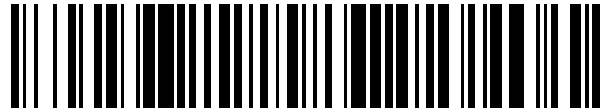


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 035**

51 Int. Cl.:

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016 PCT/GB2016/051122**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016 E 16718885 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3285767**

54 Título: **Tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

24.04.2015 GB 201507048

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

17.07.2019

73 Titular/es:

**BENEVOLENTAI CAMBRIDGE LIMITED (100.0%)
4-8 Maple Street
London W1T 5HD, GB**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ, ISABEL;
PRITCHARD, MARTYN y
RICHARDSON, PETER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 035 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

Tratamiento del dolor

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso del inhibidor de SAAO (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato, y las sales del mismo, en el tratamiento del dolor.

Antecedentes de la invención

La actividad de la amina oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO) es una actividad enzimática expresada por la Proteína-1 de Adhesión Vasculare (VAP-1) o amina oxidasa que contiene cobre 3 (AOC3), pertenece a la familia de amina oxidasas que contienen cobre (EC.1.4.3.6). Por tanto, los inhibidores de la enzima SSAO también pueden modular las funciones biológicas de la proteína VAP-1.

Se ha observado actividad de SSAO en una variedad de tejidos que incluyen tejido muscular liso vascular y no vascular, endotelio y tejido adiposo [Lewinsohn, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1984**, 17, 223-256; Nakos & Gossrau, *Folia Histochem. Cytobiol.* **1994**, 32, 3-10; Yu et al., *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 1055-1059; Castillo et al., *Neurochem. Int.* **1998**, 33, 415-423; Lyles & Pino, *J. Neural. Transm. Suppl.* **1998**, 52, 239-250; Jaakkola et al., *Am. J. Pathol.* **1999**, 155, 1953-1965; Morin et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 297, 563-572; Salmi & Jalkanen, *Trends Immunol.* **2001**, 22, 211-216]. Adicionalmente, la proteína SSAO se encuentra en el plasma sanguíneo y esta forma soluble parece tener propiedades similares a las de la forma ligada a tejido [Yu et al., *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 1055-1059; Kurkijarvi et al., *J. Immunol.* **1998**, 161, 1549-1557].

La función fisiológica precisa de esta enzima abundante todavía no se ha determinado completamente, pero parece que la SSAO y sus productos de reacción pueden presentar varias funciones en la señalización y regulación celular. Por ejemplo, descubrimientos recientes sugieren que la SSAO desempeña una función en la captación de glucosa mediada por GLUT4 [Enrique-Tarancon et al., *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 8025-8032; Morin et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 297, 563-572] y en la diferenciación de adipocitos [Fontana et al., *Biochem. J.* **2001**, 356, 769-777; Mercier et al., *Biochem. J.* **2001**, 358, 335-342]. Adicionalmente, se ha demostrado que la SSAO está implicada en procesos inflamatorios en los que actúa como proteína de adhesión para leucocitos [Salmi & Jalkanen, *Trends Immunol.* **2001**, 22, 211-216; Salmi & Jalkanen, en "Adhesion Molecules: Functions and Inhibition" K. Ley (Ed.), 2007, pág. 237-251], y también podría desempeñar un papel en el desarrollo y mantenimiento de la matriz de tejido conectivo [Langford et al., *Cardiovasc. Toxicol.* **2002**, 2(2), 141-150; Goktürk et al., *Am. J. Pathol.* **2003**, 163(5), 1921-1928]. Además, recientemente se ha descubierto una conexión en la SSAO y la angiogénesis [Noda et al., *FASEB J.* **2008**, 22(8), 2928-2935], y en base a esta conexión se espera que los inhibidores de SSAO tengan un efecto anti-angiogénico.

Varios estudios en humanos han demostrado que la actividad de SSAO en plasma sanguíneo se eleva en afecciones tales como el fallo cardíaco congestivo, la diabetes mellitus, la enfermedad de Alzheimer y la inflamación [Lewinsohn, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1984**, 17, 223-256; Boomsma et al., *Cardiovasc. Res.* **1997**, 33, 387-391; Ekblom, *Pharmacol. Res.* **1998**, 37, 87-92; Kurkijarvi et al., *J. Immunol.* **1998**, 161, 1549-1557; Boomsma et al., *Diabetologia* **1999**, 42, 233-237; Meszaros et al., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1999**, 24, 299-302; Yu et al., *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1647(1-2), 193-199; Mátyus et al., *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11(10), 1285-1298; O'Sullivan et al., *Neurotoxicology* **2004**, 25(1-2), 303-315; del Mar Hernandez et al., *Neurosci. Lett.* **2005**, 384(1-2), 183-187]. Se ha sugerido que los aldehídos reactivos y el peróxido de hidrógeno producidos por las amina oxidasas endógenas contribuyen a la progresión de enfermedades cardiovasculares, complicaciones diabéticas y la enfermedad de Alzheimer [Callingham et al., *Prog. Brain Res.* **1995**, 106, 305-321; Ekblom, *Pharmacol. Res.* **1998**, 37, 87-92; Yu et al., *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1647(1-2), 193-199; Jiang et al., *Neuropathol Appl Neurobiol.* **2008**, 34(2), 194-204]. Adicionalmente, la actividad enzimática de SSAO está implicada en el proceso de extravasación de leucocitos en las zonas de inflamación en las que se ha demostrado que la SSAO se expresa fuertemente en el endotelio vascular [Salmi et al., *Immunity* **2001**, 14(3), 265-276; Salmi & Jalkanen, en "Adhesion Molecules: Functions and Inhibition" K. Ley (Ed.), 2007, pág. 237-251]. Por consiguiente, se ha sugerido que la inhibición de SSAO tiene un valor terapéutico en la prevención de complicaciones diabéticas y en enfermedades inflamatorias [Ekblom, *Pharmacol. Res.* **1998**, 37, 87-92; Salmi et al., *Immunity* **2001**, 14(3), 265-276; Salter-Cid et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315(2), 553-562].

El documento WO2007/146188 muestra que el bloqueo de la actividad de SSAO inhibe el reclutamiento de leucocitos, reduce la respuesta inflamatoria, y se espera que sea beneficioso para la prevención y el tratamiento de ataques, por ejemplo, de epilepsia.

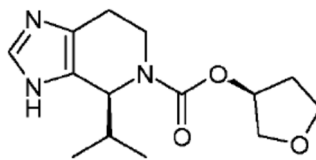
O'Rourke et al (J Neural Transm. 2007; 114(6): 845-9) examinaron el potencial de los inhibidores de SSAO en enfermedades neurológicas, habiendo demostrado previamente la eficacia de la inhibición de SSAO en un modelo de rata de apoplejía. Se evalúa un inhibidor de SSAO en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) con remisión de relapso, un modelo de ratón que comparte muchas características con la esclerosis múltiple humana. Los datos demuestran el beneficio clínico potencial de la terapia anti-SSAO con moléculas pequeñas en este modelo y, por tanto, en el tratamiento de la esclerosis múltiple humana.

Los animales con SSAO bloqueada son manifiestamente fenotípicamente normales, pero exhiben una marcada reducción de las respuestas inflamatorias activadas en respuesta a diversos estímulos inflamatorios [Stolen et al., *Immunity* **2005**, 22(1), 105-115]. Adicionalmente, el antagonismo de su función en animales naturales en múltiples modelos animales de enfermedad humana (p.ej., inflamación de zarpa inducida por carragenanos, colitis inducida por oxazolona, inflamación de pulmón inducida por lipopolisacáridos, artritis inducida por colágeno, uveítis inducida por endotoxina) por el uso de anticuerpos y/o moléculas pequeñas se ha demostrado que es protector en la reducción de la infiltración de leucocitos, reduciendo la gravedad del fenotipo de la enfermedad y reduciendo los niveles de citocinas y quimiocinas inflamatorias [Kirton et al., *Eur. J. Immunol.* **2005**, 35(11), 3119-3130; Salter-Cid et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315(2), 553-562; McDonald et al., *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **2007**, 42, 229-243; Salmi & Jalkanen, en "*Adhesion Molecules: Functions and Inhibition*" K. Ley (Ed.), **2007**, pág. 237-251; Noda et al., *FASEB J.* **2008**, 22(4), 1094-1103; Noda et al., *FASEB J.* **2008**, 22(8), 2928-2935]. Esta protección anti-inflamatoria parece proporcionarse en una amplia variedad de modelos inflamatorios, todos con mecanismos causativos independientes, más que estar restringida a una enfermedad o modelo de enfermedad particular. Esto sugeriría que la SSAO puede ser un punto nodal clave para la regulación de la respuesta inflamatoria, y por lo tanto es probable que los inhibidores de SSAO serán fármacos anti-inflamatorios efectivos en un amplio rango de enfermedades humanas y de animales. La VAP-1 también ha sido implicada en la progresión y mantenimiento de enfermedades fibróticas que incluyen las del hígado y el pulmón. Weston y Adams (*J Neural Transm.* **2011**, 118(7), 1055-64) han resumido los datos experimentales que implican la VAP-1 en la fibrosis hepática, y Weston et al (EASL Poster 2010) publicaron que el bloqueo de VAP-1 aceleró la resolución de la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono. Adicionalmente, la VAP-1 ha sido implicada en la inflamación del pulmón (p.ej., Singh et al., **2003**, *Virchows Arch* 442: 491-495), lo que sugiere que los bloqueadores de VAP-1 reducirían la inflamación pulmonar y de este modo serían beneficiosos para el tratamiento de la fibrosis quística a través del tratamiento tanto de aspectos pro-fibróticos como pro-inflamatorios de la enfermedad.

La SSAO (VAP-1) está regulada al alza en el cáncer gástrico y ha sido identificada en la vasculatura tumoral de melanoma, hepatoma y tumores de cabeza y cuello humanos (Yoong KF, McNab G, Hubscher SG, Adams OH. (1998), *J Immunol* **160**, 3978-88.; Irljala H, Salmi M, Alanen K, Gre'nman R, Jalkanen S (2001), *Immunol.* **166**, 6937-6943; Forster-Horvath C, Dome B, Paku S, et al. (2004), *Melanoma Res.* **14**, 135-40.). Un artículo (Marttila-Ichihara F, Castermans K, Auvinen K, Oude Egbrink MG, Jalkanen S, Griffioen AW, Salmi M. (2010), *J Immunol.* **184**, 3164-3173) ha demostrado que los ratones que portan VAP-1 enzimáticamente inactiva desarrollan melanomas más lentamente, y presentan una reducción del número y el diámetro de vasos sanguíneos tumorales. El crecimiento reducido de estos tumores también se vio reflejado en la reducción (en un 60-70%) de la infiltración de células supresoras mieloides. De modo alentador, la deficiencia de VAP-1 no tuvo ningún efecto en la formación de vasos o linfa en el tejido normal.

Por las anteriores razones, es de esperar que la inhibición de SSAO reduzca los niveles de productos enzimáticos pro-inflamatorios (aldehídos, peróxido de hidrógeno y amoníaco), a la vez que reduce también la capacidad adhesiva de las células inmunes y consecuentemente su activación y extra-vasado final. Las enfermedades en las que se espera que este tipo de actividad sea beneficiosa terapéuticamente incluyen todas las enfermedades en las que las células inmunes desempeñan un papel destacado en la iniciación, mantenimiento o resolución de la patología, tales como enfermedades inflamatorias y enfermedades inmunes/autoinmunes. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen esclerosis múltiple, artritis y vasculitis.

El documento WO2010/031789 (cuyo contenido se incorpora a la presente memoria a modo de referencia) describe una clase prometedora de compuestos inhibidores de SSAO, especialmente prometedor es el Ejemplo 16, que es la base libre de (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato, y tiene la siguiente estructura:



El dolor es una condición desagradable que puede interferir con la calidad de vida de una persona. Existe una necesidad médica no satisfecha de nuevos tratamientos para el dolor.

Sumario de la invención

Tras una investigación extensiva, se ha descubierto que el (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato es sorprendentemente efectivo en el tratamiento del dolor.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra el efecto de (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato en el modelo de hiperalgesia (dolor) térmica inducida por CFA.

Definiciones

El término “dolor” tal como se usa en la presente memoria incluye dolor inflamatorio. En una realización, el dolor es dolor inflamatorio.

5 “Tratamiento” tal como se usa en la presente memoria incluye la profilaxis del trastorno o afección nombrado, o el alivio o eliminación del trastorno una vez establecido.

“Una cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de un compuesto que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible mediante algún test o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto).

10 “Farmacéuticamente aceptable” significa que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica y no es indeseable ni biológicamente ni de ningún otro modo, y que incluye ser útil para uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano.

15 A menos que se indique lo contrario, el término “(3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato” tal como se usa en relación con la forma de sal cristalina descrita en la presente memoria incluye una mezcla de los enantiómeros (3S,4S) y (3R,4R). En una realización, el (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato, y las sales del mismo, tienen una pureza absoluta de >95%, preferiblemente de >99%, más preferiblemente de >99,5%. En una realización, el (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato se refiere al enantiómero (3S, 4S) que tiene una pureza enantiomérica de >95%, preferiblemente de >99%, más preferiblemente de >99,5%. En una realización (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato tiene una pureza diastereoisomérica de >95%, preferiblemente de >99%, más preferiblemente de >99,5%.

Descripción detallada de la invención

25 El (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato puede usarse como tal o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de adición ácida derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos, tal como hidroclouros, hidrobromuros, *p*-toluenosulfonatos, fosfatos, sulfatos, percloratos, acetatos, trifluoroacetatos, propionatos, citratos, malonatos, succinatos, lactatos, oxalatos, tartratos y benzoatos. Para una revisión de sales, véase el “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

30 Las sales también se pueden formar con bases. Dichas sales incluyen sales derivadas de bases inorgánicas u orgánicas, por ejemplo, sales de metales alcalinos tal como sales de magnesio o calcio, y sales de amina orgánica tales como sales de morfolina, piperidina, dimetilamina o dietilamina. Una sal particular es la sal de mesilato. Una sal alternativa es la sal de sulfato, que existe como un hidrato. En una realización, el hidrato es (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato sulfato 1,5 H₂O.

35 Una dosis típica es de 2 a 20 mg/kg, administrada una o más veces al día o por infusión continua. Una dosis diaria total típica para un humano es de 1 a 2000 mg/día, preferiblemente entre 200 y 2000 mg/día, más preferiblemente entre 500 y 2000 mg/día.

40 El (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato se puede administrar en una variedad de formas de dosis. Así, se puede administrar oralmente, por ejemplo, como un comprimido, una cápsula, una pastilla, una píldora, una suspensión acuosa u oleaginoso, un polvo o gránulo dispersable. El fármaco se administra preferiblemente por ruta oral. Debe entenderse, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la combinación de fármacos y la gravedad de la afección particular a la que se está aplicando la terapia.

45 Una composición farmacéutica que contiene el ingrediente activo puede adoptar cualquier forma adecuada, por ejemplo, disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas, polvos o gránulos dispersables, parches transdérmicos o transmucosales, cremas, pomadas o emulsiones.

50 La composición farmacéutica puede adoptar la forma de una disolución o suspensión acuosa o no acuosa (p.ej., oleaginoso) inyectable estéril. La preparación inyectable estéril también puede estar en una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable y no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, disolución tamponada de fosfato, disolución de Ringer y disolución de cloruro sódico isotónica. Adicionalmente, convencionalmente se emplean aceites estériles fijos como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, que incluye mono- o di-glicéridos sintéticos. Adicionalmente, los ácidos grasos como el ácido oleico tienen utilidad en la preparación de inyectables. Las suspensiones pueden formularse según la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión adecuados.

Las suspensiones acuosas contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinil-pirrolidona, goma de tragacanto y goma acacia; agentes dispersantes o humectantes tales una fosfatida natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo polioxietilen estearato, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo polioxietilen sorbitán monooleato. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, etil o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tal como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones no acuosas (es decir, aceitosas) se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones aceitosas pueden contener un agente espesantes, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Estas composiciones se pueden preservar mediante la adición de un anti-oxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión adecuados son conocidos.

El agente activo también se puede administrar en la forma de supositorios para administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ordinaria pero líquido a la temperatura rectal, y que por tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son manteca de cacao y polietilen glicoles.

Para administración tópica, se pueden emplear parches transdérmicos y transmucosales, cremas, pomadas, gelatinas, disoluciones o suspensiones. Para administración sub-lingual, se pueden usar formulaciones de comprimidos de disolución rápida, así como una serie de las presentaciones descritas anteriormente. Para administración oral, el fármaco se puede administrar como comprimidos, cápsulas o líquidos.

El siguiente estudio proporciona evidencias sobre las que se basa la presente invención.

Se investigó el (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato (Figura 1) en el modelo de hiperalgesia térmica de CFA, que es un modelo establecido para el dolor inflamatorio. Se observó que (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato es efectivo de un modo dependiente de la dosis, y comparable en eficacia a la indometacina de comparación de patrón oro. Más detalladamente:

Evaluación de sal de mesilato de (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato sobre la hipersensibilidad en ratas inducida por CFA (Adyuvante Completo de Freund)

La evaluación de las propiedades anti-hiperalgésicas de la sal de mesilato de (3S)-tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato se determinó a través de la medida de la carga de peso tras hipersensibilidad inducida por CFA. Las ratas naive distribuyen su peso corporal por igual entre las dos zarpas traseras. Sin embargo, cuando la zarpa inyectada (izquierda) está dolorida, el peso se redistribuye de tal modo que se apoya menos peso en la zarpa afectada (disminuye la carga de peso en la zarpa lesionada). Se midió la carga de peso en cada miembro usando un evaluador de incapacitación de rata (Linton Instruments, R.U.). Las ratas fueron colocadas en el evaluador de incapacitación con las zarpas traseras en sensores separados y se registró la fuerza media ejercida por ambos miembros traseros durante 4 segundos. La inyección de CFA también induce un edema que puede ser evaluado a través del volumen de zarpa; éste se mide usando un pletismómetro. La zarpa trasera de la rata se coloca en el cilindro que contiene una disolución y el volumen de líquido desplazado determina el volumen de zarpa.

Ratas Sprague Dawley naive macho fueron aclimatadas con comida y agua disponibles ad libitum. Se llevó a cabo la habituación al evaluador de incapacitación. Se tomaron registros de línea base de carga de peso y de volumen de zarpa antes de la inducción del agravio. La hipersensibilidad inflamatoria fue inducida mediante inyección intraplantar de CFA (100 µL de disolución 1 mg/mL) en la zarpa trasera izquierda. Se realizó una medida pre-tratamiento de la carga de peso y del volumen de zarpa para establecer la hipersensibilidad 23 horas después de CFA. A continuación los animales fueron clasificados y aleatorizados según la ventana de CFA en un diseño de cuadro latino. Entonces se administró la sal de mesilato de (3S)-tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato a 150, 250 y 500 mg/kg p.o. (dosificada en agua a 2 mL/Kg, pH ~5-6), junto con vehículo y grupo de referencia (indometacina), n=9-10 por grupo. Se determinó la carga de peso en todos los grupos 1, 2 y 4 horas después de la administración del compuesto. El volumen de zarpa se determinó 4 horas después de la administración. Los datos fueron analizados comparando los grupos de tratamiento con el grupo de control para cada tiempo.

Las lecturas de carga de peso (g) se tomaron tanto para las zarpas traseras derechas como para las izquierdas y se calculó la diferencia. Los datos se expresan como % de reversión de la hipersensibilidad al dolor, (lectura post-dosis – lectura pre-dosis)/ (lectura naive – lectura pre-dosis) x 100, en donde la diferencia de carga de peso naive – carga de peso pre-dosis se define como la ventana CFA a revertir. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante medidas ANOVA repetidas seguido de test de comparación Planificada usando InVivoStat (invivostat.co.uk), ($p < 0,05$ se consideró significativo).

La sal de mesilato de (3S)-tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato a 150 mg/kg no mostró una reversión significativa de la hipersensibilidad para ningún tiempo, 250 mg/kg mostró una reversión significativa a 4 horas, sin embargo 500 mg/kg fue efectivo para todos los tiempos con efecto máximo observado a las 4 horas post dosis. No se observó efecto en el volumen de zarpa con sal de mesilato de (3S)-tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato.

Síntesis

Se han usado las siguientes abreviaturas:

Ac.	Acuoso
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
ee	Exceso enantiomérico
ES ⁺	Electrospray
EtOAc	Acetato de etilo
h	Hora(s)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
LCMS	Espectrometría de masas de cromatografía de líquidos
M	Molar
MeOH	Metanol
[MH ⁺]	Ion molecular protonado
min	Minutos
RP	Fase inversa
MS	Espectrometría de masas
R _T	Tiempo de retención
sat	Saturado
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético

Métodos experimentales

Todos los reactivos eran de grado comercial y se usaron tal cual se recibieron sin ninguna purificación adicional, a menos que se especifique lo contrario. Se usaron disolventes de grado reactivo en todos los casos.

La analítica LCMS se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Waters ZQ conectado a un sistema de HPLC Agilent 1100. El análisis de HPLC se llevó a cabo en un sistema Agilent 1100. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvieron en un Agilent MSD-TOF conectado a un sistema de HPLC Agilent 1100. Durante los análisis se comprobó la calibración mediante dos masas y se corrigió automáticamente cuando fue necesario. Los espectros se adquieren en modo de electrospray positivo. El rango de masas adquirido fue de m/z 100-1100. Se usó detección de perfil de los picos de masas. La cromatografía flash se llevó a cabo en un sistema CombiFlash Companion equipado con columnas de sílice RediSep o en un sistema Flash Master Personal equipado con gigatubos de sílice Strata SI-1. La HPLC de fase inversa se llevó a cabo en un sistema Gilson (bomba Gilson 322 con bomba de equilibrado Gilson

321 y automuestreador Gilson 215) equipado con columnas Phenomenex SynergiHydro RP 150 x 10 mm, YMC ODS-A 100/150 x 20 mm o Chirobiotic T 250 x 10 mm. La cromatografía en columna de fase inversa se llevó a cabo en un sistema Gilson (bomba Gilson 321 y colector de fracciones Gilson FC204) equipado con columnas de sílice Merck LiChroprep® RP-18 (40-63 µm). Los compuestos se nombraron automáticamente usando ACD 6.0. Todos los compuestos fueron secados en un horno a vacío durante una noche.

Los datos de análisis de HPLC y LCMS fueron obtenidos con:

Sistema A: Phenomenex Synergi Hydro RP (C18, 30 x 4,6 mm, 4 µm), gradiente 5-100% CH₃CN (+0,085% TFA) en agua (+0,1% TFA), 1,5 mL/min, con un tiempo de gradiente de 1,75 min, 200 nm, 30 °C; o

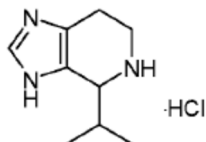
Sistema B: Phenomenex Synergi Hydro RP (C18, 150 x 4,6 mm, 4 µm), gradiente 5-100% CH₃CN (+0,085% TFA) en agua (+0,1% TFA), 1,5 mL/min, con un tiempo de gradiente de 7 min, 200 nm, 30 °C.

Los datos de HPLC quiral fueron obtenidos con:

Sistema C: Chirobiotic V polar modo iónico (150 x 4,6 mm), 70% de MeOH en tampón de formiato amónico ac. 10mM, 1,0 mL/min, a lo largo de 10 min, 200 nm, 30 °C.

INTERMEDIO 1

Hidrocloruro de 4-isopropil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridina

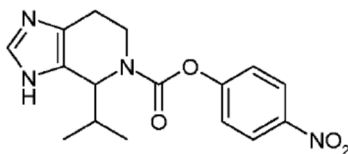


Se disolvió dihidrocloruro de histamina (61,9 g, 336 mmol) en una disolución de NaOH (33,6 g, 841 mmol) en agua (125 mL) y MeOH (500 mL), y se añadió isobutiraldehído (61,4 mL, 672 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 80 °C durante 24 h, se enfrió a temperatura ambiente, el pH se ajustó a 7 con una disolución ac. de HCl 1 M (250 mL) y los disolventes se eliminaron a vacío. El residuo se disolvió en MeOH templado (300 mL), se dejó reposar durante 1 h, se filtró y los disolventes fueron eliminados a vacío. El residuo se agitó en MeOH (50 mL) y acetona (400 mL) durante 2 h y se enfrió a 4 °C durante 2 h. El precipitado resultante se filtró y se lavó con acetona (100 mL) para dar lugar a un hidrocloreto de 4-isopropil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridina (33,0 g, 48,7%) en forma de sólido blanco.

Análisis de LCMS: pureza >90% (Sistema A, R_T = 0,51 min), ES⁺: 166,4 [MH]⁺.

INTERMEDIO 2

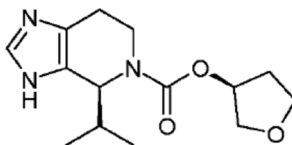
4-Nitrofenil 4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato



El Intermedio 1 (2,78 g, 8,28 mmol, 60% puro) y DIPEA (5,27 mL, 30,3 mmol) se disolvieron en DCM (100 mL). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió cloroformato de 4-nitrofenilo (4,07 g, 20,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se lavó con una disolución sat. de NaHCO₃ ac. (5 x 100 mL), se secó (MgSO₄) y los disolventes se eliminaron a vacío para dar lugar a 4-nitrofenil 4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato (5,28 g, sin purificar) en forma de goma amarilla.

Análisis de HPLC: pureza 41% (Sistema B, R_T = 4,70 min). Análisis de LCMS: pureza 86% (Sistema A, R_T = 1,70 min), ES⁺: 331,0 [MH]⁺.

(3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato



Se suspendió NaH (0,40 g, 10,0 mmol, dispersión al 60% en aceite mineral) en THF anhidro (20 mL), se enfrió a 0 °C y se añadió (S)-3-hidroxitetrahydrofurano (0,88 g, 0,68 mL, 10,0 mmol). La suspensión se agitó a 0 °C durante 30 min y a continuación se añadió a una disolución del Intermedio 2 (3,30 g, 10,0 mmol, 70% puro) en THF (60 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron dos porciones adicionales de NaH y (S)-3-hidroxitetrahydrofurano en THF después de 5 y 29 h, respectivamente. Después de 2 d la mezcla de reacción se detuvo mediante la adición de agua (10 mL) y los disolventes fueron eliminados a vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (100 mL), se lavó con una disolución ac. de Na₂CO₃ 1 M (4 x 100 mL), se secó (MgSO₄) y los disolventes fueron eliminados a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (fase normal, 20 g, Strata SI-1, gigatubo de sílice, DCM (200 mL) seguido de 2%, 4% y 5% de MeOH en DCM (200 mL de cada)) y HPLC de fase inversa (YMC ODS-A 100 x 20 mm, 5 µm, 25 mL/min, gradiente de 30% a 60% (a lo largo de 7 min) y después del 100% (3 min) de MeOH en 10% de MeOH/agua) para dar lugar a (3S)-tetrahydrofuran-3-il 4-isopropil-1,4,6,7-tetrahydro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato (34,8 mg, 1,1%) en forma de sólido blanco.

Análisis de HPLC: pureza 100% (Sistema B, R_T = 3,63 min); Análisis de LCMS: pureza 100% (Sistema B, R_T = 4,01 min), ES⁺: 280,1 [MH]⁺.

El (3S)-tetrahydrofuran-3-il-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahydro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato (39,91 mg) se disolvió en tampón de formiato amónico 10 mM y MeOH (2 mL, 1:1) y se purificó dos veces mediante HPLC quiral de fase inversa (Chirobiotic T 250 x 10 mm, 3 mL/min, experimento isocrático 70% de MeOH en tampón de formiato amónico 10 mM (40 min), pH 7,4) para dar lugar a un único diastereoisómero, el (3S)-tetrahydrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahydro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato (6,90 mg, 99% de ee).

Análisis de HPLC: pureza 100% (Sistema B, R_T = 3,63 min); HPLC quiral: pureza 99,5% (Sistema C, R_T = 2,22 min); Análisis de LCMS: pureza 100% (Sistema B, R_T = 3,90 min), ES⁺: 280,1 [MH]⁺; HRMS calculado para C₁₄H₂₁N₃O₃: 279,1583, experimental 279,1571.

(3S)-Tetrahydrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahydro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato, sal de ácido metanosulfónico (Ejemplo 1)

La base libre de (3S)-tetrahydrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahydro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato (460 mg, 1,65 mmol) se disolvió en EtOAc (10 mL) a temperatura ambiente para dar lugar a una disolución incolora transparente. Se añadió en porciones ácido metanosulfónico (107 µL) con calefacción suave. La disolución se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Los cristales resultantes fueron recolectados mediante filtración, lavados con EtOAc (2 x 10 mL) y secados durante una noche a 40°C a vacío. La sal de mesilato de (3S)-tetrahydrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahydro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5-carboxilato se obtuvo con un rendimiento del 99% (615 mg) en forma de sólido cristalino blanco. HPLC: tiempo de retención 2,27 min, pureza 99,5%. Punto de fusión: 189°C. LCMS: tiempo de retención 4,19 min, ES⁺ 280,0 [MH]⁺, 100% de pureza. HPLC quiral: tiempo de retención 3,70 min, >99,5% de. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ_H 8,72 (1H, m, NHCHNH⁺), 5,29 (1 H, m, OCH), 5,05 (0,5H, d, J 8,4Hz, CCHN), 4,89 (0,5H, d, J 7,6Hz, CCHN), 4,59 (0,5H, m, NCH_ACH_B), 4,39 (0,5H, m, NCH_ACH_B), 3,97-3,85 (4H, m, CH₂OCH₂), 3,20 (1H, m, NCH_ACH_B), 2,89 (3H, s, CH₃SO₃⁻), 2,89-2,72 (2H, m, CCH₂CH₂N), 2,23-2,07 (3H, m, CH(CH₃)₂, OCH₂CH₂), 1,16 (3H, d, J 6,4 Hz, CH₃) y 1,06-0,96 (3H, m, CH₃).

REIVINDICACIONES

1. (3S)-Tetrahidrofuran-3-il (4S)-4-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]-piridin-5-carboxilato y los hidratos y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para uso en el tratamiento del dolor.

5 2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1, y uno o más excipientes adecuados, para uso en el tratamiento del dolor.

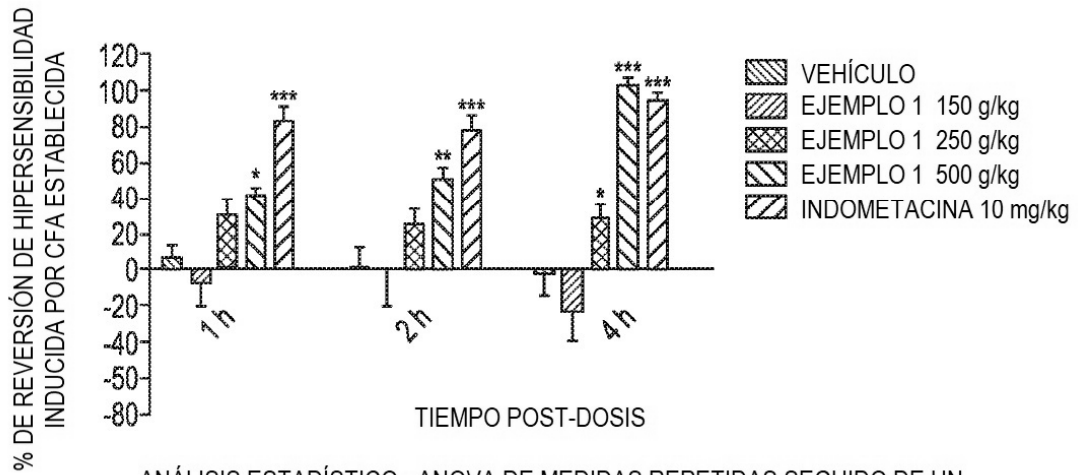
3. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el dolor es dolor inflamatorio.

4. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es el mesilato.

5. Un compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es el sulfato o un hidrato del mismo.

10

EFFECTO DEL EJEMPLO 1 EN HIPERALGESIA INDUCIDA POR CFA EN LA RATA



ANÁLISIS ESTADÍSTICO - ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS SEGUIDO DE UN TEST DE COMPARACIÓN PLANIFICADO, USANDO INVIVOSTAT
 * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 REVERSIÓN SIGNIFICATIVA DE HIPERALGESIA EN COMPARACIÓN CON VEHÍCULO PARA CADA TIEMPO

Figura 1