en las posiciones R1, R2, R3, R4 son H.

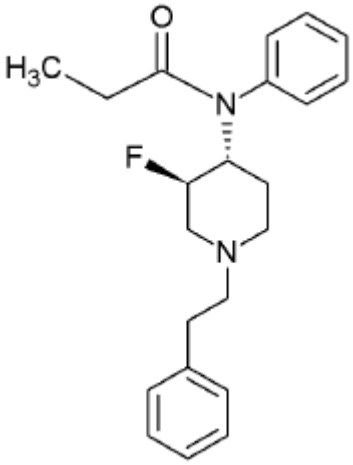
2. Compuesto según la reivindicación anterior, según la Fórmula II:



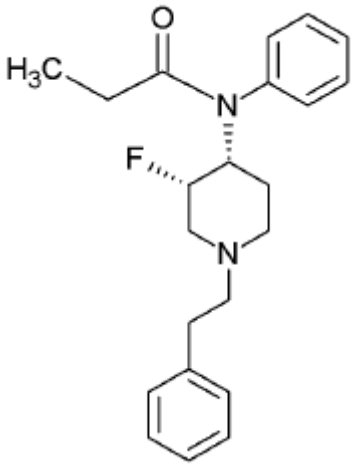
3. Compuesto según la reivindicación 1, según la Fórmula III:



4. Compuesto según la reivindicación 1, según la Fórmula IV:



5. Compuesto según la reivindicación 1, según la Fórmula IV:



6. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso como medicamento.

7. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso como medicamento en el tratamiento del dolor asociado a la inflamación.

8. Compuesto según la reivindicación anterior para uso como medicamento, caracterizado porque el compuesto activa un receptor opioide objetivo en condiciones de pH asociado a la inflamación en tejido inflamado, en el que las condiciones del pH asociado a la inflamación exhiben un valor de pH inferior a 7.

9. Compuesto para uso como medicamento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho receptor opioide objetivo se selecciona del grupo que comprende el receptor mu, receptor delta y receptor kappa.

10. Compuesto para uso como medicamento según la reivindicación 7, caracterizado porque el dolor asociado a la inflamación se selecciona del grupo que consiste en artritis, inflamación de la piel, dolor de espalda inflamatorio, dolor de cabeza, tal como migraña neurogénica, lesiones inflamatorias del sistema nervioso central y periférico, como dolor neuropático, dolor por cáncer, trastornos del sistema inmunitario, como VIH / SIDA o esclerosis múltiple, dolor traumático, dolor postoperatorio, articulaciones inflamadas, cirugía dental, dolor visceral, dolor de huesos, quemaduras y lesiones en los ojos.

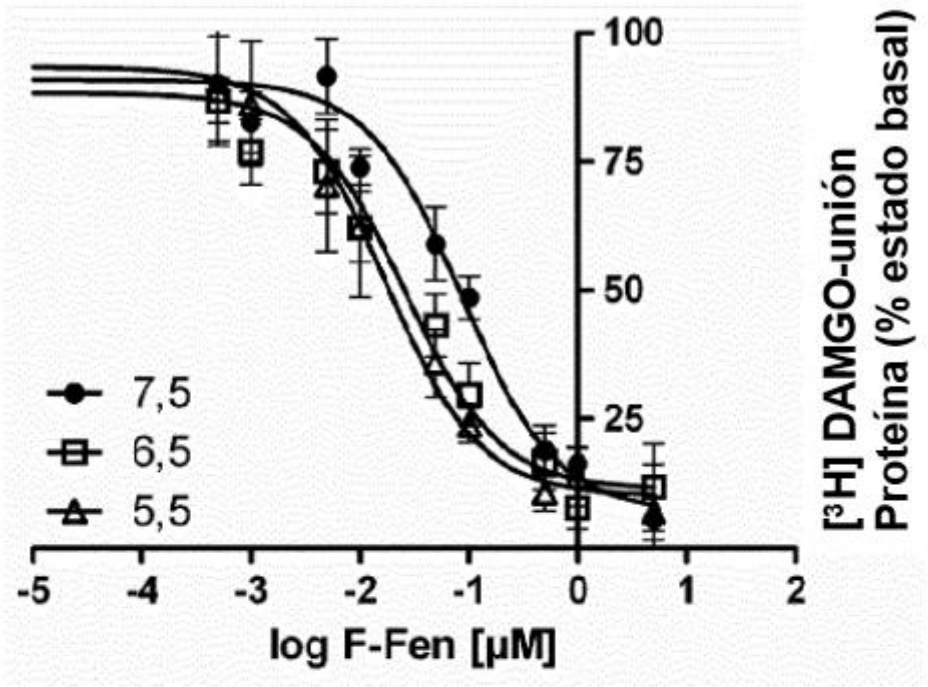
11. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y/o sus sales, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

12. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que comprende una mezcla de al menos 2 compuestos de acuerdo con las fórmulas II, III, IV y / o V, y / o sus sales.

13. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que comprende una mezcla estereoisomérica de compuestos de acuerdo con las fórmulas II, III, IV y/o V.

14. Composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicha composición está en una forma adecuada para uso tópico u oral.

Fig. 1


100
75
50
25
7,5
6,5
5,5
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
log F-Fen [µM]
[³H] DAMGO-unión
Proteína (% estado basal)

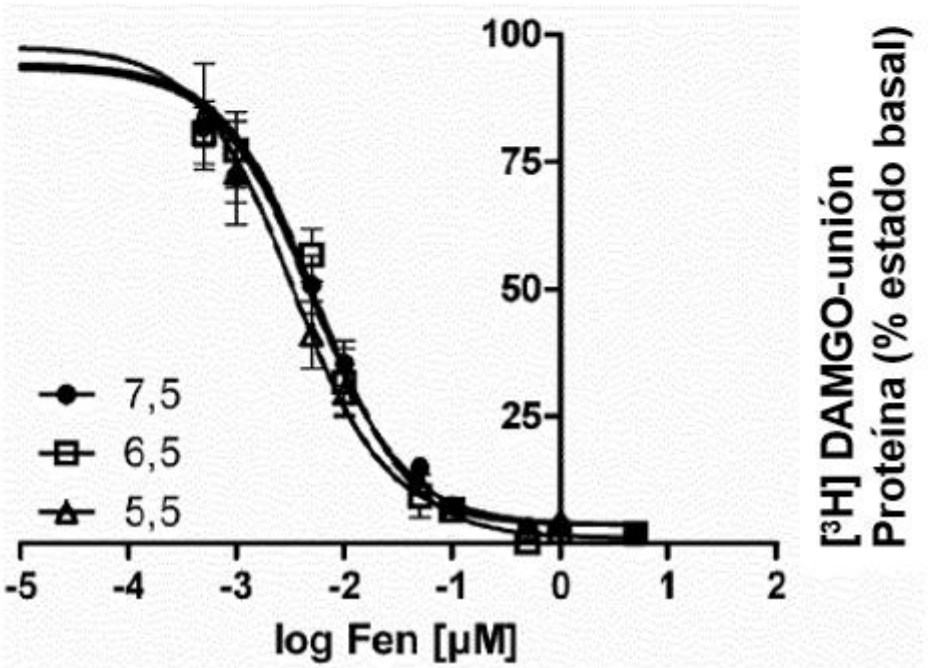

100
75
50
25
7,5
6,5
5,5
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
log Fen [µM]
[³H] DAMGO-unión
Proteína (% estado basal)

Fig. 2

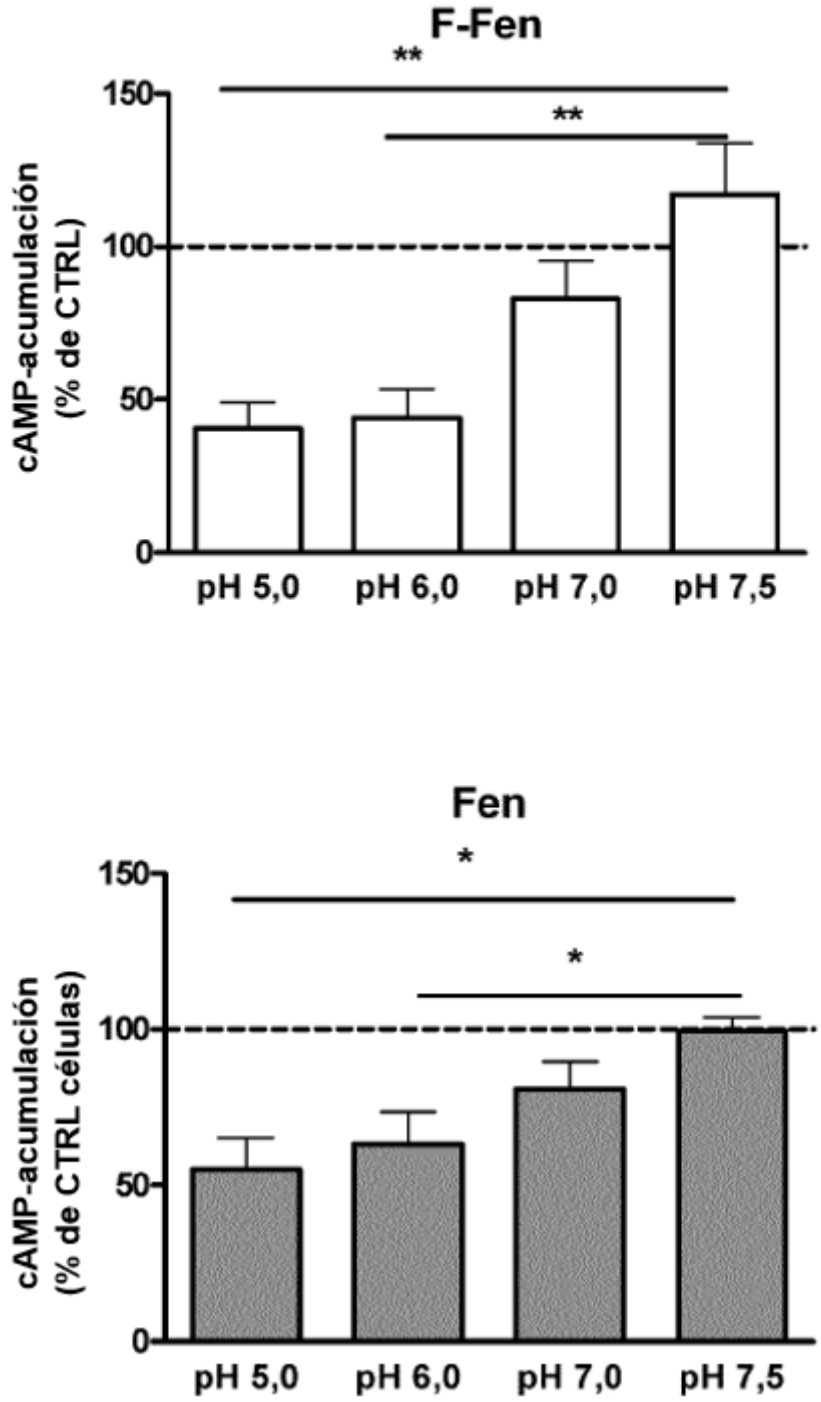

F-Fen
**
**
150
100
50
0
cAMP-acumulación
(% de CTRL)
pH 5,0
pH 6,0
pH 7,0
pH 7,5
Fen
*
*
150
100
50
0
cAMP-acumulación
(% de CTRL células)
pH 5,0
pH 6,0
pH 7,0
pH 7,5

Fig. 3

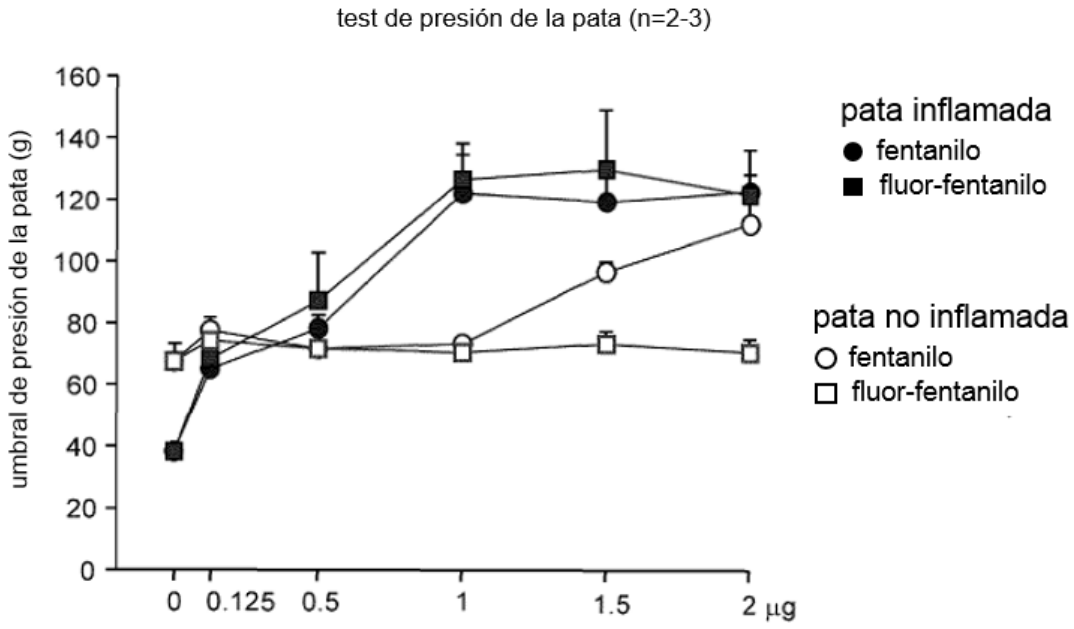

test de presión de la pata (n=2-3)
umbral de presión de la pata (g)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
0.125
0.5
1
1.5
2 µg
pata inflamada
fentanilo
fluor-fentanilo
pata no inflamada
fentanilo
fluor-fentanilo

Fig. 4

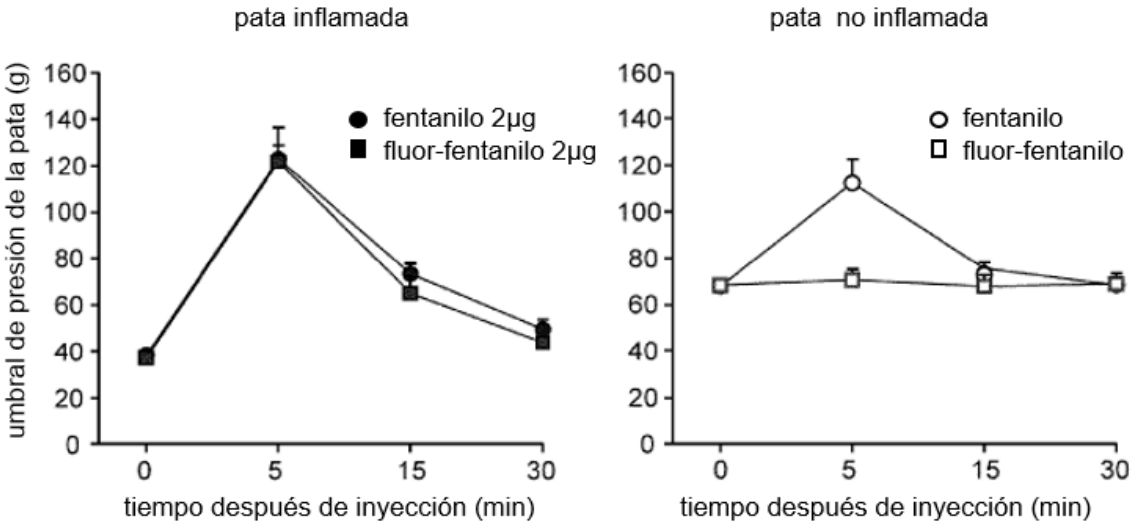

pata inflamada
pata no inflamada
umbral de presión de la pata (g)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
fentanilo 2µg
fluor-fentanilo 2µg
fentanilo
fluor-fentanilo
0
5
15
30
tiempo después de inyección (min)
tiempo después de inyección (min)

Fig. 5

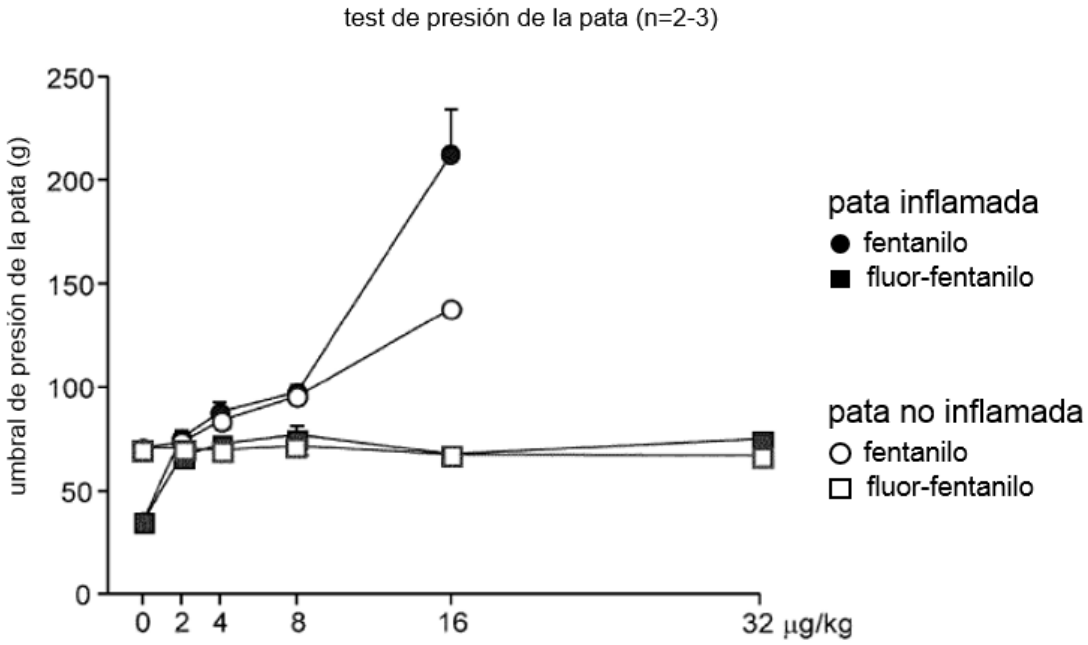

test de presión de la pata (n=2-3)
umbral de presión de la pata (g)
250
200
150
100
50
0
0
2
4
8
16
32 µg/kg
pata inflamada
fentanilo
fluor-fentanilo
pata no inflamada
fentanilo
fluor-fentanilo

Fig. 6

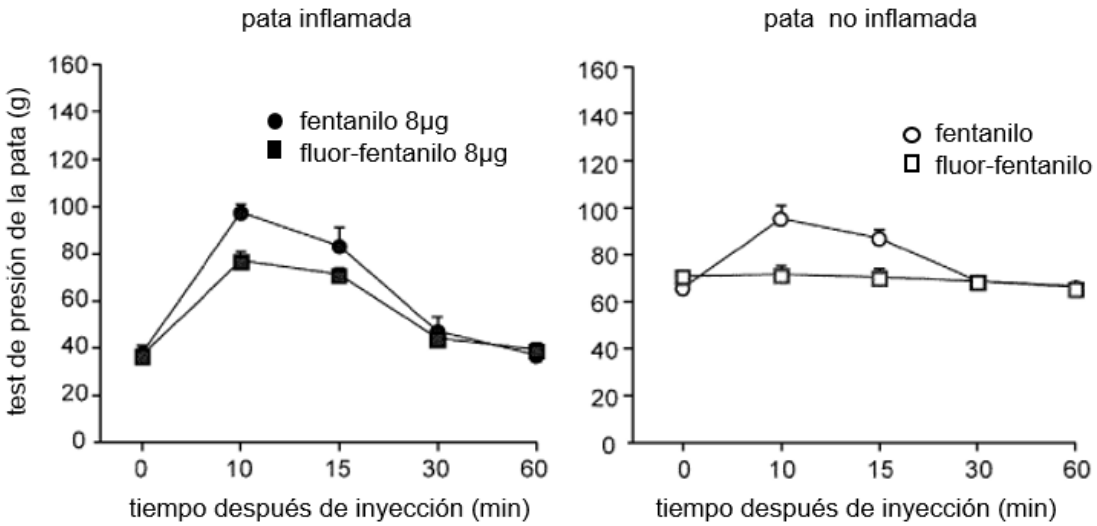

pata inflamada
pata no inflamada
test de presión de la pata (g)
fentanilo 8µg
fluor-fentanilo 8µg
fentanilo
fluor-fentanilo
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0
10
15
30
60
tiempo después de inyección (min)
tiempo después de inyección (min)

Fig. 7

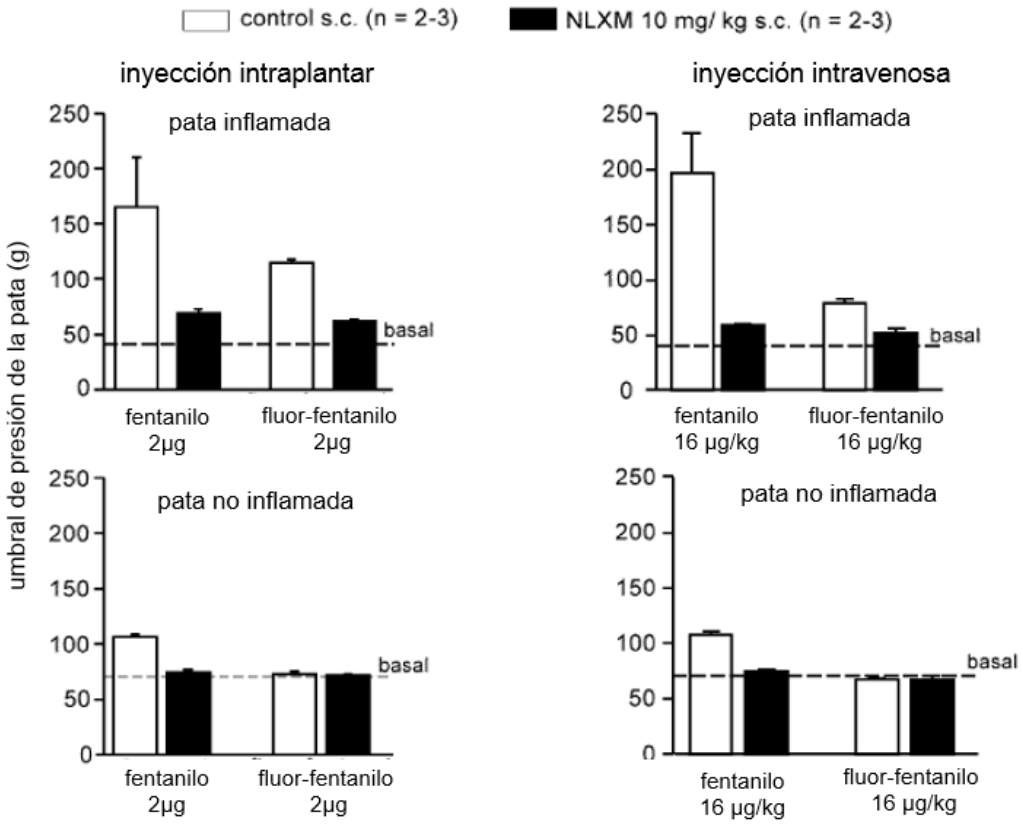
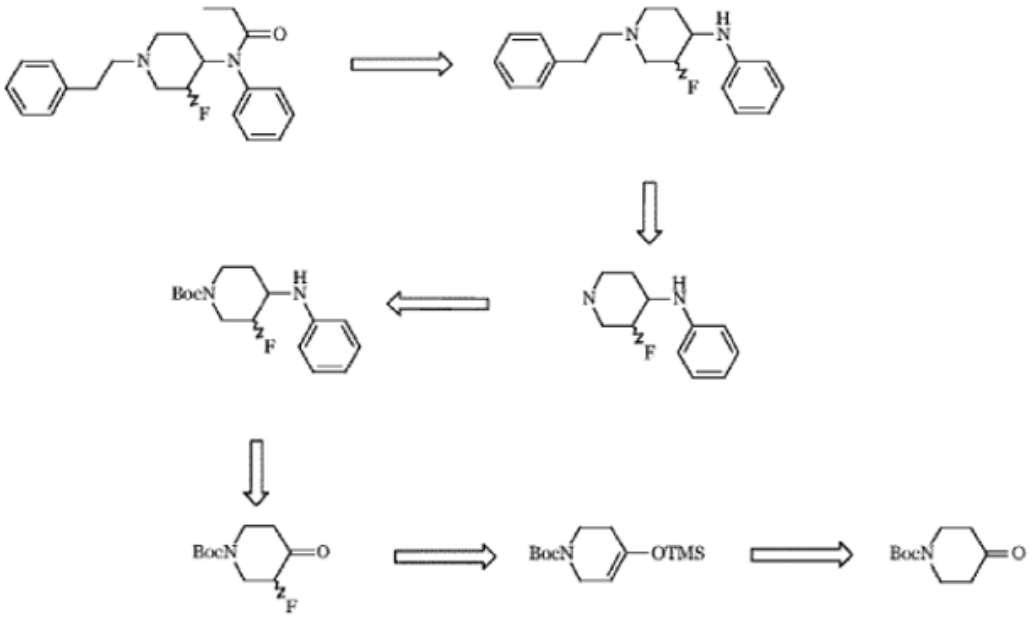

control s.c. (n = 2-3)
NLXM 10 mg/ kg s.c. (n = 2-3)
inyección intraplantar
inyección intravenosa
pata inflamada
pata no inflamada
umbral de presión de la pata (g)
250
200
150
100
50
0
basal
fentanilo 2µg
fluor-fentanilo 2µg
fentanilo 16 µg/kg
fluor-fentanilo 16 µg/kg

Fig. 8

Esquema de síntesis:



Paso 1:

Ciclohexano // Etilacetato 10:1 // $KMnO_4$

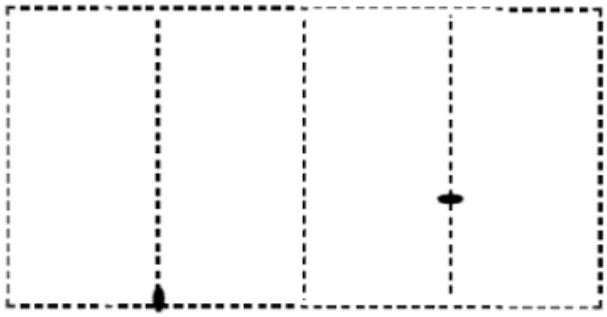
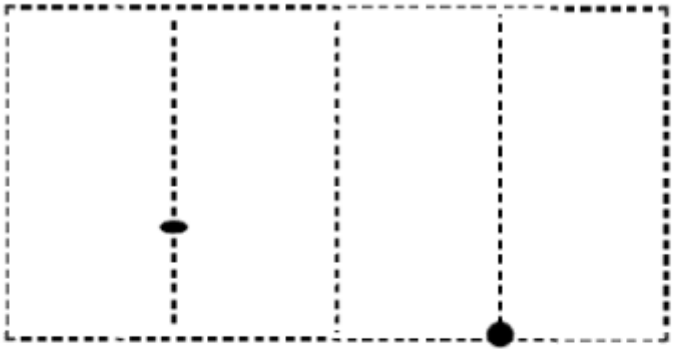


Fig. 8 (cont.)

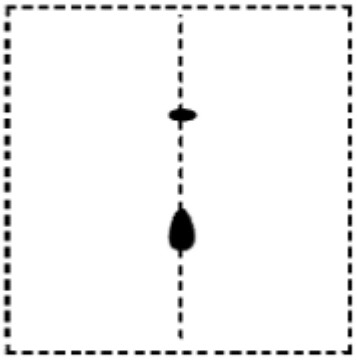
Paso 2:

Ciclohexano // Etilacetato 10:1 // $KMnO_4$



Reactante Producto

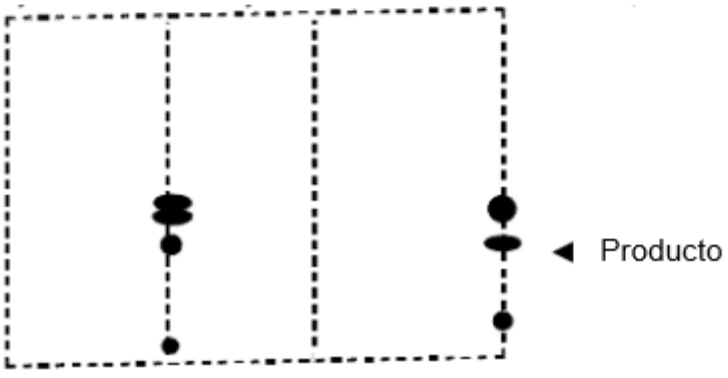
Ciclohexano // Etilacetato 10:1 // $KMnO_4$



Producto

Paso 3:

Ciclohexano // Etilacetato 3:1 // UV y $KMnO_4$

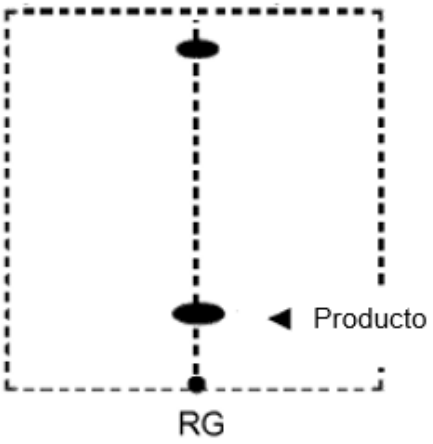


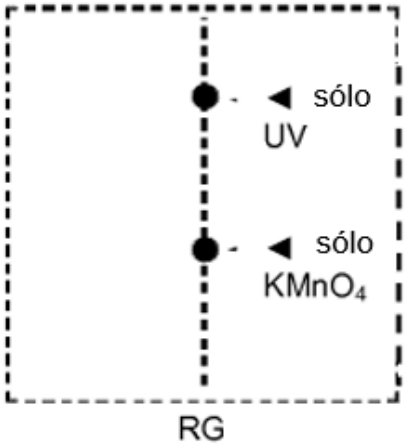
UV $KMnO_4$

Fig. 8 (cont.)

Paso 5:

Ciclohexano // Etilacetato 3:1 // $KMnO_4$ / UV



Paso 6:

Ciclohexano // Etilacetato 1:2 // UV / $KMnO_4$