

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 662**

51 Int. Cl.:

A61K 31/341	(2006.01)	C07D 213/64	(2006.01)	C07D 317/54	(2006.01)
A61K 31/357	(2006.01)	C07D 263/57	(2006.01)		
A61K 31/4406	(2006.01)	A61Q 19/02	(2006.01)		
A61P 1/16	(2006.01)	A61K 8/34	(2006.01)		
A61P 1/18	(2006.01)	A61P 17/00	(2006.01)		
A61P 17/02	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 17/16	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)	C07D 213/30	(2006.01)		
A61P 31/00	(2006.01)	C07D 307/12	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)	C07D 307/42	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2009 E 22151895 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024 EP 4046619**

54 Título: **Compuestos para blanquear (aclorar) la piel**

30 Prioridad:

21.07.2008 US 82422 P

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

21.02.2025

73 Titular/es:

**UNIGEN, INC. (100.00%)
2121 South State Street
Tacoma WA 98405, US**

72 Inventor/es:

**NANDY, SANDIP, K.;
LIU, JIYUN;
NESTEROV, ALEXANDRE, MIKHAILOVITCH;
HERTEL, CARMEN y
PADMAPRIYA, ABEYSINGHE, A**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 998 662 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 para blanquear (aclerar) la piel

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inhibidores novedosos de tirosinasa, a composiciones farmacéuticas, dermatológicas y cosméticas que comprenden dichos inhibidores, y a métodos de fabricación y uso de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

El color de la piel humana está determinado por la cantidad y el tipo de melanina producida por células especializadas, los melanocitos, que están localizados en las capas basales de la piel. La melanina, uno de los pigmentos naturales más ampliamente distribuidos, es un biopolímero homogéneo de tipo polifenol con una estructura compleja y color que varía de marrón a negro (eumelanina) y de rojo a amarillo (feomelanina) (Prota G. Med. Res. Rev. 1988, 8, 525-556). En la piel humana, se cree que la melanina actúa como un agente protector contra la radiación ultravioleta. Como tal, las personas que viven cerca del ecuador tienen una piel más oscura que las que viven en áreas alejadas del ecuador.

La sobreproducción de melanina puede causar diferentes tipos de color anormal de la piel, color del cabello, y otros trastornos dermatológicos, como el melasma, manchas de edad y sitios de daño actínico. La melanina se produce a través de una serie de reacciones oxidativas y etapas de polimerización que comienzan con el aminoácido tirosina. La tirosinasa (EC1.14.18.1), una enzima de tipo III que contiene cobre, cataliza dos reacciones iniciales en la producción de melanina: 1) la *orto*-hidroxilación de L-tirosina por acción de monofenolasa, y 2) la oxidación de 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) → *o*-dopaquinona por acción de difenolasa. La última etapa de oxidación es mucho más rápida que la primera, de esta manera, se considera que la hidroxilación de la tirosina es la etapa determinante de la velocidad en la biosíntesis de la melanina. La conversión posterior de *o*-dopaquinona en melanina se produce a través de una serie de reacciones de polimerización enzimática y no enzimática. Otras enzimas, tales como la tautomerasa dopacromática (proteína relacionada con la tirosinasa 2; TRP-2) y ácido dihidroxiindolcarboxílico (DICHA) oxidasa (proteína relacionada con la tirosinasa 1; TRP-1) también están involucrados en el proceso de la biosíntesis de melanina. Dado que la tirosinasa desempeña un papel clave en el proceso de producción de melanina, los inhibidores de esta enzima se usan a menudo como agentes para blanquear la piel (Mosher et al. En *Dermatology in General Medicine*, 1983, 205-125, Fitzpatrick T. B., Eisen A. Z., Wolff K., Freedberg I. M., Austern K. F. (eds), McGraw-Hill, Nueva York; Maeda K., Fukuda M, *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1991, 42, 361-368).

Se ha descrito en la bibliografía una serie de inhibidores tanto naturales como sintéticos de tirosinasa. La mayoría de los compuestos comprenden una estructura de fenol. Estos compuestos actúan como agentes quelantes de metales (Kojima et al. *Biol. Pharma. Bull.* 1995, 18, 1076-1078.; Seo et al. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2837-2853.; Fu et al. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 53, 7408-7414.; Kim, Y.-J.; Uyama, H. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62, 1707-1723 y las referencias citadas en el mismo). Un producto farmacéutico que contiene hidroquinona (2-4 %) es moderadamente eficaz, pero la hidroquinona se considera que es citotóxica para los melanocitos y potencialmente mutagénica para las células de mamíferos. Desafortunadamente, varios agentes supuestamente activos, por ejemplo, arbutina y ácido kójico, entre otros, no se ha demostrado que sean clínicamente eficaces cuando se analizan críticamente en estudios cuidadosamente controlados (Frenk, E. En *Melasma: New Approaches to Treatment*; Martin Dunitz: Londres, 1995, 9-15.; Dooley, T. P. En: *Drug Discovery Approaches for Developing Cosmeceuticals: Advanced Skin Care and Cosmetic Products*; Hori, W., Ed.; Comunicaciones comerciales internacionales: Southborough, MA, 1997; Dooley, T. P. *J. Dermatol. Treat.* 1997, 7, 188-200).

Muchos inhibidores de la tirosinasa son derivados de resorcinol o derivados de polifenoles de flavonoides o de *trans*-estilbeno, tales como resveratrol o sus derivados. Se sabe que estos tipos de compuestos forman quelatos fuertes con iones metálicos. (Seo et al. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2837-2853.; Fu et al. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 53, 7408-7414.; Kim, Y.-J.; Uyama, H. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62, 1707-1723 y las referencias citadas en el mismo; Lerch, K. En: *Metal ions in Biological Systems*, pág.143-186; Sigel, H., Ed.; Marcel Dekker, NY, 1981.; Wilcox et al. En: *Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase*, *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 4015-4027.; Sanchez-Ferrer et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1247, 1-11.; Decker et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 1591-1595.; Decker et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 4546-4550.; Briganti et al. *Pigment Cell Res.* 2003, 16, 101-110). Se han usado varios compuestos basados en el resto resorcinol como inhibidores de tirosinasa, véase: JP 2008-056651 A; JP 2000-095721 A; US 2005/0267047A1; US 5,339,785; US 6,093,836; US 2008/0032938 A1; US 7,282,592 B2; US 7,339,076 B1; US 5,880,314; US 6,852,310 B2; US 6,077,503; US 2005/0271608 A1; US 5,523,421; US 2007/0098655 A1; US 2005/0267047 A1. Además, el documento JP 5150894 divulga derivados de bibencilo, el documento JP 2001/335472 se refiere a derivados de estilbeno, y el documento JP 5244400 demuestra alquilresorcinol glucósidos como inhibidores de tirosinasa y agentes blanqueadores de la piel.

Aunque se ha informado de muchos compuestos como potentes inhibidores de tirosinasa, muy pocos de ellos han mostrado propiedades para blanquear la piel. Adicionalmente, se descubrió que la mayoría de estos agentes eran tóxicos o que tenían efectos secundarios adversos en los seres humanos. Como tal, continúa la búsqueda de nuevos

productos naturales o compuestos sintéticos que tengan una potente actividad inhibidora de la tirosinasa con baja citotoxicidad.

Sumario de la invención

- 5 La invención es como se define en el juego de reivindicaciones adjunto.
- 10 La presente solicitud proporciona una nueva serie de agentes despigmentantes novedosos que tienen una excelente actividad inhibitoria contra la tirosinasa y una citotoxicidad muy baja. Los compuestos son estables y se sintetizan fácilmente a partir de los materiales de partida comúnmente disponibles. Más específicamente, la presente invención proporciona derivados de 2,4-dihidroxibenceno novedosos, que son útiles como inhibidores de la tirosinasa. La invención abarca sales farmacéuticamente aceptables de estos inhibidores de tirosinasa. La invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un inhibidor de tirosinasa de la invención y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la presente invención se pueden preparar en cualquier forma farmacéutica adecuada que sea farmacéuticamente aceptable.
- 15 Los inhibidores de tirosinasa de la presente invención también son capaces de inhibir la enzima tirosinasa en un sujeto que lo necesite, después de administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un inhibidor de 2,4-dihidroxibenceno tirosinasa de la presente invención.
- 20 Los inhibidores de tirosinasa de la presente invención además pueden ser útiles también en la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones relacionadas con la actividad de la enzima tirosinasa. Dichos usos puede comprender administrar internamente o por vía tópica a un sujeto que lo necesite en una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor novedoso de 2,4-dihidroxibenceno tirosinasa de la presente invención.
- 25 Los inhibidores de tirosinasa de la presente invención también pueden encontrar aplicaciones para inhibir la síntesis de melanina en un sujeto que lo necesite. Dichas aplicaciones pueden comprender una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un compuesto de 2,4-dihidroxibenceno de la presente invención.
- 30 Los inhibidores de tirosinasa de la presente invención son para su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones relacionadas con la sobreproducción o distribución desigual de melanina, que comprende administrar internamente o por vía tópica a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un al menos un compuesto de 2,4-dihidroxibenceno de la presente invención. Las enfermedades y afecciones relacionadas con la sobreproducción o distribución desigual de la melanina incluyen, pero sin limitación, manchas de hiperpigmentación causadas por el envejecimiento de la piel, melasma, hepatopatías, quemaduras térmicas y heridas tópicas, pigmentación de la piel debido a afecciones inflamatorias causadas por hongos, infecciones microbianas y víricas, vitiligo, carcinoma, melanoma, así como otras afecciones de la piel de mamíferos.
- 35 Los inhibidores de tirosinasa de la presente invención también son para su uso para prevenir y tratar el oscurecimiento de la piel y el daño resultante de la exposición al sol o a la radiación ultravioleta (UV). Los inhibidores de la tirosinasa de la presente invención también pueden utilizarse para prevenir y tratar el oscurecimiento de la piel y los daños derivados de la exposición a sustancias químicas, calor, viento y ambientes secos. Finalmente, los inhibidores de tirosinasa de la presente invención pueden ser también para su uso en prevención y tratamiento de arrugas, piel floja, líneas y círculos oscuros alrededor de los ojos, calmar la piel sensible y prevenir y tratar la dermatitis y otras afecciones de la piel relacionadas con alergias.
- 40 En aplicaciones específicas, la dosis del(de los) inhibidor(es) de la 2,4-dihidroxibenceno tirosinasa de la presente invención administrada al sujeto que lo necesite es una cantidad eficaz no tóxica generalmente seleccionada del intervalo de 0,001 % a 100 % en función del peso total de la formulación final, y/o de 0,01 mg a 200 mg por kilogramo en función del peso corporal del sujeto. Las personas expertas en la materia que utilizan pruebas clínicas rutinarias pueden determinar las dosis óptimas para la dolencia particular que se está tratando. Las composiciones de esta invención se pueden administrar por cualquier método conocido por un experto en la materia. Los modos de administración incluyen, pero sin limitación, administración enteral (oral), administración parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular) y aplicación tópica. Un inhibidor de tirosinasa para su uso en el tratamiento de acuerdo con esta invención puede comprender administrar internamente o por vía tópica a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un 2,4-dihidroxibenceno de la presente invención. En un modo de administración preferido, la composición se administra por vía tópica.
- 45 En el presente documento también se describen, pero no forman parte de la materia objeto reivindicada, métodos novedosos para la síntesis del(de los) inhibidor(es) de 2,4-dihidroxibenceno tirosinasa como se describe en los Ejemplos 1-5. Por tanto, se describen en el presente documento opciones comercialmente viables para la síntesis y/o el aislamiento, purificación y formulación de los 2,4-dihidroxibencenos de la presente invención para producir una composición de materia que tenga la actividad fisiológica deseable.
- 60 En otra posible aplicación más, los 2,4-dihidroxibencenos se pueden utilizar en la industria alimentaria para inhibir el pardeamiento y los cambios de color en frutas, hortalizas, zumos y otros productos alimentarios.
- 65

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales adecuados.

- 5 Se debe entender que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada, son ejemplares y explicativas únicamente y no son restrictivas de la invención tal y como se reivindica. Otros objetos, ventajas y características novedosas serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada.

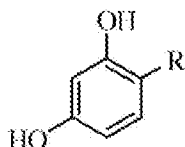
Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4-(piridinilmetil)benceno-1,3-diol (**7**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **7** era 14 μM . La Figura 1 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **7**.
- 15 La Figura 2 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-iletíl)benceno-1,3-diol (**15**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **15** era 3,3 μM . La Figura 2 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **15**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **15** era de 66 μM .
- 20 La Figura 3 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4,4'-(etano-1,2diil)dibenceno-1,3-diol (**16**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **16** era 1,7 μM . La Figura 3 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **16**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **16** era de 260 μM .
- 25 La Figura 4 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4-(2,4-dimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (**17**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **17** era 11,9 μM . La Figura 4 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **17**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **17** era de 157,8 μM .
- 30 La Figura 5 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4-(3,5-dimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (**18**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **18** era 2,97 μM . La Figura 5 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **18**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **18** era de 222,2 μM .
- 35 La Figura 6 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4-(2,4-dimetoxi-3-metilfenetil)benceno-1,3-diol (**19**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **19** era 24,7 μM . La Figura 6 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **19**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **19** era de 130,3 μM .
- 40 La Figura 7 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4-(2-(furan-2-il)etil)benceno-1,3-diol (**24**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **24** era 1,6 μM . La Figura 7 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **24**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **24** era 345,9 μM .
- 45 La Figura 8 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por 4-(2-(tetrahidrofuran-2-il)etil)benceno-1,3-diol (**25**) como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **25** era 5 μM . La Figura 8 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de compuesto **25**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **25** era >1000 μM .
- 50 La Figura 9 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por el compuesto **30** como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del compuesto **30** era 156 μM . La Figura 9 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables del compuesto **25**. Se determinó que la DL_{50} para el compuesto **30** era de 187,8 μM .
- 55 La Figura 10 ilustra gráficamente un perfil de la inhibición en la producción de melanina (•) por el ácido kójico como se describe en el Ejemplo 7. Los datos se presentan como contenido de melanina (% del control no tratado) frente a la concentración de inhibidor (μM). Se determinó que la Cl_{50} del ácido kójico en el ensayo murino era 303,5 μM . La Figura 10 también ilustra gráficamente la viabilidad celular (DL_{50}) (**x**) a concentraciones variables de ácido kójico. Se determinó que la DL_{50} para el ácido kójico era >1000 μM .
- 60 La Figura 11A representa la piel reconstruida preparada como se describe en el Ejemplo 8. La piel reconstruida se hizo crecer en la interfaz aire-líquido, haciendo posible imitar la aplicación tópica de agentes blanqueadores de la piel.
- 65 La Figura 11B muestra fotográficamente los resultados de los estudios de piel reconstruida como se describe en el Ejemplo 8. Las fotografías de la muestra de piel tomadas después de 15 días del experimento muestran importantes efectos de blanqueamiento dependientes de la dosis en los melanocitos, que aparecen en las

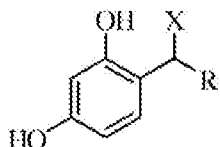
fotografías como células dendríticas oscuras.

Descripción detallada de la realización preferida

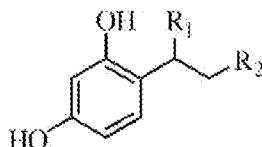
5 La presente divulgación se refiere a agentes farmacéuticos que son potentes inhibidores de la enzima tirosinasa. En particular, se refiere a derivados de 2,4-dihidroxibenceno sustituidos que son inhibidores de tirosinasa que tienen las estructuras representadas en las Fórmulas I-IV a continuación o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.



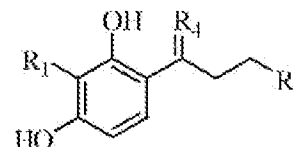
Fórmula I



Fórmula II



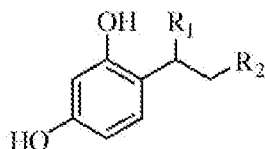
Fórmula III



Fórmula IV

10

En particular, la invención se dirige a compuestos de Fórmula III:



Fórmula III

15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R₁ es H, y R₂ es furan-3-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, furan-2-ilo tetrahidrofuran-2-ilo, 5-etilfuran-2-ilo o piridin-3-ilo. Se ha demostrado que estos compuestos tienen una excelente actividad inhibidora de la tirosinasa y una baja citotoxicidad. Se ilustra la actividad inhibitoria de compuestos representativos contra la tirosinasa de hongos, así como, la inhibición de la producción de melanina por células de melanoma B16-F1 murinas. Las propiedades de blanqueamiento de la piel de los compuestos representativos se evaluaron por medio de un modelo de piel humana reconstruida como se describe en el Ejemplo 8. Estos compuestos

20

o sus sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se muestran útiles para aplicaciones tanto cosméticas como médicas, como se detalla a continuación.

Como se usa en este contexto, el término "derivado" o "análogo" se refiere a un compuesto que tiene una estructura o función química similar a la de los compuestos de Fórmula I-IV que retienen el núcleo del anillo de 2,4-dihidroxibenceno.

25

En el presente documento se usan diversos términos para referirse a aspectos de la presente invención. Para ayudar a aclarar la descripción de los componentes de esta invención, se proporcionan las siguientes definiciones. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

30

Cabe señalar que, como se usa en el presente documento, el término "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, un inhibidor de tirosinasa se refiere a uno o más inhibidores de tirosinasa. Como tal, los términos "un" o "una", "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en el presente documento.

35

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se entenderá por un experto en la materia y variará hasta cierto punto según el contexto en el que se usa. Si hay usos del término que no están claros para los expertos en la materia dado el contexto en el que se utilizan, "aproximadamente" significará hasta más o menos el 10 % del término en particular.

40

El término "alquilo" como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada, que tiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo (C₁-C₁₀) significa un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a diez átomos de carbono. Un grupo alquilo puede estar no sustituido u opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en el presente documento.

45

El término "alcoxi" como se usa en el presente documento se refiere a un grupo -O-alquilo que tiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, un grupo alcoxi (C₁-C₁₀) incluye -OCH₃, -OCH₂CH₃, etc. hasta diez átomos de carbono.

50

Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N) y azufre (S).

El término "heteroaromático" como se usa en el presente documento se refiere a un anillo heterocíclico aromático de

5 a 14 miembros y que tiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contiene al menos 1 átomo de carbono. Los heteroaromáticos representativos incluyen piridilo, furilo, tienilo, pirrolilo e imidazolilo, etc. El grupo heteroarilo puede unirse a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono, donde sea químicamente aceptable. Un grupo heteroarilo puede estar no sustituido u opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "heterociclo" se refiere a sistemas de anillo no aromáticos de 5 a 14 miembros que están saturados, insaturados y que contienen de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El heterociclo se puede unir a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono, donde sea químicamente aceptable. Los ejemplos representativos de heterociclos no aromáticos incluyen, pero sin limitación, tetrahidrofuranilo, tetrahidropirrolilo, piranilo y tetrahidropiranilo, etc. Un grupo heterociclo puede estar no sustituido u opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en el presente documento.

El término "aromático", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que incluye o consiste en uno o más anillos aromáticos de hidrocarburo. Los anillos pueden ser sistemas de anillo mono o policíclicos. Ejemplos de anillos adecuados incluyen, pero sin limitación, benceno, bifenilo, terfenilo, naftaleno, etc.

El término "hidroxialquilo" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene el número indicado de átomos de carbono en donde uno o más de los átomos de hidrógeno en el grupo alquilo se reemplazan con un grupo -OH. Ejemplos representativos de grupos hidroxialquilo incluyen, pero sin limitación, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH, y versiones ramificadas de los mismos. Típicamente, el hidroxialquilo es un compuesto de fórmula -alquil-(C₁-C₁₀)-OH.

"Terapéutico" como se usa en el presente documento, incluye prevención, tratamiento y/o profilaxis. Cuando se utiliza terapéutico se refiere a seres humanos, así como a otros animales.

"Dosis o cantidad farmacéutica o terapéuticamente eficaz" se refiere a un nivel de dosificación suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. La dosificación precisa variará de acuerdo con una diversidad de factores, incluyendo, pero sin limitación, la edad y el tamaño del sujeto, la enfermedad y el tratamiento efectuado.

Un "huésped" o "paciente" o "sujeto" es un mamífero vivo, ser humano o animal, para quien se desea la terapia. El "huésped", "paciente" o "sujeto" generalmente se refiere al receptor de la terapia a practicar de acuerdo con el uso médico de la invención. Debe observarse que la invención descrita en el presente documento se puede usar para aplicaciones tanto veterinarias como humanas, y que el término "huésped" no debe interpretarse de manera limitativa. En el caso de aplicaciones veterinarias, los intervalos de dosificación se pueden determinar como se describe a continuación, teniendo en cuenta el peso corporal del animal.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, de manera más particular, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el agente terapéutico e incluye, pero sin limitación, líquidos estériles tales como agua y aceites.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal" de un inhibidor de tirosinasa es un producto del compuesto divulgado que contiene un enlace iónico, y se produce típicamente haciendo reaccionar el compuesto divulgado con un ácido o una base, adecuado para administrar a un sujeto. Una sal farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitación, sales de adición de ácidos que incluyen clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, hidrogenosulfatos, alquilsulfonatos, arilsulfonatos, arilalquilsulfonatos, acetatos, benzoatos, citratos, maleatos, fumaratos, succinatos, lactatos y tartratos; cationes de metales alcalinos tales como Li, Na, K, sales de metales alcalinotérreos tales como Mg o Ca, o sales de aminas orgánicas.

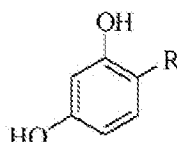
Una "composición farmacéutica" es una formulación que comprende los compuestos divulgados en una forma adecuada para la administración a un sujeto. Una composición farmacéutica de la invención se formula preferiblemente para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen, pero sin limitación, administración oral y parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, por inhalación, tópica, transdérmica, transmucosa y rectal.

El término "sustituido", como se usa en el presente documento, significa que uno o más hidrógenos en el átomo designado están sustituidos por una selección del grupo indicado, con la condición de que no se supere la valencia normal del átomo designado, y que la sustitución dé como resultado un compuesto estable. Cuando un sustituyente es ceto (es decir, =O), entonces se reemplazan 2 hidrógenos en el átomo. Los ejemplos de sustituyentes incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo C₁-C₁₀, hidroxilo (-OH); alcoxi C₁-C₁₀. Típicamente un anillo aromático,

heteroaromático o heterocíclico tendrá 1-3 sustituyentes.

Los siguientes aspectos y realizaciones referidos a los compuestos de Fórmula I no forman parte de la materia objeto de la reivindicación y son meramente ilustrativos.

5 Se divulga en el presente documento un compuesto que tiene la estructura mostrada en la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

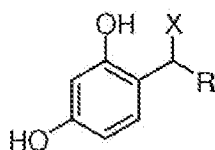


Fórmula I

10 en donde R se puede seleccionar de un anillo aromático, heteroaromático o heterocíclico sustituido o no sustituido. En un ejemplo, R se puede seleccionar del grupo que consiste en: fenilo, bifenilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-furanilo, 3-furanilo sustituidos o no sustituidos. En un ejemplo R puede estar sustituido con 1 a 3 restos (R', R'', R''') seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo alquilo C₁-C₁₀, un grupo alcoxi C₁-C₁₀ o un grupo hidroxilo. En otros ejemplos, R se puede seleccionar del grupo que consiste en 1'-(4'-metoxi)fenilo; 1'-(2,4-dihidroxi)fenilo; 1'-(3-piridilo); 1'-(bifenil-4-ol).

Los siguientes aspectos y realizaciones referidos a los compuestos de Fórmula II no forman parte de la materia objeto de la reivindicación y son meramente ilustrativos.

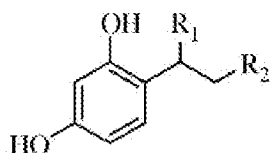
20 También se divulga un compuesto que tiene una estructura mostrada en la Fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula II

25 en donde X = H o -OH y R se puede seleccionar de un anillo aromático, heteroaromático o heterocíclico sustituido o no sustituido. En un ejemplo, R se puede seleccionar del grupo que consiste en un: fenilo, bifenilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-furanilo, 3-furanilo, sustituido o no sustituido. En un ejemplo, R puede estar sustituido con 1 a 3 restos (R', R'', R''') seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo alquilo C₁-C₁₀, un grupo alcoxi C₁-C₁₀ o un grupo hidroxilo. En otros ejemplos, R se puede seleccionar del grupo que consiste en 2'-furilo; 3'-furilo; 3'-piridilo; 3'-(2-metoxipiridilo); 1'-(2,4,6-trimetoxi fenilo); 1'-(3,4-dioxalano fenilo) y cuando X = OH, R es 3'-piridilo.

30 La presente invención se refiere a un compuesto que tiene una estructura mostrada en la Fórmula III o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

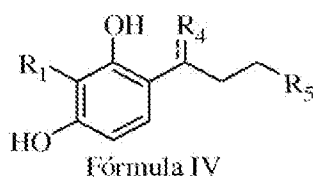


Fórmula III

35 en donde R₁ es H y R₂ es 3-furilo; 3-tetrahidrofurilo; 2'-furilo, 2'-tetrahidrofurilo o 2'-(5'-etil)-furilo; 3'-piridilo.

Los siguientes aspectos y realizaciones referidos a los compuestos de Fórmula IV no forman parte de la materia objeto de la reivindicación y son meramente ilustrativos.

40 Además, se divulga un compuesto que tiene una estructura mostrada en la Fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



en donde --- representa un enlace doble o sencillo,

R₁ se puede seleccionar del grupo que consiste en H o alquilo C₁-C₁₀;

5 R₄ se puede seleccionar del grupo que consiste en = H, OH u O; y

R₅ se puede seleccionar del grupo que consiste en un sustituido o no sustituido: anillo aromático, anillo heteroaromático, anillo heterocíclico o un resto hidroxilalquilo. En ejemplos específicos, R₁ es H o CH₃ y R₅ se puede seleccionar de un sustituido o no sustituido: anillo aromático, anillo heteroaromático o un anillo heterocíclico o un hidroxilalquilo C₁-C₁₀ (-C₁-C₁₀)-OH). En aún otros ejemplos, R₅ se puede sustituir con 1 a 3 restos (R', R'', R''') seleccionados independientemente del grupo que consiste en un grupo alquilo C₁-C₁₀, un grupo alcoxi C₁-C₁₀ o un grupo hidroxilo. En otros ejemplos R₅ se puede seleccionar del grupo que consiste en un sustituido o no sustituido: fenilo, bifenilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-furanilo, 3-furanilo o 2-tetrahidrofuranilo. En ejemplos específicos R₁ = R₄ = H y R₅ puede seleccionarse de 1'-(3',5'-dimetoxi)fenilo; 1'-(3',5'-dihidroxi)fenilo; 1-(2',4',6-trimetoxifenilo); R₁ = Me, R₄ = OH, R₅ es 1'-(2',4'-dihidroxi)fenilo; R₁ = Me, R₄ = O, R₅ es 1'-(2',4'-dihidroxi)fenilo; y R₁ = R₄ = H, R₅-CH₂CH₂OH.

15 con las siguientes condiciones:

condición 1: cuando R₁ = R₄ = H; R₅ no puede ser 1'-(2,4-dimetoxi-3-metil)fenilo.

20 condición 2: cuando R₁ = R₄ = H; R₅ no puede ser 1'-(2,4-dihidroxi)fenilo; 1'-(2,4-dialcoxi) fenilo; 1'-(2,4-dialquenoxi)fenilo o 1'-(2,4-dibenciloxi)fenilo.

condición 3: R₅ no puede ser 1'-(4-hidroxi)fenilo.

25 condición 4: cuando R₁ = R₄ = H; R₅ no puede ser 1'-(2,4-di(CO)R¹), en donde R¹ es un grupo alquilo-(C₁-C₂₀).

condición 5: cuando R₁ = R₄ = H y R₅ no puede ser un fenilo 1'-(2,4-disustituido); en donde dichos sustituyentes se seleccionan de -OR² y -OR³, en donde R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H o un alquilo (C₁-C₂₀).

30 condición 6: cuando R₁ = H y R₄ = OH; R₅ no puede ser 1'-(3,4-dihidroxi)fenilo; 1'-(3,4-dimetoxi)fenilo; 1'-(2-hidroxi)fenilo; 1'-(2-metoxi)fenilo; 1'-(4-metoxi)fenilo; fenilo; 1'-(3-metoxi,4-hidroxi)fenilo; .

La Tabla 1 enumera análogos novedosos representativos del 2,4-dihidroxibenceno de Fórmula I que son útiles como inhibidores de la tirosinasa. Los métodos sintéticos que se pueden utilizar para preparar cada compuesto, identificados en la Tabla 1 se describen en detalle en el Ejemplo 1. Se proporcionan datos de soporte de RMN de ¹H y ¹³C para cada compuesto sintetizado. En general, los compuestos de Fórmula I se pueden sintetizar a partir de materiales fácilmente disponibles utilizando técnicas convencionales de síntesis orgánica. Se pueden encontrar otras rutas de preparación en la bibliografía y la técnica pertinente. Los valores de CI₅₀ para estos compuestos según lo determinado por el ensayo de tirosinasa como se describe en el Ejemplo 6 también se exponen en la Tabla 1. Para seleccionar compuestos de Fórmula I, la Tabla 5 proporciona valores de CI₅₀ determinados por los ensayos basados en células de melanoma murino descritos en el Ejemplo 7 y de viabilidad celular (DL₅₀) según lo determinado por los métodos descritos en el Ejemplo 8.

45 La Tabla 2 enumera derivados novedosos representativos de 2,4-dihidroxibenceno de Fórmula II que son útiles como inhibidores de tirosinasa. Los métodos sintéticos que se pueden usar para preparar cada compuesto identificado en la Tabla 2 se describen en detalle en el Ejemplo 2. Se proporcionan datos de soporte de RMN de ¹H y ¹³C para cada compuesto sintetizado. En general, los compuestos de Fórmula II pueden sintetizarse a partir de materiales fácilmente disponibles utilizando técnicas de síntesis orgánica convencionales. Se pueden encontrar otras rutas de preparación en la bibliografía y la técnica pertinente. Los valores de CI₅₀ para estos compuestos según lo determinado por el ensayo de tirosinasa como se describe en el Ejemplo 6 también se exponen en la Tabla 2. Para seleccionar compuestos de Fórmula II, la Tabla 5 proporciona valores de CI₅₀ determinados por el ensayo basado en células de melanoma murino descrito en el Ejemplo 7 y de viabilidad celular (DL₅₀) según lo determinado por los métodos descritos en el Ejemplo 8.

55 La Tabla 3 enumera análogos novedosos representativos del 2,4-dihidroxibenceno de Fórmula III según la invención que son útiles como inhibidores de la tirosinasa. Los métodos sintéticos que se pueden usar para preparar cada compuesto identificado en la Tabla 3 se describen en detalle en el Ejemplo 3. Se proporcionan datos de soporte de RMN de ¹H y ¹³C para cada compuesto sintetizado. En general, los compuestos de Fórmula III se pueden sintetizar a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas de síntesis orgánica convencionales. Se pueden encontrar otras rutas de preparación en la bibliografía y la técnica pertinente. Los valores de CI₅₀ para estos compuestos según

lo determinado por el ensayo de tirosinasa como se describe en el Ejemplo 6 también se exponen en la Tabla 3. Para seleccionar compuestos de Fórmula III, la Tabla 5 proporciona valores de CI_{50} determinados por el ensayo basado en células de melanoma murino descrito en el Ejemplo 7 y de viabilidad celular (DL_{50}) según lo determinado por los métodos descritos en el Ejemplo 8.

5 La Tabla 4 enumera análogos novedosos de 2,4-dihidroxibenceno representativos de Fórmula IV que son útiles como inhibidores de tirosinasa. Los métodos sintéticos que se pueden usar para preparar cada compuesto identificado en la Tabla 4 se describen en detalle en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 5 (compuesto 34). Se proporcionan datos de soporte de RMN de 1H y ^{13}C para cada compuesto sintetizado. En general, los compuestos de Fórmula IV pueden sintetizarse a partir de materiales fácilmente disponibles utilizando técnicas de síntesis orgánica convencionales. Se pueden encontrar otras rutas de preparación en la bibliografía y la técnica pertinente. Los valores de CI_{50} para estos compuestos según lo determinado por el ensayo de tirosinasa como se describe en el Ejemplo 6 también se exponen en la Tabla 4. Para seleccionar compuestos de Fórmula IV, la Tabla 5 proporciona valores de CI_{50} determinados por el ensayo basado en células de melanoma murino descrito en el Ejemplo 7 y de viabilidad celular (DL_{50}) según lo determinado por los métodos descritos en el Ejemplo 8.

En resumen, los compuestos expuestos en las Tablas 1-4 mostraron una excelente inhibición de la enzima tirosinasa de hongos, así como, producción de melanina por células B16-F1 (Tabla 5, Figuras 1-9). La citotoxicidad se observó solo a altas concentraciones. Todos los compuestos ejemplificados en la Tabla 5 (es decir, los compuestos 7, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 25, 30) eran mucho más potentes que el ácido kójico, un blanqueador de piel de uso común como se ilustra en la Figura 10. La CI_{50} de ácido kójico (ensayo de tirosinasa) es 20 μM . La CI_{50} de ácido kójico (ensayo murino) es 303,5 μM . Adicionalmente, dos de los compuestos ensayados (compuestos 16 y 25) mostraron fuertes efectos de blanqueamiento de la piel en un modelo de piel reconstruida sin ninguna citotoxicidad detectable como se describe en el Ejemplo 8.

25 La presente invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un inhibidor de tirosinasa de acuerdo con la Fórmula II. Las composiciones de la presente invención se pueden formular como composiciones farmacéuticas, que incluyen otros componentes tales como un excipiente farmacéutica y/o cosméticamente aceptable, un adyuvante, y/o un portador. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden formularse en un excipiente que el huésped a tratar puede tolerar. Un excipiente es una sustancia inerte utilizada como diluyente o vehículo para un agente terapéutico. Ejemplos de tales excipientes incluyen, pero sin limitación, agua, tampones, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, manitol, solución de Hank, conservantes y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. Los vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos también pueden usarse. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades mínimas de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato, tampón Tris, histidina, citrato y glicina, o mezclas de los mismos, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen, pero sin limitación, EDTA, EDTA disódico, BHA, BHT, vitamina C, vitamina E, bisulfito sódico, $SnCl_2$, timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones convencionales pueden ser líquidas o sólidas, que pueden recogerse en un líquido adecuado como una suspensión o solución para administración. Por tanto, en una formulación que no es líquida, el excipiente puede comprender dextrosa, seroalbúmina humana, conservantes, etc., a la que se puede añadir agua o solución salina estéril antes de la administración.

45 La composición también puede incluir un adyuvante o un vehículo. Los adyuvantes son típicamente sustancias que generalmente mejoran la respuesta biológica de un huésped a un agente bioactivo específico. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund, otros componentes de la pared celular bacteriana, aluminio, magnesio, cobre, cinc, hierro, calcio, y otras sales basadas en iones metálicos, sílice, polinucleótidos, toxoides, proteínas séricas, proteínas de la cubierta viral, otras preparaciones derivadas de bacterias, interferón gamma; coadyuvantes de copolímero de bloques; tal como el adyuvante Titermax de Hunter (VaxcelTM., Inc. Norcross, Ga.), adyuvantes Ribí (disponibles en Ribí ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.); y saponinas y sus derivados, tal como Quil A (disponible en Superfos Biosector A/S, Dinamarca). Los portadores son típicamente compuestos que aumentan la vida media de una composición terapéutica en el huésped tratado. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, formulaciones poliméricas de liberación controlada, implantes biodegradables, liposomas, bacterias, virus, aceites, ésteres, y glicoles. Los portadores adecuados se describen en "Remington: The Science and Practice, Vigésima edición", publicado por Lippincott Williams & Wilkin.

60 La composición se puede preparar como una formulación de liberación controlada, que libera lentamente la composición de la presente invención en el huésped. Como se usa en el presente documento, una formulación de liberación controlada comprende una composición de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Los expertos en la materia conocerán vehículos adecuados de liberación controlada. Las formulaciones de liberación controlada preferidas son biodegradables (es decir, bioerosionables).

65 Las composiciones de esta invención se pueden administrar por cualquier método conocido por un experto en la materia. Los modos de administración incluyen, pero sin limitación, administración enteral (oral), administración parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular) y aplicación tópica. La administración de los inhibidores de

tirosinasa según esta invención se administran internamente o por vía tópica a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los análogos de 2,4-dihidroxibenceno de la presente invención.

5 Los agentes terapéuticos de la presente invención se pueden administrar por vía tópica por cualquier medio adecuado, conocido por los expertos en la materia para la administración tópica de composiciones terapéuticas que incluyen, pero sin limitación, como un ungüento, gel, loción, o base de crema, o como una pasta de dientes, enjuague bucal, o recubierto con material de hilo dental o como emulsión, como un parche, vendaje o mascarilla, una gasa antiadherente, un vendaje, un hisopo o una toallita de tela.

10 Una composición terapéutica se puede administrar en una diversidad de formas farmacéuticas unitarias dependiendo del método de administración. Para modos de administración particulares, una composición terapéutica de la presente invención se puede formular en un excipiente de la presente invención. Un reactivo terapéutico de la presente invención se puede administrar a cualquier huésped, preferiblemente a mamíferos y, más preferiblemente, a seres humanos. El modo particular de administración dependerá de la afección a tratar.

15 Las pomadas adecuadas pueden comprender la concentración deseada de al menos un análogo de 2,4-dihidroxibenceno de Fórmula I, es una cantidad eficaz, no tóxica, generalmente seleccionada del intervalo de 0,001 % a 100 % basado en el peso total de la formulación tópica, de 65 a 100 % (preferiblemente de 75 a 96 %) de parafina blanda blanca, de 0 a 15 % de parafina líquida y de 0 a 7 % (preferiblemente de 3 a 7 %) de lanolina o un derivado o equivalente sintético de la misma. En otro ejemplo de pomadas adecuadas, la pomada puede comprender una matriz de parafina de polietileno-líquido.

20

Las cremas adecuadas pueden estar compuestas por un sistema emulsionante junto con la concentración deseada de al menos un análogo de 2,4-dihidroxibenceno de Fórmula III como se ha proporcionado anteriormente. El sistema emulsionante puede estar compuesto, preferiblemente, por de 2 a 10 % de alcoholes de polioxietileno (por ejemplo, la mezcla disponible con la marca registrada Cetomacrogol™1000), de 10 a 25 % de alcohol estearílico, de 20 a 60 % de parafina líquida y de 10 a 65 % de agua; junto con uno o más conservantes, por ejemplo, de 0,1 a 1 % de N,N'-metilenebis[N'-(3-(hidroximetil)-2,5-dioxo-4-imidazolidinil]urea] (disponible con el nombre Imdurea USNF), de 0,1 a 1 % de alquil 4-hidroxibenzoatos (por ejemplo, la mezcla disponible de Nipa Laboratories con la marca comercial Nipastat), de 0,01 a 0,1 % de 4-hidroxibenzoato de butilo sódico (disponible en Nipa Laboratories con la marca comercial Nipabutyl sodium), y de 0,1 a 2 % de fenoxietanol.

25

30

Los geles adecuados pueden estar compuestos por un sistema semisólido en el que una fase líquida está restringida dentro de una matriz polimérica tridimensional con un alto grado de reticulación. La fase líquida puede estar compuesta por agua, junto con la cantidad deseada de al menos un análogo de 2,4-dihidroxibenceno del compuesto de Fórmula III, de 0 a 20 % de aditivos miscibles en agua, por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, o propilenglicol, y de 0,1 a 10 %, preferiblemente de 0,5 a 2 %, de un agente espesante, que puede ser un producto natural, seleccionado del grupo que incluye, pero sin limitación, tragacanto, pectina, carragenina, agar y ácido algínico, o un compuesto sintético o semisintético, seleccionado del grupo que incluye, pero sin limitación, metilcelulosa y carboxipolimetileno (carbopol);

35

40

45

junto con uno o más conservantes, seleccionados del grupo que incluye, pero sin limitación, por ejemplo, de 0,1 a 2 % de 4-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno) o fenoxietanol-diferencial. Otra base adecuada, puede comprender la cantidad deseada de al menos un análogo de 2,4-dihidroxibenceno del compuesto de Fórmula III, junto con de 70 a 90 % de polietilenglicol (por ejemplo, ungüento de polietilenglicol que contiene un 40 % de polietilenglicol 3350 y un 60 % de polietilenglicol 400, preparado de acuerdo con el Formulario Nacional de EE.UU. (USNF), de 5 a 20 % en peso de agua, de 0,02 a 0,25 % de un antioxidante (por ejemplo, hidroxitolueno butilado), y de 0,005 a 0,1 % de un agente quelante (por ejemplo, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA)).

El término parafina blanda, como se ha usado anteriormente, abarca las bases en crema o en ungüento de parafina blanda blanca y parafina blanda amarilla. El término lanolina engloba la grasa de lana nativa y la grasa de lana purificada. Los derivados de lanolina incluyen en particular lanolinas que se han modificado químicamente para alterar sus propiedades físicas o químicas y los equivalentes sintéticos de lanolina incluyen, en particular, compuestos sintéticos o semisintéticos y mezclas que se conocen y se usan en las técnicas farmacéuticas y cosméticas como alternativas a la lanolina, y pueden denominarse, por ejemplo, como sustitutos de lanolina.

50

Un equivalente sintético adecuado de lanolina que se puede usar es el material disponible con la marca registrada Softisan™ conocida como Softisan 649. Softisan 649, disponible en Dynamit Nobel Aktiengesellschaft, es un éster de glicerina de ácidos grasos vegetales naturales, de ácido isosteárico y de ácido adípico; sus propiedades son discutidas por H. Hermsdorf en Fette, Seifen, Anstrichmittel, N.º de Publicación 84, N.º 3 (1982), pág. 3-6.

55

Las otras sustancias mencionadas anteriormente como constituyentes de bases de pomadas o cremas adecuadas y sus propiedades se analizan en trabajos de referencia convencionales, por ejemplo en la farmacopea. Cetomacrogol 1000 tiene la fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, en donde m puede ser 15 o 17 y n puede ser de 20 a 24. El hidroxitolueno butilado es 2,6-di-*tert*-butil-p-cresol. Nipastat es una mezcla de 4-hidroxibenzoatos de metilo, etilo, propilo y butilo.

60

Las composiciones de la invención se pueden producir mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Por lo tanto,

65

las composiciones mencionadas anteriormente, por ejemplo, pueden prepararse convenientemente mezclando a una temperatura elevada, preferiblemente 60-70 °C, parafina blanda, parafina líquida si está presente, y lanolina o derivado o equivalente sintético de la misma. La mezcla se puede enfriar a temperatura ambiente y, después de la adición de la sal de calcio cristalina hidratada de mupirocina, junto con el corticosteroide y cualquier otro ingrediente, se agita para asegurar una dispersión adecuada.

Independientemente de la forma de administración, la dosis específica se calcula de acuerdo con el peso corporal aproximado del huésped. El perfeccionamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cada una de las formulaciones mencionadas anteriormente se realiza de manera rutinaria por los expertos en la materia y está dentro del alcance de las tareas que rutinariamente realizan sin una experimentación excesiva, especialmente a la luz de la información de dosificación y los ensayos divulgados en el presente documento. Estas dosificaciones se pueden determinar mediante el uso de los ensayos establecidos para determinar las dosificaciones utilizadas junto con los datos de dosis-respuesta apropiados.

Los inhibidores de tirosinasa de la invención se pueden sintetizar fácilmente usando metodologías sintéticas conocidas o mediante una modificación de metodologías sintéticas conocidas. Como sería fácilmente reconocido por un experto en la materia, las metodologías descritas a continuación permiten la síntesis de análogos de 2,4-dihidroxibenceno que tienen una diversidad de sustituyentes. En el presente documento se divulga un método para sintetizar los análogos de 2,4-dihidroxibenceno descritos en el presente documento. Los métodos sintéticos ejemplares se describen en los ejemplos 1-5 a continuación.

La invención abarca los compuestos de Fórmula III para su uso para prevenir o tratar (por ejemplo, aliviar uno o más síntomas de) afecciones médicas. El uso médico para prevenir o tratar comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de tirosinasa de la presente invención a un paciente que lo necesite. Las composiciones de la invención también pueden usarse para terapia profiláctica.

Los compuestos reivindicados pueden usarse para tratar a un sujeto que padece un trastorno mejorado por la inhibición de la actividad tirosinasa o la producción de cantidades excesivas de melanina. Dicho uso comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de tirosinasa como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" describe el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir una enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones, aliviando los síntomas o complicaciones, o eliminar la enfermedad, afección o trastorno. Más específicamente, "tratar" incluye revertir, aliviar, minimizar, suprimir o detener al menos un síntoma o efecto perjudicial de un estado de enfermedad (trastorno), progresión de la enfermedad, u otra condición anormal. El tratamiento continúa mientras mejoran los síntomas y/o la patología.

Más específicamente, la presente invención también proporciona un método para inhibir la síntesis de melanina en un sujeto que lo necesite. Dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos uno de los análogos de 2,4-dihidroxibenceno de la presente invención.

Los inhibidores de la tirosinasa de la presente invención además son para uso en la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones relacionadas con la sobreproducción o distribución desigual de la melanina. Las enfermedades y afecciones relacionadas con la sobreproducción o distribución desigual de la melanina incluyen, pero sin limitación, manchas de hiperpigmentación causadas por el envejecimiento de la piel, melasma, hepatopatías, quemaduras térmicas y heridas tóxicas, pigmentación de la piel debido a afecciones inflamatorias causadas por hongos, infecciones microbianas y víricas, vitíligo, carcinoma, melanoma, así como otras afecciones de la piel de mamíferos.

Los inhibidores de la tirosinasa de la presente invención también son para su uso en prevenir y tratar el oscurecimiento de la piel y el daño resultante de la exposición al sol, a la radiación ultravioleta (UV), sustancias químicas, calor, viento y ambientes secos. Finalmente, el método puede usarse para prevenir y tratar arrugas, piel floja, líneas y círculos oscuros alrededor de los ojos, calmar la piel sensible y prevenir y tratar la dermatitis y otras afecciones de la piel relacionadas con alergias.

Además de su uso para la prevención y el tratamiento de las enfermedades y afecciones de la piel descritas anteriormente, las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento proporcionan una composición eficaz que proporciona el beneficio de un aspecto de la piel suave y juvenil con un color de piel mejorado, elasticidad aumentada, envejecimiento reducido y retrasado, aspecto y textura juvenil mejorados, y mayor flexibilidad, firmeza, suavidad y flexibilidad.

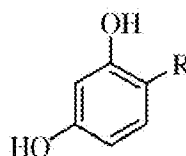
En otra aplicación más de los inhibidores de tirosina de la presente invención, los derivados de 2,4-dihidroxibenceno de la presente invención se pueden usar en la industria alimentaria para inhibir el pardeamiento y los cambios de color en las frutas, hortalizas, zumos y otros productos alimentarios.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención. Debería entenderse, sin embargo, que la invención no debe limitarse a las condiciones o detalles específicos descritos en estos ejemplos.

Ejemplos

5

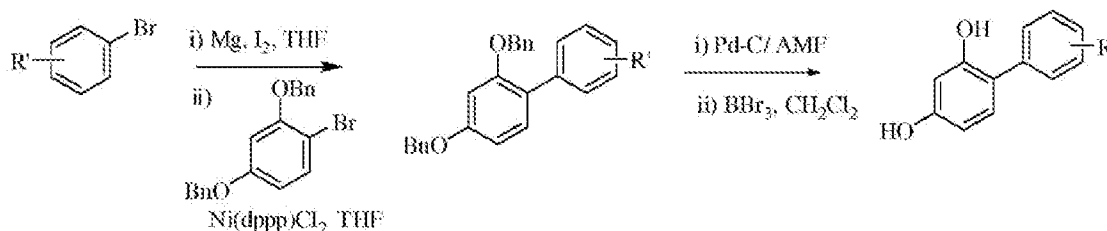
Ejemplo 1 de referencia. Métodos generales y específicos para la síntesis de compuestos de Fórmula I



Fórmula I

- 10 Los compuestos de Fórmula I se prepararon generalmente como se establece en el Esquema 1, utilizando un bromobenceno sustituido como R para fines de ilustración. Resumidamente, los compuestos de bifenilo de Fórmula I se prepararon mediante la reacción de acoplamiento de Kumada (Tamao, K.; Sumitani, K.; Kumada, M, Journal of the American Chemical Society. 1972, 94. 4374-4376) usando un catalizador de Ni(dppp)Cl₂ de los correspondientes reactivos de Grignard con bromuro de arilo apropiado, seguido de una reacción de desbencilación reductora del grupo bencilo.
- 15

Esquema 1



Procedimiento representativo del Esquema 1: Síntesis de 4'-metoxibifenil-2,4-diol (1)

20

El 4-bromoanisol (2,80 g, 15 mmol) se trató con virutas de magnesio (480 mg, 20 mmol) y yodo (una pizca) en THF para obtener el reactivo de Grignard correspondiente. El reactivo de Grignard se añadió entonces a una solución agitada de 4-bromoresorcinol protegido con bencilo (3,7 g, 10 mmol) y Ni(dppp)Cl₂ (2,7 g, 5 mmol) en THF a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual se calentó a reflujo durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió entonces y se interrumpió con cloruro de amonio, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio y se purificaron por cromatografía en columna para obtener (1,98 g, 50 %) del producto acoplado como un sólido blanquecino.

25

- 30 El producto acoplado resultante (1,5 g, 3,7 mmol) se trató entonces con una cantidad catalítica de Pd al 10 % sobre carbón activado (150 mg) y una cantidad en exceso de formiato de amonio (1,9 g, 29,6 mmol) en 15 ml de una solución de THF/MeOH (1:2) a reflujo durante 3 h para eliminar el grupo de protección de bencilo. Después de la filtración a través de Celite para eliminar el catalizador, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna para producir (720 mg, 90 %) del compuesto 1 en forma de un sólido blanquecino. RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,152 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 6,718-6,762 (m, 3H), 6,443 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,241 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,0 Hz), 3,663 (s, 3H).
- 35

Los compuestos representativos 2-4 de Fórmula I (véase la Tabla 1) se sintetizaron de acuerdo con el mismo protocolo utilizando materiales de partida apropiados. Los rendimientos globales variaron de 40-50 %.

40 Bifenil-2,2',4,4'-tetraol (2)

RMN de ¹H (MeOD, 300 MHz): δ 7,007-6,953 (m, 2H), 6,378-6,327 (m, 6H). RMN de ¹³C (MeOD, 75 MHz): δ 157,971(6C), 130,246(2CH), 107,134(2CH), 102,589(2CH).

45 4-(Piridin-3il)benceno-1,3-diol (3)

RMN de ¹H: (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,829 (s, 1H), 8,539 (d, 1H, J = 3,6 Hz), 7,885 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 7,605-7,261 (m, 1H), 6,753 (s, 1H), 6,711 (d, 1H, J = 8,4 Hz). RMN de ¹³ (CDCl₃, 75 MHz): δ 157,036(C), 150,534(CH), 137,420(CH),

136,926(CH), 134,400(C), 131,618(CH), 129,237(C), 127,931(CH), 120,872(C), 106,821(CH), 101,769(CH).

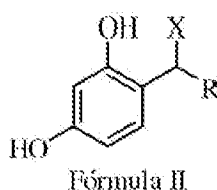
4-(4'-hidroxibifenil)benceno-1,3-diol (4)

- 5 RMN de ^1H (MeOD, 300 MHz): δ 7,511-7,183 (m, 9H), 6,88-6,83 (m, 2H). RMN de ^{13}C (MeOD, 75 MHz): δ 156,949 (3 C), 141,204(2 C), 132,709(2 C), 128,557(2 CH), 127,893(3 CH), 126,256(3 CH), 115,472(3 CH).

Tabla 1. Compuestos de referencia representativos de fórmula I

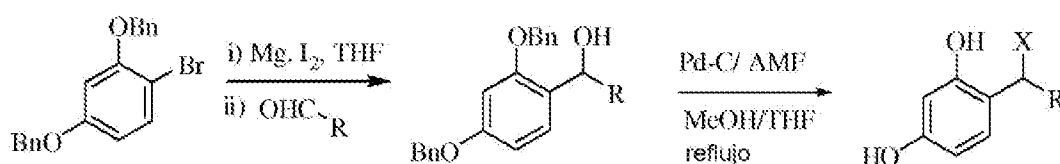
Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos
4'-Metoxibifenil-2,4-diol (1)		$\text{Cl}_{50} = 12,8 \mu\text{M}$
Bifenil-2,2',4,4'-tetraol (2)		$\text{Cl}_{50} = 60,0 \mu\text{M}$
4-(Piridin-3il)benceno-1,3-diol (3)		$\text{Cl}_{50} = 0,5 \mu\text{M}$
4-(4'-hidroxibifenil)benceno-1,3-diol (4)		$\text{Cl}_{50} = 70,0 \mu\text{M}$

- 10 Ejemplo 2 de referencia. Métodos generales y específicos para la síntesis de compuestos de Fórmula II



- 15 Los compuestos de Fórmula II se prepararon como se ilustra en el Esquema 2. Resumidamente, con referencia al Esquema 2, los compuestos de difenilmetano ilustrativos de la Fórmula II se prepararon mediante reacción de adición de Grignard con un aldehído (RCHO, en donde R = anillo aromático o heteroaromático), seguido de la deshidroxilación del grupo hidroxilo bencílico resultante y la desbencilación de los grupos protectores de benciloxi in situ.

Esquema 2



20

Procedimiento representativo del Esquema 2: Síntesis de 4-(furan-2-ilmetil)benceno-1,3-diol (5)

El 4-bromoresorcinol protegido con bencilo (2,80 g, 15 mmol) se trató con virutas de magnesio (480 mg, 20 mmol) y yodo (una pizca) en THF para proporcionar el reactivo de Grignard correspondiente, que después se añadió a una solución agitada de 2-furaldehído (3,97 g, 10 mmol) en THF a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se inactivó con cloruro de amonio, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se concentró en un evaporador rotatorio y se purificó por cromatografía en columna para proporcionar (3,0 g, 80 %) del producto acoplado.

El producto acoplado (2,5 g, 6,5 mmol) se trató entonces con una cantidad catalítica de Pd al 10 % sobre carbón activado (250 mg) y una cantidad en exceso de formiato de amonio (3,33 g, 52 mmol) en THF/MeOH (18 ml) a reflujo para eliminar los grupos protectores de bencilo. La deshidroxilación parcial del grupo hidroxil bencilo también tuvo lugar durante la reacción de desbencilación. Una vez finalizado, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite para eliminar el catalizador y se concentró para proporcionar el producto en bruto, que después se purificó por cromatografía en columna para producir (740 mg, 60 %) del compuesto 5 como un sólido blanquecino, así como, el compuesto hidroxilado (X = OH) (270 mg, 20 %). RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,306 (dd, 1H, J = 1,0 y 2,0 Hz), 6,8565 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,8085 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,3155 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,2965 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,255-6,223 (m, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 156,604(C), 156,504(C), 156,064(C), 155,556(C), 155,290(C), 140,575(CH), 131,443(CH), 130,325(CH), 116,098(C), 116,973(C), 109,761(CH), 106,303(CH), 106,111(CH), 105,156(CH), 102,513(CH), 102,061(CH), 79,946(CH), 67,489(CH₂), 35,257(CH), 29,875(CH₂), 27,102(CH₂), 25,218(CH₂).

Los compuestos representativos 6-11 de Fórmula II (véase la Tabla 2) se sintetizaron de acuerdo con el mismo esquema de reacción general usando los materiales de partida apropiados. Los rendimientos globales variaron de 50-60 %.

4-(Furan-3-ilmetil)benceno-1,3-diol (6)

RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 8,39 (d, 1H, J = 2 Hz), 8,28 (dd, 1H, J = 5 y 1,5 Hz), 6,63-6,69 (m, 1H), 7,25-7,28 (m, 1H), 6,87 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,31 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,24 (dd, 1H, J = 8 y 2,5 Hz), 3,25 (s, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 156,897(C), 155,797 (C), 148,727(CH), 145,584(CH), 138,672(C), 137,021(CH), 130,536(CH), 123,476(CH), 117,446(C), 106,221(CH), 102,283(CH), 32,196(CH₂).

4-(Piridin-ilmetil)benceno-1,3-diol (7)

RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 8,39 (d, 1H, J = 2 Hz), 8,28 (dd, 1H, J = 5 y 1,5 Hz), 6,63-6,69 (m, 1H), 7,25-7,28 (m, 1H), 6,87 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,31 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,24 (dd, 1H, J = 8 y 2,5 Hz), 3,25 (s, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 156,897(C), 155,797 (C), 148,727(CH), 145,584(CH), 138,672(C), 137,021(CH), 130,536(CH), 123,476(CH), 117,446(C), 106,221(CH), 102,283(CH), 32,196(CH₂).

También se obtuvo un producto hidroxilado (20 %) y se separó con éxito mediante cromatografía en columna (véase el compuesto 11 a continuación).

4-((2-Metoxipiridin-3-il)metil)benceno-1,3-diol (8)

RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,9015 (dd, 1H, J = 1,5 y 5,0 Hz), 7,277 (dt, 1H, J = 1,0 y 7,0 Hz), 6,778-6,823 (m, 2H), 6,313 (dd, 1H, J = 2,5 y 6,5 Hz), 6,239 (dt, 1H, J = 2,0 y 8,5 Hz), 3,935 (s, 3H), 3,749 (s, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 161,927(C), 157,766(C), 156,578(C), 155,941(C), 143,115(CH), 137,880(CH), 130,828(CH), 124,794(C), 116,498(CH), 106,133(CH), 102,098(CH), 52,482(CH₃), 28,505(CH₂).

4-(2,4,6-trimetoxibencil)benceno-1,3-diol (9)

RMN de ¹H (MeOD, 500 Hz): δ 6,587 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,242 (s, 1H), 6,239 (s, 2H), 6,106 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,0 Hz), 3,798 (s, 3H), 3,775 (s, 6H), 3,703 (s, 2H). RMN de ¹³C (CDCl₃, 125 Hz): δ 160,150(C), 158,100(2 C), 155,986(C), 155,509(C), 132,723(CH), 119,535(C), 109,882(C), 107,232(CH), 103,475(CH), 91,531(2CH), 56,258(2 CH₃), 55,802(CH₃), 23,157(CH₂).

4-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)benceno-1,3-diol (10)

RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,775 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,62-6,68 (m, 3H), 6,295 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 6,202-6,223 (m, 1H), 5,842 (s, 2H), 3,733 (s, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 155,840(C), 155,124(C), 148,362(C), 146,548(C), 134,234(C), 131,868(CH), 121,597(CH), 119,754(C), 109,431(CH), 108,687(CH), 108,154(CH), 103,761(CH), 101,299(CH₂), 35,949(CH₂).

4-(hidroxil(piridin-3-il)metil)benceno-1,3-diol (11)

RMN de ¹H (MeOD, 300 MHz): δ 8,528 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 8,355 (dd, 1H, J = 3,6 y 4,8 Hz), 7,820 (td, J = 1,5 y 7,5 Hz), 7,353 (t, 1H, J = 5,4 Hz), 7,086 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 6,315-6,267 (m, 2H), 6,067 (s, 1H); Menor parcial: 8,497 (d, 1H, J

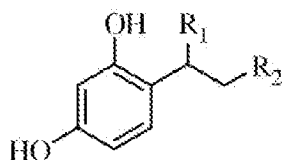
= 2,1 Hz), 7,018 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz), 5,661 (s, 1H). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 157,659(C), 155,283(C), 147,120(CH), 146,694(CH), 141,308(C), 135,144(CH), 127,604(CH), 123,495(CH), 120,885(C), 106,466(CH), 102,231(CH), 68,285(CH).

5

Tabla 2. Compuestos de referencia representativos de la fórmula II

Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos
4-(Furan-2-ilmetil)benceno-1,3-diol (5)		$\text{Cl}_{50} = 1,8 \mu\text{M}$
4-(Furan-3-ilmetil)benceno-1,3-diol (6)		$\text{Cl}_{50} = 3,0 \mu\text{M}$
4-(Piridin-ilmetil)benceno-1,3-diol (7)		$\text{Cl}_{50} = 2,0 \mu\text{M}$
4-((2-Metoxipiridin-3-il)metil)benceno-1,3-diol (8)		$\text{Cl}_{50} = 50,0 \mu\text{M}$
4-(2,4,6-trimetoxibencil)benceno-1,3-diol (9)		$\text{Cl}_{50} = 30,0 \mu\text{M}$
4-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)benceno-1,3-diol (10)		$\text{Cl}_{50} = 0,85 \mu\text{M}$
4-(hidroxil(piridin-3-il)metil)benceno-1,3-diol (11)		$\text{Cl}_{50} = 4,9 \mu\text{M}$

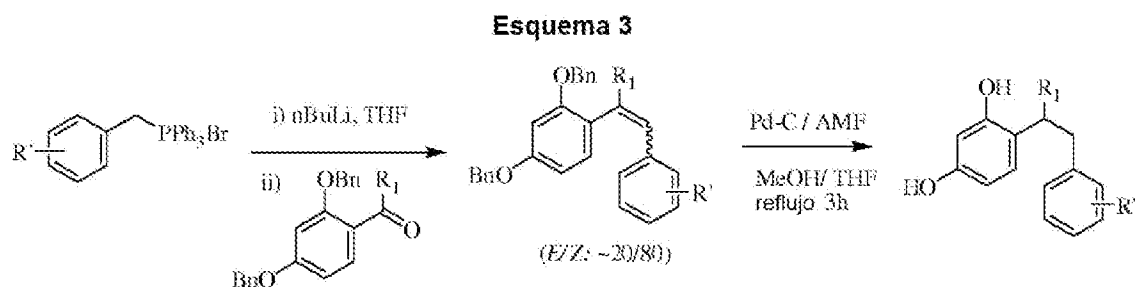
Ejemplo 3. Métodos generales y específicos para la síntesis de compuestos de Fórmula III



Fórmula III

10

Los compuestos de Fórmula III se prepararon como se ilustra en el Esquema 3, a continuación. Resumidamente, con referencia al Esquema 3, Los compuestos de 1,2-difeniletileno de Fórmula III se prepararon por reacción de Wittig entre la sal de Wittig correspondiente y el aldehído, seguido de hidrogenación con Pd sobre carbón activado y formiato de amonio (AMF).



Procedimiento representativo del esquema 3: 4-fenetilbenceno-1,3-diol (12)

5 A una solución de la sal de fosonio de bromuro de bencilo (5,2 g, 12 mmol) en THF (25 ml), se le añadió nBu-Li en hexano (6,9 ml, 11 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 h, tiempo durante el cual la mezcla desarrolló un color rojo que indica la formación de iluro. Se añadió una solución de 2,4-bis(benzoloxi)benzaldehído (3,2 g, 10 mmol) en THF (10 ml) a la solución de iluro a -80 °C y se dejó agitar durante la noche sin retirar el baño a baja temperatura. Durante ese periodo, el color rojo desapareció y se formó una suspensión blanquecina que se diluyó con hexano y se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se hizo pasar a través de un lecho corto de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo-hexano (5:95) para producir el producto acoplado (3,6 g, 92 %) en una relación de (E/Z: 20/80) como un aceite amarillo pálido.

15 El producto acoplado (3 g, 7,7 mmol) se disolvió entonces en 24 ml de THF/MeOH (1:2) seguido de un tratamiento con Pd al 10 % sobre carbón activado (300 mg) y formiato de amonio (3,92 g, 62 mmol) a reflujo durante 4 h. Después del enfriamiento, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite para retirar el exceso de catalizador. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna eluyendo con hexano y acetato de etilo (75:25) para producir el compuesto **12** (1,5 g, 95 %) como un sólido blanquecino. RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,19-7,09 (m, 5H), 7,77 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,35 (t, 1H, J = 2,5 Hz), 6,22 (s, 1H), 2,80 (d, 2H, J = 6 Hz), 2,78 (d, 2H, J = 4 Hz). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 155,911(C), 155,604(C), 142,535(C), 130,302(CH), 128,177(CH), 128,170(CH), 127,815(CH), 127,800(CH), 125,238(CH), 119,561(C), 106,029(CH), 102,150(CH), 36,274(CH₂), 31,803(CH₂).

25 Los compuestos representativos **13-27** de Fórmula III (véase la Tabla 3) se sintetizaron de acuerdo con el mismo esquema de reacción general usando los materiales de partida apropiados. Los rendimientos globales variaron de 35-55 %. En algunos casos, la reacción de hidrogenación a alta presión reductora se realizó con éxito utilizando un aparato Parr en lugar de métodos de CTH para obtener los compuestos finales.

4-(4-hidroxifenetilbenceno)-1,3-diol (13)

30 RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,985 (dd, 2H, J = 3 y 5 Hz), 6,764 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,716-6,617 (m, 2H), 6,326 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,215 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,5 Hz), 2,719 (s, 2H), 2,675 (d, 2H, J = 8,5 Hz). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 155,756(C), 155,500(C), 154,560(C), 133,707(C), 130,354(CH), 129,125(2CH), 119,742(C), 114,586(2CH), 106,048(CH), 102,127(CH), 35,393(CH₂), 31,988(CH₂).

4-(4-metoxifenetil)benceno-1,3-diol (14)

40 RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,052 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 6,748-6,772 (m, 3H), 6,343 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,222 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,0 Hz), 3,683 (s, 3H), 2,745 (t, 4H, J = 6,0 Hz). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 157,700(C), 155,893(C), 155,601(C), 134,660(C), 130,317(CH), 129,073(2CH), 119,608(C), 113,255(2CH), 106,007(CH), 102,139(CH), 54,303(CH₃), 35,350(CH₂), 31,944(CH₂).

4-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-iletil)benceno)-1,3-diol (15)

45 RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,75 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,67 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,66 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 6,61 (dd, 1H, J = 8 y 1,5 Hz), 6,27 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,17 (dd, 1H, J = 8 y 2,5 Hz), 5,87 (s, 2H), 2,71-2,72 (m, 4H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 156,01(C), 155,01 (C), 147,41(C), 145,47(C), 136,52(C), 130,14(CH), 120,87(CH), 119,23(C), 108,48(CH), 107,39(CH), 105,82(CH), 102,03(CH), 100,45(CH₂), 35,95(CH₂), 32,03(CH₂).

4,4'-(etano-1,2diil)dibenceno-1,3-diol (16)

50 RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,81 (d, 2H, J = 2 Hz), 6,29 (s, 2H), 6,20 (dd, 2H, J = 2 y 2 Hz), 2,68 (s, 4H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 155,83 (2 C), 155,47 (2 C), 130,04 (2 CH), 145,47(C), 120,01 (2 C), 105,95(2 CH), 102,05(2 CH), 30,04(2 CH₂).

4-(2,4-dimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (17)

ES 2 998 662 T3

RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 6,93 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,73 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,46 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 6,37 (dd, 1H, $J = 8$ y 2 Hz), 6,28 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 6,17 (dd, 1H, $J = 8$ y 2 Hz), 3,77 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 2,67-2,73 (m, 4H). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 159,177 (C), 158,307 (C), 155,801 (C), 155,564 (C), 155,564 (C), 130,047 (CH), 129,758 (CH), 122,988 (C), 119,900 (C), 105,796 (CH), 103,771 (CH), 101,991 (CH), 97,867 (CH), 54,392 (CH₃), 54,289 (CH₃), 29,901 (CH₂), 29,834 (CH₂).

4-(3,5-dimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (18)

10 RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 6,77 (d, 1H, $J = 10$ Hz), 6,34 (d, 2H, $J = 5$ Hz), 6,32 (d, 1H, $J = 5$ Hz), 6,25 (t, 1H, $J = 5$ Hz), 6,20 (dd, 1H, $J = 10$ y 5 Hz), 3,68 (s, 6H), 2,75 (s, 4H). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 160,67 (C, 2C), 155,98 (C), 155,60 (C), 144,91 (C), 130,32 (CH), 119,38 (C), 106,20 (CH, 2C), 105,97 (CH), 102,08 (CH), 97,50 (CH), 54,25 (2 CH₃), 36,48 (CH₂), 31,47 (CH₂).

15 4-(2,4-dimetoxi-3-metilfenetil)benceno-1,3-diol (19)

20 RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 6,972 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz), 6,624 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 6,285 (dd, 1H, $J = 1$ y 2,5 Hz), 6,184 (ddd, 1H, $J = 1,5$, 2,5 y 8 Hz), 3,783 (s, 3H), 3,694 (s, 3H), 2,723-2,762 (m, 4H), 2,114 (s, 3H). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 157,034 (C), 156,915 (C), 155,953 (C), 155,664 (C), 130,066 (CH), 127,197 (C), 126,967 (CH), 119,834 (C), 118,705 (C), 105,855 (CH), 105,841 (CH), 102,046 (CH), 59,749 (CH₃), 54,637 (CH₃), 31,008 (CH₂), 29,916 (CH₂), 7,941 (CH₃).

4-(2,4,6-trimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (20)

25 RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 6,698. (dd, 1H, $J = 1,5$ y 8 Hz), 6,262 (t, 1H, $J = 2,5$ Hz), 6,135-6,157 (m, 3H), 3,775 (s, 3H), 3,730 (s, 3H), 3,723 (s, 3H), 2,750 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 2,563 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 159,369 (C), 158,799 (2C), 155,638 (C), 155,556 (C), 129,840 (CH), 120,359 (C), 111,082 (C), 105,696 (CH), 101,906 (CH), 90,367 (2 CH), 54,744 (2 CH₃), 54,281 (CH₃), 28,790 (CH₂), 22,653 (CH₂).

30 4-(1-fenilpropan-2-il)benceno-1,3-diol (21)

35 RMN de ^1H (MeOD, 500 Hz): δ 6,928 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 6,8541 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,631 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 6,259 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 6,219 (dd, 1H, $J = 2,5$ y 8,0 Hz), 3,231 (c, 1H, $J = 6,5$ Hz), 2,854 (dd, 1H, $J = 5,5$ y 13,0 Hz), 2,519 (dd, 1H, $J = 9,0$ y 13,5 Hz), 1,087 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz). RMN de ^{13}C (MeOD, 500 Hz): δ 155,482 (C), 155,093 (C), 153,428 (C), 154,716 (C), 132,452 (CH), 129,673 (2CH), 124,583 (C), 114,242 (2CH), 105,870 (CH), 102,016 (CH), 42,284 (CH₂), 33,835 (CH), 18,575 (CH₃).

4-(2-(furan-3-il)etil)benceno-1,3-diol (22)

40 RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,348 (s, 2H), 7,187 (s, 1H), 6,342 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 6,282 (d, 2H, $J = 10,2$ Hz), 2,795-2,663 (m, 4H). RMN de ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz): δ 154,903 (C), 154,594 (C), 143,043 (CH), 139,307 (CH), 131,236 (CH), 124,802 (C), 120,509 (C), 111,259 (CH), 107,970 (CH), 103,249 (CH), 30,310 (CH₂), 25,544 (CH₂).

45 4-(2-(tetrahidrofuran-3-il)etil)benceno-1,3-diol (23)

RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz): δ 6,933 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,359-6,283 (m, 2H), 3,951-3,709 (m, 3H), 3,388 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz), 2,602-2,492 (m, 2H), 2,262-2,163 (m, 2H), 1,707-1,585 (m, 3H). RMN de ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz): δ 155,056, 154,544, 132,595, 120,639, 110,008, 107,810, 103,074, 68,188, 64,108, 33,905, 32,718, 28,432.

50 4-(2-(furan-2-il)etil)benceno-1,3-diol (24)

55 RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 7,31 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 6,78 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,28 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 6,24 (dd, 1H, $J = 3$ y 2 Hz), 6,18 (dd, 1H, $J = 8$ y 2,5 Hz), 5,95 (dd, 1H, $J = 3$ Hz), 2,78-2,82 (m, 4H). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 156,145 (C), 156,104 (C), 155,675 (C), 140,334 (CH), 129,995 (CH), 118,790 (C), 109,576 (CH), 105,867 (CH), 104,315 (CH), 102,020 (CH), 28,209 (CH₂), 28,150 (CH₂).

4-(2-(tetrahidrofuran-2-il)etil)benceno-1,3-diol (25)

60 RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 6,83 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,26 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 6,21 (dd, 1H, $J = 8$ y 2,5 Hz), 3,79-3,85 (m, 2H), 3,70-3,73 (m, 1H), 2,57-2,60 (m, 1H), 2,51-2,56 (m, 1H), 1,98-2,01 (m, 1H), 1,86-1,90 (m, 2H), 1,77-1,80 (m, 1H), 1,70-1,71 (m, 1H), 1,48-1,54 (m, 1H). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 156,01 (C), 155,619 (C), 155,675 (C), 129,958 (CH), 119,326 (C), 105,855 (CH), 102,130 (CH), 79,187 (CH), 67,104 (CH₂), 35,728 (CH₂), 30,771 (CH₂), 25,951 (CH₂), 25,218 (CH₂).

65 4-(2-(5-etilfuran-2-il)etil)benceno-1,3-diol (26)

RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 6,786 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 6,278 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 6,1845 (dd, 1H, $J = 2,5$ y 8,0 Hz), 5,189 (s, 2H), 2,766 (s, 4H), 2,578 (c, 2H, $J = 7,5$ Hz), 1,194 (td, 3H, $J = 7,5$ y 1,0 Hz). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 156,090(C), 155,649(C), 155,401(C), 154,142(C), 129,999(CH), 118,938(C), 105,852(CH), 104,734(CH), 103,779(CH), 102,006(CH), 28,309(CH₂), 28,268(CH₂), 20,828(CH₂), 11,443(CH₃).

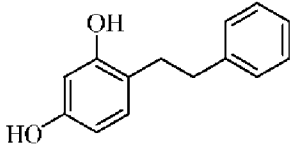
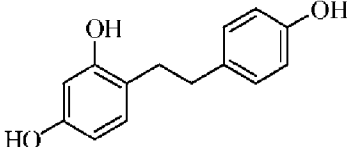
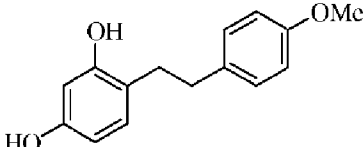
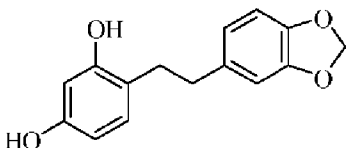
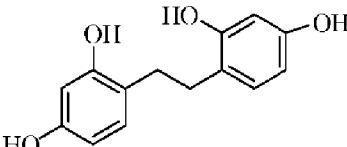
5

4-(2-(piridin-3il)etil)benceno-1,3-diol (27)

10

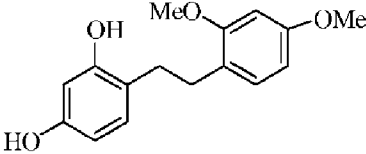
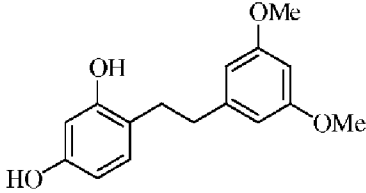
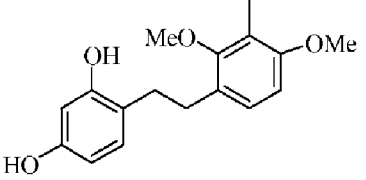
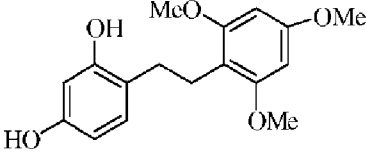
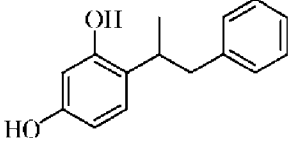
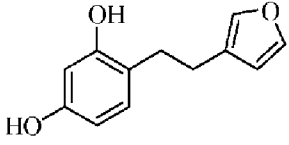
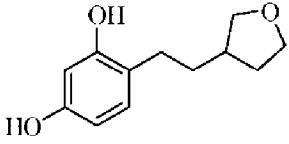
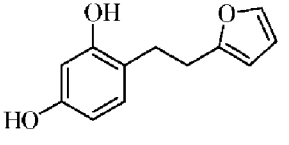
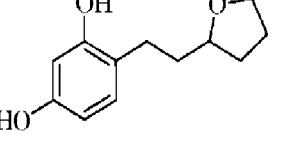
RMN de ^1H (MeOD, 300 MHz): δ 8,293 (dd, 1H, $J = 4,8$ y 1,5 Hz), 8,250 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz), 7,605 (dt, 1H, $J = 8,1$ y 1,5 Hz), 7,291 (ddd, 1H, $J = 7,5$, 4,5 y 0,6 Hz), 6,673 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,270 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 6,139 (dd, 1H, $J = 8,4$ y 2,1 Hz), 2,880 (td, 2H, $J = 6,6$ y 1,8 Hz), 2,778 (td, 2H, $J = 6,6$ y 1,2 Hz). RMN de ^{13}C (MeOD, 125 MHz): δ 156,06(C), 156,04(C), 149,00(CH), 146,00(CH), 138,90(C), 137,34(CH), 130,57(CH), 123,72(CH), 118,31(C), 106,03(CH), 102,25(CH), 33,14(CH₂), 31,48(CH₂).

Tabla 3. Compuestos representativos de fórmula III

Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos
4-Fenetilbenceno-1,3-diol (12)		$\text{Cl}_{50} = 2,8 \mu\text{M}$
4-(4-hidroxifenetil)benceno-1,3-diol (13)		$\text{Cl}_{50} = 2,9 \mu\text{M}$
4-(4-metoxifenetil)benceno-1,3-diol (14)		$\text{Cl}_{50} = 1,2 \mu\text{M}$
4-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilet)etil)benceno-1,3-diol (15)		$\text{Cl}_{50} = 0,25 \mu\text{M}$
4,4'-(etano-1,2diil)dibenceno-1,3-diol (16)		$\text{Cl}_{50} = 0,35 \mu\text{M}$

15

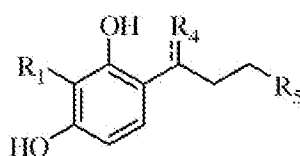
(continuación)

Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos
4-(2,4-dimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (17)		Cl ₅₀ : = 3,0 μM
4-(3,5-dimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (18)		Cl ₅₀ : = 2,8 μM
4-(2,4-dimetoxi-3-metilfenetil)benceno-1,3-diol (19)		Cl ₅₀ : = 0,80 μM
4-(2,4,6-trimetoxifenetil)benceno-1,3-diol (20)		Cl ₅₀ : = 40,0 μM
4-(1-fenilpropan-2-il)benceno-1,3-diol (21)		Cl ₅₀ : = 8,4 μM
4-(2-(furan-3-il)etil)benceno-1,3-diol (22)		Cl ₅₀ : = 1,0 μM
4-(2-(tetrahidrofuran-3-il)etil)benceno-1,3-diol (23)		Cl ₅₀ : = 5,8 μM
4-(2-(furan-2-il)etil)benceno-1,3-diol (24)		Cl ₅₀ : = 0,2 μM
4-(2-(tetrahidrofuran-2-il)etil)benceno-1,3-diol (25)		Cl ₅₀ : = 4,5 μM

(continuación)

Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos
4-(2-(5-etilfuran-2-il)etil)benceno-1,3-diol (26)		Cl ₅₀ : = 0,86 μM
4-(2-(piridin-3il)etil)benceno-1,3-diol (27)		Cl ₅₀ : = 1,8 μM

Ejemplo 4 de referencia. Métodos generales y específicos para la síntesis de compuestos de Fórmula IV



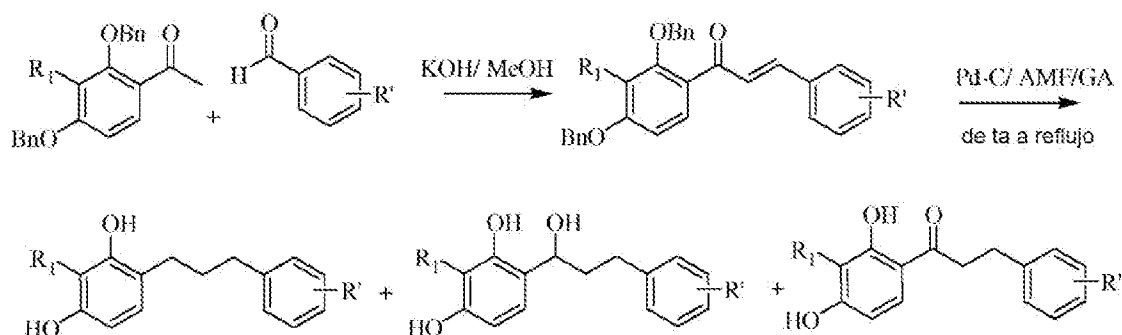
Fórmula IV

5

Los compuestos de Fórmula IV se prepararon como se describe en el Esquema 4. Resumidamente, los 1,3-difenilpropanos ilustrativos de Fórmula IV se prepararon mediante condensación aldólica catalizada por base para proporcionar las calconas respectivas, que se redujeron después por transferencia catalítica de hidrógeno (CTH) utilizando formiato de amonio (AMF) y un catalizador de Pd-C.

10

Esquema 4



Procedimiento representativo del Esquema 4: Síntesis de los compuestos 28, 29 y 30

15

Método general para la reacción de condensación aldólica

A una solución que contenía 2,4-dibenciloxiacetofenona (7,67 g, 23,1 mmol) y 3,5-dimetoxibenzaldehído (3,80 g, 23 mmol) en 100 ml de MeOH anhidro se le añadió KOH (1,4 g, 25 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. Precipitó un sólido amarillo que se filtró y se lavó con agua. El producto en bruto finalmente se cristalizó en MeOH para proporcionar un sólido cristalino amarillo (9,97 g; 87 %).

20

Método general para la reducción por CTH

25

El producto de condensación, la cetona α,β-insaturada (3 g, 7,5 mmol) se disolvió en 24 ml de ácido acético glacial seguido de la adición de Pd al 10 % sobre carbón activado (300 mg) y formiato de amonio (3,92 g, 62 mmol) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 4 h. Después de enfriarla, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite para eliminar el catalizador. El producto en bruto se concentró en un evaporador rotatorio y se purificó por cromatografía en columna eluyendo con hexano y acetato de etilo (75:25) para dar el compuesto 28 (1,1 g, 50 %)

como un sólido blanquecino y el compuesto **29** (0,57 g, 25 %) como un líquido amarillo espeso.

Método general para la desmetilación

5 A una solución agitada de **28** (1,4 g, 4,9 mmol) en CH₂Cl₂ seco (20 ml) en atmósfera de argón a -80 °C, se le añadió BBr₃ (2,67 g, 10,7 mmol) y la mezcla se calentó lentamente a 0 °C. La reacción se interrumpió añadiendo agua enfriada con hielo y se añadió metanol. El disolvente se eliminó entonces en un evaporador rotatorio y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna eluyendo con acetato de etilo/hexanos (25:75) para proporcionar el compuesto **30** (1,14 g, 90 %) como un sólido.

10

4-(3-(3,5-dimetoxifenil)propil)benceno-1,3-diol (**28**)

15 RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,828 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,344 (d, 2H, J = 2,5 Hz), 6,288 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 2,265 (t, 1H, J = 2,0 Hz), 6,226 (dd, 1H, J = 2,5 Hz y 8,0 Hz), 3,723 (s, 6H), 2,503-2,558 (m, 4H), 1,800-1,826 (m, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 160,772 (2C), 155,860(C), 155,597(C), 145,065(C), 130,080(CH), 119,774(C), 106,055(2 CH), 105,937(CH), 102,094(CH), 97,326(CH), 54,226(2 CH₃), 35,587(CH₂), 31,563(CH₂), 28,924(CH₂).

4-(3-(3,5-dimetoxifenil)-1-hidroxipropil)benceno-1,3-diol (**29**)

20 RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,977 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 6,316-6,337 (m, 3H), 6,309 (t, 1H, J = 2,5 Hz), 6,259 (t, 1H, J = 2,5 Hz), 4,781 (dd, 1H, J = 5,5 Hz, J₂ = 7,5 Hz), 3,704 (s, 6H), 2,623 (ddd, 1H, J = 13,5 Hz, J₂ = 10,0 Hz, J₃ = 5,5 Hz), 2,5222 (ddd, 1H, J = 20,0 Hz, J₂ = 9,5 Hz, J₃ = 6,5 Hz), 2,031-1,908 (m, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 160,806(2C), 157,356(C), 156,189(C), 144,503(C), 128,070(CH), 118,275(C), 106,640(CH), 106,155(2 CH), 102,239(CH), 97,515(CH), 78,440(CH), 54,185(CH₃), 54,059(CH₃), 37,786(CH₂), 32,070(CH₂).

25

4-(3-(3,5-dihidroxifenil)propil)benceno-1,3-diol (**30**)

30 RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,827 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 6,267 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 6,211 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,5 Hz), 6,142 (d, 2H, J = 2,0 Hz), 6,074 (t, 1H, J = 2,5 Hz), 2,507 (t, 2H, J = 8,0 Hz), 2,455 (t, 2H, J = 8,0 Hz), 1,76-1,84 (m, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 157,848(2C), 155,849(C), 155,582(C), 145,065(C), 129,995(CH), 119,793(C), 106,559(2CH), 105,859(CH), 102,054(CH), 99,514(CH), 35,420(CH₂), 31,593(CH₂), 28,961(CH₂).

4-(3-(2,4,6-trimetoxifenil)propil)benceno-1,3-diol (**31**)

35 El compuesto **31** se sintetizó siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **28** anterior utilizando como materiales de partida 2,4-dibenciloxiacetofenona y 2,4,6-trimetoxibenzaldehído. RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,822 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 6,250 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,197 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,0 Hz), 6,165 (s, 2H), 3,768 (s, 3H), 3,764 (s, 6H), 2,562 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 2,461 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 1,617-1,653 (m, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 159,273(C), 158,729(2C), 155,556(C), 155,449(C), 129,655(2CH), 120,426(C), 111,382(C), 105,789(CH), 101,968(CH), 90,285(CH), 54,655(2CH₃), 54,274(CH₃), 29,716(CH₂), 29,064(CH₂), 22,142(CH₂).

40

4-(3-(2,4-dihidroxifenil)propil)-2-metilbenceno-1,3-diol (**32**)

45 El compuesto **32** se sintetizó siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **30** utilizando como materiales de partida 2,4-dibenciloxiacetofenona y 2,4-dimetoxi-3-metilbenzaldehído. RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 6,879 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,747 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 6,352 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 6,341 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 6,285 (dd, 1H, J = 8,0 Hz y 2,5 Hz), 2,567 (dd, 4H, J = 8,0 y 7,5 Hz), 2,133 (s, 3H), 1,786-1,817 (m, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 155,486(C), 155,316(C), 153,428(C), 152,906(C), 130,295(CH), 126,523(CH), 120,933(C), 120,518(C), 111,556(C), 106,788(CH), 106,377(CH), 102,283 (CH), 30,767(CH₂), 29,649(CH₂), 29,127(CH₂), 7,833(CH₃).

50

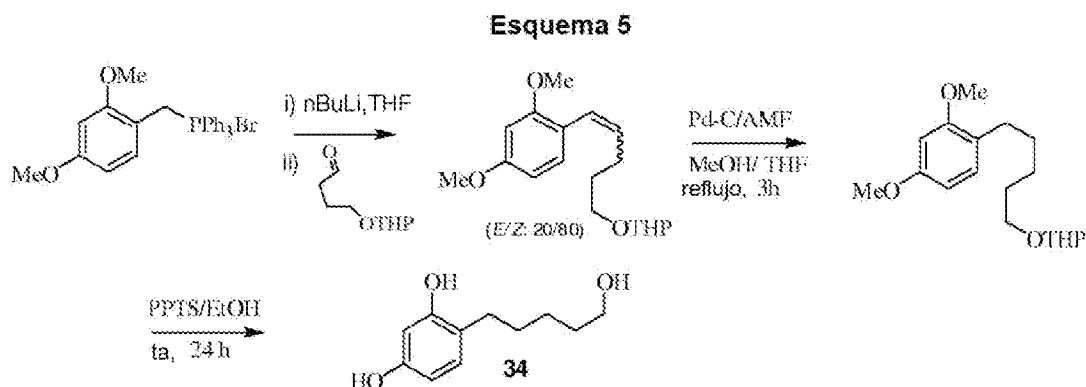
4-(3-(2,4-dihidroxi-3-metilfenil)-3-(2,4-dihidroxifenil)propan-1-ona (**33**)

55 El compuesto **33** se sintetizó siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **28** utilizando como materiales de partida 2,4-dibenciloxiacetofenona y 2,4-dimetoxi-3-metilbenzaldehído. La reducción con formiato de Pd-C/amonio se llevó a cabo a temperatura ambiente en lugar de usar calentamiento a reflujo. La reacción de desmetilación con triobromuro de boro se realizó utilizando un protocolo similar al descrito en el procedimiento para el compuesto **30**. RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 7,628 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,868 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 6,349 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,283 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 6,203 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,0 Hz), 3,127 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 2,862 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 2,031 (s, 3H). RMN de ¹³C (MeOD, 500 MHz): δ 205,420(C), 162,894(C), 162,264(C), 156,438(C), 155,782(C), 130,710(CH), 129,510(CH), 118,364(C), 112,249(C), 110,820(C), 106,596(CH), 105,970(CH), 102,142(CH), 47,089(CH₂), 25,810(CH₂), 6,361(CH₃).

60

Ejemplo 5 de referencia. Síntesis de 4-(5-hidroxifenil)benceno-1,3-diol (**34**)

65 El compuesto **34** se sintetizó como se establece en el Esquema 5.



A una solución de la sal de fosonio de bromuro de 2,4-bis(benzoxi)encilo (7,72, 12 mmol) en THF (25 ml) se le añadió nBu-Li en hexano (6,9 ml, 11 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 h, durante ese periodo la mezcla desarrolló un color rojo que indicaba la formación de iluro. Se añadió una solución de 4-(tetrahidropirani)butanal (1,72 g, 10 mmol) en THF (10 ml) a la solución de iluro a -80 °C y se dejó agitar la mezcla durante la noche sin retirar el baño a baja temperatura, durante ese periodo, el color rojo desapareció y se formó una suspensión blanquecina que se diluyó con hexano y se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se hizo pasar a través de un lecho corto de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo-hexano (5:95) para dar el producto acoplado (5,2 g, 92 %) en una relación de (*E/Z*: 20/80) como un aceite amarillo pálido.

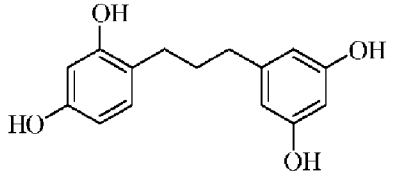
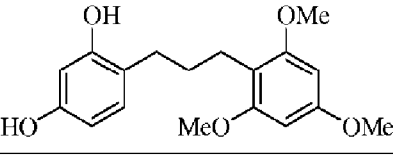
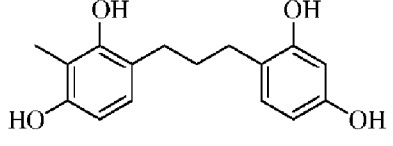
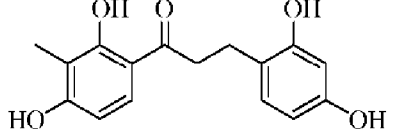
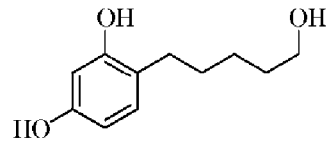
El producto acoplado (3,6 g, 7,7 mmol) se disolvió entonces en 24 ml de THF/MeOH (1:2) seguido de un tratamiento con Pd al 10 % sobre carbón activado (360 mg) y formiato de amonio (3,92 g, 62 mmol) a reflujo durante 4 h. Después de enfriarse, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite para retirar el exceso de catalizador. El producto en bruto, después de la concentración, se purificó por cromatografía en columna eluyendo con hexano y acetato de etilo (80:20) para producir el producto reducido (2,15 g, 95 %) como un líquido espeso incoloro.

A una solución agitada del producto reducido (1,2 g, 4 mmol) en etanol (20 ml) se le añadió tolueno-4-sulfonato de piridinio (350 mg, 1,39 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 24 h. La eliminación del disolvente al vacío seguido de cromatografía en columna del residuo sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo-hexano (10:90) dio el compuesto del título (34) como un sólido blanquecino (690 mg, 88 %). RMN de ¹H (MeOD, 500 MHz): δ 8,825 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 6,2705 (d, 1H, *J* = 0,5 Hz), 6,215 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 3,538 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz), 2,491 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 1,526-1,585 (m, 4H), 1,358-1,40 (m, 2H). RMN de ¹³C (MeOD, 125 MHz): δ 155,705(C), 155,482(C), 129,984(CH), 120,108(C), 105,926(CH), 102,061(CH), 61,722(CH₂), 32,189(CH₂), 29,182(CH₂), 29,086(CH₂), 25,322(CH₂), 103,761(CH).

Tabla 4. Compuestos de referencia representativos de Fórmula IV

Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos
4-(3-(3,5-dimetoxifenil)propil)encilo-1,3-diol (28)		Cl ₅₀ : = 1,02 μM
4-(3-(3,5-dimetoxifenil)-1-hidroxi)propil)encilo-1,3-diol (29)		Cl ₅₀ : = 5,15 μM

(continuación)

Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos
4-(3-(3,5-dihidroxifenil)propil)benceno-1,3-diol (30)		Cl ₅₀ = 0,5 μM
4-(3-(2,4,6-trimetoxifenil)propil)benceno-1,3-diol (31)		Cl ₅₀ = 0,165 μM
4-(3-(2,4-dihidroxifenil)propil)-2-metilbenceno-1,3-diol (32)		Cl ₅₀ = 2,3 μM
4-(3-(2,4-dihidroxi-3-metilfenil)-3-(2,4-dihidroxifenil)propan-1-ona (33)		Cl ₅₀ = 2,54 μM
4-(5-hidroxipentil)benceno-1,3-diol (34)		Cl ₅₀ = 1,0 μM

Ejemplo 6. Ensayo de tirosinasa**5 Reactivos**

La tirosinasa aislada de las especies de hongos *Agaricus bisporus* se adquirió en Sigma-Aldrich Inc. (N.º de catálogo T3824-50KU). La enzima se disolvió en el tampón de ensayo de tirosinasa (fosfato de sodio 100 mM, pH 6,8) a una concentración de 10 U/μl y se almacenó a -70 °C. Para los experimentos, la enzima se diluyó nuevamente en el tampón de ensayo a una concentración de 0,2 U/μl.

Todos los compuestos de ensayo se disolvieron inicialmente en DMSO al 100 % a una concentración de 400 mM. Los compuestos se diluyeron adicionalmente en DMSO al 100 % hasta una concentración de 80 μM. Las soluciones madre de 80 μM de los compuestos se diluyeron entonces diez veces en el tampón de ensayo de tirosinasa hasta la concentración de 8 μM. Los compuestos se diluyeron entonces en serie en incrementos por triplicado en el tampón de ensayo que contenía DMSO al 10 %, manteniendo la concentración de DMSO constante en todas las muestras. Estos compuestos diluidos en serie se utilizaron posteriormente como soluciones madre concentradas dos veces en los ensayos de actividad de tirosinasa.

El sustrato de tirosinasa, L-DOPA (Sigma-Aldrich Inc, N.º de catálogo 37830) se disolvió en el tampón de ensayo de tirosinasa hasta una concentración de 4 mM. Esta solución se usó entonces como la solución madre concentrada cuatro veces de sustrato en los ensayos de actividad de tirosinasa.

Condiciones de ensayo

Los ensayos de tirosinasa se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo transparente a temperatura ambiente. El volumen final de los ensayos fue de 200 μl por pocillo. Se mezclaron 100 μl de compuestos de ensayo concentrados dos veces con 50 μl de L-DOPA 4 mM. Las reacciones se iniciaron añadiendo 50 μl de tirosinasa de hongos (0,2 U/μl, 10 U por reacción), y se dejó proceder durante 15 minutos. La acumulación de producto coloreado se controló mediante absorción de luz a 450 nm utilizando un lector de placas Victor 2 (Perkin-Elmer Inc.).

Resultados

Los ensayos se realizaron por triplicado y cubrieron un intervalo de concentración de compuestos de ensayo de 4 μM a 5,5 nM. La absorción media ($n = 3$) de los pocillos que no contenían enzima se restó como blancos. Los datos se calcularon como porcentaje de actividad de los pocillos que contenían la tirosinasa, pero no compuestos de ensayo. Los valores de Cl_{50} se calcularon a partir de ajustes de regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism. Los resultados para compuestos representativos de Fórmulas I-IV se exponen en las Tablas 1-4 a continuación, y en las Figuras 1-9.

Ejemplo 7. Ensayos basados en células de melanoma murino

Los compuestos seleccionados se analizaron para determinar la capacidad de suprimir la producción de melanina por las células de melanoma murino B16-F1 como se detalla a continuación.

Materiales

Se adquirieron células de melanoma murino B16-F1 de la ATCC (N° de catálogo CRL-6323). La solución de CellTiter96 AqueousOne se adquirió de Promega (N.º de catálogo G3581). Se adquirieron filtros de baja proteína con un tamaño de poro de 0,2 μm , en PALL Life Sciences. (N° de catálogo PN4454). Se adquirió Alpha-MSH en Bachem Inc. (N° de catálogo H-1075.0005). Todos los reactivos de cultivo de tejidos se adquirieron de Invitrogen Inc.

Las células B16-F1 se mantuvieron en medios de crecimiento celular (DMEM/Glucosa Alta complementada con glutamina, piruvato de sodio, suero de ternera fetal dializado al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, 50 unidades/ml de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin) a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95 % de aire y 5 % de CO_2 .

Todos los compuestos de ensayo se disolvieron inicialmente en DMSO al 100 % a una concentración de 400 mM. Después, se añadieron 6 μl de compuestos de ensayo 400 mM a 1,2 ml de los medios de crecimiento celular complementados con alfa-MSH 200 nM, dando una concentración final de 2 mM para el compuesto de ensayo y una concentración de 0,5 % para DMSO. Los compuestos se centrifugaron durante 1 hora a 20.000xg. Los sobrenadantes (1 ml) se recogieron y se filtraron a través de filtros estériles de 0,2 μm . Los compuestos se diluyeron en serie en incrementos de dos veces en los medios de crecimiento celular estériles complementados con DMSO al 0,5 % y alfa-MSH 200 nM, manteniendo así la concentración de alfa-MSH y DMSO constante para todas las muestras. Estos compuestos diluidos en serie se utilizaron posteriormente como soluciones madre concentradas dos veces en los ensayos de producción de melanina y de viabilidad celular.

Métodos

Las células B16-F1 se sembraron en los pocillos de placas de 96 pocillos de fondo transparente a 40.000 células por pocillo, en 100 μl de los medios de crecimiento celular. Al día siguiente, se añadieron 100 μl de compuestos de ensayo concentrados dos veces recién preparados a los pocillos. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95 % de aire y 5 % de CO_2 durante 72 horas. Al final del periodo de incubación, los medios acondicionados que contenían melanina se retiraron de las células y se transfirieron a otra placa. Para medir el contenido de melanina, la absorción de luz de los medios acondicionados se tomó a 450 nm con un lector de placas Victor 2 (Perkin-Elmer Inc.).

La viabilidad de las células se midió utilizando un ensayo convencional de reducción de tetrazolio basado en el potencial redox de las células vivas. Después de la aspiración de los medios acondicionados que contienen melanina, las células se rellenaron inmediatamente con 100 μl de medio fresco complementado con una solución de 16 % de CellTiter96 AqueousOne que contiene sales de tetrazolio. Las células se mantuvieron a 37 °C durante 20-40 minutos adicionales. La conversión de tetrazolio se supervisó midiendo la absorbancia de los pocillos celulares a 450 nm con un lector de placas Victor 2 (Perkin-Elmer Inc.).

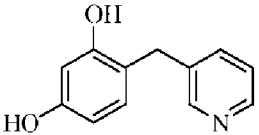
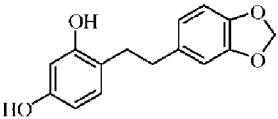
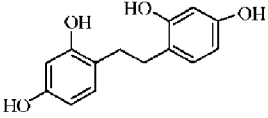
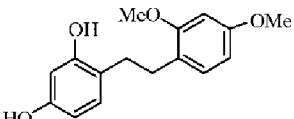
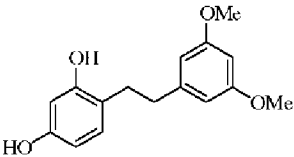
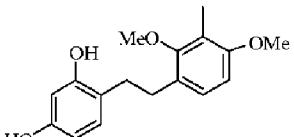
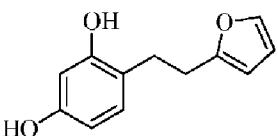
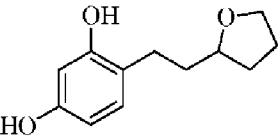
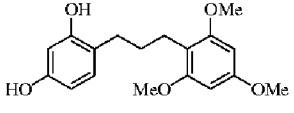
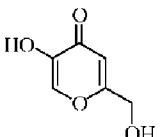
Resultados

Los resultados de los experimentos representativos se resumen en la Tabla 5 y en las Figuras 1-9. Más del 90 % de la melanina producida por las células cultivadas de melanoma se encuentra en medios extracelulares. Por lo tanto, al final del experimento, se recogieron medios que contenían melanina y se determinaron las cantidades relativas de melanina por adsorción a 450 nm. La viabilidad de las células se determinó mediante un procedimiento colorimétrico de uso común que está basado en la conversión de los compuestos de tetrazolio en productos de formazán coloreados (utilizando el ensayo CellTiter96 AqueousOne de Promega). Las enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas logran esta conversión, y la cantidad de producto de formazán es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y cubrieron un intervalo de concentración de compuestos de ensayo de 2 μM a 1000 μM . La absorción media ($n = 4$) de los pocillos que no contenían células se restó como blancos. Los resultados se calcularon como porcentaje de pocillos que contenían las células pero no compuestos de ensayo. Los valores de Cl_{50} se calcularon a partir de ajustes de regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism. Los

resultados se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del ensayo de tirosinasa de hongos, Ensayo de producción de melanina y estudios de viabilidad celular para compuestos representativos de fórmulas I-IV

Compuesto	Estructura	Ensayo de tirosinasa de hongos	Producción de melanina	Viabilidad celular
7 invención		Cl ₅₀ = 2,0 μM	Cl ₅₀ = 14 μM	
15 comparativo		Cl ₅₀ = 0,25 μM	Cl ₅₀ = 3,3 μM	DL ₅₀ = 66 μM
16 comparativo		Cl ₅₀ = 0,35 μM	Cl ₅₀ = 1,7 μM	DL ₅₀ = 260 μM
17 comparativo		Cl ₅₀ = 3,0 μM	Cl ₅₀ = 11,9 μM	DL ₅₀ = 157,8 μM
18 comparativo		Cl ₅₀ = 2,8 μM	Cl ₅₀ = 2,97 μM	DL ₅₀ = 222,2 μM
19 comparativo		Cl ₅₀ = 0,80 μM	Cl ₅₀ = 24,7 μM	DL ₅₀ = 130,3 μM
24 comparativo		Cl ₅₀ = 0,2 μM	Cl ₅₀ = 1,60 μM	DL ₅₀ = 345,9 μM
25 comparativo		Cl ₅₀ = 4,5 μM	Cl ₅₀ = 5 μM	DL ₅₀ >1000 μM
31 comparativo		Cl ₅₀ = 0,165 μM	Cl ₅₀ = 156,1 μM	DL ₅₀ = 187,8 μM
ácido kójico comparativo		Cl ₅₀ = 20 μM	Cl ₅₀ = 303,5 μM	DL ₅₀ >1000 μM

5

Ejemplo 8. Estudios de piel humana reconstruida

Materiales y métodos

Los efectos de blanqueamiento de la piel de los compuestos de ensayo se estudiaron utilizando un modelo de piel reconstruida, Melanoderm™ proporcionado por MatTek Corp. (Ashland, MA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Resumidamente, los queratinocitos epidérmicos humanos normales y los melanocitos humanos normales derivados de donantes de piel oscura se cultivaron conjuntamente en una superficie de membrana recubierta de colágeno para formar tejido cutáneo altamente diferenciado de múltiples capas (MEL-300-B). Los tejidos se mantuvieron en la incubadora de CO₂ a 37 °C. Las superficies apicales de la piel reconstruida (9 mm de diámetro) se expusieron al aire, mientras que las superficies inferiores permanecieron en contacto con 5 ml de medio de mantenimiento, que contenía factores diferenciadores de la piel (EPI-100-NNM-113). Los compuestos de ensayo se formularon en propilenglicol al 80 % de la siguiente manera: se disolvieron 10 mg de cada compuesto de ensayo durante la noche en 1 ml de propilenglicol (1,2-propanodiol, Sigma-Aldrich). Los compuestos se esterilizaron entonces pasando a través de un filtro de 0,2 µm y se diluyeron en agua estéril/propilenglicol hasta concentraciones finales de 0,2 %, 0,4 % y 0,8 %. La concentración de propilenglicol se mantuvo al 80 % para todas las muestras. Además se utilizaron los siguientes controles: agua estéril, propilenglicol al 80 % y ácido fólico al 1 % en agua.

Los compuestos de ensayo se aplicaron a la superficie apical de los tejidos de la siguiente manera: 10 µl de cada compuesto de prueba, 10 µl de propilenglicol al 80 % (control del vehículo), 25 µl de agua estéril (control negativo) y 25 µl de ácido fólico al 1 % (control positivo). Las muestras se volvieron a aplicar cada dos días durante 15 días. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Al final del experimento, se tomaron imágenes microscópicas utilizando un microscopio fotográfico equipado con un objetivo de contraste de fase 25X y una cámara CCD en color.

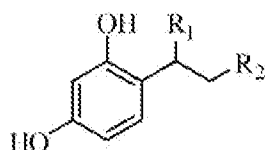
Resultados

Las posibles propiedades de blanqueamiento de la piel de los compuestos de ensayo se exploraron más a fondo en un modelo de piel reconstruida. El modelo consiste en queratinocitos epidérmicos normales derivados de humanos y melanocitos, que se han cultivado conjuntamente para formar una epidermis humana altamente diferenciada multicapa. En este estudio, los melanocitos se obtuvieron de un donante altamente pigmentado. La piel reconstruida se hizo crecer en la interfaz aire-líquido, haciendo posible imitar la aplicación tópica de agentes blanqueadores de la piel (Figura 10A).

Diferentes concentraciones de compuestos de ensayo, propilenglicol al 80 % (control del vehículo), agua (control negativo) o ácido fólico al 1 % (control positivo) se aplicaron repetidamente por vía tópica sobre la superficie de la piel reconstruida durante 15 días. Dos de los compuestos de ensayo, concretamente, el compuesto n.º 16 y el compuesto n.º 25, mostraron efectos de blanqueamiento significativos sobre los melanocitos de la piel, sin causar alteraciones detectables de la morfología celular (Figura 10B). De ellos, el compuesto n.º 16 mostró el mayor efecto con un blanqueamiento significativo de los melanocitos observado tan pronto como 3 días después del comienzo del experimento (datos no mostrados). Las fotografías de la muestra de piel tomadas después de 15 días del experimento muestran importantes efectos de blanqueamiento dependientes de la dosis en los melanocitos, que aparecen en las fotografías como células dendríticas oscuras.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula III:



Fórmula III

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

10 R_1 es H; y
 R_2 es furan-3-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, furan-2-ilo, tetrahidrofuran-2-ilo, 5-etilfuran-2-ilo o piridin-3-ilo.

15 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 4-(2-(furan-3-il)etil)benceno-1,3-diol (22), 4-(2-(tetrahidrofuran-3-il)etil)benceno-1,3-diol (23), 4-(2-(furan-2-il)etil)benceno-1,3-diol (24), 4-(2-(tetrahidrofuran-2-il)etil)benceno-1,3-diol (25), 4-(2-(5-etilfuran-2-il)etil)benceno-1,3-diol (26), y 4-(2-(piridin-3-il)etil)benceno-1,3-diol (27).

3. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

20 4. Un compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con la sobreproducción o distribución desigual de la melanina.

25 5. El compuesto para el uso según la reivindicación 4, en donde las enfermedades o afecciones se seleccionan de hiperpigmentación o daños resultantes de la exposición al sol o a la radiación ultravioleta (UV), bronceado, manchas de hiperpigmentación causadas por el envejecimiento de la piel, melanoma, hepatopatías, quemaduras térmicas, heridas tóxicas, pigmentación de la piel debida a afecciones inflamatorias provocadas por infecciones fúngicas, microbianas o víricas, vitíligo, carcinoma o melanoma.

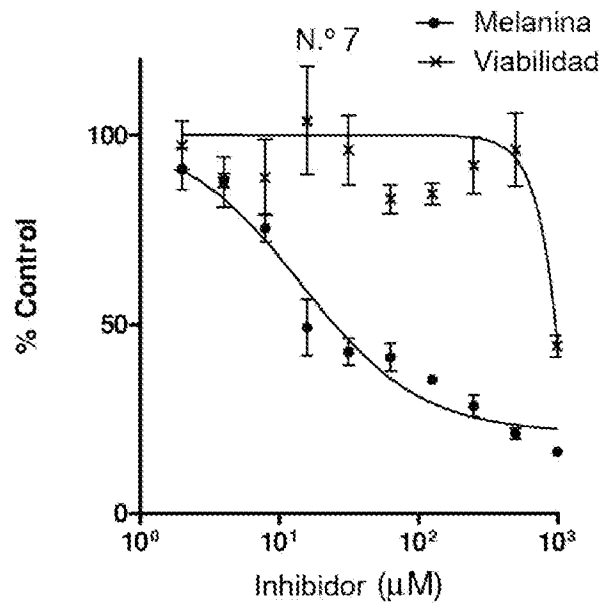


Fig. 1

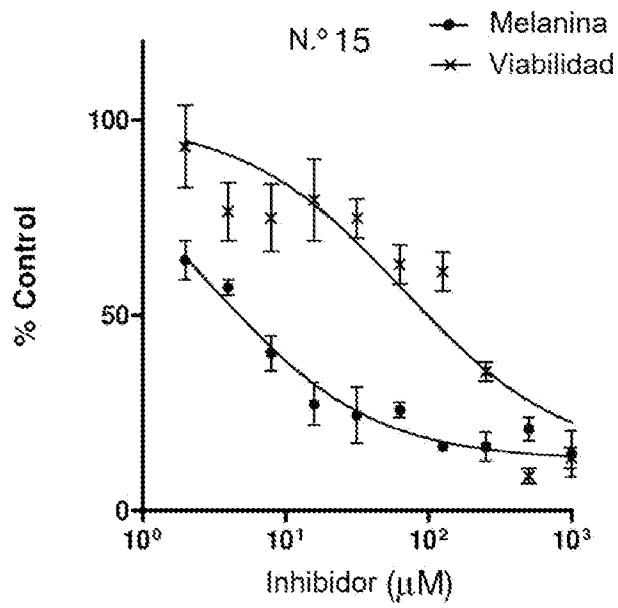


Fig. 2

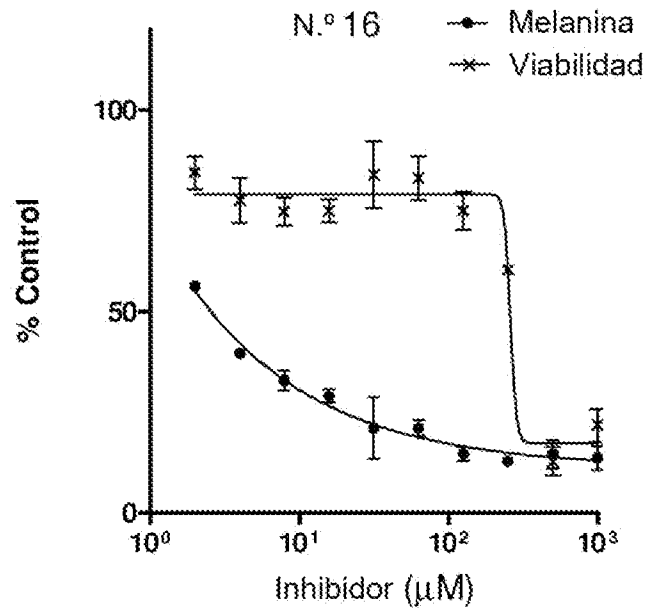


Fig. 3

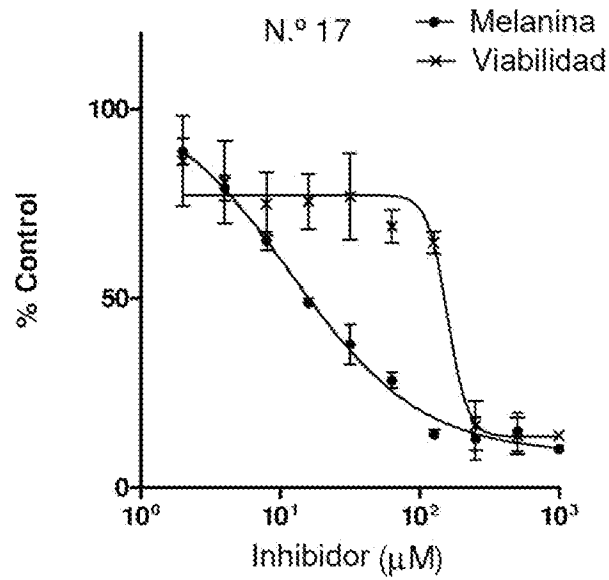


Fig. 4

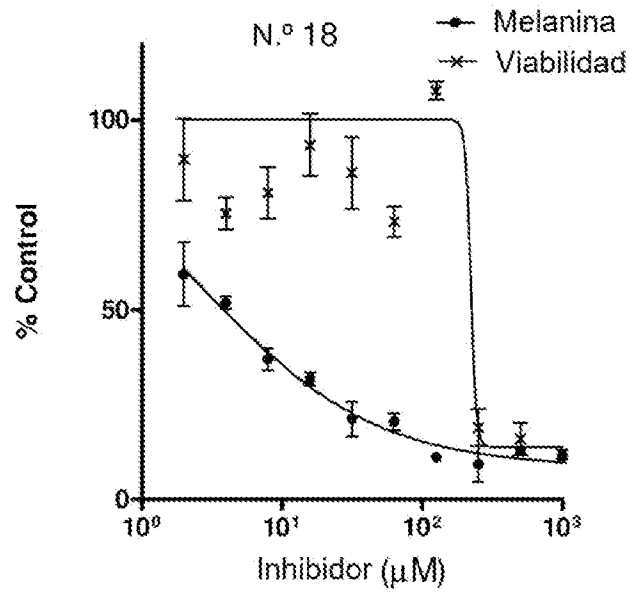


Fig. 5

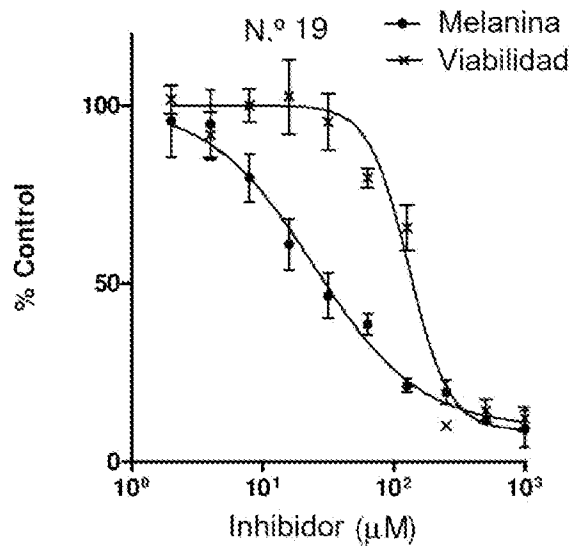


Fig. 6

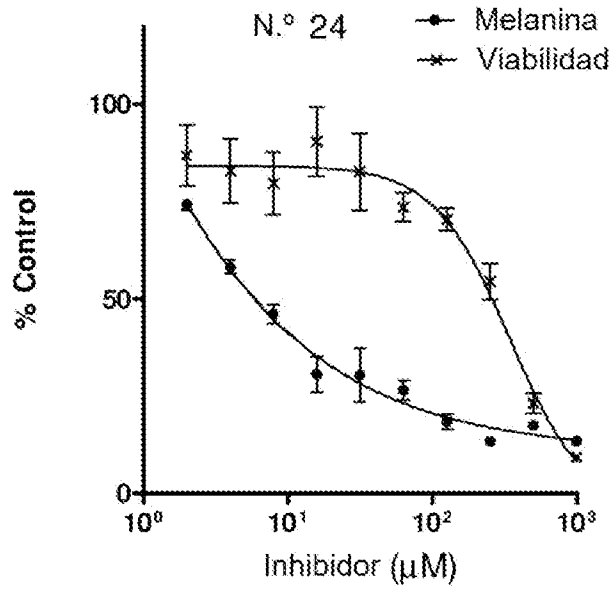


Fig. 7

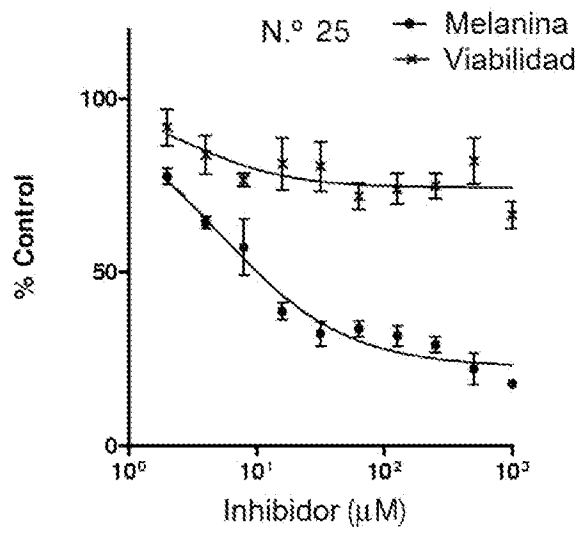


Fig. 8

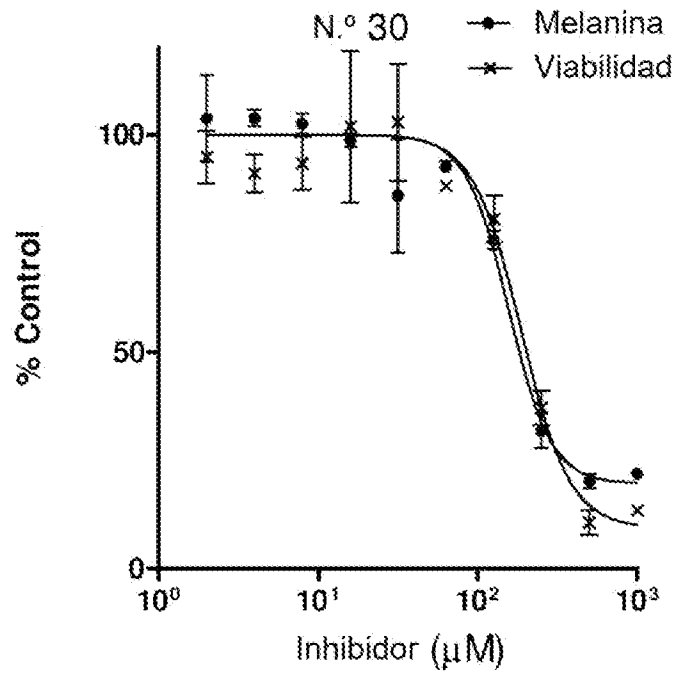


Fig. 9

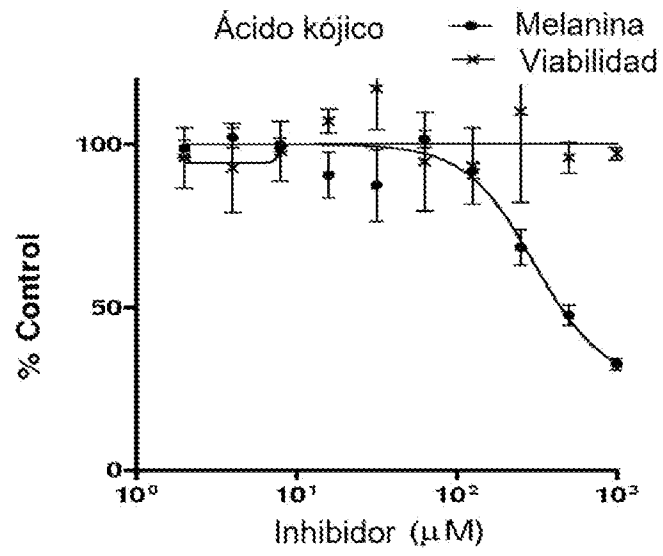


Fig. 10

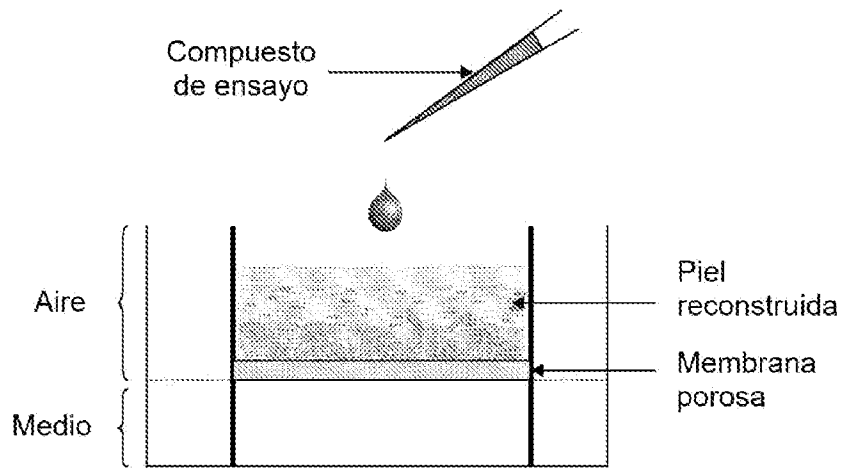


Fig. 11A

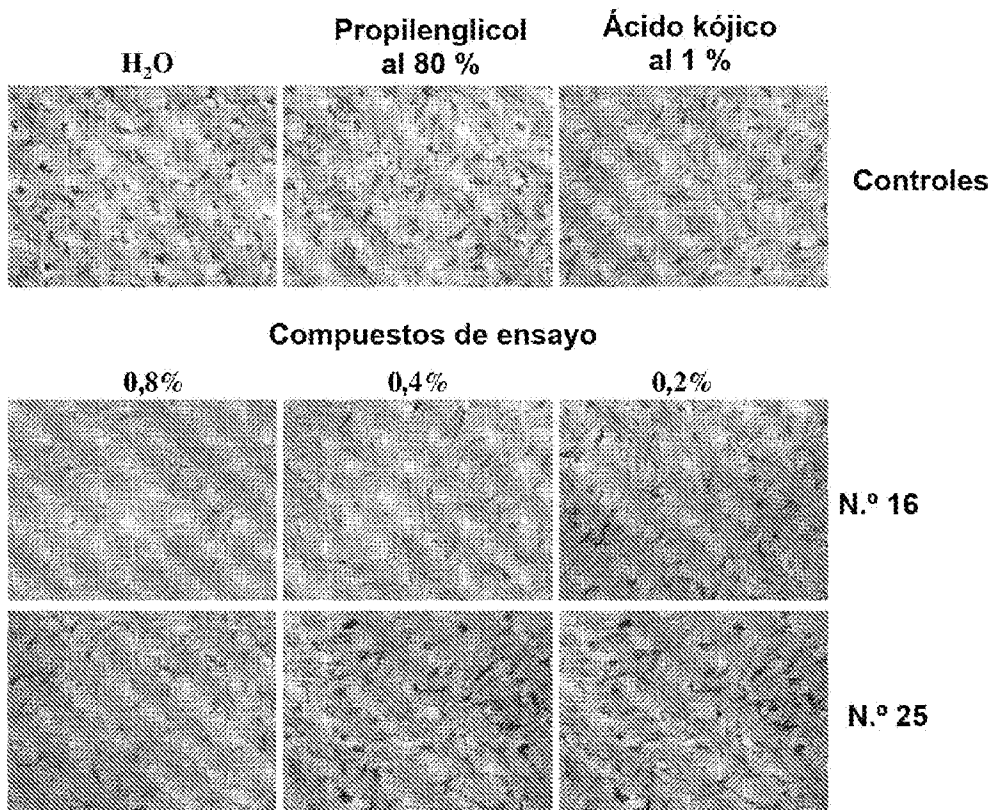


Fig. 11B