



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 240**

51 Int. Cl.:

C07D 217/00 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/4725 (2006.01)

A61P 13/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07764992 .9**

96 Fecha de presentación : **02.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2041094**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54

Título: **Biarilcarboxiarilamidas como moduladores del receptor vanilloide-1.**

30

Prioridad: **10.07.2006 EP 06014302**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73

Titular/es: **PHARMESTE S.R.L.**
Via Saragat 1
44100 Ferrara, IT

72

Inventor/es: **Baraldi, Pier, Giovanni;**
Borea, Pier, Andrea;
Geppetti, Pierangelo;
Pavani, Maria, Giovanna;
Fruttarolo, Francesca y
Trevisani, Marcello

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 240 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).

DESCRIPCION

Biarilcarboxiarilamidas como moduladoras del receptor vanilloide-1.

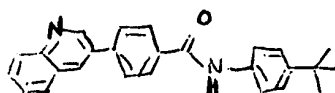
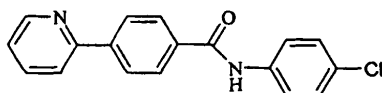
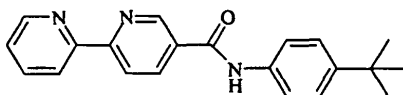
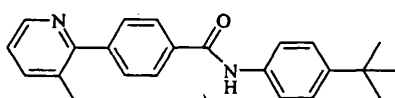
Campo de la invención

La presente invención se refiere a moduladores del receptor vanilloide, en particular a antagonistas del TRPV1.

5 Estado de la técnica

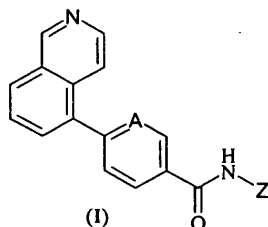
El potencial receptor transitorio vanilloide 1 (TRPV1) está fuertemente implicado en la génesis de la hiperalgesia térmica y mecánica y se le ha presentado como el responsable de un papel clave en diferentes estados patológicos que incluyen el dolor neuropático y trastornos urológicos.

10 Se conocen antagonistas del receptor vanilloide que contienen un resto biaril; La Patente WO 2004/056774¹ divulga, entre otras, las arilamidas del ácido biaril-4-carboxílico substituidas siguientes:

**15 Descripción de la invención**

Se ha encontrado ahora que reemplazando el resto piridilo o el anilo quinolein-3-ilo en los compuestos anteriores con un anillo isoquinolein-5-ilo, pueden obtenerse antagonistas del TRPV1 con propiedades mejoradas.

De acuerdo con ello, la invención proporciona moduladores del receptor vanilloide-1 mejorados de fórmula general (I)



20

en la que:

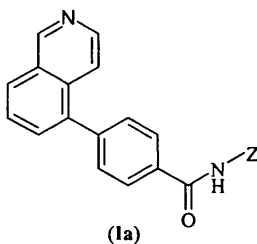
A es CH o N;

Z es un anillo fenilo o piridilo, opcionalmente substituido con uno o dos grupos R, los cuales pueden ser el mismo o diferentes entre sí y están seleccionados entre alquilo de C₁-C₄, preferiblemente metilo, isopropilo o *terc*-butilo, haloalquilo de C₁-C₄, preferiblemente trifluorometilo, o halógeno.

25

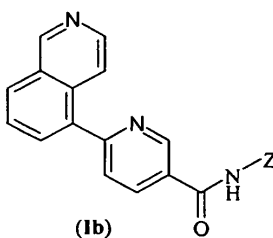
Para los fines de la presente invención, halógeno significa un átomo de halógeno seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo, preferiblemente cloro.

Un primer grupo de compuestos preferidos de la invención es el de fórmula (Ia)



en la cual Z es tal como se ha definido anteriormente.

Un segundo grupo de compuestos preferidos de la invención es el de fórmula (Ib)

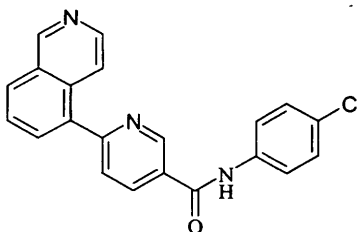


5

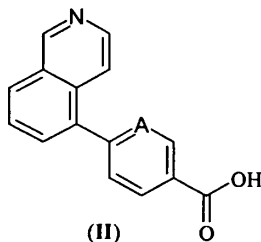
en la cual Z es tal como se ha definido anteriormente.

En los compuestos de fórmula (Ia) y (Ib), Z es preferiblemente un anillo fenilo sustituido en la posición para con un grupo R distinto de hidrógeno, preferiblemente cloro. El compuesto el más preferido de acuerdo con la invención es N-(4-clorofenil)-6-(isoquinolein-5-il)piridino-3-carboxamida (denominada en la presente invención en adelante como V394)

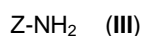
10



Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse mediante procedimientos convencionales, tales como la reacción de un compuesto de fórmula (II)

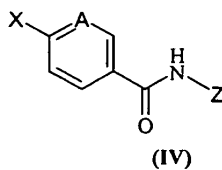


15 en la que A es tal como se ha definido anteriormente y el grupo carboxi está activado tal como cloruro, con un compuesto de fórmula (III)

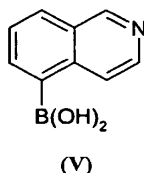


en la que Z es tal como se ha definido anteriormente.

20 Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse mediante la reacción de Suzuki² entre un compuesto de fórmula (IV)



en la que A y Z son tal como se ha definido anteriormente y X es un halógeno seleccionado entre yodo y bromo y ácido borónico (V)



- 5 Por ejemplo, el compuesto V394 se prepara de manera conveniente mediante la reacción de Suzuki entre 6-bromo-6-cloro-N-(4-clorofenil)piridino-3-carboxamida y ácido isoquinolein-5-il-5-borónico.

Los compuestos de fórmula (I) modulan el receptor vanilloide TRPV1; el compuesto preferido V394 mostró un valor K_1 de 15 nM (13-17) en la médula espinal de rata y un valor IC_{50} de 0,83 nM (0,74-0,93) en neuronas de ganglios de la raíz dorsal de rata cultivadas. De acuerdo con ello, los compuestos de la invención pueden usarse para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de estados inflamatorios, tales como dolor crónico e hiperalgesia inflamatoria. Estas formulaciones pueden prepararse mediante procedimientos y excipientes convencionales, tales como los divulgados en el Remington's Pharmaceutical Science Handbook, XVII ed. Mack Publ., N.Y., USA.

La invención se ilustrará aquí a continuación mediante el ejemplo siguiente.

15 **Ejemplo**

Materiales y procedimientos

20 Todos los compuestos disponibles comercialmente se adquirieron de Aldrich y se usaron sin purificación adicional. Los desarrollos de las reacciones se monitorizaron mediante cromatografía de capa fina sobre gel de sílice (previamente recubierta con placas Merck F₂₅₄), las manchas se examinaron con luz UV y se visualizaron con KMnO₄ acuoso. Las cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice de Merck (malla 230-240).

Los espectros de RMN-¹H se registraron sobre un espectrómetro Varian 400 MHz usando TMS como patrón interno. Los espectros de masa se obtuvieron con un espectrómetro Waters-Micromass ZMD. Los puntos de fusión se determinaron sobre un aparato Buchi-Tottoli y están sin corregir.

Ejemplo - N-(4-clorofenil)-6-(isoquinolein-5-il)piridino-3-carboxamida (V394)

25 **Etapa a) - 6-cloro-N-(4-clorofenil)piridino-3-carboxamida**

30 Se disolvió cloruro 6-cloro-nicotínico disponible comercialmente (56,8 mmol, 10 g) en 50 ml de CH₂Cl₂ anhidro y se agregó, gota a gota, a una solución de diisopropiletilamina (DIEA) (1,2 equiv., 68,2 mmol, 11,67 ml) y 4-cloroanilina (1,2 equiv., 68,2 mmol, 8,70 g) en 50 ml de CH₂Cl₂ a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas y, a continuación, se diluyó con CH₂Cl₂ (200 ml) y se lavó con agua (1 x 200 ml) y salmuera (1 x 100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró. El producto bruto se cristalizó a partir de éter dietílico, proporcionando 13 g de un sólido de color blanco. Rendimiento = 86%. RMN-¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ 7,35 (2H, d, J= 8,8 Hz), 7,47 (1H, d, J= 8,2 Hz), 7,58 (2H, d, J= 8,8 Hz), 7,88 (1H, s ancho), 8,16 (1H, dd, J= 8,4 Hz, J'= 2,8 Hz), 8,84 (1H, d, J= 2,4 Hz).

Etapa b) - ácido isoquinolein-5-il-5-borónico

35 Una solución 2,5 M de *n*-BuLi (1,2 equiv., 3 mmol, 1,2 ml) en 20 ml de THF recién destilado, enfriado a -78°C, se agregó con una solución de 5-bromoisoquinoleina (2,5 mmol, 520 mg) en 5 ml de THF. La mezcla resultante se dejó reaccionar a esta temperatura durante 45 minutos. A continuación, se agregó una solución de borato de triisopropilo (1,2 equiv., 3 mmol, 0,7 ml) y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 5 minutos y, a continuación, se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante un tiempo adicional de una hora. La mezcla se interrumpió mediante la lenta adición de una solución de NaOH al 5% (30 ml). La capa acuosa se separó y se acidificó a pH 5/6 mediante la adición de HCl al 10% a 0°C. La extracción con acetato de etilo, evaporación de la fase orgánica y cristalización a partir de éter dietílico, proporcionó 250 mg de un sólido de color blanco. Rendimiento = 58%. RMN-¹H (d₆-

DMSO, 200 MHz) δ 7,66 (1H, t, J= 7,2 Hz), 8,07 (1H, d, J= 5,8 Hz), 8,13 (1H, d, J= 8,0 Hz), 8,34 (1H, d), 8,47 (1H, d), 8,50 (2H, s ancho), 9,29 (1H, s); $[M^{+1}]$ 174,1 ($C_9H_8BNO_2$ requiere 172,98).

Etapa c) - N-(4-clorofenil)-6-(isoquinolein-5-il)piridino-3-carboxamida (reacción de Suzuki)

5 Una mezcla de ácido isoquinolein-5-il-5-borónico (1,5 equiv., 8,4 mmol, 1,46 g), 6-cloro-N-(4-clorofenil)piridino-3-carboxamida (5,6 mmol, 1,5 g), acetato de paladio (4% mol, 48 mg), trifenilfosfina (2 equiv., 2,94 g), Na_2CO_3 al 15% (4 ml), EtOH (4 ml) y tolueno (50 ml), se calentó a 80°C durante 16 horas. Después de evaporación, se agregó una solución de bicarbonato sódico saturada y el sólido precipitado se filtró y, a continuación, se lavó con acetato de etilo. El residuo se recrystalizó a partir de metanol, obteniéndose 1,4 g compuesto V394 en forma de un sólido de color blanco. P.fus. (éter dietílico) = 258°C. Rendimiento = 69%. RMN- 1H (d_6 -DMSO, 400 MHz) δ 7,471 (2H,d, J= 8,8 Hz), 7,838 (1H, m), 7,852 (2H, d, J= 8,8 Hz), 7,953 (1H, d, J= 8,0 Hz), 8,049 (1H, dd, J= 7,2 Hz, J'= 0,8 Hz), 8,085 (1H, d, J= 6,0 Hz), 8,290 (1H, d, J= 8,4 Hz), 8,490 (1H, dd, J= 8,4 Hz, J'= 2,2 Hz), 8,543 (1H, d, J= 6,0 Hz), 9,300 (1H, d, J= 1,6 Hz), 9,438 (1H, s), 10,695 (1H, s); $[M^{+1}]$ 360,4 ($C_{21}H_{14}ClN_3O$ requiere 359,81).

Ensayo biológico

15 Se usaron ratas Sprague-Dawley recién nacidas y adultas (~250 g) (Harlam, Italia). Todos los experimentos cumplieron con las directrices nacionales y fueron aprobados por el Comité de Ética Regional.

Ensayo de unión de radioligando

20 Se usaron ratas Sprague-Dawley macho con pesos corporales entre 250 a 350 g en el momento del ensayo. Para los ensayos de unión, las ratas se sacrificaron por decapitación bajo anestesia y la médula espinal se retiró y rompió usando un homogeneizador de tejidos Polytron en tampón enfriado en hielo que contenía KCl 5 mM, NaCl 5,8 mM, $CaCl_2$ 0,75 mM, $MgCl_2$ 2 mM, sacarosa 320 mM, Hepes 10 mM, pH 8,6⁵. El tejido homogeneizado se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 35000 x g durante 30 minutos a 4°C (Beckman Avanti J25). El gránulo se volvió a suspender en el mismo tampón tal como se ha descrito anteriormente y se usó en los experimentos de unión. En los experimentos de saturación, se incubaron 150 μ g de proteína/muestra procedentes de suspensiones de membrana con [3H]-Resiniferatoxin ([3H]-RTX) (0,003-3 nM) en el tampón de ensayo que contenía 0,25 mg/ml de albúmina de suero bovino libre de grasa a 37°C durante 60 minutos. En los experimentos de competencia, las membranas se incubaron a 37°C durante 60 minutos con [3H]-RTX (0,4 nM) y con concentraciones crecientes (desde 0,1 nM hasta 3 μ M) de los compuestos examinados.

30 La unión no específica se valoró en la presencia de RTX 1 μ M. Después de incubación, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se incubó con glucoproteína de α 1-ácido bovina (200 μ g por tubo) durante 15 minutos para reducir la unión RTX no específica. La RTX unida a la membrana se separó de la RTX libre mediante centrifugación de las muestras a 18500 x g durante 15 minutos. La punta del tubo de la microcentrífuga que contenía el gránulo se cortó y se determinó la radioactividad mediante recuento por centelleo (Packard 2500 TR). La concentración de proteína se determinó de acuerdo con un procedimiento Bio-Rad con albúmina de suero bovino como un patrón de referencia (Bradford, 1976). Los estudios de saturación y competencia se analizaron con el programa Ligando⁶.

35 Mediciones de fluorescencia de Ca^{2+} en neuronas de ganglios de la raíz dorsal de ratas cultivados

40 Se anestesiaron terminalmente y decapitaron ratas adultas. Los ganglios de la raíz dorsal se extirparon e introdujeron en solución tamponada con fosfato (PBS) fría antes de transferirlos a colagenasa (10 mg/ml), tripsina (5 mg/ml) y DNasa (1 mg/ml) durante 35 minutos a 37°C. Los ganglios, introducidos en DMEM frío suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin, se disociaron en células individuales mediante varias pasadas a través de una serie de agujas de jeringuilla (de 23G a 25G). El medio y los ganglios se filtraron para eliminar los residuos, se cubrieron con 8 ml de medio DMEM y se centrifugaron (200 x g durante 5 minutos). El gránulo de célula final se volvió a suspender en medio DMEM (suplementado con 100 ng/ml de Factor de Crecimiento de Nervios de ratón (NGF-7S de ratón) y base libre de citosina- β -D-arabinofuranosido (ARA-C) (2,5 μ M). Las células se sembraron sobre porta-objetos de vidrio de 25 mm recubiertos con poli-L-lisina (8,3 μ M) y laminina (5 μ M) y se mantuvieron durante 5 a 8 días a 37°C en una incubadora humidificada gaseada con CO_2 al 5% y aire, y a continuación, se agregó Fura-2-AM-éster (3 μ M) en una solución tampón de Ca^{2+} que tenía la composición siguiente (mM): $CaCl_2$ 1,4, KCl 5,4, $MgSO_4$ 0,4, NaCl 135, D-glucosa 5, HEPES 10 con BSA (0,1%), a pH 7,4, durante 40 minutos a 37°C. A continuación, las células se lavaron dos veces con solución tampón de Ca^{2+} y se transfirieron a una cámara bajo la observación de un microscopio NiKon Eclipse TE300. El Fura-2-AM-éster se excitó a 340 nM y 380 nM lo que indica cambios relativos de $[Ca^{2+}]_i$ mediante la relación F_{340}/F_{380} registrada con un sistema de análisis de imágenes dinámico (Laboratory Automation 2.0, RCS, Florencia, Italia) y las células se dejaron (al menos 10 minutos) alcanzar una fluorescencia estable antes de empezar el experimento. Se realizó una curva de calibración usando tampón que contenía Fura-2AM-éster y las concentraciones determinantes de Ca^{2+} libre. Esta curva se usó, a continuación, para convertir los datos obtenidos a partir de la relación F_{340}/F_{380} a $[Ca^{2+}]_i$ (nM)⁸. Se estudiaron los efectos de los pretratamientos con capsazepina (CPZ), SB366791 y V394 sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ producidos por capsaicina 0,1 μ M.

Alodinia secundaria inducida por capsaicina en ratas

Se inyectó capsaicina (20 nmol/50 µl/garra) en la superficie plantar de la piel lisa de la garra derecha de ratas anes-
 5 tesiadadas con éter dietílico (Chaplan, y otros, 1994). El compuesto V394 se administró oralmente (30 µmol/kg) 2
 horas antes de la inyección de capsaicina. La alodinia táctil se valoró 90 minutos después del exposición a la cap-
 saicina.

Fármacos y reactivos

Los fármacos y reactivos se obtuvieron de las compañías indicadas: [³H]-Resiniferatoxin (Perkin Elmer, Boston, MA),
 SB-366791 (Tocris, UK), capsaicina, capsazepina, ionomicina, laminina, poli-L-lisina, substancia P (Sigma, Italia);
 10 NGF-7S de ratón y colagenasa/dispasa (Roche Diagnostics, Italia); medio de Eagle Modificado de Dulbecco
 (DMEM), suero bovino fetal (FBS) térmicamente inactivado, L-glutamina (200 mM), penicilina/estreptomina (10.000
 IU/ml ± 10,000 UG/ml), (Gibco, Italia); Fura-2-AM-éster (Società Italiana Chimici, Italia). Las concentraciones madre
 de capsaicina (10 mM), capsazepina (10 mM), (E)-3-(4-clorofenil)-N-(3-metoxifenil)acrilamida (identificada como SB-
 366791) (1 mM) y V394, se prepararon en DMSO al 50% y Tween 80 al 50%. El Fura-2-AM-éster y la ionomicina se
 15 disolvieron en DMSO al 100%. Todos los otros fármacos se disolvieron en agua destilada. A continuación, se prepa-
 raron las diluciones apropiadas en solución tampón de Krebs.

Resultados**Ensayo de unión de radioligando**

La curva de saturación de [³H]-RTX para TRPV1 expresado en médula espinal de ratas mostró un valor K_D de 0,21
 (0,16-0,27) y una valor B_{máx} de 57 (53-62) fmol/mg de proteína. La representación de Scatchard fue esencialmente
 20 lineal y el análisis por ordenador de los datos indicó que únicamente había presente una clase de sitios de unión de
 alta afinidad. Los experimentos de unión de competencia de [³H]-RTX revelaron que el V394 y el SB-366791 de
 referencia tenían un valor K_i de 15 (13-17) y 36 (30-43) nM, respectivamente.

Fluorescencia de Ca²⁺

La capsaicina (0,1 µM) ocasionó un incremento en [Ca²⁺] en la extensa mayoría (95%) de neuronas de ganglios de la
 25 raíz dorsal, las cuales fueron identificadas de este modo como neuronas que expresan TRPV1. El valor IC₅₀ de **V394**
 que inhibió la movilización de [Ca²⁺] provocada por capsaicina fue de 0,83 nM (0,74-0,93). Los antagonistas de
 TRPV1 de referencia, capsaicina y SB-366791, inhibieron la respuesta de la capsaicina con un IC₅₀ de 948 (676-
 1330) nM y 8,7 (3,4-17,3) nM, respectivamente. Los resultados están expresados como media y límites de confianza
 del 95%.

Alodinia secundaria inducida por capsaicina en ratas

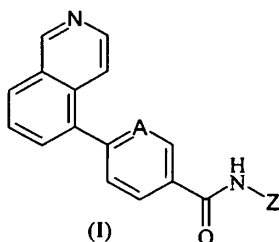
90 minutos después de exposición a la capsaicina, el compuesto V394 produjo un efecto preventivo significativo
 (55%) contra el efecto pro-alodínico de la capsaicina.

Referencias

- 35 1. Bakthavatchalam, R.; Blum, C.A.; Brielmann, H.; Darrow, J.W.; De Lombaert, S.; Yoon, T.; Zheug, X. Pa-
 tente WO 2004/056774, 170 págs.
2. Sieh, W.C.; Carlson, J.A. *J. Org. Chem.*, vol.57, págs. 379-381, (1992).
3. Zhang, J.; Assodi, J.; Charter, C.; L'hermite, N.; Weston, J. *Tetrahedron Let.*, vol. 42, págs. 6683-6686,
 (2001).
4. Meier, P.; Legraverant, S.; Mueller, S.; Schaub, J. *Synthesis*, vol. 4, págs. 551-554, (2003).
- 40 5. a) Szallasi, A. and Blunberg, P.M. *Neurosciences*, vol. 8, pág. 368, (1992). b) Szallasi, A. and Blunberg,
 P.M. *Naunym Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 347, págs. 84-91, (1993).
6. Munson, P.J.; Rodbard, D. *Anal. Biochem.*, vol. 107, págs. 220-239, (1980).
7. Rigoni, M.; Trevisani, M.; Gazzieri, D.; Nadaletto, R.; Tognetto, M.; Creminon, C.; Davis, J.B.; Campi, B.;
 Amatesi, S.; Geppetti, P.; Harrison, S. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 138, págs. 977-985, (2003).
- 45 8. Kudo, Y.; Ozaki, K.; Miyakawa, A.; Amano, T.; Ogura, A. *Jap. J. Pharmacol.*, vol. 41, págs. 345-351,
 (1986).

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula general (I)



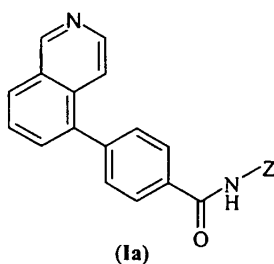
en la que:

5 A es CH o N;

Z es un anillo fenilo o piridilo, opcionalmente sustituido con uno o dos grupos R, los cuales pueden ser el mismo o diferentes entre sí y están seleccionados entre alquilo de C₁-C₄, haloalquilo de C₁-C₄, o halógeno.

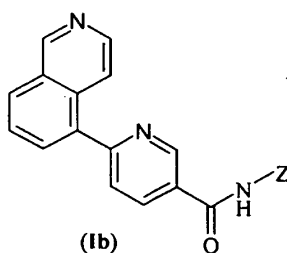
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R está seleccionado entre metilo, isopropilo, terc-butilo o trifluorometilo.

10 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de fórmula (Ia)



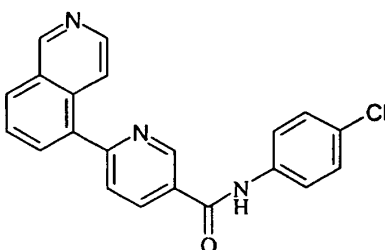
en la cual Z es tal como se define en la reivindicación 1.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de fórmula (Ib)



15 en la cual Z es tal como se define en la reivindicación 1.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 de fórmula



6. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como medicamentos.
 7. Uso de los compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trastornos urológicos.
 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la enfermedad inflamatoria es dolor neuropático.
- 5 9. Composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 mezclado con vehículos y/o excipientes aceptables farmacéuticamente.