

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 148**

51 Int. Cl.:

C07D 235/08 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2011 E 11820193 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2610255**

54 Título: **Compuestos y composición de 1H-benzo[d]imidazol-5-ilo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

25.08.2010 KR 20100082258

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

06.06.2016

73 Titular/es:

**NEOPHARM CO., LTD. (100.0%)
928 Tamnip-dong Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR**

72 Inventor/es:

**GWAK, HYUNG SUB;
KIM, YONG ZU;
KIM, UK IL;
PARK, BYEONG DEOG;
PARK, TAE KYO;
WOO, SUNG HO;
YUN, JOUNG YUL;
LEE, DAE YON;
LEE, HYANG SOOK;
JEON, JEONG EUN;
JEONG, SE KYOO y
CHOI, HYUNG MOOK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 573 148 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

Compuestos y composición de 1H-benzo[d]imidazol-5-ilo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a compuestos que incluyen derivados de benzoimidazol y sus sales, como nuevos compuestos heterocíclicos y, más particularmente, a un inhibidor de la receptor activado por proteasas 2 (PAR-2) y una composición para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias.

Técnica antecedente

10 El receptor activado por proteasas 2 (PAR-2) pertenece al receptor acoplado a proteína G (GPCR), y se encontró en asociación con el receptor de trombina (PAR-1) encontrado en 1991. Como resultado de la búsqueda del mecanismo de activación de PAR-2, se ha sido conocido que PAR-2 tiene un mecanismo de activación específico en el sentido de que, cuando una proteasa, tal como tripsina o triptasa derivada de células, escinde un sitio específico de una secuencia peptídica presente en un terminal de un dominio extracelular del PAR-2, una secuencia peptídica que aparece en un terminal del receptor (por ejemplo, SLIGRL para los seres humanos) está combinada con un sitio específico del PAR-2, el cual se activa entonces (Exp. Rev. Mol. Med. 4 (16): 1-17, 2002).

15 Recientemente, se ha informado de que el PAR-2 desempeña un papel importante en la reacción de inflamación de la piel, la función de barrera cutánea y la aparición de prurito y, por lo tanto, se representa una fuerte asociación entre el papel de PAR-2 y la dermatitis atópica que muestra todos esos síntomas como síntomas más importantes de la enfermedad.

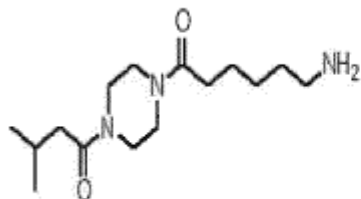
20 Se sabe que PAR-2 está presente en diversas células en los seres humanos, y se ha informado de su eficacia en la inducción de reacciones inflamatorias, reacciones de activación de células nerviosas, etc. Además, se ha informado de que PAR-2 promueve el transporte de melanosoma, mientras que está implicado en el mecanismo de transmisión de señales entre los queratinocitos y los melanocitos en la piel y, de esta manera, está estrechamente asociado con la pigmentación de la piel (Drug Dev. Res. 59: 408-416, 2003).

25 Además, recientemente se ha informado de que la activación del PAR-2 está asociada de manera muy estrecha con la función de barrera cutánea. Es decir, se ha informado de que, cuando la función de barrera cutánea está dañada, la actividad de la proteasa aumenta rápidamente en el estrato córneo, lo que conduce a la activación del PAR-2 (J. Invest Dermatol 126: 2074-2076, 2006), y se ha confirmado que un material derivado del ácaro del polvo o la cucaracha, que es un tipo de alérgeno, que causa y exacerba la dermatitis atópica, tiene también un efecto de activación del PAR-2. Estudios previos del presente investigador mostraron que, cuando se aplica un alérgeno a la piel que tiene barreras cutáneas alteradas, la activación del PAR-2 inhibe la recuperación de la función de barrera cutánea, y cuando se aplican simultáneamente un inhibidor de PAR-2 y un alérgeno, el mecanismo de recuperación de la barrera se normaliza (J. Invest. Dermatol. 128: 1930-1939, 2008). Además, se informó de que la recuperación de la barrera cutánea es promovida cuando el inhibidor de PAR-2 se aplica a la piel que tiene barreras cutáneas alteradas. Teniendo en cuenta que la alteración de la barrera cutánea es el síntoma más común en la piel de pacientes con dermatitis atópica, se espera que este efecto del inhibidor de PAR-2 de recuperación de la alteración de la barrera cutánea sea capaz de ayudar a mejorar los síntomas de la dermatitis atópica.

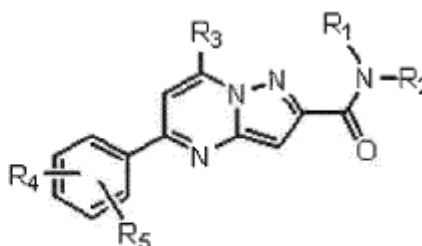
30 Se ha informado de que la activación intradérmica del PAR-2 causa prurito, y se conoce que este prurito causa comportamiento de rascado. Según los resultados de investigación existentes sobre los efectos anti-pruriginosos de los inhibidores de PAR-2 (patente japonesa expuesta a inspección pública con N° de publicación JP2004-170323), se ha informado de que el comportamiento de rascado se redujo significativamente cuando se aplicó el inhibidor de PAR-2 a la piel. Según el mecanismo pruriginoso conocido, las células nerviosas se activan por la activación del PAR-2 presente en la fibra nerviosa en la piel y, de esta manera, se transmite una señal pruriginosa al cerebro. Se confirmó que, en un modelo animal en el que se aplica un material activador de PAR-2 a la piel, la función de PAR-2 asociada con pruriginosa aumentó rápidamente el número de veces de rascado, y este fenómeno se suprimió cuando se inhibió la activación del PAR-2 (J. Neurosci. 2003, 23, 6176-6180).

40 Como materiales que tienen una eficiencia inhibidora selectiva de PAR-2, en la actualidad se conocen dos especies en todo el mundo, y una de ellas es ENMD-1068 de EntreMed Company, una empresa de capital riesgo de biotecnología en los Estados Unidos, cuya eficacia se verificó en una revista académica.

45 Además, la patente japonesa expuesta a inspección pública con N° de publicación 2004-170323 de Sumitomo Pharmacy Company divulga un inhibidor de PAR-2.



ENMD-1.068



inhibidor de Sumitomo Company

Con respecto a la exacerbación de la inflamación de la piel debida al PAR-2 y a los efectos antiinflamatorios de los materiales que tienen actividad inhibidora de PAR-2, se confirmó que, cuando la tripsina, que es una proteasa del PAR-2 activador, o el péptido activador (AP), que es un material del PAR-2 activador, se aplicó a la piel, la inflamación de la piel aumentó, y cuando se aplicó conjuntamente un inhibidor de la proteasa, se redujo la inflamación de la piel (FASEB J. 2003, 17, 1871-1885).

Massimo et al. (Ytterbium Triflate 1,2 promoted synthesis of benzimidazole derivatives, SYNLETT, nº 10, 1 de Enero de 2004) se refiere a bencimidazolas sustituidas de manera diferente sintetizadas en presencia de Yb(OTf)₃ como catalizador.

Yagupolskii et al. (2-alkyl-1-(2-aryl-1,1-difluoro-2-hydroxyethyl)benzimidazoles: potential angiotensin II receptor antagonists, Tetrahedron letters, Pergamon, GB, vol 41, nº 13, 1 de Marzo de 2000) se refiere a 2-alkil-1-(bromodifluorometil)benzimidazolas sintetizadas y condensadas con aldehídos aromáticos para dar 2-alkil-1-(2-aryl-1,1-difluoro-2-hidroxietyl)-benzimidazolas.

Schulenberg et al. (The preparation of 2-methyl-1-phenylbenzimidazole 3-oxide, The Journal of Organic Chemistry, American Chemical Society, Estados Unidos, vol. 29, nº 7) se refiere a la síntesis de varios N-óxidos de benzimidazol.

El documento WO 2009/000413 A1 se refiere a la síntesis regioselectiva catalizada por cobre de benzimidazolas y azabenimidazolas.

El documento EP 1988076 A1 se refiere al derivado de amida o sal del mismo que puede ser usado para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades en las que están implicados los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT₇.

El documento WO 2010/012745 A3 se refiere a benzimidazolas útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular excesiva o anormal.

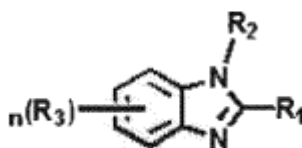
Los presentes inventores sintetizaron varios compuestos durante un largo tiempo con el fin de sintetizar materiales que tienen actividad inhibidora de PAR-2 y confirmaron las actividades de los mismos, y finalmente inventaron nuevos compuestos que tenían una excelente actividad inhibidora de PAR-2.

Divulgación

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos heterocíclicos representados por la Fórmula Química 2, que están abarcados dentro de la Fórmula Química 1 siguiente, como nuevos compuestos heterocíclicos.

[Fórmula Química 1]



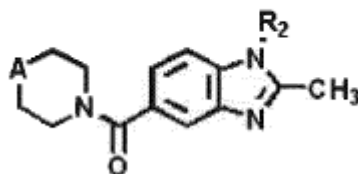
Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias, que incluya el compuesto heterocíclico de Fórmula Química 2 según la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y también, una composición inhibidora de receptor activado por proteasas 2 (PAR-2) que incluya el compuesto de Fórmula Química 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Solución técnica

Un compuesto heterocíclico representado por la Fórmula Química 2 siguiente:

[Fórmula Química 2]

5



en la que en la Fórmula Química 2,

10

A es CH_2 o NR_{31} ;

R_{31} se selecciona de entre hidrógeno, alquilo (C1-C7), alquilcarbonilo (C1-C7) y cicloalquilcarbonilo (C3-C6); y

R_2 es bencilo, y el bencilo de R_2 puede estar sustituido adicionalmente con halógeno, alquilo (C1-C7) o heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros.

15

El término sustituyentes, que incluye "alquilo", "alcoxi" y las otras partes "alquilo" y, descritas en la presente memoria, pueden tener una cadena lineal o una cadena ramificada. En la presente invención, alquilo (C1-C7) incluye metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, n-pentilo, i-pentilo, n-hexilo y n-heptilo; alcoxi (C1-C6) puede incluir metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi, t-butoxi, n-pentoxi, i-pentoxi y n-hexiloxi; y cicloalquilo (C3-C6) puede incluir ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Además, arilo (C6-C12) puede incluir fenilo, naftilo, bifenilo, antrilo y similares. Los anillos heterocíclicos de 5 o 6 miembros pueden incluir anillos heterocíclicos alifáticos y hetero arilo. En particular, heterocicloalquilo, es decir, los anillos heterocíclicos alifáticos pueden incluir morfolinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirrolidonilo, piperidonilo, oxazolidinonilo y tiazolidinonilo; heteroarilo puede incluir heteroarilo monocíclico tal como furilo, tiofenilo, pirrolilo, piranilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, triazinilo, tetrazinilo, triazolilo, tetrazolilo, furazanilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo y similares, y heteroarilo policíclico, tal como, benzofuranilo, benzotiofenilo, isobenzofuranilo, benzoimidazolilo, benzotiadiazolilo, benzoisotiazolilo, benzoisoxazolilo, benzoxazolilo, isoindolilo, indolilo, indazolilo, benzotiazolilo, quinolilo, isoquinolilo, cinnolinilo, quinazolinilo, quinolizínilo, quinoxalinilo, carbazolilo, fenantridinilo, benzodioxolilo y similares.

20

25

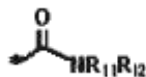
Más específicamente, en la Fórmula Química 1 (fuera del alcance de la presente invención),

R_1 es alquilo (C1-C7);

R_2 se selecciona de entre hidrógeno, halógeno, alquilo (C1-C7), arilo (C6-C12) y ar(C6-C12)alquilo(C1-C7);

30

R_3 se selecciona de entre hidrógeno, halógeno, alquilo (C1-C7), arilo (C6-C12), alcoxycarbonilo (C1-C7),



y;

35

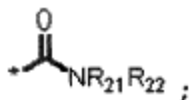
R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C1-C7), cicloalquilo (C3-C6), arilo (C6-C10), heterocicloalquil arilo (C6-C12) o heteroarilo (C3-C12), y R_{11} y R_{12} pueden estar unidos entre sí a través de alquileno, oxialquileno o aminoalquileno para formar un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros;

n es un número entero de 1 a 4;

40

el arilo (C6-C12) de R_2 y R_3 y el anillo heterocíclico formado a partir de R_{11} y R_{12} puede estar sustituido adicionalmente con halógeno, hidroxilo, alquilo (C1-C7), arilo (C6-C10), cicloalquilo (C3-C6), heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros, heterocicloalquilcarbonilo de 5 o 6 miembros, cicloalquil sulfonilo de 5 o 6 miembros, heteroarilo de 5 o 6 miembros, alcoxi (C1-C6), alcoxycarbonilo (C1-C7), alquilcarbonilo (C1-C7), ciclo (C3-C6) alquilcarbonilo (C1-C7), ar (C6-C10) alquilcarbonilo (C1-C7), heteroarilcarbonilo (C3-C10), arilcarbonilo (C6-C10), alquilsulfonilo (C1-C7), amino alquilcarbonilo (C1-C7), alquiloxicarbonilo (C1-C7), ar (C6-C10) alquiloxicarbonilo (C1-C7), amino alquilamino (C1-C7), alquilamido (C1-

C7), alquilcarbamoilo (C1-C7), alquilsulfoneamido (C1-C7), o

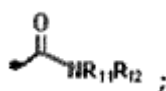


5 y

R₂₁ y R₂₂ son cada uno independientemente alquilo (C1-C7) o cicloalquilo (C3-C6), arilo (C6-C12), o R₂₁ y R₂₂ pueden estar unidos entre sí a través de alquileno para formar anillos heterocíclicos de 5 o 6 miembros.

Más preferiblemente, en el compuesto heterocíclico representado por la Fórmula Química 1, R₁ es metilo; R₂ es bencilo o fenilo; R₃ se selecciona de entre alcóxicarbonilo (C1-C7) y

10



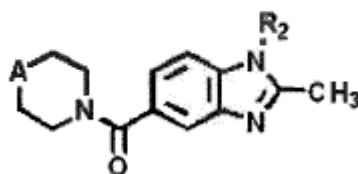
15

R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C1-C7), cicloalquilo (C3-C6), arilo (C6-C10), heterocicloalquil arilo (C6-C12) o heteroarilo (C3-C12); R₁₁ y R₁₂ pueden estar unidos entre sí a través de alquileno, oxialquileno o aminoalquileno para formar un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros; y n es un número entero de 1 a 4.

Además, el compuesto heterocíclico según la presente invención incluye la Fórmula Química 2 siguiente:

[Fórmula Química 2]

20



En la Fórmula Química 2,

A es CH₂ o NR₃₁;

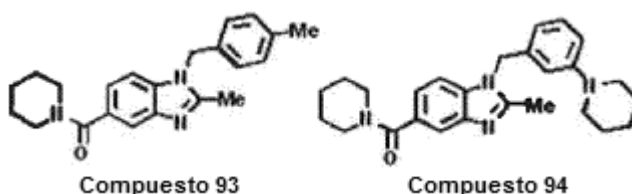
R₃₁ se selecciona de entre hidrógeno, alquilo (C1-C7), alquilcarbonilo (C1-C7) y cicloalquilcarbonilo (C3-C6); y

25

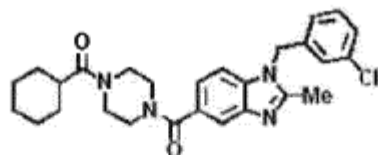
R₂ es bencilo y el bencilo de R₂ puede estar sustituido adicionalmente con halógeno, alquilo (C1-C7) o heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros.

Los ejemplos específicos del compuesto heterocíclico según la presente invención pueden seleccionarse de entre las siguientes estructuras, pero no se limitan a las mismas.

30

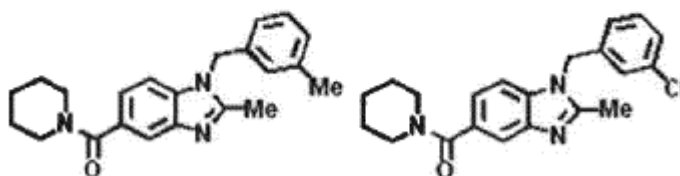


35



Compuesto 95

5



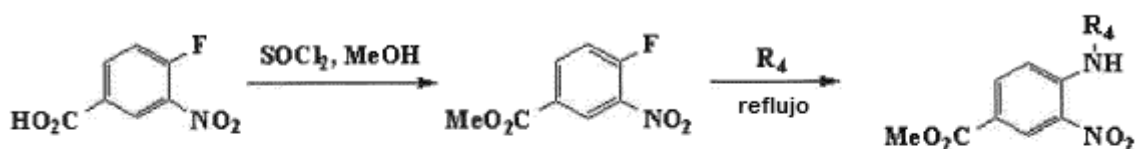
Compuesto 98

Compuesto 99

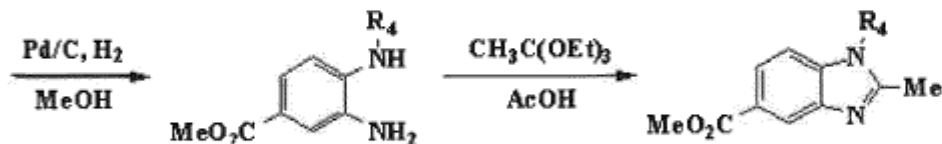
10 El compuesto de Fórmula Química 2 según la presente invención puede prepararse mediante el Esquema de Reacción 1 siguiente, pero no se limita al mismo.

[Esquema de Reacción 1]

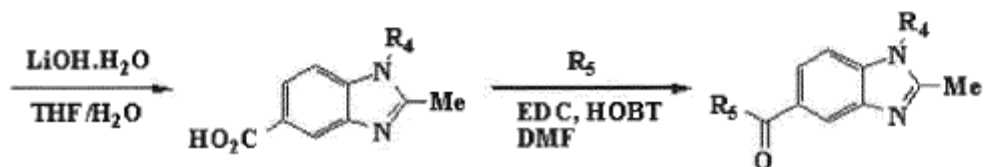
15



20



25



30

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel, que incluye el compuesto heterocíclico de Fórmula Química 2 representado por la Fórmula Química 2 según la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las enfermedades inflamatorias de la piel pueden incluir alteración de la barrera cutánea, inflamación de la piel, psoriasis, dermatitis atópica, hiper-pigmentación post-inflamatoria (PIH) y prurito, pero no se limitan a las mismas.

Además, la presente invención puede incluir una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de metástasis de cáncer, enfermedad gastrointestinal, asma y cirrosis hepática, que incluye el compuesto heterocíclico representado por la Fórmula Química 2 según la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35

Además, la presente invención proporciona una composición inhibidora de receptor activado por proteasas 2 (PAR-2) que incluye el compuesto heterocíclico representado por la Fórmula Química 2 según la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, la presente invención proporciona una composición cosmética que incluye el compuesto heterocíclico representado por la Fórmula Química 2 según la presente invención.

Efectos ventajosos

La presente invención proporciona compuestos heterocíclicos representados por la Fórmula Química 2, y el compuesto de Fórmula Química 2 según la presente invención o la sal del mismo es un inhibidor del receptor activado por proteasas 2 (PAR-2) y tiene alta actividad. Se sabe que PAR-2 desempeña un papel importante en la inflamación o las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, en particular metástasis del cáncer, las enfermedades gastrointestinales que cubren la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) y similares, el asma y la cirrosis hepática. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las enfermedades que implican PAR-2 son principalmente enfermedades crónicas intratables, puede anticiparse que el desarrollo de inhibidores PAR-2 eficaces tendrá una gran posibilidad comercial.

En particular, en lo que se refiere a la piel, se sabe que PAR-2 está implicado en reacciones importantes, tales como la hiper-pigmentación intradérmica y la inducción de prurito, además de la inflamación y, además, se ha informado de que PAR-2 desempeña un papel importante en el mantenimiento de la función de barrera cutánea y el tratamiento de las heridas y, de esta manera, el inhibidor de PAR-2 tiene también una alta posibilidad en el tratamiento de enfermedades de la piel. La dermatitis atópica, que es una enfermedad de la piel que muestra simultáneamente estos diversos síntomas de la piel, es una enfermedad inflamatoria crónica intratable de la piel y muestra simultáneamente diversos síntomas debido a la activación de PAR-2, tales como prurito severo y alteración de la barrera cutánea, hiper-pigmentación post-inflamatoria (PIH) y similares, y de esta manera se determina que la dermatitis atópica es una enfermedad a la cual es aplicable en primer lugar el inhibidor de PAR-2.

Además, se ha informado de que la expresión de PAR-2 aumenta en una región herida de la piel, y se ha informado de que cuando esta región herida es tratada con un componente que tiene eficacia inhibitora de PAR-2, se promueve el tratamiento de la herida.

Por lo tanto, el compuesto de Fórmula Química 2 o la sal del mismo, según la presente invención, puede usarse para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias tales como la alteración de la barrera cutánea, la inflamación de la piel, la dermatitis atópica y similares, y el tratamiento de la herida, y es útil como una composición farmacéutica o una composición cosmética.

Además, el compuesto de Fórmula Química 2 o la sal del mismo, según la presente invención, es útil como un inhibidor de receptor activado por proteasas 2 (PAR-2).

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un perfil de análisis de la actividad inhibitora de PAR-2, especificado en el Ejemplo Experimental 1;

La Fig. 2 muestra los resultados del ensayo de β -arrestina en el Ejemplo Experimental 2;

La Fig. 3 muestra los efectos de los materiales candidatos a inhibidores de PAR-2 sobre la recuperación después de la alteración grave de la barrera cutánea (**: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$);

La Fig. 4 muestra los cambios en la pérdida de la permeabilidad transdérmica mediante la aplicación de los inhibidores de PAR-2 en un modelo animal de dermatitis crónica usando oxazolona;

La Fig. 5 muestra los cambios en el contenido de humedad en el estrato córneo mediante la aplicación de inhibidores de PAR-2 en un modelo animal de dermatitis crónica usando oxazolona;

La Fig. 6 muestra los cambios en el espesor de la epidermis mediante la aplicación de inhibidores de PAR-2 en un modelo animal de dermatitis crónica usando oxazolona; y

La Fig. 7 muestra los efectos sobre los queratinocitos PCNA-positivos, de materiales selectivos en un modelo animal de dermatitis crónica usando oxazolona.

Mejor modo

La presente invención está dirigida a proporcionar compuestos heterocíclicos representados por la Fórmula Química 2 indicada a continuación, como nuevos compuestos heterocíclicos.

Con el fin de evaluar la actividad inhibitora de PAR-2 del compuesto de Fórmula Química 2 según la presente invención, conociéndose que el mecanismo de PAR-2 está asociado con el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel, tales como alteración de la barrera cutánea, inflamación de la piel, psoriasis, síndrome de Netherton o dermatitis atópica, se llevaron a cabo experimentos in vitro e in vivo. Según los resultados, puede confirmarse que el compuesto de la presente invención tenía actividad inhibitora de PAR-2 en las células.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, una composición cosmética, y una composición inhibitora de receptor activado por proteasas 2 (PAR-2), para el tratamiento y la prevención de

enfermedades inflamatorias de la piel, que incluyen el compuesto de Fórmula Química 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Aquí, las enfermedades inflamatorias de la piel incluyen alteración de la barrera cutánea, psoriasis acompañada de inflamación de la piel, síndrome de Netherson, dermatitis atópica y similares.

5 Además, la presente invención puede proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de heridas de la piel, que usa el hecho de que la supresión de la expresión de PAR-2 promueve el tratamiento de las heridas.

En la presente invención, la composición farmacéutica o la composición de inhibidor de PAR-2 pueden incluir, como un ingrediente activo, el compuesto de Fórmula Química 1 según la presente invención al 0,001 ~ 90% en peso, y preferiblemente al 0,001 ~ 50% en peso.

10 Además, la composición farmacéutica o la composición de inhibidor de PAR-2 para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel o el tratamiento de heridas de la piel, según la presente invención, pueden incluir toda composición que pueda ser administrable al cuerpo vivo, incluyendo aplicaciones externas, inyecciones, inhalaciones, preparaciones orales y similares. Las formas de dosificación que son aplicables a la piel o mucosa no están particularmente limitadas, pero pueden formularse en líquido, aceite líquido, suspensión, crema, ungüento, gel, jalea o spray.

15 En adelante lo que sigue, la presente invención se describirá por medio de los ejemplos y ejemplos experimentales siguientes, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de (2-metil-1-m-tolil-1H-benzo[d]imidazol-5-il) (piperidin-1-il)metanona (Compuesto 98)

[Etapa 1] Preparación de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo

20 Se disolvió ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico (3,00 g, 16,2 mmol) en metanol 40 ml, y se añadió cloruro de tionilo (3,5 ml, 48,6 mmol) lentamente al mismo a 0°C. La temperatura se elevó lentamente hasta temperatura ambiente y, a continuación, se agitó a reflujo durante 1 hora. El disolvente se eliminó por concentración a presión reducida, para obtener un compuesto objetivo como un sólido de color marfil (3,12 g, 97%).

¹H RMN (600 MHz, cloroformo-d1) δ = 8,73 (dd, J = 2,4 Hz, 7,5 Hz, 1H), 8,34 (m, 1H), 7,42 (t, J = 9,0 Hz, 1H), 3,99 (s, 3H)

25 [Etapa 2] Preparación de 3-amino-4-(m-tolilamino)benzoato de metilo

30 El compuesto obtenido en la Etapa 1 (1,30 g, 6,53 mmol), m-toluidina (1,40 g, 13,1 mmol) y carbonato de potasio (870 mg, 6,53 mmol) se disolvieron en acetonitrilo y, a continuación, se agitó a reflujo durante 12 horas. El disolvente se eliminó por concentración a presión reducida y, a continuación, el precipitado generado mediante la adición de hexano al mismo se filtró y se lavó con hexano, para obtener 3-nitro-4-(m-tolilamino)benzoato de metilo como un sólido naranja (1,37 g, 73%).

El compuesto anterior (1,00 g, 3,49 mmol) se disolvió en MeOH 50 mL y, a continuación, se añadieron 50 mg de Pd/C, seguido de agitación bajo gas hidrógeno a 1 atm durante 2 horas. La mezcla reaccionada se filtró usando celite, y el filtrado se concentró a presión reducida, para obtener un compuesto objetivo como un sólido amarillo (0,90 g, 99%).

35 ¹H RMN (600 MHz, cloroformo-d1) δ = 7,46 (m, 2H), 7,13-7,15 (m, 2H), 6,74 (m, 3H), 5,59 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,65 (s, 2H), 2,29 (s, 3H)

[Etapa 3] Preparación de ácido 2-metil-1-m-tolil-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico

40 Una mezcla del compuesto obtenido en la Etapa 2 (0,46 g, 1,80 mmol) y ortoacetato de trietilo (1,46 g, 9,00 mmol) se disolvió en 3 ml de ácido acético 3 ml, y se agitó a reflujo durante 12 horas. La mezcla reaccionada se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida y, a continuación, se diluyó con 20 ml de acetato de etilo. El material resultante se lavó dos veces con 30 ml de una solución acuosa saturada de carbonato de sodio y, a continuación, una vez con 30 ml de agua, de manera secuencial y, a continuación, se tomó la capa orgánica y se deshidrató con sulfonato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, y se purificó por medio de un cromatógrafo de columna, para obtener 2-metil-1-m-tolil-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxilato de metilo como un sólido púrpura (436 mg, 86%).

45 El compuesto anterior (398 mg, 1,42 mmol) se disolvió en 8 ml de solución de mezcla THF/H₂O3/1 en presencia de hidróxido de litio monohidrato (300 mg, 7,10 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y, a continuación, se concentró a presión reducida. El sólido generado mediante la aplicación de una solución acuosa de HCl 1 N a la misma se filtró para obtener ácido 2-metil-1-m-tolil-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico como un sólido púrpura (330 mg, 88%), que se usó en la siguiente reacción sin un procedimiento de purificación separado.

[Etapa 4] Preparación de (2-metil-1-m-tolil-1H-benzo[d]imidazol-5-il) (piperidin-1-il) metanona (Compuesto 98)

El compuesto obtenido en la Etapa 3 (80,0 mg, 0,300 mmol) se disolvió en DMF y, a continuación, se añadieron HOBT (81 mg, 0,6 mmol), TEA (126 μ L, 1,2 mmol) y piperidina 28,1 mg (0,330 mmol) al mismo. Se colocó clorhidrato de EDC (25 mg, 0,13 mmol) en su interior a 0°C y, a continuación, se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla reaccionada se diluyó con acetato de etilo (32 ml) y, a continuación, se lavó con agua (32 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de filtración y concentración bajo presión reducida y, a continuación, se sometió a cromatografía en columna (MC:MeOH = 30:1), para obtener un compuesto objetivo (79,4 mg, 79%).

^1H RMN (600 MHz, cloroformo- d_1) δ = 7,72 (m, 1H), 7,44 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,26 (dd, J = 1,8 Hz, 8,4 Hz, 1H), 7,10-7,13 (m, 3H), 3,70 (br, 2H), 3,39 (br, 2H), 2,49 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 1,51-1,66 (br m, 6H)

Con el fin de evaluar eficacia inhibitoria de PAR-2 del Compuesto 98 preparado en el Ejemplo 1, se llevaron a cabo experimentos in vitro e in vivo.

<Evaluación de la actividad in vitro del inhibidor de PAR-2 >

Ejemplo de Ensayo 1: Ensayo de inmovilización de calcio

Con el fin de evaluar actividad inhibitoria de PAR-2 del material sintetizado, en primer lugar, se construyó un sistema de ensayo capaz de medir el cambio en la concentración de iones de calcio en una célula en tiempo real y, a continuación, se realizó una evaluación usando el sistema de ensayo. PAR-2 es un tipo de receptor acoplado a proteína G (GPCR). Cuando el PAR-2 se activa en la célula, la fosfolipasa C-b (PLC-b) se activó para escindir 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2) en trifosfato de inositol (IP3) y diacil-glicerol (DAG). El IP3 generado en la presente memoria promueve la secreción de iones de calcio en un retículo endoplásmico (ER), el depósito de iones de calcio en la célula, lo que resulta en un aumento de los iones de calcio en la célula. En base a los resultados de búsqueda existentes, se construyó un sistema de ensayo de selección in vitro capaz de buscar materiales que pueden suprimir el aumento de la concentración de iones de calcio en la célula debido a la activación de PAR-2. Como activador de PAR-2 usado en el experimento, se usó péptido activador (AP). Como un reactivo para detectar la concentración de iones de calcio en la célula, se usó el kit de ensayo Calcium-4 de Molecular Probe Company. Se usó HCT-15, una línea celular sobre-expresada de PAR-2 como una línea celular usada en el experimento. Los materiales candidatos a inhibidores de PAR-2 se trataron durante 5 minutos y, a continuación, se trataron con el AP, y se observó el cambio en la fluorescencia durante 2 minutos, en tiempo real usando FlexStation II de Molecular Device Company.

La actividad inhibitoria de PAR-2 del material sintetizado se evaluó usando dicho protocolo, y el perfil de ensayo del Compuesto 98 sintetizado en el Ejemplo 1 se muestra en la Fig. 1.

Ejemplo de ensayo 2: Ensayo GPCR de β -arrestina

Se introdujo, de manera aditiva, un protocolo de ensayo in vitro capaz de detectar la activación de PAR-2 además del ensayo de inmovilización de calcio, y se midió la actividad del material seleccionado. En primer lugar, la actividad inhibitoria de PAR-2 del Compuesto 98 se midió usando el kit de ensayo GPCR de β -arrestina PathHunter™ de DiscoverX Company, capaz de detectar la acumulación de β -arrestina, que es un material de reacción intercelular generado principalmente por la activación de PAR-2. Según los resultados de la medición, se observó un valor IC50 ligeramente diferente del ensayo de inmovilización de calcio (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre el resultado del ensayo de Calcium-4 y el resultado del ensayo de β -arrestina

Compuesto	IC50 (μ M)		CC50 (μ M)
	Calcium-4	PathHunter™	
Compuesto 98	242,6	95,28	> 100

Ejemplo de Ensayo 3: Microscopía confocal

Con el fin de confirmar visualmente la activación de PAR-2, se preparó una línea celular que tenía la siguiente estructura con referencia a los documentos de referencia existentes, y la activación de PAR-2 se observó usando un microscopio confocal. Como una línea celular, se usaron células epiteliales de riñón de rata transformadas con el virus de sarcoma murino de Kirsten (células KNRK), que es una línea celular en la que normalmente no se expresa PAR-2. En la célula KNRK, un terminal N se marcó con el epítipo Flag y un terminal C se marcó con el epítipo Myc, de manera que se construyó una célula transfectada estable. Flag y Myc de la línea celular PAR-2 KNRK preparada de esta manera se sometieron a doble tinción, y se observó la activación o no activación de PAR-2 usando microscopía confocal ([tripsina] = 1 μ M, [SLIGKV (AP)] = 100 μ M). Cuando el PAR-2 no se activaba, Flag y Myc tenían doble tinción y de esta manera aparecía un color amarillo en la imagen fusionada. Sin embargo, cuando se activaba el PAR-2, Flag se separaba y de

esta manera se mostraba una imagen roja.

Como resultado de que la línea celular PAR-2 KNRK se trató simultáneamente con un material seleccionado, el Compuesto 98, junto con tripsina, péptido activador (SLIGKV) ([tripsina] = 1 μ M, [SLIGKV (péptido activador)] = 100 μ M, [Compuesto 98] = 200 μ M), se observó una imagen de color amarillento y, de esta manera, se confirmó que se suprimió la activación de PAR-2.

<Evaluación de la actividad in vivo del inhibidor de PAR-2>

Ejemplo de ensayo 4: Experimento sobre la recuperación de la barrera cutánea grave

La tasa de recuperación después de la alteración de la barrera cutánea grave se evaluó en un compuesto seleccionado usando ratones atímicos. Las pieles de ambas regiones abdominales de cada uno de los ratones atímicos (SKH-1) de 6~8 semanas de edad se sometieron a remoción repetitiva de cinta adhesiva, de manera que la pérdida de agua transepidermica alcanzó un nivel de aproximadamente 35~40 $\text{g/m}^2/\text{hr}$ y, a continuación, se aplicaron muestras respectivas a los mismos. La pérdida de agua transepidermica se midió usando el dispositivo TEWameter (Courage & Khazaka, Alemania) inmediatamente antes y después de la alteración de la barrera cutánea y 3 horas y 6 horas después de la aplicación, y la tasa de recuperación de la pérdida de agua transepidermica se calculó como se indica a continuación.

$$\% \text{Recuperación de TEWL} = \left(1 - \left(\frac{\text{TEWL}_a - \text{TEWL}_c}{\text{TEWL}_a - \text{TEWL}_b}\right)\right) \times 100$$

(en la que TEWL_a es el valor TEWL inmediatamente después de la alteración de la barrera, TEWL_b es el valor TEWL de referencia, y TEWL_c es el valor TEWL en el momento indicado).

Según los resultados del experimento, se observó que el grupo tratado con 1,0% de Compuesto 98 mostraba una recuperación rápida. Asimismo, se observó que el grupo tratado con 0,1% de Compuesto 98 tenía una diferencia estadísticamente significativa. Según los resultados de investigación existentes, después de la alteración de la barrera cutánea, la actividad de la proteasa aumentó en la epidermis de la región perturbada, lo que conduce a un aumento en la actividad de PAR-2 en la epidermis. Se ha informado de que la barrera cutánea se altera rápidamente cuando se suprime la activación de PAR-2, y el presente estudio confirmó el mismo resultado de que el inhibidor de PAR-2 promueve la recuperación de la barrera cutánea. Estos resultados del estudio mostrados en la Fig. 3 muestran que el Compuesto 98 es un material que tiene la mejor actividad en la promoción de la recuperación después de la alteración de la barrera cutánea.

Ejemplo de Ensayo 5: Modelo de oxazolona

La eficacia de un material seleccionado se evaluó usando un modelo animal de dermatitis crónica. Se usó un modelo animal en el que se indujo dermatitis crónica mediante la aplicación continua de oxazolona, que es un tipo de hapteno, a los ratones atímicos. Se ha informado de que el modelo de oxazolona recientemente desarrollado mostró diversas dermatitis atópicas de manera comparativamente precisa, y el estudio previo realizado por los presentes inventores ha confirmado que diversos síntomas de la dermatitis atópica general son similares a los síntomas clínicos. Con el fin de construir un modelo animal de dermatitis crónica, se aplicó 5% de oxazolona a ratones atímicos de 6 semanas (SKH-1) y sensibilizados de esta manera, y se aplicó 0,1% de oxazolona una vez cada dos días a partir de una semana después, resultando en la inducción de síntomas de dermatitis. La muestra se aplicó a un animal después de la inducción a un intervalo de una vez al día durante tres días, y se observaron los cambios de diversas funciones dérmicas y del espesor de la piel. Finalmente, se llevó a cabo una biopsia de la piel y se realizó una observación histológica.

Como un grupo de control positivo usado en el experimento, se usó 0,05% de desonide, que es un esteroide de potencia relativamente baja, y se observaron la pérdida de agua transepidermica, el contenido de humedad en el estrato córneo y el cambio de espesor de la piel.

Los resultados obtenidos mediante la evaluación de la eficacia inflamatoria del Compuesto 98 usando el modelo de oxazolona son los siguientes. En cuanto a la recuperación de la pérdida de agua transepidermica y la recuperación del contenido de humedad en el estrato córneo, se observó que el grupo tratado con el Compuesto 98 había promovido la recuperación en comparación con el grupo control (Figs. 4 y 5).

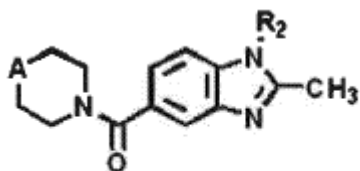
El tejido después del tratamiento durante 5 días fue sometido a biopsia y se realizó una tinción H&E y, de esta manera, se midió el cambio de espesor de la piel. Como resultado, se confirmó que todos los grupos tratados tenían una disminución

estadísticamente significativa en el espesor de la piel en comparación con los grupos no tratados (Fig. 6). Como resultado de la tinción PCNA, se observó que el grupo tratado con el Compuesto 98 tenía una disminución estadísticamente significativa en los queratinocitos PCNA positivos en comparación con el grupo control (Fig. 7).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto heterocíclico representado por la Fórmula Química 2 siguiente:

5



[Fórmula Química 2]

10 en la que en la Fórmula Química 2,

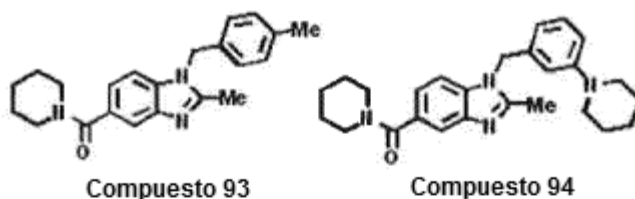
A es CH₂ o NR₃₁;

R₃₁ se selecciona de entre hidrógeno, alquilo (C1-C7), alquilcarbonilo (C1-C7) y cicloalquilcarbonilo (C3-C6); y

R₂ es bencilo, y el bencilo de R₂ puede estar sustituido adicionalmente con halógeno, alquilo (C1-C7) o heterocicloalquilo de 5 o 6 miembros.

15 2. Compuesto heterocíclico según la reivindicación 1, en el que el compuesto heterocíclico se selecciona de entre las estructuras siguientes:

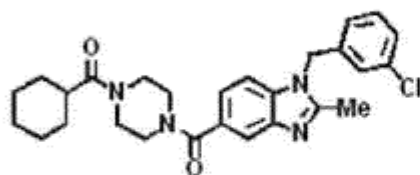
20



Compuesto 93

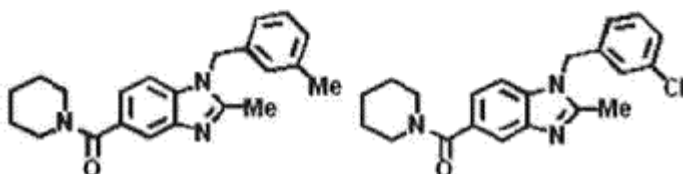
Compuesto 94

25



Compuesto 95

30



Compuesto 98

Compuesto 99

35 3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel, que comprende el compuesto heterocíclico de Fórmula Química 2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que la composición farmacéutica es para su uso en el

tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen acné, rosácea, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, hiper-pigmentación post-inflamatoria (PIH), dermatitis de contacto, prurito, psoriasis, liquen plano, eczema, infecciones de la piel y síndrome de Netherton.

5. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de heridas de la piel, que comprende el compuesto heterocíclico de Fórmula Química 2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
6. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y prevención de la metástasis de cáncer, enfermedad gastrointestinal, asma y cirrosis hepática, que comprende el compuesto heterocíclico de Fórmula Química 2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 7. Una composición cosmética que comprende el compuesto heterocíclico de Fórmula Química 2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.

FIG. 1

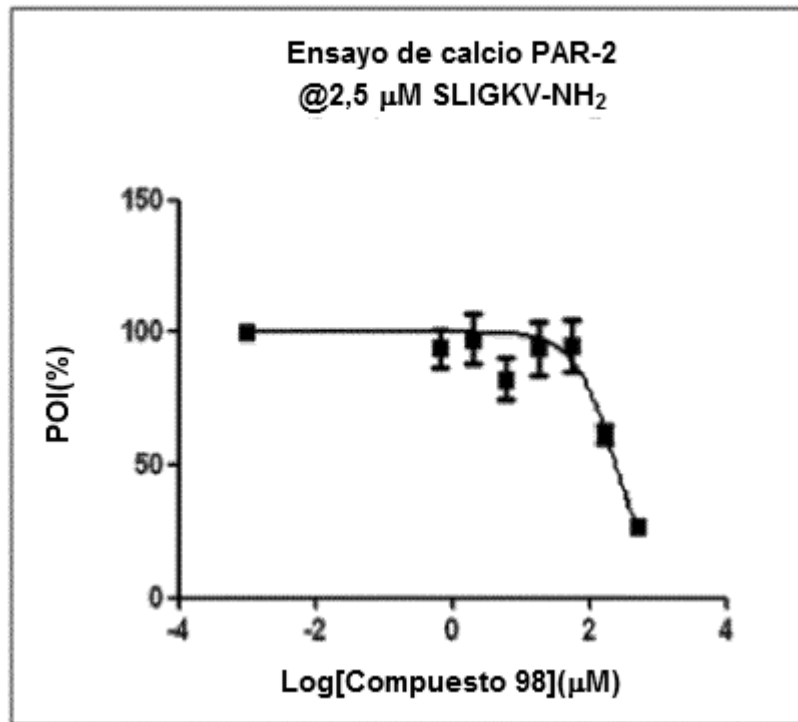


FIG. 2

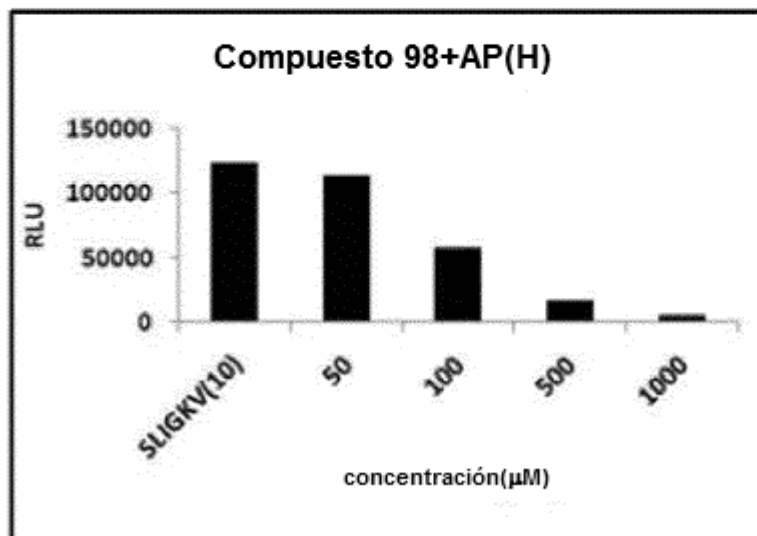


FIG. 3

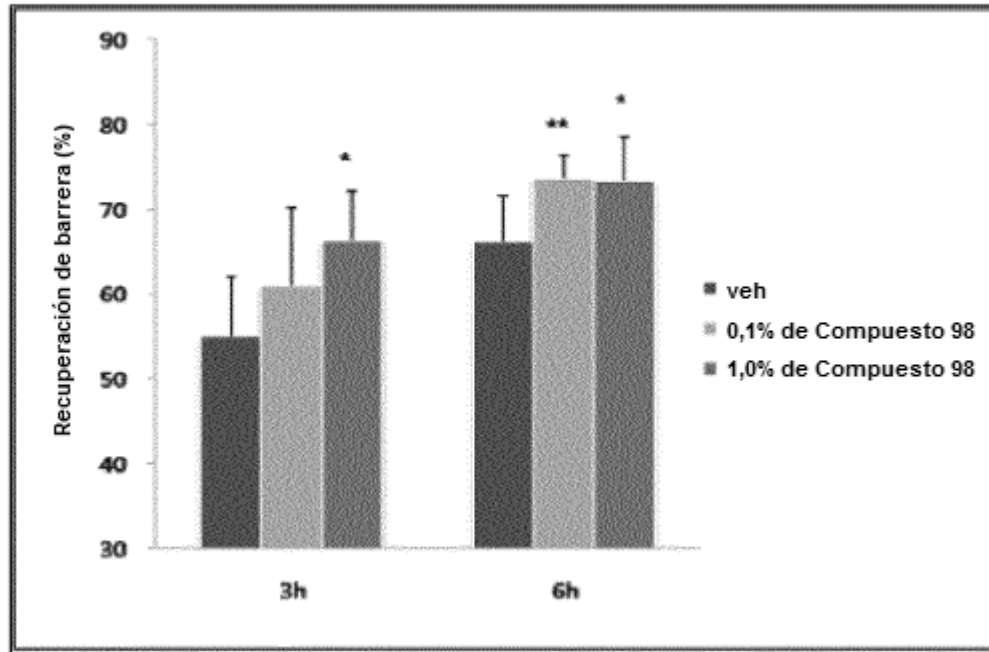


FIG. 4

TEWL en modelo de Oxazolona

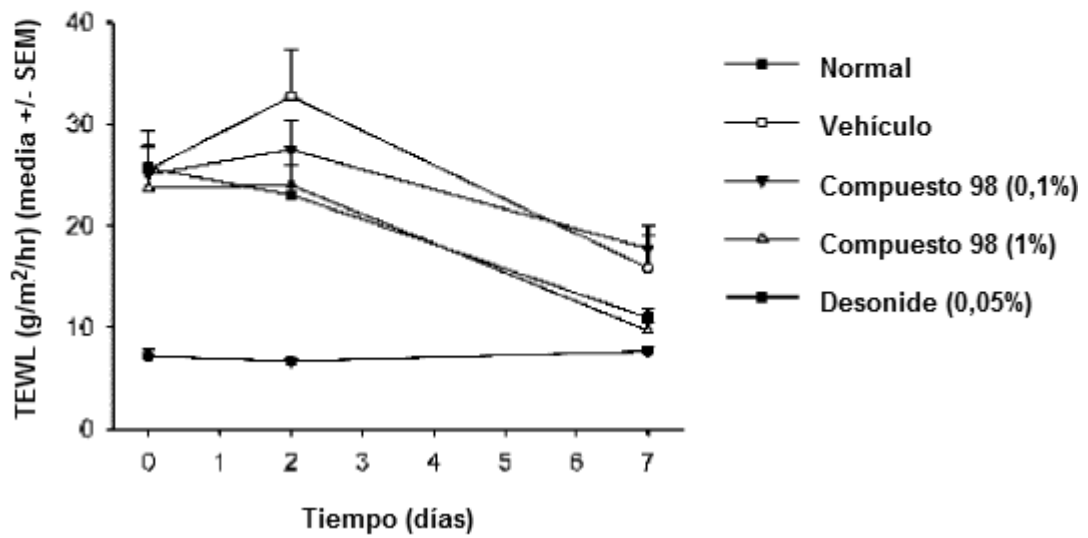


FIG. 5

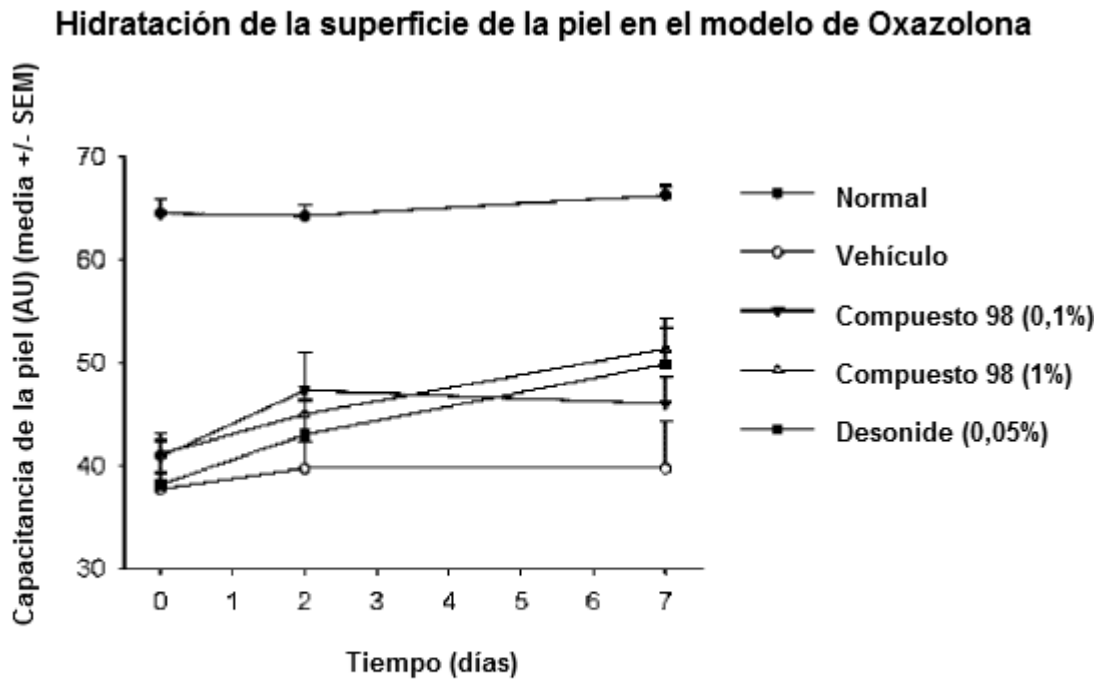
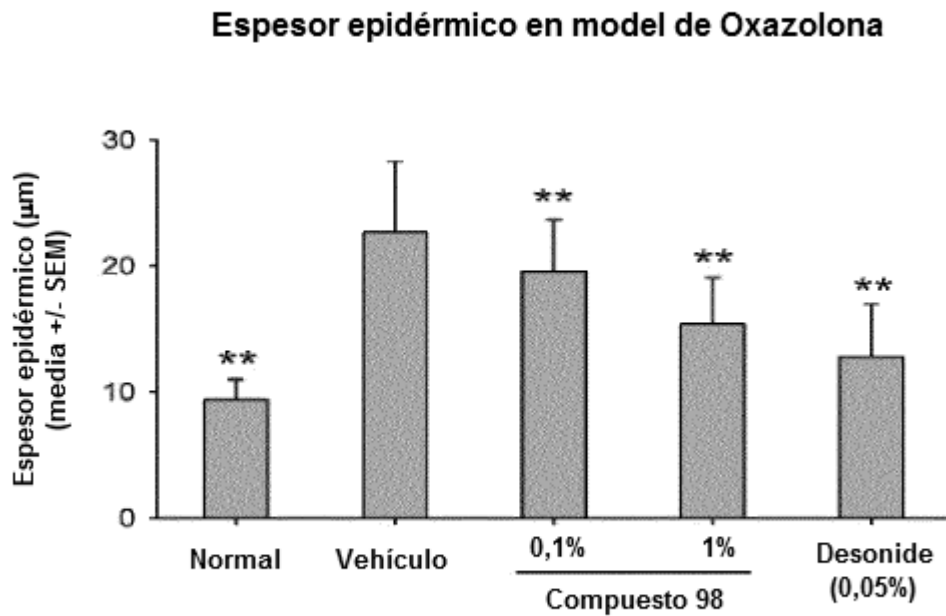


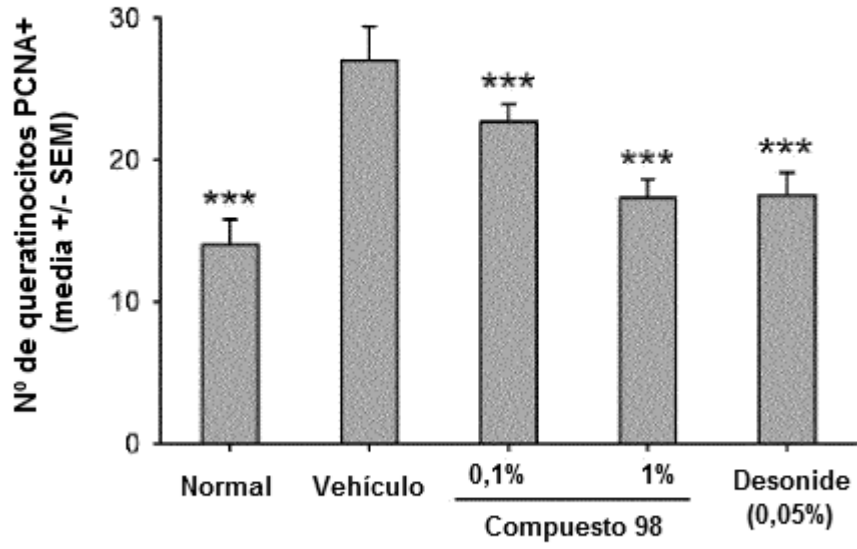
FIG. 6



** : $p < 0,011$ versus grupo tratado con vehículo. El valor P se calculó mediante el ensayo t de Student.

FIG. 7

Queratinocito PCNA positivo en modelo de Oxazolona



***: $p < 0,011$ versus grupo tratado con vehículo. El valor P se calculó mediante el ensayo t de Student.