

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 262**

51 Int. Cl.:

C07D 239/22 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 405/04 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2009 E 09757461 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2300440**

54 Título: **Antagonistas de TRPA1 de 3,4-dihidropirimidina**

30 Prioridad:

02.06.2008 EP 08157398

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

26.06.2013

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V. (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**GIJSEN, HENRICUS JACOBUS MARIA;
BERTHELOT, DIDIER, JEAN-CLAUDE y
DE CLEYN, MICHEL, ANNA, JOZEF**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

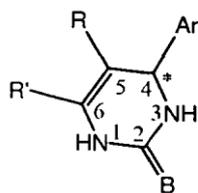
ES 2 409 262 T3

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

Antagonistas de TRPA1 de 3,4-dihidropirimidina

- 5 La presente invención se refiere a compuestos novedosos de 3,4-dihidropirimidina de fórmula (I) que tienen propiedades antagonistas del receptor TRPA1, a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos, a procedimientos químicos para preparar estos compuestos y a su uso en el tratamiento de enfermedades vinculadas a la modulación de los receptores TRPA1 en animales, en particular seres humanos.
- 10 El receptor de potencial transitorio A1 (TRPA1), anteriormente denominado receptor ANKTM1, pertenece a la familia de receptores de potencial transitorio (TRP) de canales selectivos de cationes que se ha demostrado que transducen señales mecánicas, térmicas e inflamatorias relacionadas con el dolor (véase por ejemplo *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 (2007) 989-1003; *Cell* 124 (2006) 1123-1125).
- 15 TRPA1 es un canal permeable a calcio no selectivo, que modula el potencial de membrana modulando el flujo de cationes tales como iones calcio y sodio. La desregulación de canales iónicos está asociada a menudo con estados patológicos, y compuestos que pueden modular una o más funciones de canales iónicos, incluyendo TRPA1, son de gran interés como posibles agentes terapéuticos. Activadores o agonistas del receptor TRPA1, tales como isotiocianatos (isotiocianato de ajo, el componente acre de la mostaza) y gases lacrimógenos, provocan dolor
- 20 agudo e inflamación neurógena (véase, por ejemplo *PNAS* 103 (2007) 13519-13524; *Cell* 124(2006) 1269-1282). La modulación del receptor TRPA1 puede conducir a una homeostasis mejorada del flujo de iones y el potencial de membrana.
- 25 En un modelo de dolor inducido por formalina, se ha demostrado que TRPA1 es el sitio principal de la acción generadora de dolor de la formalina *in vivo*, y la activación de TRPA1 subyace a las respuestas fisiológicas y de comportamiento asociadas con este modelo de hipersensibilidad al dolor. La activación inducida por formalina del canal TRPA1 puede atenuarse por antagonistas de TRPA1 (*PNAS* 103 (2007) 13525-13530).
- 30 Hay un interés en que la identificación y el desarrollo de ligandos del receptor TRPA1 sean de posible uso en la prevención, el tratamiento o el alivio de los síntomas de una enfermedad o estado asociado con TRPA1 (véanse por ejemplo los documentos WO 2007/073505 o WO 2007/098252 para patentes que reivindican antagonistas de TRPA1).
- 35 Las 3,4-dihidropirimidinas sin anulación del doble enlace 5-6 de la dihidropirimidina, tal como se muestran a modo de ejemplo mediante la fórmula (II), se han reivindicado como antagonistas de TRPA1 en el documento WO 2007/073505, pero en los presentes experimentos tales compuestos no mostraron antagonismo, o muy débil, en el receptor TRPA1 humano. En la bibliografía se han descrito una pocas dihidropirimidinonas (por ejemplo el compuesto A: *Indian J, Chem., sección B*, 43B (2004), 135-140. Compuestos B y C: *Phosphorous and Sulfur* 39, (1988), 211-16, véase también *Latvijas PSR Zinatnu Akademijas Vestes, Kimijas Serija* (1968), 324-7). Se han reivindicado compuestos de dihidropirimidinona de fórmula D como agentes de aclarado de lentillas en el documento EP 489991.
- 40

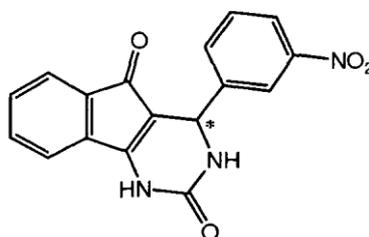


(II)

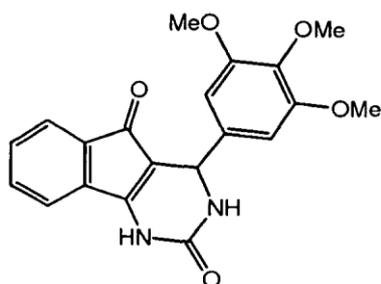
B = O o S

R = COOH, éster o amida

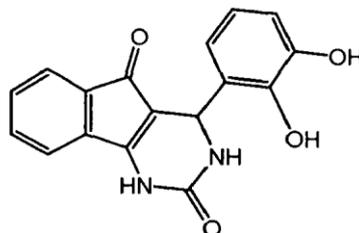
R' = alquilo o arilo



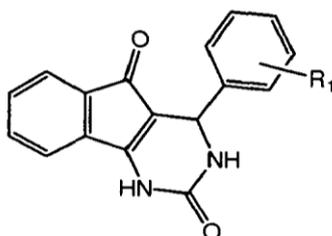
compuestos A



compuestos B



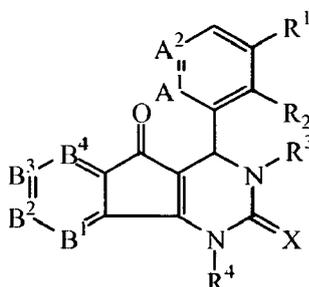
compuestos C



compuestos D

R¹ puede ser halo, NO₂, alquilo C₁₋₆, alcoxilo C₁₋₆

5 La presente invención se refiere a compuestos novedosos de fórmula (I)



(I),

incluyendo cualquier forma estereoquímicamente isomérica de los mismos, en la que:

10 A¹ y A² son ambos CR⁵, o uno de A¹ o A² es N y el otro es CR⁵, en el que cada R⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆, alquiloxilo C₁₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆ o polihaloalquiloxilo C₁₋₆;

15 B¹, B², B³ y B⁴ son todos CH, o uno de B¹, B², B³ y B⁴ es N y los otros son CH;

X es O o S;

20 R¹ es halo, hidroxilo, ciano, amino, alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquiloxilo C₁₋₆, polihaloalquiloxilo C₁₋₆, arilo, ariloxilo u OR⁶ en el que R⁶ es alquilo C₁₋₆ sustituido con hidroxilo, alquiloxilo C₁₋₄, arilo, ariloxilo, alquilcarbonilo C₁₋₄, alquilcarboniloxilo C₁₋₄ o NR⁷R⁸ en el que R⁷ y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

R² es hidrógeno, flúor, alquilo C₁₋₄ o alquiloxilo C₁₋₄;

25 y R¹ y R² pueden tomarse juntos para formar un radical -O-CH₂-O- u -OCH₂-CH₂-O-;

R³ es hidrógeno, alquilo C₁₋₄ o arilalquilo C₁₋₂;

R⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₄ o arilalquilo C₁₋₂;

30 cada arilo se selecciona, independientemente del otro, de un fenilo sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de hidrógeno, halo, hidroxilo, alquilo C₁₋₄, polihaloalquilo C₁₋₄,

alquioxilo C₁₋₄, polihaloalquioxilo C₁₋₄, ciano, nitro, amino o mono- o di-(alquil C₁₋₄)amino;

siempre que cuando X es O y A¹ y A² son ambos CR⁵ en el que R⁵ es hidrógeno y R² es hidrógeno o alquioxilo C₁₋₄ y R³ y R⁴ son hidrógeno, entonces R¹ no es halo, alquilo C₁₋₆ o alquioxilo C₁₋₆;

o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos o un solvato de los mismos o un N-óxido de los mismos.

La condición pretende que queden excluidos los compuestos proporcionados por el documento EP 0489991 o los números CAS 371142-26-6, 371131-70-3, 371129-06-5 y 371120-50-2.

Tal como se usa en las definiciones precedentes:

- halo es genérico para flúor, cloro, bromo y yodo;

- alquilo C₁₋₄ define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal y ramificada que tienen desde 1 hasta 4 átomos de carbono tales como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, 1-metiletilo, 2-metilpropilo y similares;

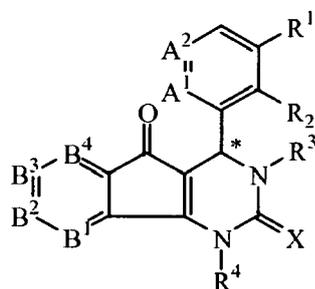
- alquilo C₁₋₆ pretende incluir alquilo C₁₋₄ y los homólogos superiores del mismo, que tienen 5-6 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, 2-metilbutilo, pentilo, hexilo y similares;

- polihaloalquilo C₁₋₄ se define como alquilo C₁₋₄ polihalosustituido, en particular alquilo C₁₋₄ (tal como se definió anteriormente en el presente documento) sustituido con de 2 a 6 átomos de halógeno tales como difluorometilo, trifluorometilo, trifluoroetilo, y similares;

- polihaloalquilo C₁₋₆ se define como alquilo C₁₋₆ polihalosustituido, en particular alquilo C₁₋₆ (tal como se definió anteriormente en el presente documento) sustituido con de 2 a 6 átomos de halógeno tales como difluorometilo, trifluorometilo, trifluoroetilo, y similares.

El término "formas estereoquímicamente isoméricas" tal como se usó anteriormente en el presente documento define todas las posibles formas isoméricas que pueden tener los compuestos de fórmula (I). A menos que se mencione o se indique lo contrario, la designación química de los compuestos indica la mezcla de todas las posibles formas estereoquímicamente isoméricas, conteniendo dichas mezclas todos los diastereómeros y enantiómeros de la estructura molecular básica. Más en particular, los centros estereogénicos pueden tener la configuración R o S; los sustituyentes en radicales saturados cíclicos (parcialmente) bivalentes pueden tener la configuración o bien cis o bien trans. Se pretende obviamente que las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de fórmula (I) estén abarcadas dentro del alcance de esta invención.

Todos los compuestos de fórmula (I) tienen al menos un átomo de carbono quiral tal como se indica en la figura a continuación con el *. Se pretende que tanto la configuración R como la S de dicho átomo de carbono quiral estén cubiertas bajo el término "formas estereoquímicamente isoméricas". Los compuestos de fórmula (I) que se han preparado como una mezcla de los enantiómeros R y S pueden resolverse para dar sus enantiómeros individuales usando técnicas de resolución conocidas en la técnica tales como por ejemplo cromatografía de fluidos supercríticos (CFS).



(I)

La configuración estereoquímica absoluta de los compuestos de fórmula (I) y de los productos intermedios usados en su preparación puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica usando métodos bien conocidos, tales como, por ejemplo, difracción de rayos X o VCD.

Además, algunos compuestos de fórmula (I) y algunos de los productos intermedios usados en su preparación pueden presentar polimorfismo. Ha de entenderse que la presente invención abarca cualquier forma polimórfica que tenga propiedades útiles en el tratamiento de los estados indicados anteriormente en el presente documento.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables tal como se mencionó anteriormente en el presente

documento pretenden comprender las formas de sal de adición de ácido no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos de fórmula (I) pueden formar. Estas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente tratando la forma de base con un ácido apropiado de este tipo. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos halogenados, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y ácidos similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y ácidos similares.

10 A la inversa, dichas formas de sal pueden convertirse mediante tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

Los compuestos de fórmula (I) pueden existir en formas tanto no solvatada como solvatada. El término 'solvato' se usa en el presente documento para describir una asociación molecular que comprende un compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua o etanol. El término hidrato se usa cuando dicho disolvente es agua.

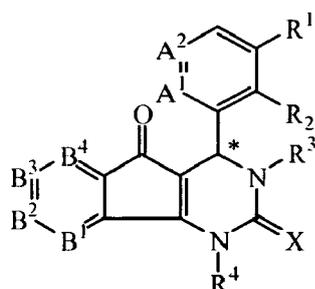
Compuestos interesantes de fórmula (I) son aquellos compuestos de fórmula (I) en los que se aplican una o más de las siguientes restricciones:

- 20 a) A^1 y A^2 son ambos CR^5 en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno o halo; o
- b) uno de A^1 y A^2 es CR^5 en el que R^5 es hidrógeno o halo y el otro de A^1 y A^2 es N; o
- 25 c) B^1 , B^2 , B^3 y B^4 son todos CH; o
- d) R^2 es hidrógeno o alquilo C_{1-4} ; o
- e) R^1 y R^2 pueden tomarse juntos para formar un $-O-CH_2-O-$; o
- 30 f) R^3 es hidrógeno o metilo; o
- g) R^4 es hidrógeno, metilo o fenilmetilo;
- 35 h) arilo es fenilo o fenilo sustituido con halo, trifluorometilo, ciano o alquilo C_{1-4} ; o
- i) el centro estereogénico en C^* tiene la configuración R.

Un grupo particular de compuestos de fórmula (I) son aquellos compuestos de fórmula (I) en los que X es S.

Otro grupo particular de compuestos de fórmula (I) son aquellos compuestos de fórmula (I) en los que A^1 y A^2 son ambos CR^5 en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno o halo; R^1 es halo, hidroxilo, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} en el que el alquilo C_{1-6} puede estar opcionalmente sustituido con alcoxilo C_{1-4} , hidroxilo, alquilcarboniloxilo C_{1-4} o NR^7R^8 en el que R^7 y R^8 son alquilo C_{1-4} .

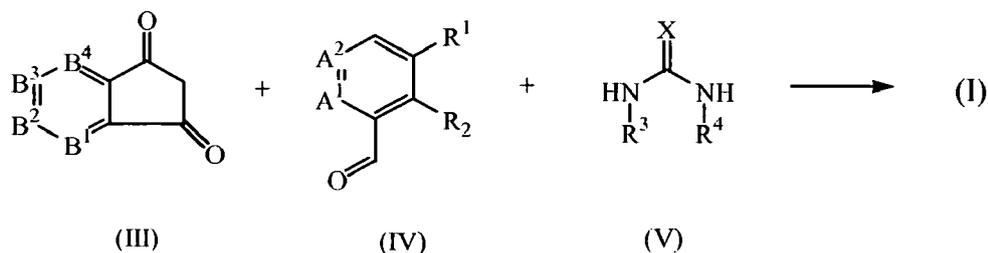
Aún otro grupo particular de compuestos de fórmula (I) son aquellos compuestos de fórmula (I) en los que A^1 y A^2 son ambos CR^5 en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno; B^1 , B^2 , B^3 y B^4 son todos CH; X es S; R^1 es alquilo C_{1-4} , en el que el alquilo C_{1-4} está opcionalmente sustituido con alcoxilo C_{1-4} o hidroxilo y el centro estereogénico en C^* tiene la configuración R.



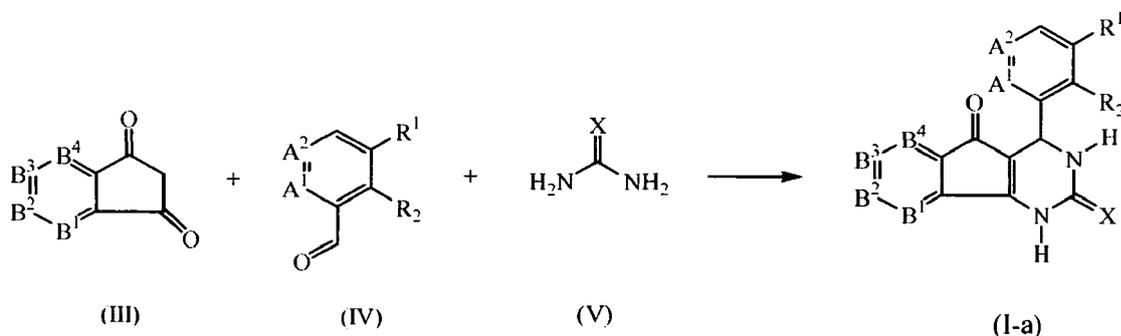
(I)

Síntesis general (rutas sintéticas)

55 En general, pueden sintetizarse compuestos de fórmula (I) mediante una reacción de condensación de múltiples componentes entre un compuesto de 1,3-dicarbonilo (III), un aldehído (IV) y (tio)urea (V).

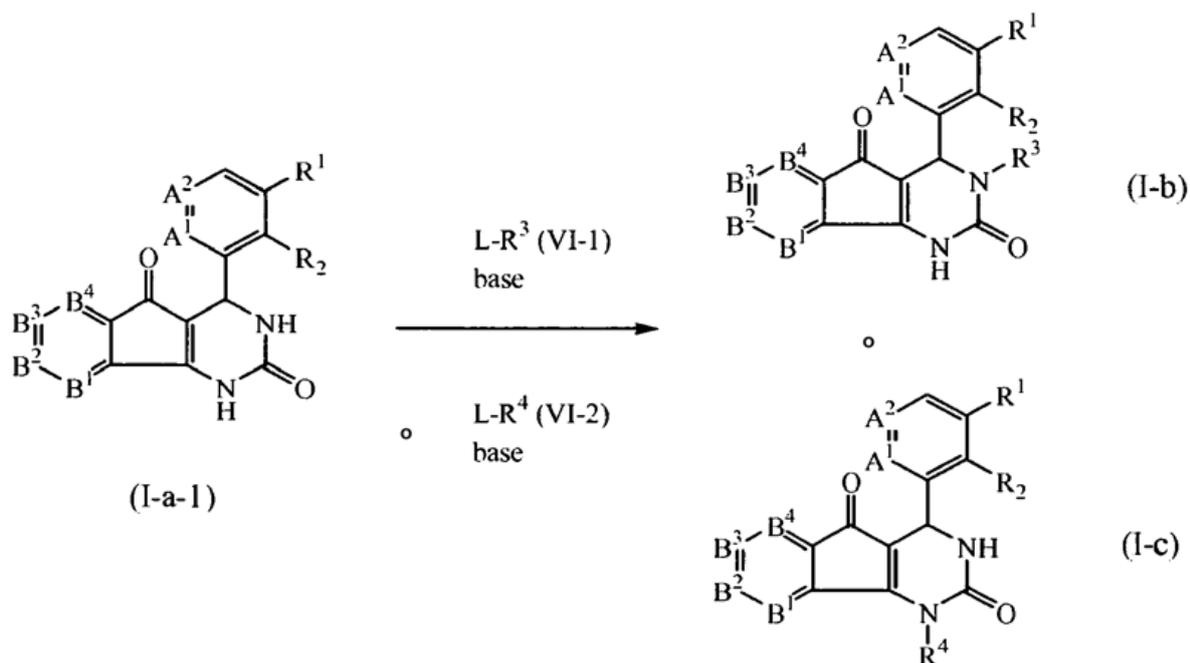


- 5 Los compuestos de fórmula (I-a), definidos como compuestos de fórmula (I) en la que R^3 y R^4 representan hidrógeno, pueden sintetizarse mediante una reacción de condensación de múltiples componentes entre un compuesto de 1,3-dicarbonilo (III), un aldehído (IV) y (tio)urea (V), conocida como reacción de Biginelli. (Para la metodología general de Biginelli véase por ejemplo Tetrahedron 336 (1993) 6937-6963. Para reacciones de Biginelli más específicas para compuestos de fórmula (I) véase por ejemplo Indian J. Chem. 43B (2004), 135-140).

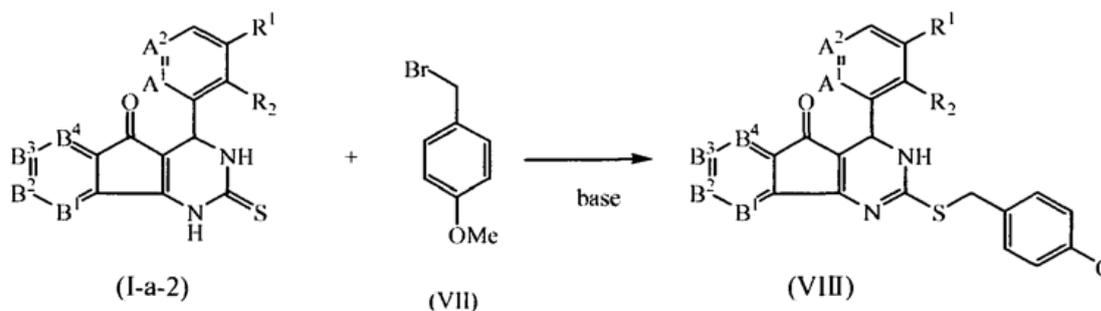


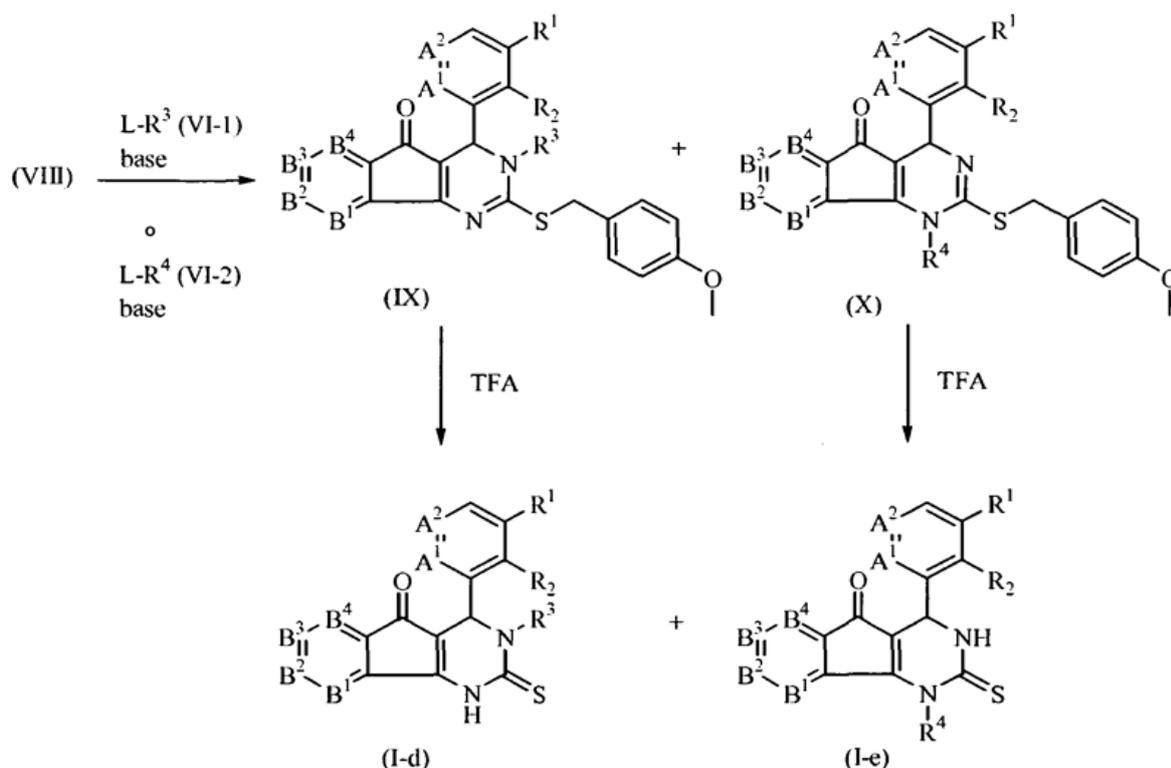
- 10 Esta reacción puede ejecutarse mezclando y calentando los componentes en presencia de un catalizador ácido de Lewis o mineral y con o sin presencia de un disolvente. Ejemplos de catalizadores útiles son HCl, HBr, H_2SO_4 , ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido p-toluenosulfónico, cloruro de trimetilsililo, yoduro de trimetilsililo, eterato de trifluoruro de boro, cloruro de cobre (I), cloruro férrico, cloruro de indio (III), triflato de iterbio, cloruro de cerio (III), cloruro de zirconio (IV), oxicloriguro de zirconio (IV), bromuro de litio, ácido fenilpirúvico, cloruro de calcio, éster de polifosfato o catalizadores de ácido de arcilla sólidos tales como arcilla montmorillonita KSF o combinaciones de estos catalizadores.
- 15
- 20 Disolventes útiles son preferiblemente disolventes polares tales acetonitrilo, ácido acético, metanol, etanol u otros alcoholes, tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona o dioxano.
- Puede realizarse el calentamiento en condiciones térmicas convencionales o en condiciones de microondas.
- 25 Pueden prepararse también compuestos de fórmula (I-a) en un procedimiento de dos etapas, en el que el producto de condensación de Knoevenagel entre (III) y (IV) se hace reaccionar con (V), tal como se describe en, por ejemplo Phosphorous and Sulfur 39, (1988), 211-16 o Chem. Heterocycl. Compd. (Engl. Transl.) 24 (1988), 936-941.

- 30 Los compuestos de fórmula (I-b) y (I-c), definidos como compuestos de fórmula (I) en la que X representa O y R^3 y/o R^4 no son hidrógeno, pueden prepararse haciendo reaccionar compuestos de fórmula (I-a-1), definidos como compuestos de fórmula (I) en la que X representa O y R^3 y R^4 representan hidrógeno, con un producto intermedio (VI), en el que L es un grupo saliente tal como halo, metanosulfoniloxilo, bencenosulfoniloxilo, trifluorometanosulfoniloxilo y grupos salientes reactivos similares, en presencia de una base adecuada tal como NaH o K_2CO_3 en un disolvente inerte para la reacción tal como por ejemplo THF, 1,4-dioxano, 2-propanona o dimetilformamida.
- 35



- Los compuestos de fórmula (I-d) y (I-e), definidos como compuestos de fórmula (I) en la que X representa S y R³ y/o R⁴ no son hidrógeno, pueden prepararse alquilando el compuesto (I-a-2), definido como compuestos de fórmula (I) en la que X representa S y R³ y R⁴ representan hidrógeno, con el reactivo (VII), para dar el producto intermedio (VIII), que puede alquilarse con un producto intermedio (VI-1) o (VI-2), en el que L es un grupo saliente tal como halo, metanosulfoniloxilo, bencenosulfoniloxilo, trifluorometanosulfoniloxilo y grupos salientes reactivos similares, en presencia de una base adecuada tal como NaH o K₂CO₃ en un disolvente inerte para la reacción tal como por ejemplo 2-propanona, 1,4-dioxano, dimetilformamida o THF para dar los productos intermedios (IX) y/o (X). Tras el tratamiento de los productos intermedios (IX) o (X) con TFA bajo calentamiento térmico o asistido por microondas, se obtienen los compuestos de fórmula (I-d) y (I-e), respectivamente.





Los sustituyentes R¹ pueden derivatizarse adicionalmente mediante transformaciones de grupo funcional convencionales para preparar los compuestos de fórmula (I) finales deseados.

5

Los materiales de partida y algunos de los productos intermedios están disponibles comercialmente o pueden prepararse según procedimientos de reacción convencionales generalmente conocidos en la técnica.

10

Los compuestos de fórmula (I) tal como se preparan en los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento pueden sintetizarse en forma de mezclas racémicas de enantiómeros que pueden separarse uno del otro siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos de fórmula (I) que se obtienen en forma racémica pueden convertirse en las formas de sal diastereoméricas correspondientes mediante reacción con un ácido quirál adecuado. Dichas formas de sal diastereoméricas se separan posteriormente, por ejemplo, mediante cristalización fraccionada o selectiva y los enantiómeros se liberan de la misma mediante un álcali. Una manera alternativa de separar las formas enantioméricas de los compuestos de fórmula (I) implica cromatografía de líquidos usando una fase estacionaria quirál. Dichas formas isoméricas estereoquímicamente puras pueden derivarse también de las correspondientes formas isoméricas estereoquímicamente puras de los materiales de partida apropiados, siempre que la reacción se produzca de manera estereoespecífica. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizará mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

20

25

Los compuestos de fórmula (I), incluyendo cualquier forma estereoquímicamente isomérica de los mismos, o sales de adición de ácido, solvatos o N-óxidos farmacéuticamente aceptables de los mismos, tienen propiedades antagonistas del receptor de potencial transitorio A1 (TRPA1) tal como se demuestra en los ejemplos farmacológicos. El ejemplo farmacológico D describe la metodología para medir el antagonismo de TRPA1 y los resultados se enumeran en la tabla 5.

30

Por tanto, los presentes compuestos de fórmula (I) son útiles como medicamento especialmente en el tratamiento de un estado o enfermedad mediado por el receptor TRPA1, en particular actividad antagonista del receptor TRPA1. Posteriormente, los presentes compuestos pueden usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado o una enfermedad mediado por la actividad de TRPA1, en particular actividad antagonista de TRPA1.

35

Preferiblemente, la presente invención proporciona también el uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de estados o enfermedades seleccionados de estados o enfermedades mediados por TRPA1.

Además, se da a conocer un método de tratamiento de un estado mediado por la actividad de TRPA1 en un sujeto mamífero que comprende administrar a un mamífero que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente

eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Estados o enfermedades mediados por TRPA1 son por ejemplo dolor, dolor crónico, sensibilidad al tacto, sensibilidad al prurito, irritación de la piel, dolor posquirúrgico, dolor por cáncer, dolor neuropático, dolor inflamatorio, migraña, neuropatía diabética, psoriasis, eczema, dermatitis, neuralgia posherpética, incontinencia urinaria, pancreatitis, osteoartritis, artritis reumatoide, mucositis oral, inhibición o estimulación del crecimiento capilar, lacrimación, lesiones oculares, blefaroespasma e irritación pulmonar (por ejemplo tos) y estimulación de la cicatrización de heridas.

El término “tratar” y “tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a tratamiento curativo, paliativo y profiláctico, incluyendo revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir la enfermedad, el trastorno o el estado al que se aplica tal término o uno o más síntomas de tal enfermedad, trastorno o estado.

Adicionalmente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I).

Con el fin de preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, se combina una cantidad eficaz del compuesto particular, en forma de sal de adición de ácido o base, como principio activo, en mezcla íntima con al menos un portador farmacéuticamente aceptable, portador que puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas están deseablemente en forma farmacéutica unitaria adecuada, preferiblemente, para administración oral, administración rectal, administración percutánea, inyección parenteral o administración tópica.

Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma farmacéutica oral, puede emplearse cualquiera de los portadores farmacéuticos líquidos habituales, tales como por ejemplo agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y disoluciones; portadores farmacéuticos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su fácil administración, comprimidos y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Para composiciones de inyección parenteral, el portador farmacéutico comprenderá principalmente agua estéril, aunque pueden incluirse otros componentes con el fin de mejorar la solubilidad del principio activo. Pueden prepararse disoluciones inyectables por ejemplo usando un portador farmacéutico que comprende una solución salina, una disolución de glucosa o una mezcla de ambas. Pueden prepararse también suspensiones inyectables usando agentes de suspensión, portadores líquidos apropiados y similares. En composiciones adecuadas para administración percutánea, el portador farmacéutico puede comprender opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, opcionalmente combinado con proporciones menores de aditivos adecuados que no provocan un efecto perjudicial significativo en la piel. Dichos aditivos pueden seleccionarse con el fin de facilitar la administración del principio activo a la piel y/o ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones tópicas pueden administrarse de diversos modos, por ejemplo, como parche transdérmico, pipeta para la aplicación en la piel o ungüento. Las sales de adición de los compuestos de fórmula (I), debido a su solubilidad en agua aumentada con respecto a la forma de base correspondiente, son obviamente más adecuadas en la preparación de composiciones acuosas.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas de la invención en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. “Forma unitaria de dosificación” tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son comprimidos (incluyendo comprimidos recubiertos o ranurados), cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, suspensiones o disoluciones inyectables, cucharillas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de los mismos.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de formas de dosis sólidas, por ejemplo, comprimidos (formas tanto tragables como masticables), cápsulas o cápsulas de gelatina, preparados por medios convencionales con excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa y similares), cargas (por ejemplo lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio y similares), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice y similares), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de patata, glicolato sódico de almidón y similares), agentes humectantes (por ejemplo laurilsulfato de sodio) y similares. Tales comprimidos pueden recubrirse también mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de por ejemplo disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden formularse como un producto seco para su mezcla con agua y/u otro portador líquido adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales, opcionalmente con otros aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo

jarabe de sorbitol, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo lecitina o goma arábica), portadores no acuosos (por ejemplo aceite de almendras, ésteres oleosos o alcohol etílico), edulcorantes, aromatizantes, agentes de enmascaramiento y conservantes (por ejemplo p-hidroxibenzoatos de propilo o metilo o ácido sórbico).

5 Edulcorantes farmacéuticamente aceptables útiles en las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden preferiblemente al menos un edulcorante intenso tal como aspartamo, acesulfamo de potasio, ciclamato de sodio, alitamo, un edulcorante de dihidrochalcona, monelina, esteviósido, sucralosa (4,1',6'-tricloro-4,1',6'-tridesoxigalactosacarosa) o, preferiblemente, sacarina, sacarina de sodio o calcio, y opcionalmente al menos un
10 edulcorante a granel tal como sorbitol, manitol, fructosa, sacarosa, maltosa, isomalt, glucosa, jarabe de glucosa hidrogenado, xilitol, caramelo o miel. Se usan convenientemente edulcorantes intensos en bajas concentraciones. Por ejemplo, en el caso de sacarina de sodio, dicha concentración puede oscilar entre aproximadamente el 0,04% y el 0,1% (peso/volumen) de la formulación final. El edulcorante a granel puede usarse eficazmente en mayores concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 35%, preferiblemente entre
15 aproximadamente el 10% y el 15% (peso/volumen).

Los aromas farmacéuticamente aceptables que pueden enmascarar componentes de sabor amargo en las formulaciones de baja dosificación son preferiblemente aromas de fruta tales como aroma de cereza, frambuesa, grosella negra o fresa. Una combinación de dos aromas puede producir muy buenos resultados. En las
20 formulaciones de alta dosificación, pueden requerirse aromas farmacéuticamente aceptables más fuertes tales como caramelo, chocolate, menta fresca, fantasía y similares. Cada aroma puede estar presente en la composición final en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,05% y el 1% (peso/volumen). Se usan ventajosamente combinaciones de dichos aromas fuertes. Preferiblemente, se usa un aroma que no experimenta ningún cambio o pérdida de sabor y/o color en las circunstancias de la formulación.

25 Los compuestos de fórmula (I) pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, convenientemente inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión intravenosa continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo en ampollas o envases de múltiples dosis, que incluyen un conservante añadido. Pueden tomar formas
30 tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de isotonización, de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar presente en forma de polvo para mezclar con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

35 Los compuestos de fórmula (I) pueden formularse también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, que contienen por ejemplo bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y/u otros glicéridos.

40 Los compuestos de fórmula (I) pueden formularse también en composiciones oftálmicas para aplicación tópica al ojo, tales como una disolución acuosa no irritante isotónica.

Los expertos en el tratamiento de enfermedades vinculadas a la mediación del receptor TRPA1 determinarán fácilmente la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) a partir de los resultados de prueba
45 presentados a continuación en el presente documento. En general, se contempla que una dosis terapéuticamente eficaz será de desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente que va a tratarse. Puede ser apropiado administrar la dosis terapéuticamente eficaz en forma de dos o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo de todo el día. Dichas subdosis pueden formularse como formas farmacéuticas unitarias, conteniendo cada una por ejemplo desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente
50 1000 mg, más particularmente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 mg, del principio activo por forma farmacéutica unitaria.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto es la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un individuo o animal, da como resultado un nivel suficientemente alto de ese compuesto en el individuo o animal como para provocar un aumento o una disminución discernible en la estimulación de receptores TRPA1.
55

La frecuencia y dosificación exactas de la administración dependen del compuesto particular de fórmula (I) usado, el estado particular que esta tratándose, la gravedad del estado que está tratándose, la edad, el peso y el estado físico general del paciente particular así como la otra medicación que el paciente pueda estar tomando, tal como conocen bien los expertos en la técnica. Además, dicha "cantidad terapéuticamente eficaz" puede disminuirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del paciente tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los compuestos de la presente invención. Los intervalos de cantidad diaria eficaz mencionados anteriormente en el presente documento son por tanto sólo pautas.
60

Parte experimental

“DIPE” se define como diisopropil éter, “DMF” se define como *N,N*-dimetilformamida, “DMSO” se define como dimetilsulfóxido, “DCM” o “CH₂Cl₂” se define como diclorometano y “THF” se define como tetrahidrofurano. El término ‘CH₃CN’ significa acetonitrilo, ‘K₂CO₃’ significa carbonato de potasio, ‘CH₃OH’ significa metanol, ‘MgSO₄’ significa sulfato de magnesio, ‘NaH’ significa hidruro de sodio, ‘EtOH’ significa etanol, ‘TFA’ significa ácido trifluoroacético, ‘EtOAc’ significa acetato de etilo.

Métodos de purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución:

10 - Método de purificación A

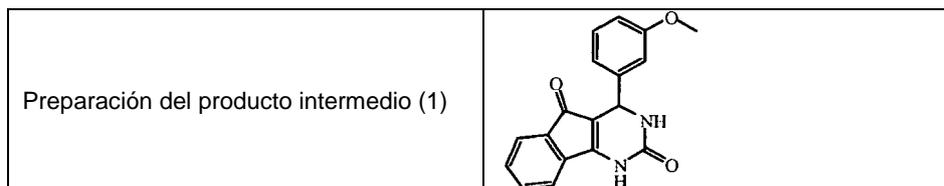
Se purificó el producto mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (Shandon Hyperprep® C18 BDS (*Base Deactivated Silica*, sílice desactivada para bases) 8 μm, 250 g, D.I. 5 cm). Se aplicó un gradiente con tres fases móviles (fase A: una disolución de NH₄HCO₃ al 0,25% en agua; fase B: CH₃OH; fase C: CH₃CN). Se recogieron las fracciones deseadas y se sometieron a tratamiento final.

- Método de purificación B

20 Se purificó el producto mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (Shandon Hyperprep® C18 BDS (sílice desactivada para bases) 8 μm, 250 g, D.I. 5 cm). Se aplicó un gradiente con tres fases móviles (fase A: el 90% de una disolución de NH₄OAc al 0,5% en agua + el 10% de CH₃CN; fase B: CH₃OH; fase C: CH₃CN). Se recogieron las fracciones deseadas y se sometieron a tratamiento final.

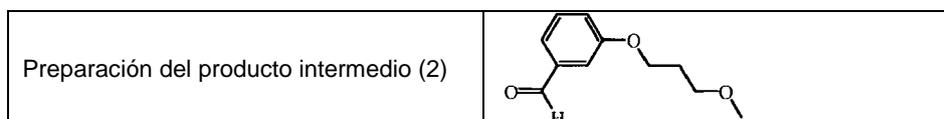
A. Síntesis de los productos intermedios

25

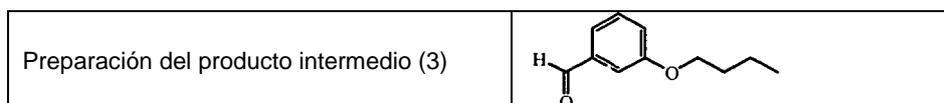
Ejemplo A.1

30 Se calentó una mezcla de urea (8 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7 mmol), 3-metoxibenzaldehído (4 mmol) y HCl acuoso concentrado (20 gotas) en acetonitrilo (30 ml) en un horno microondas a 110°C durante 20 minutos. Se separó mediante filtración el producto y se secó durante la noche a vacío. Se suspendió el producto en acetonitrilo y se sometió a reflujo durante 1 hora. Se separó mediante filtración el producto sólido y se secó a vacío durante la noche, produciendo el producto intermedio (1) usado en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

35 Ejemplo A.2



40 Se agitó una mezcla de 3-hidroxibenzaldehído (10 mmol), 3-metoxi-1-bromopropano (12 mmol) y K₂CO₃ (10 mmol) en metanol (3 ml) y se calentó en un horno microondas a 100°C durante 15 minutos. Se calentó la mezcla obtenida otros 25 minutos a 110°C. Se eliminó el disolvente bajo una corriente de nitrógeno y se extrajo el residuo sólido con hexano (3 x 50 ml). Se concentró la fase orgánica, produciendo 1,44 g del producto intermedio (2).

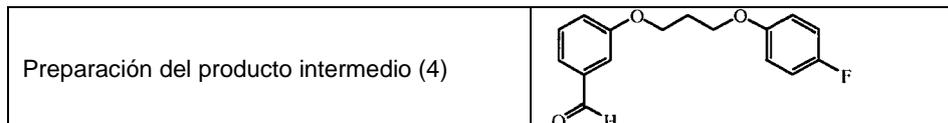
Ejemplo A.3

45

Se hizo reaccionar una mezcla de 3-hidroxibenzaldehído (2,88 g), 1-bromobutano (3 g) y K₂CO₃ (2,8 g) en metanol (6 ml) en un horno microondas durante 30 minutos a 110°C. Se evaporó a vacío el disolvente. Se trató el precipitado sólido resultante con heptano (50 ml) y se separó el sobrenadante mediante decantación (3 veces), produciendo el producto intermedio (3) usado como tal en la siguiente etapa sin análisis adicional.

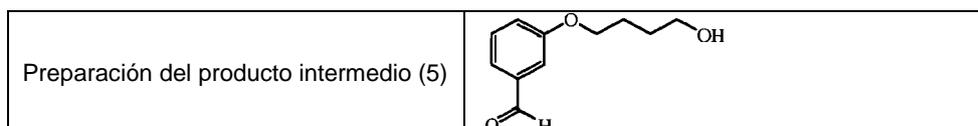
50

Ejemplo A.4



5 Se agitó una mezcla de 3-hidroxibenzaldehído (21,5 mmol), 1-(3-bromopropoxi)-4-fluorobenceno (21,5 mmol) y K_2CO_3 (23 mmol) en metanol (7 ml) y se calentó en el microondas a 100°C durante 60 minutos. Se concentraron las aguas madres a presión reducida y entonces se separaron entre agua y DCM. Se secó la fase orgánica ($MgSO_4$), se concentró y se purificó el residuo en columna de gel de sílice (eluyente CH_2Cl_2/CH_3OH de 100/0 a 99/1). Se recogieron las fracciones de producto y se evaporó el disolvente, produciendo 2,65 g del producto intermedio (4).

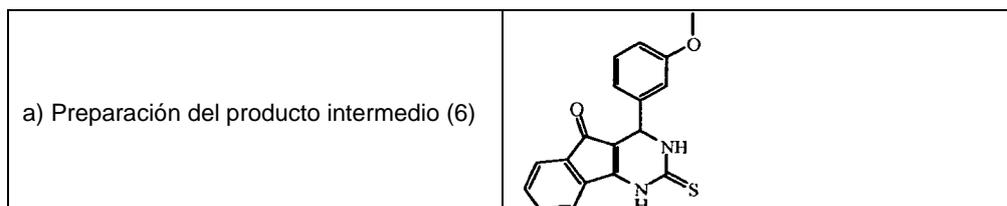
10 Ejemplo A.5



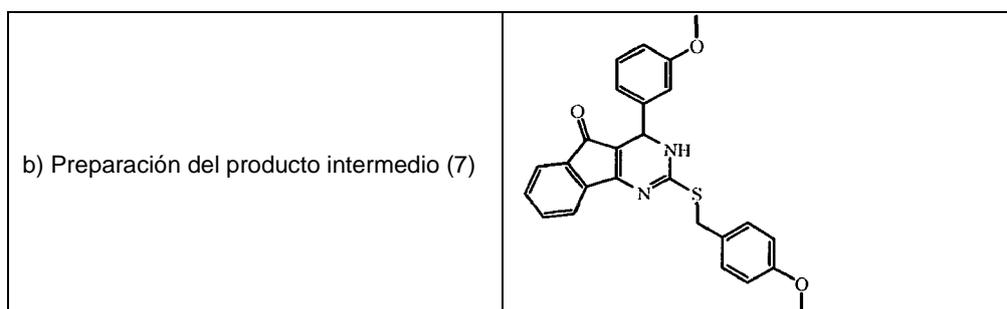
15 Se agitó una mezcla de 3-hidroxibenzaldehído (25 mmol), 1-acetato de 4-bromo-1-butanol (30 mmol) y K_2CO_3 (30 mmol) en metanol (8 ml) y se calentó en el microondas a 100°C durante 60 minutos. Se concentraron las aguas madres a presión reducida y entonces se separaron entre agua y DCM. Se secó la fase orgánica ($MgSO_4$), se concentró y se purificó el residuo en columna de gel de sílice (eluyente CH_2Cl_2/CH_3OH de 100/0 a 97/3). Se recogió la fracción de producto deseada y se evaporó el disolvente, produciendo 1,65 g del producto intermedio (5).

Ejemplo A.6

20

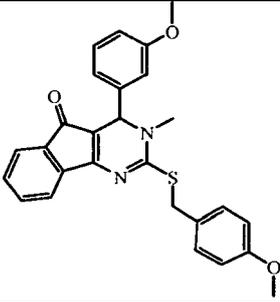
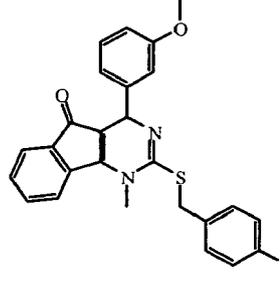


25 Se calentó una mezcla de inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol), 3-metoxibenzaldehído (5 mmol), tiourea (5 mmol) y HCl concentrado (15 gotas) en acetonitrilo (20 ml) en un microondas a 110°C durante 30 minutos. Se separó mediante filtración la mezcla de reacción caliente. Se agitó el residuo de filtro sólido en acetonitrilo en ebullición, entonces se separó mediante filtración y se secó a vacío a 50°C. Se repitió la reacción 5 veces, produciendo 3,3 g del producto intermedio (6).



30 Se agitó una disolución del producto intermedio (6) (1,551 mmol) en DMF (5 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno, entonces se añadió NaH (1,6 mmol) y se agitó la mezcla de reacción resultante a 50°C durante 30 minutos, entonces se enfrió. Se añadió 1-(bromometil)-4-metoxibenceno (1,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante una hora. Se evaporó el disolvente. Se repartió el residuo entre CH_2Cl_2 y H_2O . Se separó la fase orgánica, se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH_2Cl_2/CH_3OH a 99/1). Se recogieron las fracciones de producto y se evaporó el disolvente. Se secó el residuo a vacío a 50°C, produciendo 170 mg del producto intermedio (7).

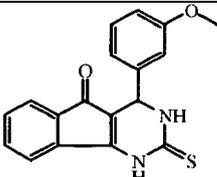
35

c) Preparación del producto intermedio (8)	
y el producto intermedio (9)	

5 Reacción bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó una mezcla de producto intermedio (7) (4,52 mmol), yodometano (5 mmol) y K_2CO_3 (10 mmol) en DMF (25 ml) a $80^\circ C$ durante una hora. Se enfrió la mezcla y se evaporó el disolvente. Se repartió el residuo entre DCM y agua. Se separó la fase orgánica, se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH_2Cl_2). Se recogieron dos fracciones de producto y se evaporó su disolvente, produciendo 1 g del producto intermedio (8) y 0,1 g del producto intermedio (9).

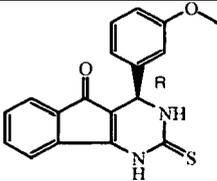
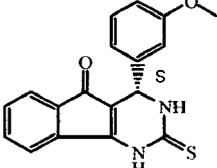
10 B. Preparación de los compuestos

Ejemplo B.1

Preparación del compuesto (1)	
-------------------------------	---

15 Se agitó una mezcla de 3-metoxibenzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (10 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a $110^\circ C$ durante 22 minutos. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó el precipitado con acetonitrilo y se secó a vacío, produciendo 0,62 g del compuesto (1).

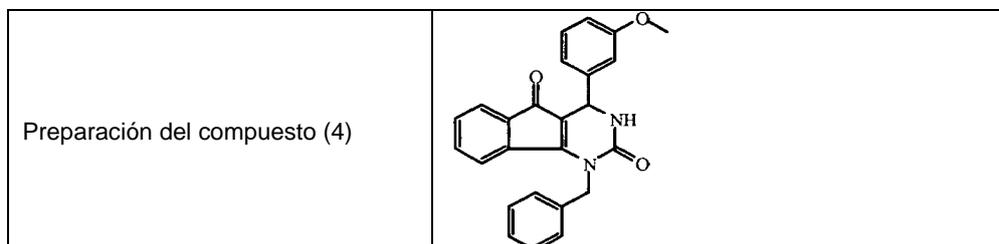
20 Ejemplo B.2

Preparación del compuesto (2)	
y el compuesto (3)	

Se sometió el compuesto (1) (1,5 g) a una separación de enantiómeros mediante cromatografía de fluidos supercríticos (CFS, columna: Diacel AS-H 20x250 mm, fase móvil: 40% de MeOH/60% de CO_2 + isopropilamina al 0,2%, isocrática a $40^\circ C$ y 100 bar). Se recogieron dos grupos de fracciones de producto y se evaporó su disolvente,

produciendo el compuesto (2) y el compuesto (3).

Ejemplo B.3

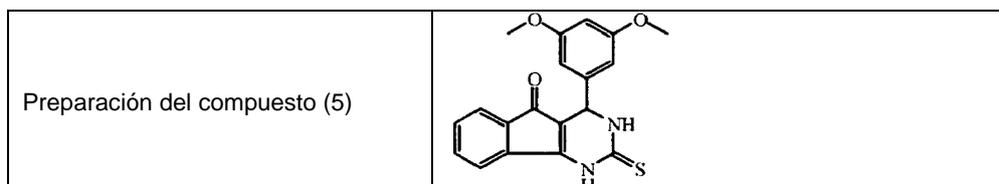


5

Se añadieron el producto intermedio (1) (0,8 mmol), (bromometil)benceno (1 mmol) y K_2CO_3 (1 mmol) a acetonitrilo (40 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se lavó entonces dos veces con agua. Se purificó en primer lugar la mezcla de productos mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: CH_2Cl_2/CH_3OH 90/10) y se purificó entonces adicionalmente mediante HPCL, método A. Se recogieron las fracciones de producto deseadas y se evaporó el disolvente. Se añadió metanol al residuo y se evaporó la mezcla. Se secó a vacío el residuo sólido, produciendo el compuesto (4).

10

Ejemplo B.4

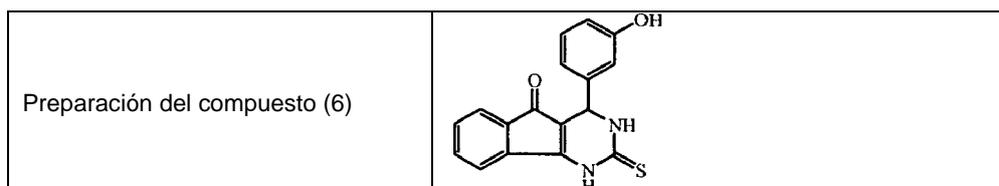


15

Se agitó una mezcla de 3,5-dimetoxibenzaldehído (6,5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (9,7 mmol) y tiourea (6,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a $110^\circ C$ durante 22 minutos. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó el precipitado rojo con acetonitrilo y se secó a vacío. Se trituró esta fracción en metanol y algo de 2-propanona, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,6 g del compuesto (5).

20

Ejemplo B.5

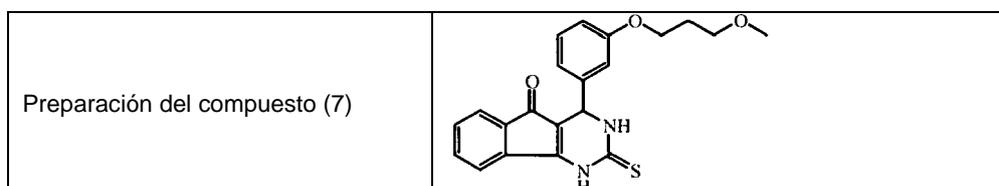


25

Se agitó una mezcla de 3-hidroxibenzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a $110^\circ C$ durante 22 minutos. Se calentó la mezcla de reacción 22 minutos adicionales a $110^\circ C$ en el horno microondas. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se añadió lentamente DIPE (± 5 ml) gota a gota. Se continuó agitando a temperatura ambiente y tras 10 minutos se había formado un precipitado rojo. Se separó éste mediante filtración, se lavó con una mezcla de $CH_3CN/DIPE$ (3/1), seguido por DIPE, entonces se secó a vacío. Se recrystalizó la fracción obtenida en CH_3OH/CH_3CN , se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,122 g del compuesto (6).

30

Ejemplo B.6

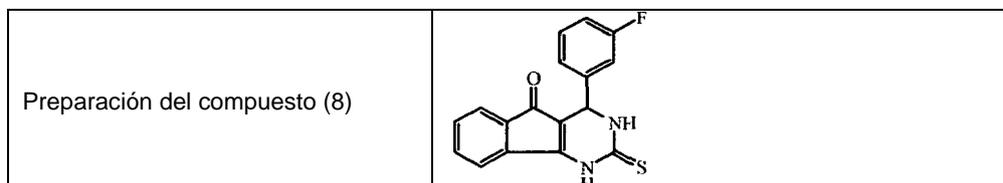


35

Se agitaron el producto intermedio (2) (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo

(20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en el horno microondas a 110°C durante 25 minutos. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración y se lavó con acetonitrilo. Se trituro una parte (0,5 g) de la fracción del producto en etanol (20 ml), se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,47 g del compuesto (7).

5

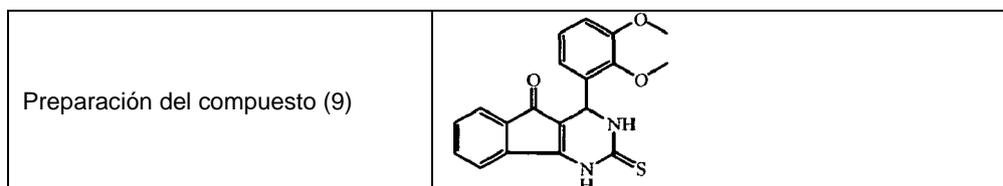
Ejemplo B.7

Se añadió HCl concentrado (15 gotas) a una mezcla de 3-fluorobenzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml). Se calentó la mezcla de reacción resultante en el horno microondas a 110°C durante 25 minutos. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración y se lavó con acetonitrilo, dando 350 mg del compuesto (8).

10

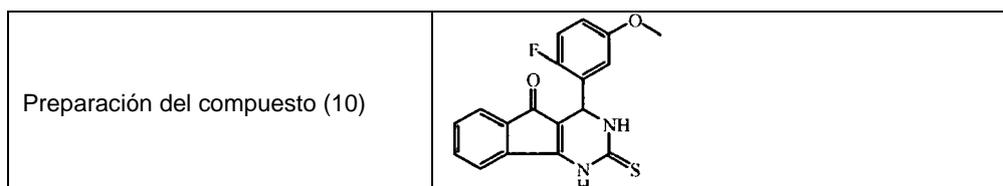
Ejemplo B.8

15



Se calentó una mezcla de inden-1,3(2H)-diona (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) con HCl concentrado (15 gotas) en un horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche a 80°C y entonces se separó mediante filtración el precipitado caliente, se lavó con acetonitrilo, entonces se secó. Se trituro esta fracción durante 2 horas a 80°C en metanol (8 ml), se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,29 g del compuesto (9).

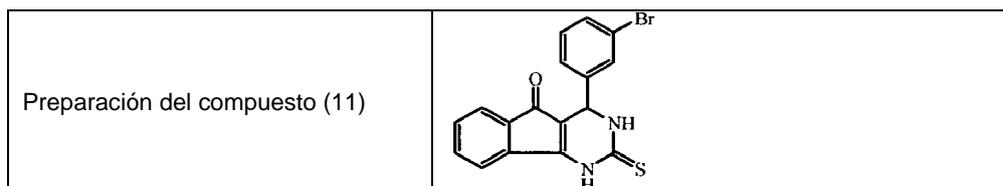
20

Ejemplo B.9

25

Se agitó una mezcla de 2-fluoro-5-metoxibenzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 25 minutos. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración y se lavó con acetonitrilo. Se trituro esta fracción en metanol, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,53 g del compuesto (10).

30

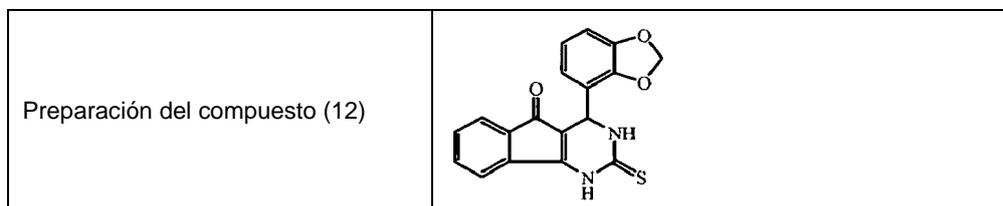
Ejemplo B.10

35

Se agitó una mezcla de 3-bromobenzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 25 minutos. Se agitó la mezcla de reacción a 80°C durante otras 2 horas y entonces se separó mediante filtración en caliente y se lavó con acetonitrilo. Se trituro la fracción obtenida en metanol (10 ml) durante 2 horas a 80°C. Se separó mediante filtración el precipitado y se secó, produciendo

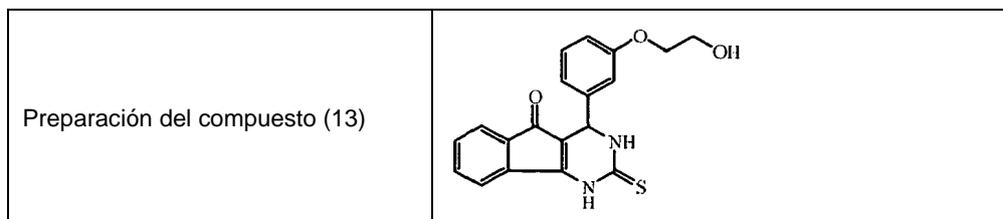
0,73 g del compuesto (11).

Ejemplo B.11



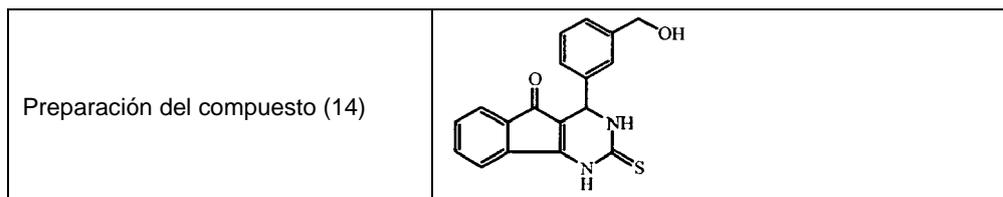
5 Se agitó una mezcla de 1,3-benzodioxol-4-carboxaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en el horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó entonces la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C fuera del horno microondas. Se formó un precipitado de color naranja amarillento, que se separó mediante filtración y se lavó con acetonitrilo. Se trató una parte de esta fracción de producto a 80°C con HCl ac. 1 N (4 ml) y metanol (2 ml) durante 1,5 horas. Tras enfriar y filtrar, se trituró la fracción de producto en metanol, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,081 g del compuesto (12).

Ejemplo B.12



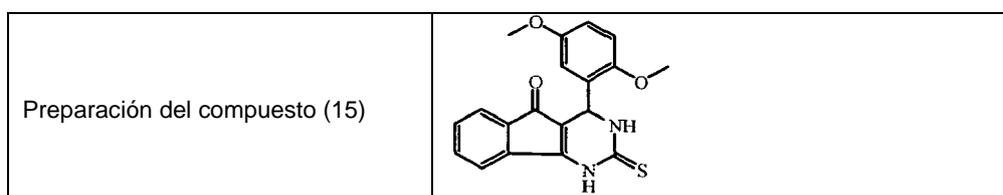
15 Se agitó una mezcla de 3-(2-hidroxietoxi)benzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (7,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml). Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración caliente y se lavó con acetonitrilo. Se trituró esta fracción en metanol, entonces se separó mediante filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,366 g del compuesto (13).

Ejemplo B.13



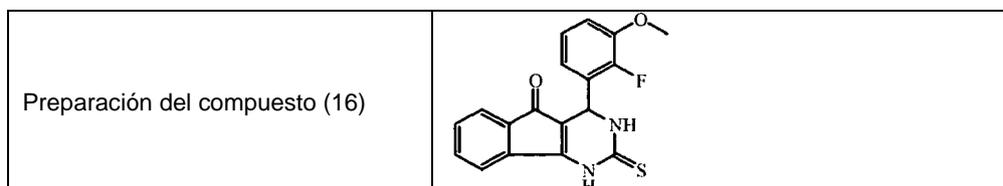
25 Se agitó una mezcla de 3-(hidroximetil)benzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó entonces la mezcla de reacción otras 2 horas a 80°C fuera del horno microondas. Se formó un precipitado de color naranja amarillento tras agitar a temperatura ambiente durante otras 24 horas, que se separó mediante filtración y se lavó con acetonitrilo. Se trituró esta fracción de producto en metanol, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,200 g del compuesto (14).

Ejemplo B.14



- 5 Se agitó una mezcla de 2,5-dimetoxibenzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (7,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración caliente y se lavó con acetonitrilo. Se trituro la fracción obtenida en metanol, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,380 g del compuesto (15).

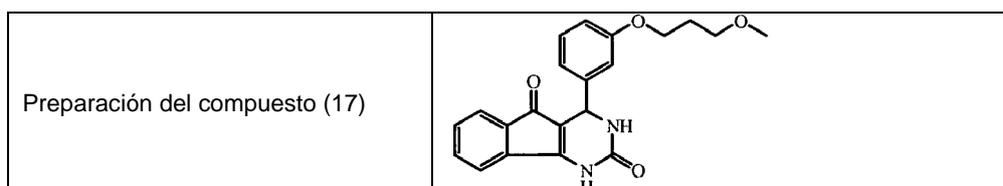
Ejemplo B.15



- 10 Se agitó una mezcla de 2-fluoro-3-metoxibenzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (7,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml). Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración caliente y se lavó con acetonitrilo. Se trituro la fracción en metanol, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,340 g del compuesto (16).

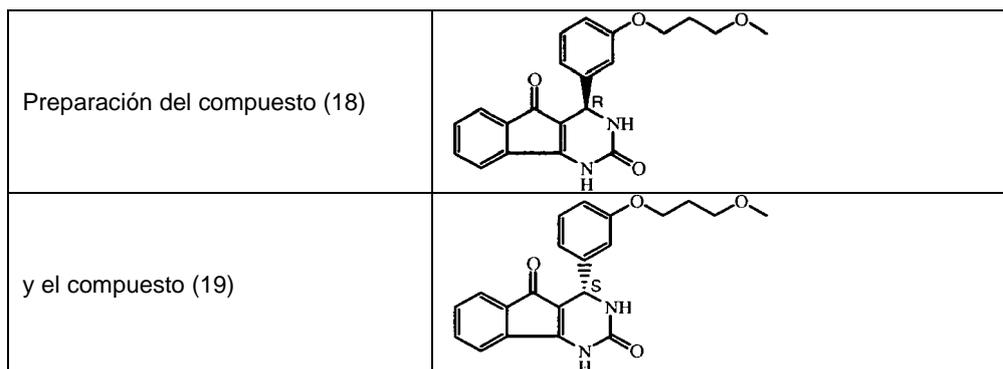
15

Ejemplo B.16

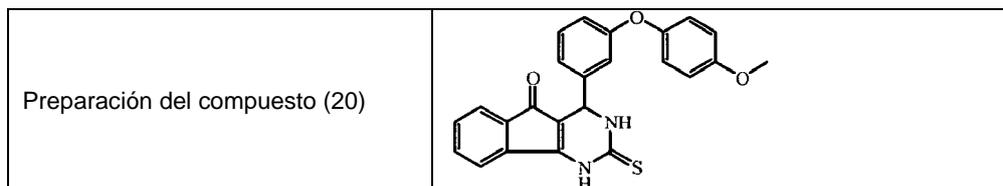


- 20 Se agitó una mezcla de producto intermedio (2) (2,3 mmol), inden-1,3(2H)-diona (3,5 mmol) y urea (2,3 mmol) en acetonitrilo (15 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (7 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 30 minutos. Se agitó entonces la mezcla de reacción durante la noche a 80°C fuera del horno microondas. Se separó mediante filtración el precipitado de color amarillo, se lavó con acetonitrilo y se secó a vacío, produciendo 0,180 g del compuesto (17).

25 Ejemplo B.17

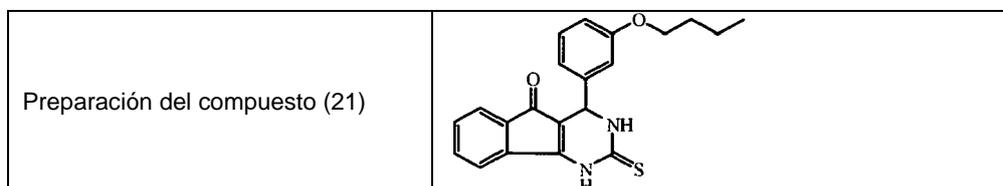


- 30 Se separó el compuesto (17) (0,329 mmol) en enantiómeros mediante purificación por CFS preparativa (columna: Diacel AS-H 20x250 mm, fase móvil: 35% de MeOH/65% de CO₂ + isopropilamina al 0,2%, isocrática a 40°C y 100 bar). Se recogieron dos grupos de fracciones de producto. Se evaporaron ambas fracciones y se cristalizó cada residuo en acetonitrilo, se separaron mediante filtración y se secaron a vacío, produciendo 43 mg del compuesto (18) y 35 mg del compuesto (19).

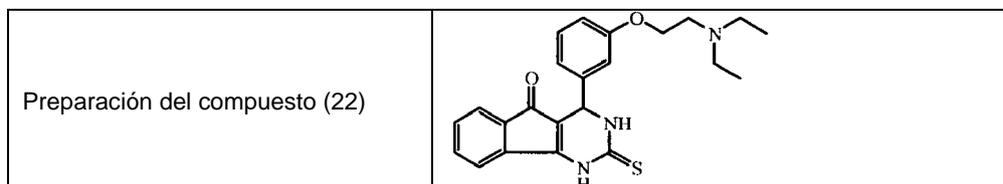
Ejemplo B.18

- 5 Se agitó una mezcla de 2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-5-carboxaldehído (2,5 mmol), 1,3-ciclopentanodiona (3,75 mmol) y tiourea (2,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (10 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración caliente y se lavó con acetonitrilo. Se trituroó esta fracción en metanol caliente, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,195 g del compuesto (20).

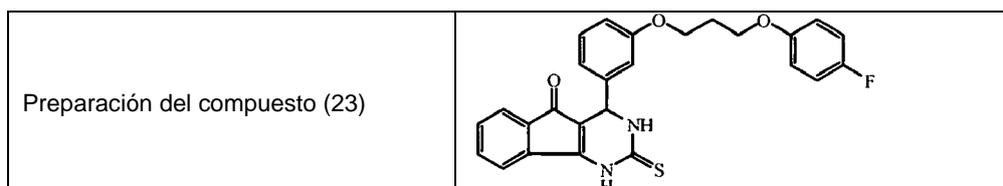
10

Ejemplo B.19

- 15 Se calentó una mezcla de tiourea (5 mmol), producto intermedio (3) (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (5 mmol) y HCl (6 gotas) en acetonitrilo (20 ml) durante 25 minutos hasta 110°C en un horno microondas, entonces se agitó y se calentó durante la noche a 80°C fuera del horno microondas. Se filtró la mezcla caliente y se trató el sólido con metanol a reflujo de 80°C durante 2 horas. Se separó mediante filtración el precipitado obtenido caliente, produciendo 0,650 g del compuesto (21).

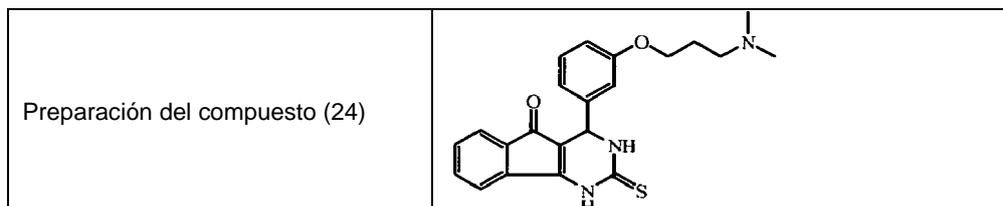
20 Ejemplo B.20

- 25 Se agitó una mezcla de 3-(2-dietilaminoetoxi)benzaldehído (5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (7,5 mmol) y tiourea (5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (15 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 30 minutos. Se calentó la mezcla de reacción otros 30 minutos a 110°C y entonces se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante HPCL, método B. Se recogió la fracción de producto deseada por separado mediante decantación. Se disolvió el sólido obtenido en metanol y se concentró de nuevo la disolución, produciendo 0,075 g del compuesto (22).

30 Ejemplo B.21

- 35 Se agitó una mezcla de producto intermedio (4) (2,5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (3,75 mmol) y tiourea (2,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (10 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 25 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración caliente y se lavó con acetonitrilo, se separó mediante filtración y se secó. Se trituroó esta fracción en metanol caliente, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,423 g del compuesto (23).

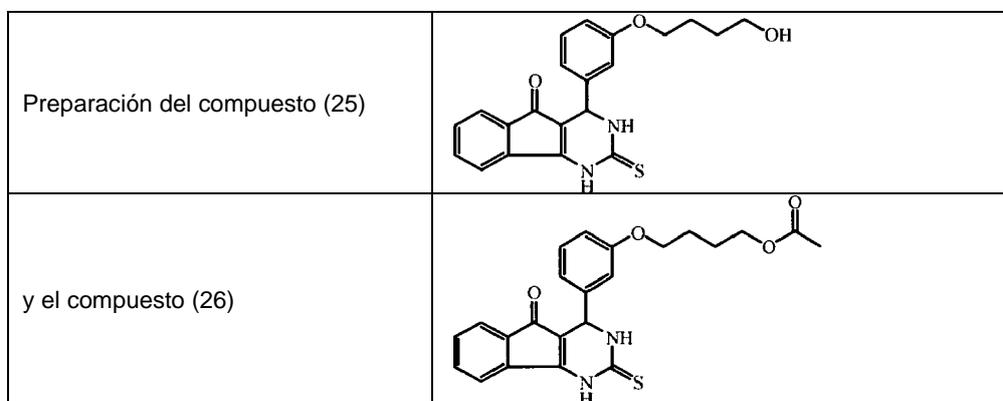
Ejemplo B.22



- 5 Se agitó una mezcla de 3-[3-(dimetilamino)propoxi]benzaldehído (4,8 mmol), 1,3-ciclopentanodiona (7,2 mmol) y tiourea (4,8 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (25 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 30 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante HPCL, método B. Se concentraron las fracciones que contenían el producto y se trituró el residuo en metanol a 80°C, entonces se separó mediante filtración y se secó, produciendo 0,050 g del compuesto (24).

10

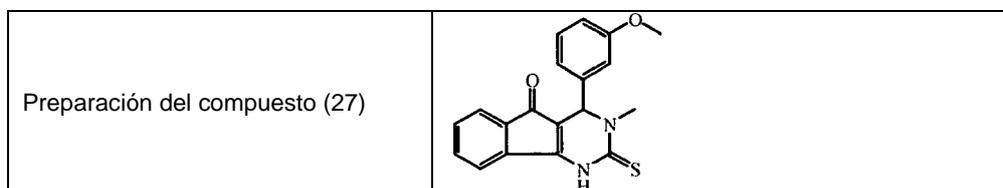
Ejemplo B.23



- 15 Se agitó una mezcla de producto intermedio (5) (2,5 mmol), inden-1,3(2H)-diona (3,75 mmol) y tiourea (2,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado (10 gotas) y se calentó la mezcla de reacción en un horno microondas a 110°C durante 22 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 2 horas a 80°C. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración caliente y se lavó con acetonitrilo. Se trituró esta fracción en metanol caliente y entonces se purificó adicionalmente mediante HPCL, método A. Se recogieron dos fracciones de producto y se evaporó su disolvente, produciendo 0,135 g del compuesto (25) y 0,020 g del compuesto (26).

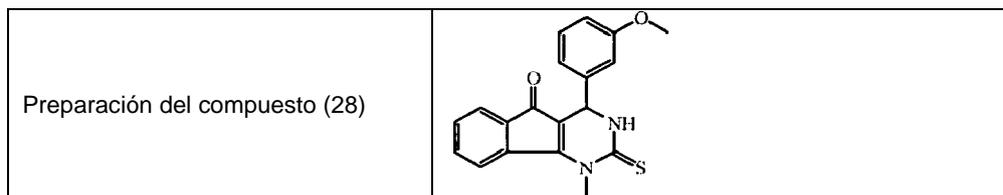
20

Ejemplo B.24

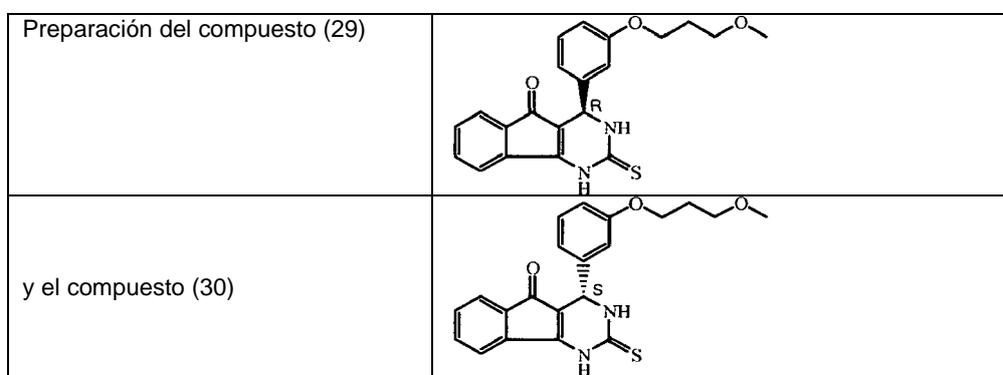


- 25 Se agitó una mezcla de producto intermedio (8) (2,19 mmol) en TFA (15 ml) en un horno microondas a 110°C durante 10 min., entonces se enfrió la mezcla de reacción y se evaporó el disolvente. Se agitó el residuo en EtOAc. Se separó mediante filtración el precipitado y se agitó en acetato de etilo en ebullición reciente, entonces se separó mediante filtración la fracción de producto y se secó (vacío, 50°C), produciendo 190 mg del compuesto (27).

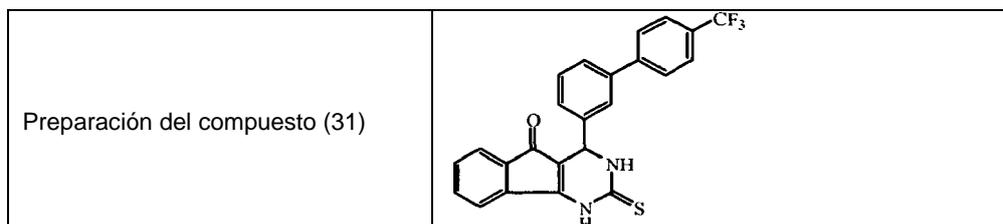
Ejemplo B.25



- 5 Se calentó una mezcla de producto intermedio (9) (0,219 mmol) en TFA (1,5 ml) en un horno microondas durante 20 minutos a 110°C. Se evaporó el disolvente y se disolvió el residuo en acetato de etilo. Se lavó con agua la disolución orgánica, entonces se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante HPCL, método B. Se recogieron las fracciones de producto y se evaporó el disolvente. Se secó a vacío el residuo a 50°C, produciendo 7 mg del compuesto (28).

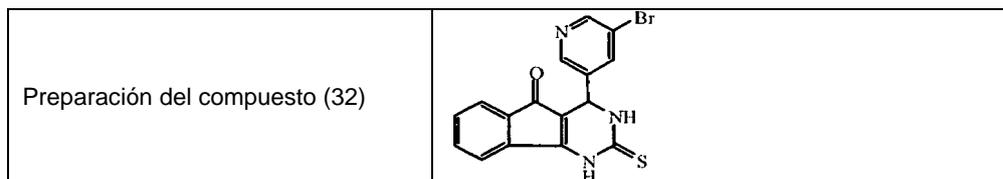
10 Ejemplo B.26

- 15 Se calentó una mezcla de inden-1,3(2H)-diona (7,527 mmol), 3-(3-metoxipropoxi)benzaldehído (4,994 mmol), tiourea (0,4992 mmol) y HCl concentrado en acetonitrilo (20 ml) en un microondas a 110°C durante 25 minutos. Se separó mediante filtración el precipitado resultante y se suspendió en EtOH en ebullición. Se separó mediante filtración el precipitado (mientras la mezcla estaba todavía caliente), entonces se secó a vacío a 50°C. Se separó la fracción obtenida para dar sus enantiómeros mediante purificación por CFS preparativa (columna: Diacel AS-H 30x250 mm, fase móvil: 40% de MeOH/60% de CO₂ + isopropilamina al 0,2%, isocrática a 40°C y 100 bar). Se recogieron dos fracciones de producto y se evaporó su disolvente. Se cristalizó cada residuo en acetonitrilo, se separaron mediante filtración y se secaron a vacío, produciendo el compuesto (29) y el compuesto (30).
- 20

Ejemplo B.27

- 25 Se calentó una mezcla de inden-1,3(2H)-diona (6 mmol), 4'-trifluorometilbifenil-3-carboxaldehído (3,996 mmol), tiourea (3,996 mmol) y HCl concentrado en acetonitrilo (20 ml) en un horno microondas durante 30 minutos a 110°C. Se separó mediante filtración el sólido resultante y se secó a vacío. Se agitó esta fracción de producto en metanol en ebullición, se separó mediante filtración caliente, entonces se secó a vacío a 50°C, produciendo 340 mg del compuesto (31).
- 30

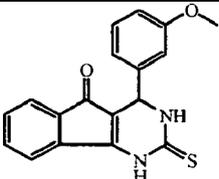
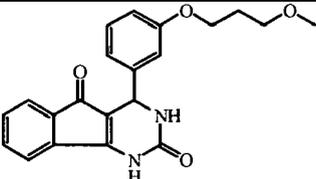
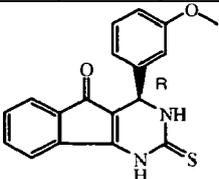
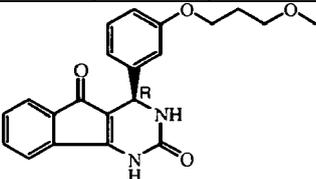
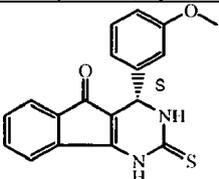
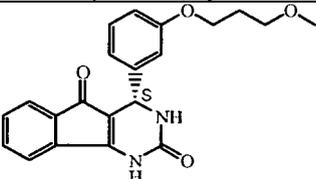
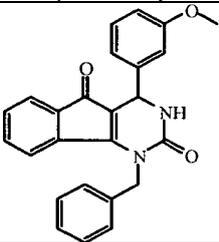
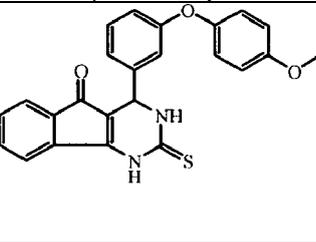
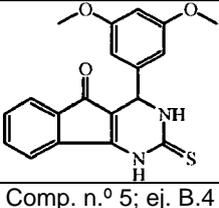
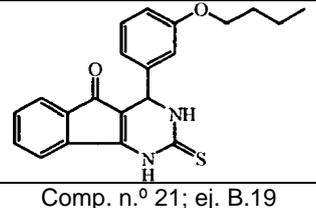
Ejemplo B.28

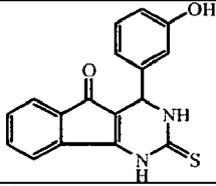
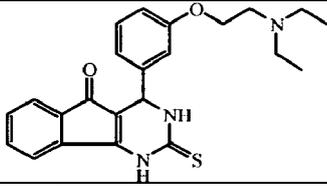
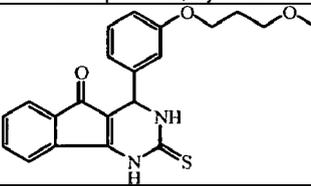
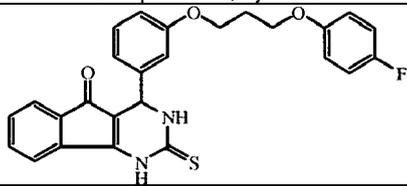
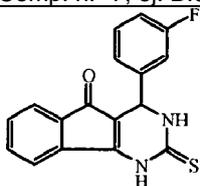
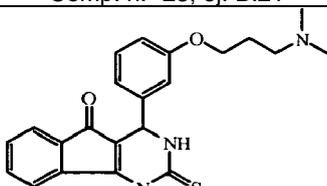
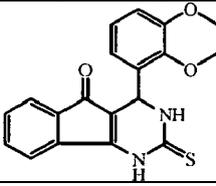
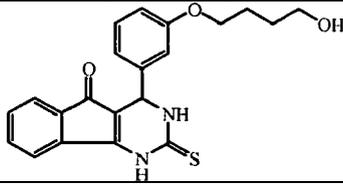
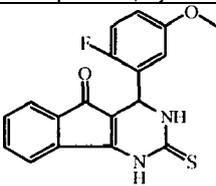
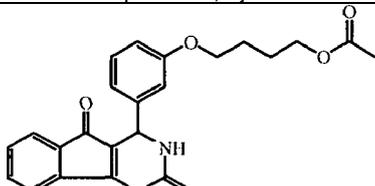
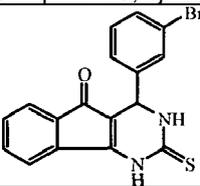
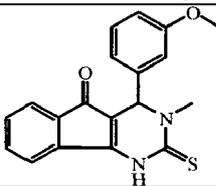
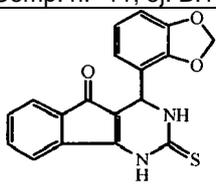
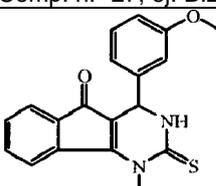
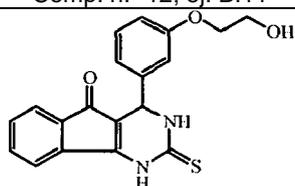
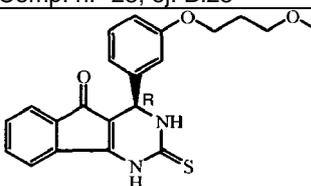


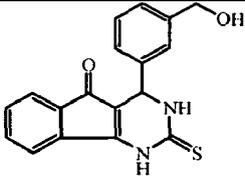
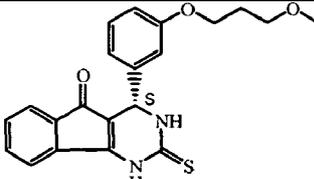
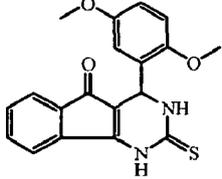
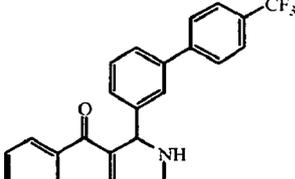
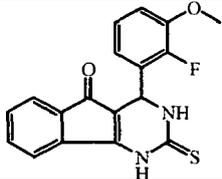
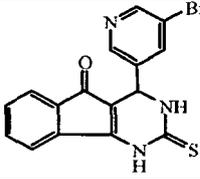
- 5 Se hizo reaccionar una mezcla de inden-1,3(2H)-diona (5,5 mmol), 5-bromo-3-piridincarboxaldehído (5 mmol), tiourea (20 mmol) y cloruro de calcio (0,5 mmol) en DMF (6 ml) en un horno microondas a 130°C durante 80 minutos. Se enfrió la mezcla de reacción y entonces se vertió en agua. Se separó mediante filtración el precipitado resultante y se agitó en acetonitrilo en ebullición. Se separó mediante filtración de nuevo el precipitado y se secó (vacío, 50°C). Se purificó la fracción obtenida mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Se recogieron las fracciones de producto y se separó mediante filtración el precipitado formado, se lavó con agua, entonces se secó a vacío a 50°C. Se agitó la fracción de producto en metanol en ebullición, se separó mediante filtración caliente, entonces se secó a vacío a 50°C, produciendo 100 mg del compuesto (32).

La tabla 1 enumera los compuestos que se prepararon según uno de los ejemplos anteriores.

15 Tabla 1:

 <p>Comp. n.º 1; ej. B.1</p>	 <p>Comp. n.º 17; ej. B.16</p>
 <p>Comp. n.º 2; ej. B.2</p>	 <p>Comp. n.º 18; ej. B.17</p>
 <p>Comp. n.º 3; ej. B.2</p>	 <p>Comp. n.º 19; ej. B.17</p>
 <p>Comp. n.º 4; ej. B.3</p>	 <p>Comp. n.º 20; ej. B.18</p>
 <p>Comp. n.º 5; ej. B.4</p>	 <p>Comp. n.º 21; ej. B.19</p>

	
Comp. n.º 6; ej. B.5	Comp. n.º 22; ej. B.20
	
Comp. n.º 7; ej. B.6	Comp. n.º 23; ej. B.21
	
Comp. n.º 8; ej. B.7	Comp. n.º 24; ej. B.22
	
Comp. n.º 9; ej. B.8	Comp. n.º 25; ej. B.23
	
Comp. n.º 10; ej. B.9	Comp. n.º 26; ej. B.23
	
Comp. n.º 11; ej. B.10	Comp. n.º 27; ej. B.24
	
Comp. n.º 12; ej. B.11	Comp. n.º 28; ej. B.25
	
Comp. n.º 13; ej. B.12	Comp. n.º 29; ej. B.26

	
Comp. n.º 14; ej. B.13	Comp. n.º 30; ej. B.26
	
Comp. n.º 15; ej. B.14	Comp. n.º 31; ej. B.27
	
Comp. n.º 16; ej. B.15	Comp. n.º 32; ej. B.28

HPCL, método A

Se purificó el producto mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (Shandon Hyperprep®
 5 C18 BDS (sílice desactivada para bases) 8 µm, 250 g, D.I. 5 cm). Se usaron tres fases móviles (fase A: el 90% de una disolución de NH₄OAc al 0,5% en agua + el 10% de CH₃CN; fase B: CH₃OH; fase C: CH₃CN). En primer lugar, se mantuvo el 75% de A y el 25% de B con una velocidad de flujo de 40 ml/min. durante 0,5 minutos. Se aplicó entonces un gradiente hasta el 50% de B y el 50% de C en 41 minutos con una velocidad de flujo de 80 ml/min. Se aplicó entonces un gradiente hasta el 100% de C en 20 minutos con una velocidad de flujo de 80 ml/min. y se
 10 mantuvo durante 4 minutos.

HPCL, método B

Se purificó el producto mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (Shandon Hyperprep®
 15 C18 BDS (sílice desactivada para bases) 8 µm, 250 g, D.I. 5 cm). Se usaron tres fases móviles (fase A: una disolución de NH₄HCO₃ al 0,25% en agua; fase B: CH₃OH; fase C: CH₃CN). En primer lugar, se mantuvo el 75% de A y el 25% de B con una velocidad de flujo de 40 ml/min. durante 0,5 minutos. Se aplicó entonces un gradiente hasta el 50% de B y el 50% de C en 41 minutos con una velocidad de flujo de 80 ml/min. Se aplicó entonces un gradiente hasta el 100% de C en 20 minutos con una velocidad de flujo de 80 ml/min. y se mantuvo durante 4 minutos.
 20

HPCL, método C

Se purificó el producto mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (Shandon Hyperprep®
 25 C18 BDS (sílice desactivada para bases) 8 µm, 250 g, D.I. 5 cm). Se usaron tres fases móviles (fase A: una disolución de NH₄HCO₃ al 0,25% en agua; fase B: CH₃OH; fase C: CH₃CN). En primer lugar, se mantuvo el 75% de A y el 25% de B con una velocidad de flujo de 40 ml/min. durante 0,5 minutos. Se aplicó entonces un gradiente hasta el 100% de B en 41 minutos con una velocidad de flujo de 80 ml/min. Se aplicó entonces un gradiente hasta el 100% de C en 20 minutos con una velocidad de flujo de 80 ml/min. y se mantuvo durante 4 minutos.
 30

C. Parte analíticaC.1. Procedimiento general 1 de CL-EM

Se realizó la medición de CL usando un sistema Acquity UPCL (Waters) que comprende una bomba binaria, un organizador de muestras, un calentador de columna (ajustado a 55°C), un detector de matriz de diodos (DAD) y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos a continuación. Se dividió el flujo desde la columna hasta un espectrómetro EM. Se configuró el detector de EM con una fuente de ionización por electrospray. Se adquirieron los espectros de masas explorando desde 100 hasta 1000 en 0,18 segundos usando un tiempo de permanencia de 0,02 segundos. El voltaje de la aguja capilar era de 3,5 kV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 140°C. Se usó nitrógeno como gas nebulizador. Se realizó la adquisición de datos con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.
 35
 40

Se llevó a cabo UPCL de fase inversa (cromatografía de líquidos de ultrarresolución) en una columna C18 híbrida de etilsiloxano/sílice (BEH) con puente (1,7 μm , 2,1 x 50 mm; Waters Acquity) con una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Se usaron dos fases móviles (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1% en H₂O/metanol 95/5; fase móvil B: metanol) para establecer una condición de gradiente de desde el 95% de A y el 5% de B hasta el 5% de A y el 95% de B en 1,3 minutos y se mantuvo durante 0,2 minutos. Se usó un volumen de inyección de 0,5 μl . El voltaje de cono era de 10 V para el modo de ionización positiva y de 20 V para el modo de ionización negativa.

Tabla 2: Datos de CLEM – Tiempo de retención (R_t en minutos), pico de (MH)⁺ (de la base libre)

Comp. n.º	R_t	MH ⁺
8	1,14	311
9	1,11	353
11	1,23	371
21	1,33	365

C.3 Puntos de fusión

Se determinaron los puntos de fusión (p.f.) para varios compuestos con un instrumento DSC823e (Mettler-Toledo). Se midieron los puntos de fusión con un gradiente de temperatura de 30°C/minuto. Los valores notificados son valores pico. La temperatura máxima era de 400°C. Los valores se obtienen con incertidumbres experimentales que están comúnmente asociadas con este método analítico.

Tabla 3: Punto de fusión

Comp. n.º	p.f.	Comp. n.º	p.f.
1	295,22°C	18	206,47°C
2	252,73°C	19	207,44°C
3	253,60°C	20	269,04°C
4	188,65°C	22	243,58°C
5	287,08°C	23	245,01°C
6	288,04°C	24	237,90°C
7	235,68°C	25	224,49°C
10	289,27°C	26	199,50°C
12	289,34°C	27	286,94°C
13	261,08°C	29	172,85°C
14	265,63°C	30	171,86°C
15	295,33°C	31	149,46°C
16	287,05°C	32	294,61°C
17	251,12°C		

C.4 Rotación óptica

Se midió la rotación óptica usando un polarímetro Perkin Elmer 341. $[\alpha]_D^{20}$ indica la rotación óptica medida con luz a la longitud de onda de la línea D del sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C*. La longitud de trayectoria de la célula es de 10 cm. A continuación del valor real, se mencionan la concentración y el disolvente de la disolución que se usó para medir la rotación óptica.

Tabla 4: Rotación óptica

Comp. n.º	Rotación óptica específica $[\alpha]_D^{20}$
2	+605,19° (589 nm, c 0,2158% p/v, DMF, 20°C)
3	-623,67° (589 nm, c 0,2264% p/v, DMF, 20°C)
18	+349,06° (589 nm, c 0,1166% p/v, MeOH, 20°C)

19	-363,73° (589 nm, c 0,0932% p/v, MeOH, 20°C)
29	+588,75° (578 nm, c 0,1938% p/v, DMF, 20°C)
30	-581,71 ° (578 nm, c 0,2876% p/v, DMF, 20°C).

D. Ejemplos farmacológicos

Célula y cultivo

5

Se clonó el gen de TRPA1 humano en el vector inducible pT-REx-Dest30 y después de eso se transfectó de manera estable en células T-Rex™-293 (adquiridas de Invitrogen, Merelbeke, Bélgica). Se usó este sistema de expresión de TRPA1h inducible por tetraciclina con el fin de impedir la sobrecarga de Ca²⁺ en las células cultivadas debido a la expresión sostenida de TRPA1. Se mantuvieron células TRPA1h/TREx-HEK293 (denominadas células TRPA1h en el texto siguiente) en condiciones de cultivo celular estériles convencionales. El medio de cultivo para las células TRPA1h-HEK era DMEM (Gibco BRL, Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) complementado con geneticina 0,5 g/l (Gibco), blasticidina 5 mg/l (Invitrogen), L-glutamina 14,6 g/l (200 mM; Gibco), penicilina/estreptomicina 5 g/l (5.10⁻⁶ UI/l, Gibco), ácido pirúvico 5,5 g/l (Gibco) y suero de ternero fetal al 10% (Hyclone, Logan UT, EE.UU.).

10

15

Fluorometría de Ca²⁺

20

La unión de un agonista al canal iónico TRPA1 activa y abre el canal iónico, lo que provoca un gran aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Para detectar y medir la concentración de Ca²⁺ intracelular, se cargaron las células con un tinte sensible a Ca²⁺. Los cambios en la fluorescencia en la célula, que corresponden a cambios en la concentración de Ca²⁺ en la célula, pueden monitorizarse cinéticamente con el instrumento FDSS (Hamamatsu) y son indicativos de agonismo hacia el canal iónico TRPA1 y esto puede reducirse mediante antagonistas del receptor TRPA1.

25

Para las mediciones fluorométricas de Ca²⁺, se resuspendieron células TRPA1h-HEK en medio de siembra HBSS: HBSS (con CaCl₂ y MgCl₂; Gibco) complementado con L-glutamina 14,6 g/l (200 mM; Gibco), penicilina/estreptomicina 5 g/l (5.10⁻⁶ UI/l, Gibco), ácido pirúvico 5,5 g/l (Gibco), HEPES 5 mM (Gibco), 5 ml de insulina-transferrina-selenio-x (Gibco) y suero de ternero fetal al 10% (inactivado por calor durante 30 minutos a 56°C; Hyclone, Logan UT, EE.UU.). Se sembraron las células en placas de polipropileno de fondo redondo de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (Costar Coming, Data Packaging, Cambridge MA, EE.UU.) a 12000 células/pocillo. Se añadió tetraciclina 50 ng/ml para inducir la expresión de TRPA1h 24 h antes del experimento.

30

35

Se cargaron las células con Fluo4-AM 5 mg/l (Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) disuelto en medio de siembra HBSS complementado con Probenecid 0,7 g/l (Sigma) y se incubaron durante 1 h a 37°C y posteriormente a 20°C durante de 1 a 2 h. Se midió la fluorescencia en el lector de placas basado en obtención de imágenes FDSS 6000 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japón). La longitud de onda de excitación era de 488 nm y la longitud de onda de emisión de 540 nm. Tras un período de control de 12 segundos, se añadieron los compuestos de JNJ y se midió la señal de Ca²⁺ en el plazo de 14 minutos tras la aplicación. Finalmente, se añadió el agonista de TRPA1 control éster metílico del ácido 11H-dibenzo[b,e]azepin-10-carboxílico [cuya síntesis se describe a continuación en el presente documento como compuesto (D-6)] o BITC (isotiocianato de bencilo, FLUKA) a una concentración final de 25 nM. Este protocolo permitió estudiar el agonismo (en la ventana de tiempo en la que se añadieron compuestos agonistas de TRPA1) y el antagonismo (comprobando si la aplicación previa de los compuestos reducía el efecto agonista del agonista control). Se calculó la razón de emisión dividiendo la señal de emisión (Em₅₄₀) entre la primera señal Em₅₄₀ del periodo de control para compensar la fluorescencia de fondo. En cada placa de 384 pocillos, se realizaron 4 series de experimentos control con DMSO de los cuales 2 con y 2 sin agonista control éster metílico del ácido 11H-dibenzo[b,e]azepin-10-carboxílico o BITC. Para mediciones del Ca²⁺ intracelular, se diluyeron adicionalmente disoluciones madre de compuestos (10 o 100 mM) en DMSO con el fin de obtener finalmente DMSO al 1% en la disolución extracelular.

45

50

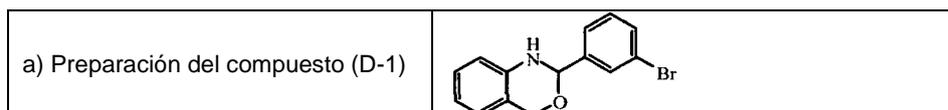
Se encontró que los valores de antagonismo de los compuestos descritos determinados con éster metílico del ácido 11H-dibenzo[b,e]-azepin-10-carboxílico o BITC concordaban bien unos con otros. Se enumeran en la tabla 5 valores de CI50 medidos usando éster metílico del ácido 11H-dibenzo[b,e]azepin-10-carboxílico como agonista de TRPA1.

Tabla 5: Valores de CI50 para el antagonismo de TRPA1

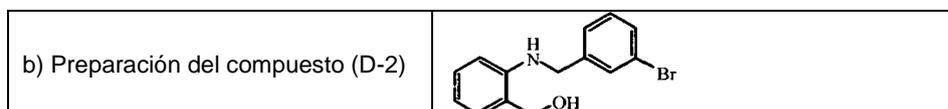
Comp. n.º	CI50, TRPA1h	Comp. n.º	CI50, TRPA1h
1	~128 nM	17	~1688 nM
2	~76 nM	18	1318 nM
3	>10 µM	19	>10 µM

4	~6026 nM	20	1462 nM
5	~2775 nM	21	314 nM
6	~636 nM	22	1202 nM
7	47 nM	23	4860 nM
8	~1063 nM	24	>10 μ M
9	>10 μ M	25	~685 nM
10	~365 nM	26	557 nM
11	495 nM	27	>10 μ M
12	~4406 nM	28	~85 nM
13	213 nM	29	~13 nM
14	~708 nM	30	>10 μ M
15	>10 μ M	31	>10 μ M
16	~287 nM	32	1669 nM

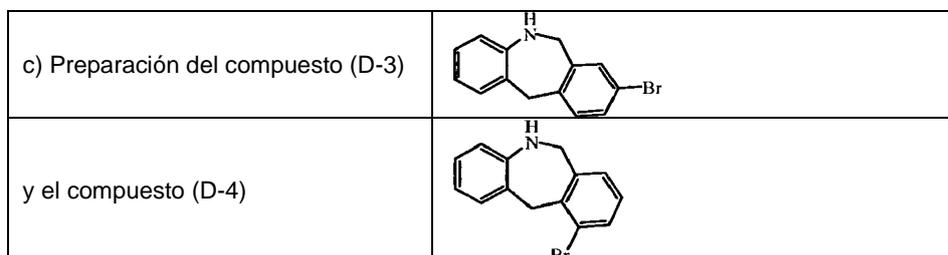
Síntesis del agonista de TRPA1 éster metílico del ácido 11H-dibenzo[b,e]azepin-10-carboxílico (compuesto (D-6) – ejemplo de referencia)



5 Se agitó una mezcla de 2-aminobencenometanol (0,073 mol) y 3-bromo-benzaldehído (0,073 mol) en 2-propanol (100 ml) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente. Se cristalizó parte (3 g) del residuo (20,5 g) en hexano. Se separó mediante filtración el precipitado y se secó, produciendo 1,37 g del compuesto (D-1).



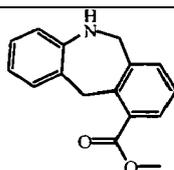
10 Reacción bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió lentamente borohidruro de sodio (0,1172 mol) a una mezcla de compuesto (D-1) (0,0586 mol) en etanol (200 ml). Se agitó la mezcla de reacción y se sometió a reflujo durante 1 hora. Se enfrió la mezcla sobre un baño de hielo-agua, se extinguió con NH_4Cl al 20% y se extrajo con CH_2Cl_2 . Se secó la fase orgánica, se filtró y se evaporó el disolvente, produciendo 14,8 g del compuesto (D-2).



20 Se añadió una disolución del compuesto (D-2) (0,180 mol) en CH_2Cl_2 (50 ml) a lo largo de un período de una hora a una disolución enfriada (\pm de -10 a -20°C) de H_2SO_4 concentrado (500 ml). Se retiró entonces el baño de hielo y se agitó la mezcla durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla de reacción a hielo-agua, se enfrió sobre hielo y se alcalinizó con una disolución de NaOH acuosa al 50%. Se extrajo la mezcla resultante (\pm 3 l) con CH_2Cl_2 . Se separó la fase orgánica, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a vacío el filtrado. Se purificó una parte (8 g) de este residuo mediante cromatografía de fluidos supercríticos (CFS, columna: Diacel AD-H 30 x 250 mm, fase móvil: 55% de MeOH/45% de CO_2 + isopropilamina al 0,2%, 40°C, 100 bar) dando 2 g del compuesto (D-4) (isómero de 7-bromo) y 4,65 g del compuesto (D-3) (isómero de 9-bromo).

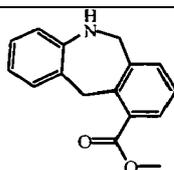
25

d) Preparación del compuesto (D-5)



5 Se colocó una mezcla de compuesto (D-4) (0,008 mol), acetato de potasio (4 g), Pd(OAc)₂ (0,04 g) y 1,1'-(1,3-propanodiol)bis[1,1-difenil-fosfina] (0,16 g) en metanol (100 ml) y THF (100 ml) en un reactor de presión y se presurizó con gas CO hasta 50 kg/cm². Se calentó la mezcla de reacción a 125°C durante 16 horas, entonces se enfrió, se filtró sobre Dicalite y se evaporó el disolvente. Se repartió el residuo entre CH₂Cl₂ y agua. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró, entonces se concentró el filtrado. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente, produciendo 1,86 g del compuesto (D-5).

e) Preparación del compuesto (D-6)

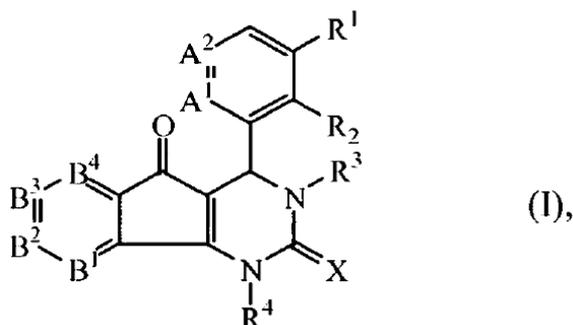


10 Se agitó una mezcla de compuesto (D-5) (0,00735 mol) y óxido de manganeso (0,0367 mol) en tolueno (20 ml) a 90°C durante 4 horas. Se filtró la mezcla de reacción sobre un lecho de gel de sílice (eluyente: tolueno, luego CH₂Cl₂). Se concentró la fase de CH₂Cl₂ (amarilla). Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: heptano/EtOAc de 100/0 a 70/30). Se recogieron las fracciones de producto y se evaporó el disolvente. Se trituró el residuo en DIPE, se separó mediante filtración y se secó, produciendo 1,35 g del éster metílico del ácido 11H-dibenzo[b,e]azepin-10-carboxílico como compuesto (D-6).

15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



5

incluyendo cualquier forma estereoquímicamente isomérica del mismo, en la que:

10 A^1 y A^2 son ambos CR^5 , o uno de A^1 o A^2 es N y el otro es CR^5 , en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno, halo, alquilo C_{1-6} , alquiloxilo C_{1-6} , polihaloalquilo C_{1-6} o polihaloalquiloxilo C_{1-6} ;

B^1 , B^2 , B^3 y B^4 son todos CH o uno de B^1 , B^2 , B^3 y B^4 es N y los otros son CH;

X es O o S;

15

R^1 es halo, hidroxilo, ciano, amino, alquilo C_{1-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alquiloxilo C_{1-6} , polihaloalquiloxilo C_{1-6} , arilo, ariloxilo u OR^6 en el que R^6 es alquilo C_{1-6} sustituido con hidroxilo, alquiloxilo C_{1-4} , arilo, ariloxilo, alquilcarbonilo C_{1-4} , alquilcarboniloxilo C_{1-4} o NR^7R^8 en el que R^7 y R^8 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o alquilo C_{1-4} ;

20

R^2 es hidrógeno, flúor, alquilo C_{1-4} o alquiloxilo C_{1-4} ;

y R^1 y R^2 pueden tomarse juntos para formar un radical $-O-CH_2-O-$ u $-O-CH_2-CH_2-O-$;

25

R^3 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} o arilalquilo C_{1-2} ;

R^4 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} o arilalquilo C_{1-2} ;

30

cada arilo se selecciona, independientemente del otro, de un fenilo sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de hidrógeno, halo, hidroxilo, alquilo C_{1-4} , polihaloalquilo C_{1-4} , alquiloxilo C_{1-4} , polihaloalquiloxilo C_{1-4} , ciano, nitro, amino o mono- o di-(alquil C_{1-4})amino;

siempre que cuando X es O y A^1 y A^2 son ambos CR^5 en el que R^5 es hidrógeno y R^2 es hidrógeno o alquiloxilo C_{1-4} y R^3 y R^4 son hidrógeno, entonces R^1 no es halo, alquilo C_{1-6} o alquiloxilo C_{1-6} ;

35

o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo o un N-óxido del mismo.

40

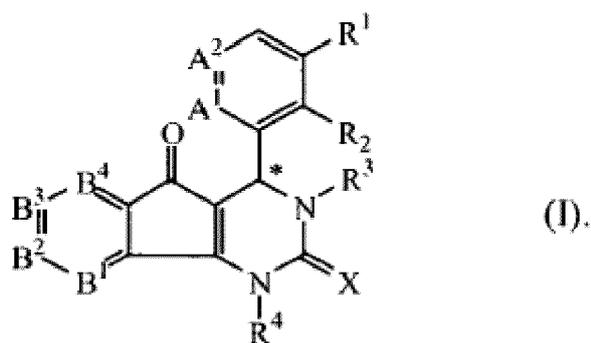
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que B^1 , B^2 , B^3 y B^4 son todos CH.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X es S.

4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que A^1 y A^2 son ambos CR^5 en el que cada R^5 se selecciona independientemente de hidrógeno o halo.

45

5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene la configuración R en el átomo de carbono quiral marcado con un *



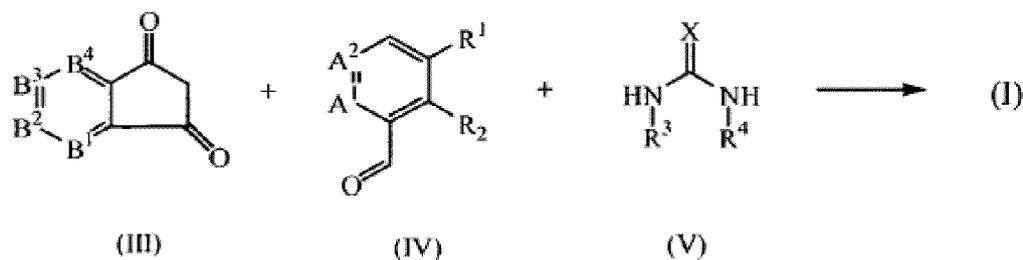
6. Composición farmacéutica que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5 7. Proceso para preparar una composición farmacéutica según la reivindicación 6, en el que una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 se mezcla íntimamente con un portador farmacéuticamente aceptable.

10 8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como medicamento.

9. Proceso para preparar un compuesto de fórmula (I), que puede prepararse:

15 a) mediante una reacción de condensación entre un producto intermedio de 1,3-dicarbonilo (III), un aldehído (IV) y (tio)urea (V),



20 o b) se convierten, unos en otros, compuestos de fórmula (I) siguiendo reacciones de transformación conocidas en la técnica; o si se desea; se convierte un compuesto de fórmula (I) en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, o por el contrario, se convierte una sal de adición de ácido de un compuesto de fórmula (I) en una forma de base libre con álcali; y, si se desea, preparando formas estereoquímicamente isoméricas del mismo.