

B1

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

(1)

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para inhibir el factor de transcripción inducible por hipoxia. Moduladores de procesos patológicos de angiogénesis, oncogénesis, inflamación, apoptosis y terapia celular.

Sector técnico de la invención

La presente invención se incluye en el campo de la Farmacología y Química Médica y se refiere a nuevas moléculas representadas por la fórmula general (I), especialmente la denominada FM19G11, así como a las composiciones farmacéuticas que las contienen. Dichas composiciones optimizadas farmacológicamente son capaces de modular y/o inhibir la transcripción de genes modulados por el factor de transcripción inducible por hipoxia (en adelante, HIF) y que están directa y/o indirectamente involucrados en procesos patológicos relacionados con cáncer, inflamación, reparación de tejidos, diferenciación de células troncales y terapia regenerativa.

La presente invención también se refiere a un método de síntesis de dichas moléculas (I) y a su utilización en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de los procesos patológicos mencionados.

Antecedentes de la invención

Prácticamente todas las células del organismo son sensibles a las variaciones en los niveles de nutrientes y entre ellos el más importante para la fisiología celular es el oxígeno. La disminución en los niveles de oxígeno celular está íntimamente relacionada con su importancia en la proliferación celular, por ejemplo en las células endoteliales que forman los nuevos vasos sanguíneos, fenómeno éste conocido como angiogénesis. Las células tumorales presentan respuestas a la depleción de oxígeno mediante la activación de una serie característica de genes que les permiten sobrevivir y reaccionar frente a estas condiciones adversas. En los últimos años los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) han sido objeto de numerosos estudios como reguladores clave de la respuesta celular a la falta de oxígeno y han sido ampliamente relacionados en la literatura científica con procesos patológicos de cáncer, de inflamación, de patologías cardiovasculares y neurodegenerativas y, en general de todas aquellas llamadas patologías angiogénicas, como retinopatía diabética, artritis reumatoide, placas de arteriosclerosis, endometriosis, enfermedad de Crohn, soriasis, hipertrofia prostática benigna, y cáncer. (Folkman, "Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?" *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2007; 6, 273-286; Mazure, "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression" *Nature*, 2006; 44, 437-443). Cada vez más, especialmente en cáncer, la terapia se basa en el uso de composiciones que sean mezclas de compuestos activos, con modos de acción diferentes y toxicidades no acumulativas. Por lo tanto, la necesidad de terapias de combinación requiere la caracterización de un mayor arsenal de compuestos eficaces en la lucha contra la enfermedad oncológica, especialmente si además tenemos en cuenta la actual tendencia de la medicina personalizada.

Las células troncales son de especial relevancia para estudiar la etiología de procesos tumorales así como su potencial en la práctica clínica. Existen evidencias de que determinados tumores cerebrales, como por ejemplo los glioblastomas, meduloblastomas y astrocitomas, contienen células con capacidad de multipotencialidad similar a determinados progenitores neurales. Recientemente se ha comprobado que la hipoxia es un factor que está íntimamente asociado a procesos de indiferenciación de las células troncales adultas. De hecho la localización de algunas células troncales adultas coinciden con zonas hipóxicas y/o altamente vascularizadas (Palmer *et al.* "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis," *The Journal of Comparative Neurology* 2000; 425, 479-494.; Maurer *et al.*, "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells" *Neurosci. Lett.* 2003; 344, 165-168). El empleo de las células madre procedentes del mismo tejido, comprometidas e influenciadas por el mismo microambiente al que van a ser sometidas, podría resultar una alternativa más eficiente en los ensayos de regeneración del sistema celular lesionado. Por lo tanto, la presente invención también presenta una potencial relevancia dentro del ámbito de la moderna disciplina de Medicina Regenerativa.

HIF y Cáncer

Aunque las bases celulares y moleculares subyacentes a los fenómenos de hipoxia son complejas y variadas, ya se empiezan a conocer algunas de las moléculas clave. La respuesta celular adaptativa frente a la disminución en los niveles de oxígeno (hipoxia) se realiza mediante la inducción de un patrón de expresión génico característico. Una de estas moléculas claves que regulan la respuesta celular a la hipoxia es el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF). HIF es un heterodímero compuesto de dos subunidades expresadas tanto constitutivamente (HIF 1 β), como inducidas por la hipoxia (HIF1 α , HIF2 α). En condiciones de normoxia HIF1 α y HIF2 α son indetectables, ya que su regulación está mediada por los procesos de ubiquitinación y rápida degradación por el proteasoma. La proteína del oncogen VHL actúa como sustrato de reconocimiento del complejo E3 Ubiquitina ligasa que señala HIF1 α y HIF2 α para su degradación por el proteasoma. Ambos complejos, VHL/HIF1 α y VHL/HIF2 α , dependen de la hidroxilación específica de dos residuos de prolina situados en la proteína, hidroxilación que está catalizada por una nueva familia de dioxigenasas 2-oxoglutarato-dependientes (prolil-hidroxilasas) (Semenza G.L. "Targeting HIF-1 for cancer therapy" *Nature Rev.* 2003; 3, 721-732; Lando D. *et al.* "Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation" *Eur J Biochem.* 2003; 270, 781-90). Debido a la necesidad de oxígeno de estas enzimas para llevar a cabo su reacción catalítica, es comúnmente aceptado que son éstas los sensores reales de la presencia de oxígeno para regular los niveles de HIF1 α /HIF2 α citoplásmicos. En condiciones de normoxia y proliferación activa de las células se observa que las rutas de proliferación y supervivencia desencadenadas por los

factores de crecimiento, también inducen la expresión de HIF1 α /HIF2 α por activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Ras/RAF/MEKK (Poulaki V. *et al.* "Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1 alpha and VEGF" *J Clin Invest.* 2002; 109, 805-15; Hudson C.C. *et al.* "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin" *Mol Cell Biol.* 2002; 22:7004-14; Guba M. *et al.*, "Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor" *Nat. Med* 2002; 8, 128-35). Cuando las células se enfrentan a una deficiencia de oxígeno, HIF1 α /HIF2 α , se acumulan en el citosol y esta acumulación permite su interacción con HIF1 β , su traslocación al núcleo y la activación de los genes -más de doscientos genes diferentes-, que han sido descritos como genes diana de HIF y que median la respuesta celular inducida por estos factores de transcripción (Semenza G.L. "Targeting HIF-1 for cancer therapy" *Nature Rev.* 2003; 3, 721-732; Paul S.A. *et al.*, "HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis" *J. Cel. Physiol.* 2004; 200, 20-30). Algunos de los genes inducidos por HIF se encuentran incluidos dentro de los factores moleculares conocidos como factores de crecimiento (*Growth Factors*), como por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el de insulina (IGF) y el factor de crecimiento tisular β (TGF), por mencionar algunos. Dado que los procesos de proliferación celular activa implican directa o indirectamente, la generación de falta de oxígeno en la célula, la hipoxia puede ser considerada como una característica incluso fisiológica. La disminución de los niveles de oxígeno en la célula y la consecuente estabilización de la proteína de HIF citoplásmica supone, entre otros efectos, el reclutamiento de células endoteliales circulantes derivadas de médula ósea y la proliferación de células endoteliales vasculares y que promueven la neovascularización en procesos isquémicos y tumorales (Harris *et al.*, "Hypoxia a key regulatory factor in tumour growth". *Nat Rev Cancer.* 2002; 2, 38-47; Takahashi T. *et al.*, "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization" *Nat Med.* 1999; 5, 434-8). HIF puede estar controlando una amplia variedad de genes que median respuestas relacionadas con metabolismos energético, de supervivencia, de neovascularización, migración celular, adhesión celular y ha sido demostrada su importancia como promotor de la progresión tumoral (Mazure, "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression", *Nature* 2006; 44, 437-443; Semenza G.L. "Targeting HIF-1 for cancer therapy" *Nature Rev.* 2003; 3, 721-732). Además de actuar como "controlador" de la homeostasis de oxígeno y promover la supervivencia y proliferación celular, HIF presenta una función dual como inductor de la muerte celular programada (apoptosis) induciendo genes pro-apoptóticos que pueden ser respuestas presentes en tejidos hipóxicos (Pouyssegur *et al.*, "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression" *Nature* 2006; 441, 437-443).

El concepto de célula troncal tumoral está despertando un creciente interés en los científicos de todo el mundo ya que se han aislado células de diferentes tumores con características de célula troncal. Se sabe que condiciones de hipoxia promueven eventos moleculares que tienen como consecuencia una bajada de expresión de los genes reparadores (en inglés, *Mismatch Repair genes*, MMR) de las mutaciones que se producen en el DNA durante su replicación en la fase S del ciclo celular (Mihaylova VT, *et al.*, "Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells" *Mol Cell Biol.* 2003 May; 23(9):3265-3273.). Determinadas enfermedades como el cáncer de colon hereditario no polipósico (nPCC), están asociadas a una deficiencia en estos genes reparadores cuya consecuencia es la aparición de inestabilidad en secuencias microsatélites del ADN y que se detectan en un 95% de los tumores nPCC o en el 15% de los tumores de colon esporádicos. Las células troncales persisten por largos períodos de tiempo y, por tanto, en condiciones de mal funcionamiento de los sistemas reparadores del material genético, tendrían más posibilidades de acumular mutaciones que otros tipos de células con vida media más corta. La bajada de estos genes MMR en célula troncal bajo condiciones de hipoxia podría suponer un incremento y acumulación de mutaciones no reparadas que podría aumentar las posibilidades de adquirir un fenotipo maligno. Atendiendo a resultados científicos previamente publicados, se sabe que tras la represión, la expresión de los genes reparadores puede ser recuperada por un inhibidor de las histonas deacetilasas conocido como Trichostatin A (TSA) (Cameron EE, *et al.*, "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer" *Nat Genet.* 1999 Jan; 21(1):103-107.). Esta droga es capaz de aumentar el grado de acetilación de las histonas localizadas en la región promotora de esos genes, lo que confiere a la cromatina una conformación accesible a los factores de transcripción que regulan estos genes. El hecho de que una droga recupere genes que frenan o evitan el cáncer la convierte en un posible candidato como agente antitumoral. El TSA es una droga que se encuentra actualmente en fase preclínica para tratamiento de cáncer de mama (Vigushin DM, *et al.*, "Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer *in vivo*" *Clin Cancer Res.* 2001 Apr; 7(4):971-6).

HIF y Medicina Regenerativa

La etiología de ciertos procesos oncogénicos está íntimamente ligada al potencial de autorrenovación y diferenciación de las células troncales (Clarke MF. "Neurobiology: at the root of brain cancer" *Nature*, 2004; 432, 281-2.) y por lo tanto ligada al potencial terapéutico de la medicina regenerativa. Los procesos de división, diferenciación y funcionamiento de las células troncales están reguladas por señales complejas de su entorno, incluyendo la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Durante el desarrollo embrionario, así como en el cerebro adulto, la hipoxia fisiológica se ha vinculado con proliferación e indiferenciación de distintas células progenitoras y células troncales (Studer L *et al.*, "Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen". *J Neurosci.*, 2000; 20(19), 7377-83; Morrison SJ, *et al* "Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells". *J Neurosci.* 2000; 20(19), 7370-6). Según resultados recientes, las células madre neurales se encuentran asociadas a nichos altamente angiogénicos y se ha demostrado que HIF es esencial en el desarrollo del sistema nervioso central (Sharp F.R. y Bernaudin M, "HIF1 and oxygen sensing in the brain". *Nature Rev.* 2004, 5, 437-448; Ryan E R, Lo J & Johnson, "HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization". *EMBO J.*, 1998; 17, 3005-3015; Ding and Schultz, "A role for chemistry

in stem cell biology" *Nature Biotech.*, 2004; 22, 833-840). También resultados recientes demuestran el sinergismo de los mecanismos moleculares de hipoxia con factores moleculares de indiferenciación, como son los factores de transcripción Notch y Oct-4, que median los procesos de diferenciación celular en diferentes tejidos. La sinergia entre estas dos importantes rutas de señalización celular con la hipoxia conduce a la modulación de las rutas de diferenciación celular que median estos importantes marcadores de indiferenciación (Gustafsson y *et al.*, "Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state". *Developmental Cell*, 2005; 9, 617-628; Covelto *et al.*, "HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth". *Genes & Development* 2006; 20, 557-570).

En la presente invención se ha utilizado los siguientes modelos de células troncales:

- *La línea celular C17.2*, que es una línea celular de precursores neurales multipotentes, que fue derivada de la capa granular externa de cerebelo de ratones recién nacidos, e inmortalizada por transducción del gen v-myc mediada por retrovirus (Snyder EY, *et al.*, "Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum" *Cell*. 1992 Jan; 10(68), 33-51). Esta línea celular proporciona progenitores neurales homogéneos de manera ilimitada y es considerada como célula madre neural desde el punto de vista operativo (Parker MA, *et al.*, "Expression profile of an operationally-defined neural stem cell clone. 1". *Exp Neurol*. 2005 Aug, 194(2), 320-32). Cuando estas células se transplantan en un cerebelo de ratón recién nacido parecen participar en el desarrollo normal del cerebelo. Estas células están dotadas de una extraordinaria plasticidad y ante un daño cerebral son capaces de migrar hacia la zona afectada, diferenciarse a neuronas o glia, conectar y recibir conexiones de otras células nerviosas, así como incluirse en la citoarquitectura normal del tejido dañado de una manera no tumorigénica (Snyder *et al.*, "Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum" *Cell*. 1992 Jan; 10(68), 33-51). Por estas razones se han sugerido su posible utilidad como trasplante y terapia celular para regeneración neural en enfermedades neurodegenerativas (Wei-Guo Liu, *et al.* "Dopaminergic neuroprotection by nurturing-expressing c17.2 neural stem cells in a rat model of Parkinson disease" *Parkinsonism and Related Disorders* 2007; 13, 77-88; Snyder EY, *et al.*, "Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct; 14, 94(21), 11663-8). Las C17.2 no sólo no parecen evolucionar hacia un fenotipo tumorigénico una vez transplantadas, si no que además parecen mostrar un comportamiento acosador o persecutorio de las células tumorales. Cuando las C17.2 se implantaron en cerebro de ratones en los que se había desarrollado un glioma, estas células migraron hacia el borde invasor del tumor rodeándolo. Incluso tienen la capacidad de rodear pequeñas islas de células malignas que escapan de la masa tumoral principal (Aboody KS, *et al.* "Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas". *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Nov 7; 97(23), 12393-5). Los autores de la presente invención consideran estas células como una posible herramienta para estudios de terapia génica, ya que pueden liberar genes con potencial terapéutico que actúen sobre la masa tumoral. Las C17.2 también se han ensayado en modelos de regeneración de médula espinal (Teng YD, "Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 Mar 5; 99(5), 3024-9). En animales en los que se implantaron estas células, se observó recuperación funcional de los miembros afectados, posiblemente debido a regeneración parcial de fibras nerviosas inmersas en la zona lesionada. Ourednik y col. muestran como estas células contribuyen a restablecer funciones de neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson (Ourednik J *et al.*, "Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons" *Nat Biotechnol*. 2002 Nov 20; 11, 1103-10). En este caso se vuelve a poner de manifiesto su potencial en terapia génica, así como su posible papel como neuroprotector o en el posible restablecimiento de funciones en neuronas dañadas.

- *Cultivo primario de progenitores neurales adultos (NPC)* de la zona endimaria y subependimaria del sistema nervioso central (SNC). La médula espinal puede regenerarse en determinados vertebrados adultos, como es el caso de los peces y en el anfibio urodele, sin embargo, la mayoría de los vertebrados han perdido este potencial durante el desarrollo. En la médula espinal en urodele los axones no solamente crecen y vuelven a reconectarse con las estructuras a las que inervaba antes de la lesión, si no que además es capaz de reponer aquellas neuronas y células gliales perdidas. La fuente de esta regeneración parece ser una población de células endimarias alineadas en el canal central y que se extienden hasta la superficie de la *pia mater* (Egar M, Singer M "The role of ependyma in spinal cord regeneration in the urodele, Triturus" *Exp Neurol* 1972; 37, 422-430; Benraiss A, *et al.* "Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain". *J Neurosci* 2001; 21, 6718-6731; Echeverri K. and Tanaka EM "Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration". *Science* 2002; 298, 1993-1996; Ferretti *et al.* "Changes in spinal cord regenerative ability through phylogenesis and development: lessons to be learnt". *Dev Dyn* 2003; 226, 245-256.). En varios modelos de lesión del sistema nervioso central, se ha descrito que existe proliferación y diferenciación de células endimarias, lo que sugiere la existencia de una fuente endógena con poder regenerativo (Johansson CB, *et al.* "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system". *Cell* 1999; 96, 25-34). En ambos modelos, tanto en esclerosis múltiple, que cursa con un proceso inflamatorio y que deriva en una desmielinización y degeneración axonal, como en la lesión traumática de la médula espinal se ha descrito este proceso de neurogénesis (Danilov *et al.*, "Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis". *European J Neuroscience* 2006; 23, 394-400; Ke Y, *et al.* "Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice". *Stem Cells* 2006. Published online). Aunque, a pesar de que el proceso de neurogénesis ocurre, éstos precursores neurales son insuficientes para reemplazar el tejido degenerado y por lo tanto para recuperar la función perdida. En los mamíferos adultos, las células endimarias alineadas en el canal central en la médula espinal pueden formar neuroesferas (colonias formadas por células madre neurales) *in vitro* (Danilov A, *et al.* "Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis". *European J Neuroscience* 2006; 23, 394-400). Las células

madre adultas procedentes de la zona subventricular del cerebro, *in vitro* pueden proliferar como esferoides indiferenciados y diferenciarse a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos (Weiss S, *et al.* "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis" *J Neuroscience* 1996; 16, 7599-7609), resultando en una herramienta óptima para la reconstrucción del tejido medular lesionado. Sin embargo, el trasplante *in vivo* de estas células madre no ha dado resultados positivos. Estas células o bien permanecen indiferenciadas o bien aparecen con fenotipo astrogliar contribuyendo a la cicatriz glial (Ricci-Vitiani L, *et al.* "Influence of local environment on the differentiation of neural stem cells engrafted onto the injured spinal cord". *Neurol Res.* 2006; 28(5), 488-92). Por lo tanto, el cultivo primario de progenitores neurales adultos (NPC), y concretamente aquellos de la zona endependimaria y subependimaria del sistema nervioso central (SNC), resultan un modelo idóneo para el estudio *in Vitro* del comportamiento de células madre que, fisiológicamente se encuentran en un ambiente hipóxico. Los NPC poseen capacidad de auto-renovación y multipotencialidad, pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos. Durante los últimos años las células madre y/o NPC adultos han mostrado ser una fuente muy atractiva en los procesos de reparación de enfermedades neurodegenerativas o en lesiones traumáticas del SNC. El trasplante de precursores neurales adultos puede integrarse y reconectar a lo largo de las rutas axonales ya existentes en la médula espinal tras una lesión aguda (Vroemen, *et al.* "Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways" *Eur J Neurosci.* 2003; 18(4), 743-51). Akiyama y colaboradores muestran que, el trasplante de precursores neurales, derivados de cerebro humano adulto, puede facilitar los procesos de remielinización en la médula espinal desmielinizada (Akiyama Y, *et al.* "Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord" *Exp Neurol.* 2001, 167(1), 27-39).

- *Células troncales mesenquimales de médula ósea (BMMSC)*: son las células que forman parte del estroma de la médula ósea (MO), y pueden diferenciarse *in vitro* en diversos tipos celulares como condrocitos, osteocitos y adipocitos, sin inducir tumores, además han demostrado tener capacidad regenerativa de diversos tejidos y se están utilizando en terapia celular tisular. En los últimos años ha aumentado el interés en BM-MSC, puesto que diversos estudios sugerían que estas células podían diferenciarse *in vitro* a cardiomiocitos, sin embargo, la necesidad de utilizar como agente inductor el compuesto teratogénico 5-azacitidina, limita la aplicabilidad clínica de esta estrategia (Laflamme M.A. and Murry M.A. "Regenerating the heart" *Nature Biotechnology*, 2005; 23:845-856.). Por otra parte, existen evidencias que indican que la inyección directa de BM-MSC no estimuladas en el corazón, en ratas y cerdos en estado post-infarto mejora la función ventricular (Ma J. *et al.*, "Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction" *Basic Res Cardiol.* 2005; 100:217-223). Una nueva teoría procedente de los estudios de Gneccchi M *et al.* (Gneccchi M. *et al.* "Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells" *Nature Medicine.* 2005; 11:367-368), implica la secreción de factores citoprotectores paracrinamente derivados de las células troncales mesenquimales, de modo que al adicionar el medio producido al someter estas BM-MSC a condiciones hipóxicas sobre cardiomiocitos ventriculares de rata cultivados en hipoxia, disminuye la apoptosis de estos cardiomiocitos. Estos resultados suponen una teoría de "hipótesis paracrina" de la acción de BM-MSC, implicada en la protección y reparación tisular; en lugar de ser consecuencia de la diferenciación cardiomiogénica de BM-MSC. El aislamiento de estos factores secretados puede ser de gran aplicación terapéutica para prevenir el daño en el tejido isquémico. Obtenemos esta línea de células troncales adultas humanas de la Fundación Inbiomed, San Sebastián, España (www.inbiomed.com), y en concreto de su banco celular de reciente creación Inbiobank (www.inbiobank.org). Las BM-MSC tienen un fenotipo típico CD29+, CD73+, CD105+, CD166+, CD45- y CD31- (Pittenger MF *et al.*, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells" *Science* 1999; 284: 143-147; Javazon EH *et al.*, "Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging", *Exp Hematol* 2004 May; 32(5):414-25). Las BM-MSC se siembran a densidad de 2000 células/cm², cuando alcanzan una confluencia del 90% son subcultivadas de nuevo mediante tripsinización. El medio de cultivo utilizado es Low-Glucose DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal.

- *Células de pulpa dentaria* son las células troncales mesenquimales específicas que se localizan en los tejidos humanos postnatales de pulpa dentaria, y son responsables de la regeneración del complejo dentina-pulpa, el cual se compone de una matriz mineralizada formada por túbulos alineados con odontoblastos, y tejido fibroso que contiene vasos sanguíneos y que constituye la estructura fisiológica de los dientes (Gronthos S, *et al.* "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*" *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Dec 5; 97(25):13625-30.; Gronthos S *et al.* "Stem cell properties of human dental pulp stem cells" *J Dent Res* 2002 Aug; 81(8):531-5). Estas células pueden diferenciarse *in vitro* en odontoblastos, adipocitos y células con morfología neural. La respuesta celular a la hipoxia y reoxigenación en el cerebro y en el corazón, han sido ampliamente investigadas como modelos relevantes a la patogénesis de daño isquémico; por lo que estudiar la respuesta y actividad de las células troncales de pulpa dentaria bajo condiciones de hipoxia (Kim S, Edwall L, Trowbridge H, Chien S. "Effects of local anesthetics on pulpal blood flow in dogs", *J Dent Res.* 1984; 63(5), 650-2; Kim S, *et al.*, "Functional alterations in pulpal microcirculation in response to various dental procedures and materials" *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88, Suppl 1, 65-71) y reoxigenación *in vitro*, con la ventaja de utilizar moduladores de HIF constituiría un modelo relevante para la patogénesis de daño isquémico *in situ*.

Inhibidores de la Angiogénesis

Existen compuestos que protegen a inhibidores que modulan la actividad transcripcional de HIF1 mediante modos de acción diferentes, que afectan a rutas de señalización celular y/o a fenómenos estructurales o epigenéticos, algunos de los cuales según se detallan en la Tabla 1 y pueden encontrarse más ampliamente referenciados y descritos en la reciente revisión sobre angiogénesis de J. Folkman ("Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?" *Nat. Rev Drug Discovery*, 2007, 6, 273-286.).

TABLA 1

Relación de los principales inhibidores de la actividad transcripcional de HIF (ver revisión de J. Folkman "Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?" *Nat. Rev Drug Discovery*, 2007; 6, 273-286,)

Compuesto	Diana farmacológica
BAY 43-9006	RAF Quinasa
CCI-779	mTOR
Celebrex	COX2
ZD-1839 (Iressa)	EGFR tirosina quinasa
2-ME2	Polimerización Microtúbulo
17-AAG	HSP90
FK228	HDAC
SAHA	HDAC

Existen en el estado de la técnica abundantes documentos de patente que describen y reivindican diversos compuestos y las composiciones farmacéuticas que los contienen, que son inhibidores del factor HIF para el tratamiento o prevención de patologías relacionadas con la hipoxia, considerados como inhibidores de la angiogénesis. Entre ellos citaremos los siguientes:

La solicitud de patente WO2007/022412 A2 describe un método de tratamiento de angiogénesis no deseada en el tejido de un sujeto que padece o es susceptible de padecer una enfermedad o desorden angiogénico, mediante el uso de una terapia de combinación que comprende la administración de un inhibidor del factor de transcripción inducible por hipoxia y de un segundo agente antiangiogénico como por ejemplo: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina 1, interleukina 8 (IL-8) o un inhibidor directo de la angiogénesis de angiostatina, trombospondina o tumstatina.

El documento WO 2005/089490 A2 describe y reivindica compuestos y métodos para inhibir la hipoxia inducible por el HIF en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de uno de los compuestos inhibidores de dicha invención. El método para tratar el cáncer que reivindican consiste en la administración de uno de los compuestos conjuntamente con terapia que consiste en radiación o quimioterapia.

La solicitud de patente WO 2006/066775 A1 se refiere al uso de antibióticos de dicetoditiopiperacinas, tales como la cetocina y gliotoxina, para la preparación de medicamentos para el tratamiento de patologías en las que es necesario la inhibición del HIF1 α a p300.

El documento WO 02/36574 A1 se refiere a un derivado de geldanamicina que utilizan para eliminar un cáncer en una célula o tratar un cáncer en un paciente tanto *in vitro* como *in vivo* administrando una cantidad suficiente del derivado de geldanamicina para inhibir el HIF1 α .

El documento US 2006003961 A1 se refiere a la interacción de OS-9 con ambos HIF1 y HIF1 α prolin hidroxilasa. La pérdida de función OS-9 aumenta los niveles de proteína HIF1 α y la transcripción de HIF1 en condiciones no hipóxicas. Estos datos indican que OS-9 es un componente esencial del complejo multiproteínico que regula los niveles de proteína de HIF1 α de una forma dependiente del O₂. También se describen los agentes que modulan dichas complejos, así como los métodos para identificar dichos agentes.

El documento WO 2004/091648 A1 se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para inhibir la expresión de HIF1 y los genes regulados por HIF1, angiogénesis, el crecimiento de tumores o la progresión/metástasis de un

tumor que comprende poner en contacto las células o tejido del tumor con una composición que contenga con derivados del 3(5'hidroximetil 2'fúril) 1-bencil-indazol o uno de sus nuevos derivados. Posteriormente, el mismo solicitante, en el documento WO 2005/030121 A2 describe la inhibición del crecimiento de un tumor *in vivo* utilizando unos compuestos heterocíclicos determinados a excepción del 3(5'hidroximetil 2'fúril) 1-bencil-indazol para inhibir el factor de expresión de la hipoxia inducible en células o tejidos de tumores.

En los documentos WO 2004/087066 A2 y WO 2007/025169 A2, ambos del mismo solicitante, se utilizan composiciones farmacéuticas que comprenden, en el caso del primer documento, compuestos derivados de 2,2-dimetilbenzopirano opcionalmente en combinación con otros agentes citostáticos para el tratamiento o la prevención de patologías relacionadas con la hipoxia inducible por el factor HIF1 y, en el caso del segundo documento, composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de aril-sulfonamidas para el cáncer de pulmón o de vejiga, originados por el mismo mecanismo.

Así, estos y otros documentos de patente divulgan la inhibición de la actividad de HIF e incluso su relación con la modulación de la angiogénesis. Sin embargo, en ningún momento ninguno de estos documentos hace referencia a compuestos que puedan estar relacionados con los compuestos representados por la molécula de fórmula general (I) como inhibidor de la actividad de HIF que es el objeto de la presente invención.

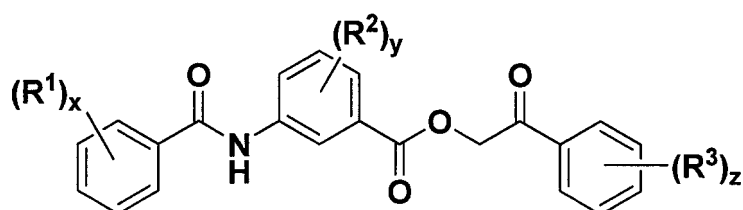
El documento "Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy", (Belozerov Vladimir E. y Van Meir Edwin G., publicada en *Anti-Cancer Drugs*, 16(9): 901-909, 2005) muestra al factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF 1) como modulador del elevado número de acontecimientos moleculares necesarios para la adaptación de las células tumorales a la hipoxia. Es por esto que HIF 1 se convierte en una diana atractiva para el desarrollo de fármacos anticáncer. En esta publicación se mencionan algunas de las pequeñas moléculas inhibidoras de la función HIF1 últimamente desarrolladas. Estas moléculas rompen la ruta de señalización de HIF1 a través de gran variedad de mecanismos, incluyendo la inhibición de la síntesis de la proteína HIF1 α , estabilización, translocación nuclear y transactivación de los genes diana. La publicación divulga la relación entre HIF y los procesos cancerígenos y el uso de moléculas inhibidoras de HIF para el desarrollo de fármacos anticáncer, sin embargo, no menciona ningún compuesto de fórmula general (I).

Se han descrito únicamente dos compuestos cuya estructura cumple la fórmula general (I), en ambos casos sin presentar ninguna actividad biológica. El 3-(2,4-(dinitro)benzamido)benzoato de 2-4-(metoxi)fenil-2-oxoetilo es mencionado como fórmula B1C11 en la página 47 del documento US 2006223812 A1 que se refiere al uso de compuestos capaces de inhibir la formación de agregados de proteínas y de despolimerizar agregados de proteínas para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de condiciones neurodegenerativas como el Alzheimer y el 3-(4-bromo)benzamido benzoato de 2-4-(nitro)fenil-2-oxoetilo que aparece en el documento (Kim, S. Y. *et al.*, "Pharmacophore-based virtual screening: the discovery of novel methionyl-tRNA synthetase inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 4898-4907) que describe la realización de una selección virtual de una base de datos química con 508.143 compuestos para buscar nuevos inhibidores de la metionil-tRNA sintetasa. Ninguno de estos dos compuestos tiene relación con la modulación y/o inhibición de la actividad del HIF.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el diseño de moléculas sintéticas dirigidas al reconocimiento de mecanismos moleculares que posean la capacidad de modular la transcripción de genes de relevancia biológica es considerado como uno de los mayores retos de la biotecnología, en el punto de confluencia entre la química y la biología y de un enorme potencial en la terapéutica. Cada vez más, especialmente en cáncer, la terapia se basa en el uso de composiciones que son mezclas de compuestos activos, con modos de acción diferentes y toxicidades no acumulativas.

Objeto de la invención

Un objeto de la presente invención se refiere a compuestos representados por la fórmula general (I), especialmente el denominado FM19G11, que sean capaces de modular, regular y/o inhibir el factor de transcripción HIF. Tales compuestos son útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el cáncer, la inflamación, las enfermedades autoinmunes y terapia regenerativa.



(I)

Otro objeto de la invención se refiere a un método de síntesis de las moléculas de fórmula general (I) o una sal de las mismas.

Otro objeto de la presente invención son composiciones farmacéuticas conteniendo una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una de las moléculas de fórmula general (I) para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis. Los moduladores y/o inhibidores objeto de la presente invención pueden estar presentes en la misma o en diferente composición farmacéutica.

Descripción detallada de la invención

La selección de compuestos naturales y sintéticos potencialmente activos como agentes terapéuticos ha constituido durante las últimas décadas la manera de obtener moléculas candidatas con actividad farmacológica. Antes del final del siglo XX se empezó a seleccionar estos compuestos basándose en las “bibliotecas combinatorias” (John Nielsen *et al.*, “Synthetic Methods for the Implementation of Encoded Combinatorial Chemistry” *J. Am. Chem. Soc.* 1993; 115, 9812-9813) y ya en el siglo XXI la convergencia de la ciencia farmacéutica y la tecnología de la información está proporcionando oportunidades para la terapia y el tratamiento de enfermedades sin precedente. La informática ha penetrado en todas las esferas del descubrimiento, desarrollo y fabricación de drogas. Las bibliotecas combinatorias o quimiotecas son grandes colecciones de compuestos químicos que se seleccionan para identificar nuevas drogas potenciales siguiendo un procedimiento para identificar moléculas individuales pequeñas de una biblioteca combinatoria con actividad farmacológica (EP 0751950) o la preparación de una fórmula general, por ejemplo, de amidas desarrollada como fármacos inhibidores de proteasa (EP 0950045) o nuevas dianas terapéuticas y su uso para la identificación analgésica y/o antiinflamatoria (ES 2265201 A1). La llegada de la química combinatoria ha revolucionado el proceso de hallar nuevas drogas. La nueva tecnología permite estudiar 50.000-100.000 muestras por día, con lo que se ha revolucionado la información en el mundo de la biología y la medicina (Ashis K. Mukherjee and Anil C. Ghosh. “The challenges in information technology based drug discovery” *Int. J. Inf. Man.* 2002, (IJITM), vol. 1, No. 4, 345- 356).

La selección de una molécula de una base de datos puede llevarse a cabo, por ejemplo, a partir de unos 2 millones de compuestos obtenidos de 15 quimiotecas (Mozziconacci J.C. *et al.*, 9th Electronic Computational Chemistry Conference (ECCC) 03-2003, Internet and World Wide Web). Así, se llevaron a cabo análisis estructurales para valorar la singularidad y diversidad de las bibliotecas. La semejanza de estos compuestos con las drogas se investigó utilizando características químicas comunes tales como la flexibilidad, los tipos de átomos, los grupos funcionales y “la regla de cinco”. En 1997 Lipinski *et al.*, (“Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings”. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997; 23 (1-3), 3-25) describieron un método para medir la absorción o la permeabilidad de un compuesto, denominada la “regla de cinco” (“rule of five”), basada en los cuatro parámetros especificados en la Tabla a continuación:

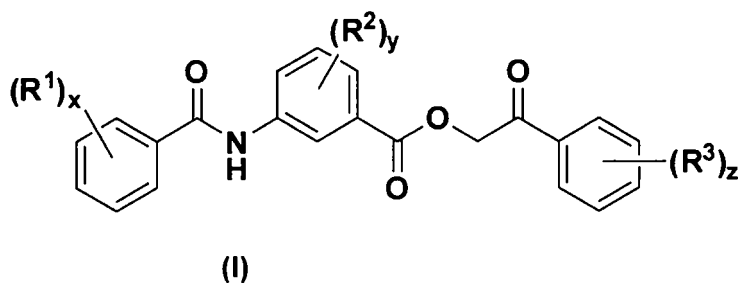
<u>PARAMETROS</u>	<u>VALORES</u> (Para buena absorción o predicción de permeabilidad)
Log P	≤ 5
Donadores HB	≤ 5
Receptores HB	≤ 10
Peso molecular	≤ 500

Concretamente, la molécula activa de fórmula general (I) de la presente invención fue identificada a partir de la deconvolución subsiguiente al cribado masivo de las quimiotecas comerciales siguientes: Key organics, ChemStar; InterbioScreen, Microsource Discovery Systems, Tim Tec, Tripos, Speccs, Sigma-Aldrich, Otava, Saines, ChemBridge, Prestwick Chemical Library de entre las cuales se seleccionaron la Myrianscreen (Sigma-Aldrich) y Prestwick que suponen una buena representación de diversidad estructural y de propiedades de compuestos con potencial de fármaco. Así, los criterios de selección de los compuestos que componen las quimiotecas del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) son criterios propios basados en:

ES 2 325 724 B1

- La diversidad estructural, cobertura del espacio químico basada en la estimación del coeficiente de Tanimoto.
- Regla de 5 de Lepinsky (Rule of 5)
- $\text{clogP} \leq 5$
- Peso Molecular, entre 300 y 900.
- Reactividad. HB donadores y receptores
- Toxicidad no evidente en célula.
- Facilidad de síntesis. Entre 3-10 pasos de síntesis descrita o cuya complejidad estructural suponga- según el criterio de nuestros químicos de síntesis-, un proceso similar.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un compuesto seleccionado de la fórmula general (I):



en la que: R^1 , R^2 y R^3 pueden ser independientemente:

- (i) hidrógeno;
- (ii) un grupo alquilo $-(CH_2)_n-H$, lineal o ramificado, opcionalmente con una insaturación donde $n = 1-10$, preferiblemente metilo o etilo;
- (iii) un ácido carboxílico $-COOH$ o un éster de fórmula $-COOR$, siendo R un grupo alquilo $-(CH_2)_n-H$, lineal o ramificado, opcionalmente con una insaturación, donde $n = 1-10$, preferiblemente metilo o etilo;
- (iv) grupo hidroxilo $-OH$, grupo $-NO_2$;
- (v) halógeno; grupo $-CHa_3$, donde Ha = halógeno, preferiblemente CF_3 ;
- (vi) $-NHCOR$ siendo R un grupo alquilo $-(CH_2)_n-H$, lineal o ramificado, opcionalmente con una insaturación, donde $n = 1-10$, preferiblemente metilo o etilo;

siendo $x, y, z = 1-4$;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a excepción del 3-(2,4-(dinitro)benzamido)benzoato de 2-4-(metoxi)fenil)-2-oxoetilo ($R^1 = 2,4\text{-di-NO}_2$, $R^2 = H$, $R^3 = 4\text{-OMe}$), y el 3-(4-bromo) benzamido) benzoato de 2-4-(nitro)fenil)-2-oxoetilo ($R^1 = 4\text{-Br}$, $R^2 = H$, $R^3 = 4\text{-NO}_2$).

El compuesto seleccionado de entre los comprendidos por la fórmula general (I) como representativo de la invención es el denominado FM19G11 en el que $R^1 = 2,4\text{-di-NO}_2$, $R^2 = H$, y $R^3 = 4\text{-CH}_3$.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" indica una formulación de un compuesto que no provoca irritación significativa en un organismo y no merma la actividad biológica ni las propiedades del compuesto. Las sales farmacéuticas pueden obtenerse por reacción de un compuesto de la invención con ácidos inorgánicos, por ejemplo el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido nítrico, el ácido fosfórico, el ácido metanosulfónico, el ácido etanosulfónico, el ácido p-toluenosulfónico, el ácido salicílico y similares.

La invención también se refiere a un método de síntesis de compuestos comprendidos dentro de la fórmula general (I), que consta generalmente de tres etapas. En la Figura 1 se muestra el resumen de la síntesis de los compuestos cuya obtención se detalla más adelante en los ejemplos.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contengan una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la fórmula (I) y uno o más vehículos o diluyentes y opcionalmente uno o más adyuvantes fisiológicamente aceptables.

En general, es deseable administrar una dosis de cada compuesto de al menos 10 micromolar y, preferentemente de al menos 100 nanomolar, preferiblemente la administración es en el rango de 100 a 500 nanomolar, aunque se pueden utilizar dosis inferiores. La dosis puede ser única y puede ser administrada en forma de polvo o forma sólida. El periodo de administración puede variar pudiendo ser una administración continua o de liberación periódica o continuada durante días, semanas o meses si bien puede ser recomendable en ciertos casos una periodicidad diaria o incluso de varias veces al día.

La dosis efectiva para la administración de la composición farmacéutica (o inhibidores) depende del efecto de los compuestos y de su potencia como inhibidores. El término "dosis efectiva" se refiere a la cantidad suficiente de compuesto activo para producir el efecto deseado en el que la angiogénesis y los síntomas de la enfermedad son atenuados. La dosis no debe ser utilizada en proporciones que causen efectos colaterales indeseados, cuya valoración clínica les haga adversos y no tratables terapéuticamente, como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, fallo cardíaco congestivo, y similares. Generalmente la dosis variará con la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente y podrá ser determinada en cada caso.

La vía de administración del compuesto activo en forma de composición farmacéutica puede ser intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutánea (SC), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP), intratecal, es decir, en el espacio que rodea la médula espinal (IT), intraocular (IO), intrapleural (IPI), intrauterina (IU), rectal, vaginal, tópica, intratumoral, o similares, dependiendo del problema a solucionar y del paciente.

En caso necesario el compuesto de la invención se puede administrar como un profármaco. El término "profármaco" indica un agente que se convierte "*in vivo*" en el fármaco original. En ciertas situaciones, los profármacos pueden ser más fáciles de administrar que el fármaco original. Por ejemplo, el profármaco puede estar biodisponible por administración oral, pero el compuesto original no, o el profármaco puede tener una solubilidad mejor que permita su administración intravenosa.

Los compuestos objeto de la presente invención pueden ser mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables que actúen como diluyentes o vehículos, compatibles con el ingrediente activo, en cantidades adecuadas para ser usadas en metodologías terapéuticamente aceptables. Excipientes adecuados son, por ejemplo aunque no limitados a éstos, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener sustancias como humectantes o emulsionantes, tamponadores de pH y similares que estabilicen o mejoren la efectividad de los ingredientes activos.

Generalmente los compuestos moduladores y/o inhibidores de la invención deben ser formulados en una solución tamponada a un pH entre 5,5 y 7,0, más preferiblemente entre 5,5-6,0 y más preferiblemente ajustado a 5,5. El ajuste del pH puede realizarse por la adición de un ácido apropiado, como el ácido clorhídrico. Además, los "vehículos" acuosos pueden contener más de un tampón salino, así como sales tales como cloruro sódico y potásico, dextrosa, polietilenglicol, y otros solutos. Las composiciones líquidas pueden también contener otras soluciones líquidas además de o en lugar de agua, como por ejemplo, soluciones líquidas de glicerina, aceites vegetales y similares.

Los compuestos de la invención pueden contener sales de los componentes que sean farmacéuticamente aceptables. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales formadas por adición de ácidos (formadas con los grupos amino de la estructura del inhibidor) que son formadas con ácido inorgánicos como por ejemplo clorhídrico o fosfórico o como ácidos orgánicos como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con radicales de grupos carboxílicos pueden ser derivadas desde bases inorgánicas como por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos y de bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

Otro aspecto de la invención es un kit que comprende la composición farmacéutica con uno o más compuestos de la fórmula general (I), un vehículo o diluyente y/o uno o más adyuvantes, que pueden estar juntos o separados en uno o más contenedores dependiendo de la vía de administración de la composición en cada caso.

Los criterios de selección de los compuestos que componen las quimiotecas son criterios propios y basados en la diversidad estructural, la representatividad de farmacóforos, el número de centros quirales, la solubilidad y la facilidad de su síntesis química. La colección del CIPF se seleccionó a través del ensayo de los elementos de respuesta de HIF (HRE) (Ejemplo 1) seleccionándose los compuestos activos por su potencia frente a la inhibición de la actividad y por su selectividad frente a los ensayos celulares basados en los elementos de respuesta de dos factores de transcripción diferentes, Jun B (CRE) y c-Fos (TRE), (Ejemplo 2). La selección del mejor inhibidor obtenido según estos criterios de potencia y selectividad se identificó como FM19G11, lo que implicó la necesidad de la obtención de cantidad suficiente de dicho compuesto activo. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método de obtención por síntesis química del compuesto FM19G11 (Figura 1). También se presentan métodos de obtención por síntesis química de intermedios así como de análogos estructurales del compuesto FM19G11. Estos análogos son comparados en estudios de Relación de Estructura vs. Actividad (SAR) (Ejemplos 3-31).

El trabajo desarrollado muestra cómo los compuestos de la invención inhiben la transcripción de genes diana de HIF, como la prolil-hidrolasa 3 (PHD 3), el propio HIF en su regulación autocrina y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en un modelo de célula tumoral (Ejemplo 32). Esta actividad inhibitoria también es mostrada sobre modelos de célula progenitora neural (Ejemplo 33) así como sobre cultivo primario de progenitores neurales de origen ependimario de médula espinal adulta (epNSC) (Ejemplos 34 y 35) y, finalmente, sobre un modelo de célula mesenquimal de pulpa dentaria (Ejemplo 36).

La presente invención demuestra la baja toxicidad celular de FM19G11 frente a un panel de líneas celulares de mamíferos con representación de diferentes tejidos (Ejemplo 37) así como frente a organismos vertebrados completos en modelos embrionarios de peces (Ejemplo 38).

La invención caracteriza a FM19G11 mediante HPLC calculando su tiempo de retención (Ejemplo 39), sirviendo este método analítico para establecer la estabilidad de FM19G11 en suero bovino (Ejemplo 40).

Todas estas características presentan a los compuestos de la invención como posibles moduladores y/o inhibidores de procesos patológicos de angiogénesis, inflamación, apoptosis y terapia celular.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan aquí sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

Ejemplo 1

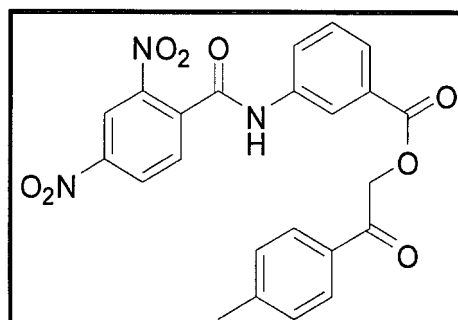
Ensayo de HIF 1 y selección del compuesto FM19G11

Para identificar inhibidores directos de la actividad de HIF primero se construyó una línea recombinante estable, a partir de la línea tumoral de cervix, conocida en la literatura científica como HeLa, que contuviera las secuencias de ácido desoxiribonucleico (ADN) de la región localizada entre las posiciones -985 y -951 del factor de crecimiento del endotelio vascular humano (hVEGF), repetidas nueve veces (9X) y fusionadas al gen reportero luciferasa (LUC). Este plásmido, cedido por el Dr. Manuel Ortiz de Landazuri del Hospital de La Princesa de Madrid, llamado 9XHRE-LUC, se preparó usando un kit comercial (Endofree Maxi-Prep; Qiagen, Inc., Valencia, CA). Las transfecciones se realizaron con FuGene6 (Roche, cat. 1814443) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, la relación $\mu\text{g DNA} : \mu\text{g FuGene}$, ha sido 1:3. Las líneas celulares transfectadas se generaron por cotransfección con el vector pCMV-Hygrom que expresa un gen de resistencia a Hygromicina en células de mamífero permitiendo la selección de los clones transfectados. A las 48 horas se sustituyó el medio de crecimiento por medio fresco conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de Hygromicina (Sigma), se recogieron los clones resistentes al antibiótico y se analizaron mediante RT-PCR para seleccionar el clon con la construcción deseada. Rutinariamente la líneas celular HeLa 9XHRE-LUC se mantuvo en crecimiento exponencial mediante la realización de subcultivos en DMEM (Invitrogen-Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA), suplementado con 10% Suero Bovino Fetal inactivado (Whittaker Bioproducts), penicilina (50 IU/ml), estreptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$) (Invitrogen-Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Las células se cultivaron a 37°C con una atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO₂ y 300 nM de Desferoxamina (DFX; Sigma St. Louis, MO).

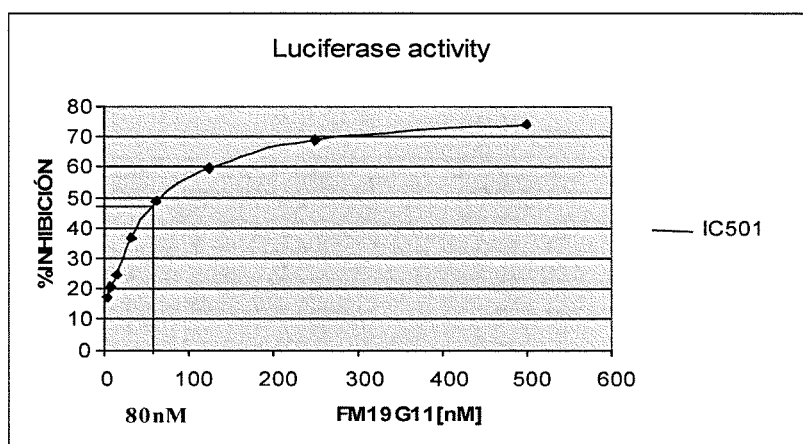
Los compuestos de la Colección del CIPF, procedente de una selección de colecciones comerciales de Sigma-Aldrich, fueron solubilizados en DMSO a una concentración final de 5 mM y conservados a -80°C. La concentración de estos compuestos en el ensayo de luciferasa fue de 1 mM final en el pocillo de la placa multipocillo donde se llevó a cabo la reacción. Los ensayos de luciferasa se realizaron en placas blancas de 96 pocillos (*Valtecknova ref. 3917*) usando el kit Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Inc., Madison, WI) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Entre los 12.250 compuestos analizados se seleccionó el compuesto FM19G11 que presentó una IC₅₀ de 80 nM en condiciones de hipoxia química (300 nM DFX), actividad que fue posteriormente corroborada en condiciones de hipoxia física (1% de O₂) en una cámara de hipoxia (IN VIVO₂ 400 RUSKINN).

El panel A de la siguiente figura muestra la estructura química de FM19G11 así como en el panel B se puede observar la curva de dosis respuesta con FM19G11 con la correspondiente IC₅₀ obtenida de 80 nM. El panel C muestra la relación de inhibición de la actividad de HIF1 α por FM19G11 expresada en Unidades Relativas de Luciferasa (RLU) en condiciones de hipoxia (1% O₂) y Normoxia (20% O₂).

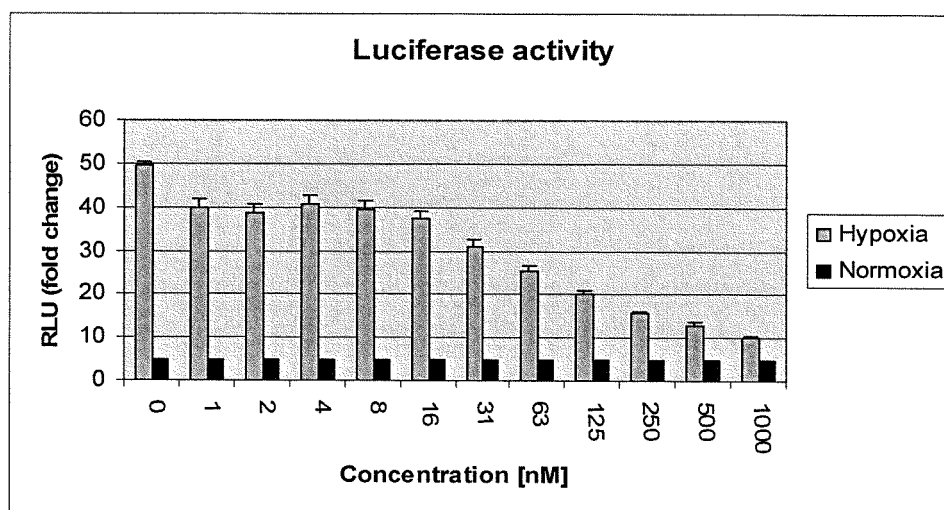
A



B



C

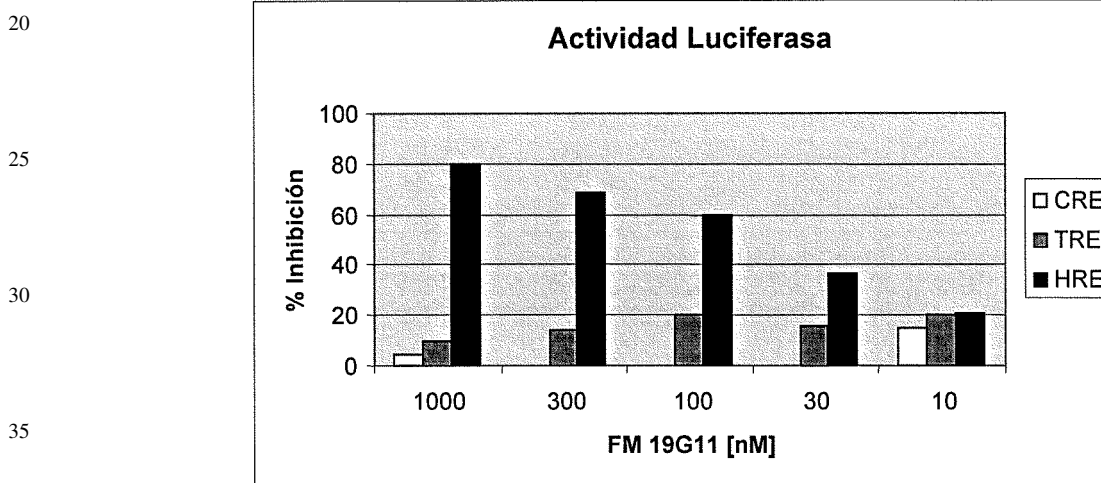


Ejemplo 2

Estudios de selectividad de FM19G11

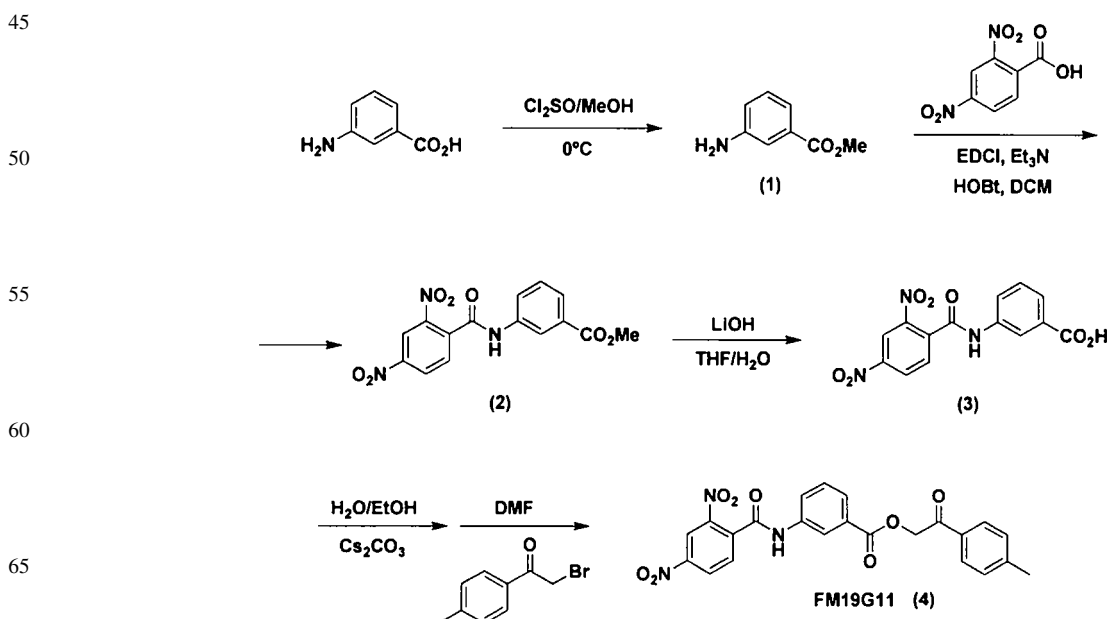
Los ensayos de selectividad con el compuesto activo FM19G11 se realizaron en placas blancas de 96 pocillos utilizando las cepas recombinantes Hek 293-TRE-LUC y Hek 293-CRE-LUC que representan la actividad transcripcional de factores de transcripción del complejo AP-1. El ensayo de luciferasa para medir actividad transcripcional, se realizó usando el kit Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Inc., Madison, WI), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante y las líneas Hek 293-TRE-LUC y Hek 293-CRE-LUC contienen los elementos de respuesta de factores de transcripción del complejo AP-1, en concreto de c-FOS y JUNB, respectivamente. Las líneas Hek 293-TRE-LUC y Hek 293-CRE-LUC fueron cedidas por la Dra. Rosa Farrás.

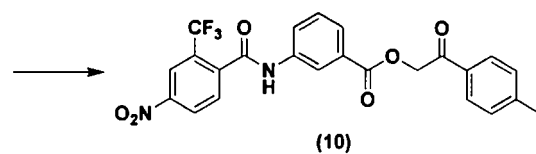
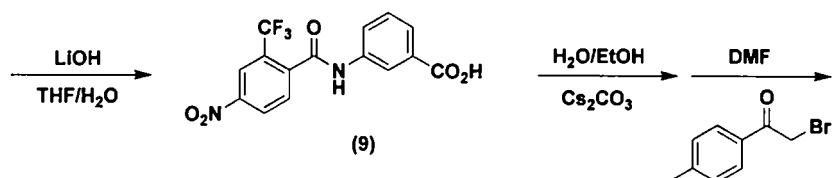
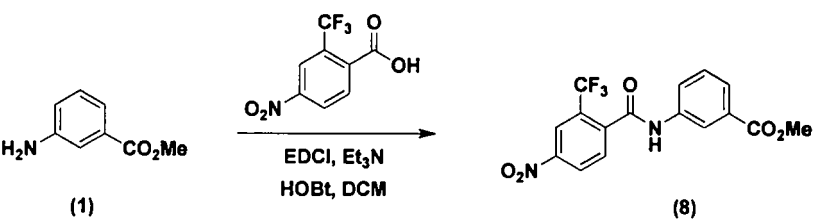
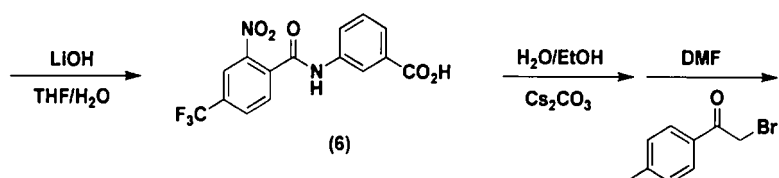
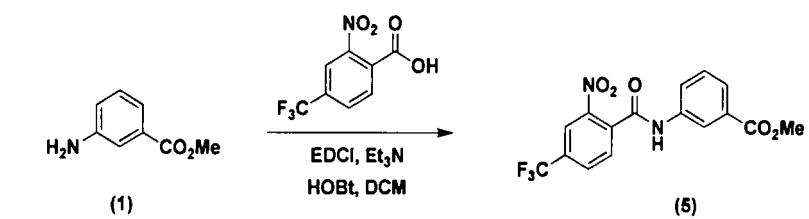
La figura siguiente muestra la actividad selectiva de FM19G11 por inhibición de la expresión de luciferasa observada en los ensayos realizados frente a las tres líneas celulares. La línea HeLa 9XHRE-LUC (barras negras) presenta una inhibición dosis dependiente de la concentración del inhibidor mientras que Hek 293-TRE-LUC (barras grises) y Hek 293-CRE-LUC (barras blancas) no ven afectadas en ningún caso, en las condiciones experimentales realizadas, sus niveles transcripcionales medidos por la emisión luminiscente del gen reportero LUC.

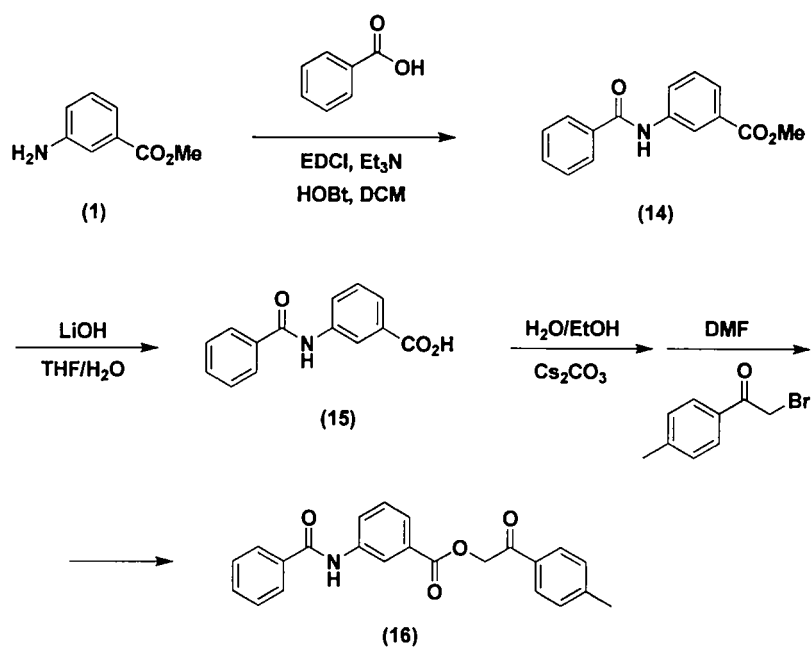
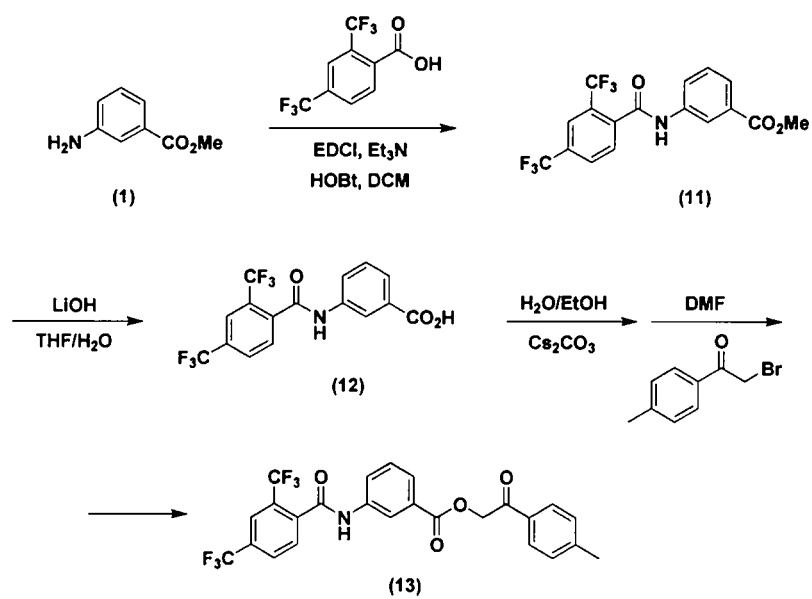


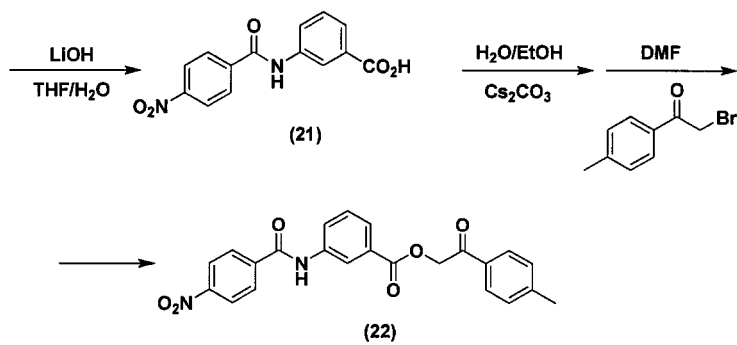
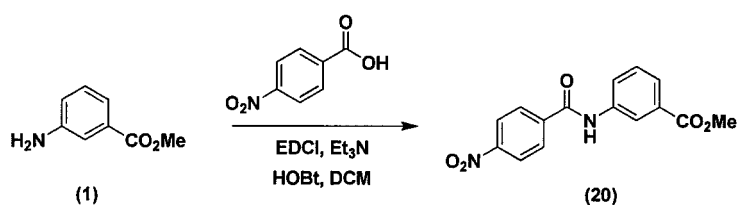
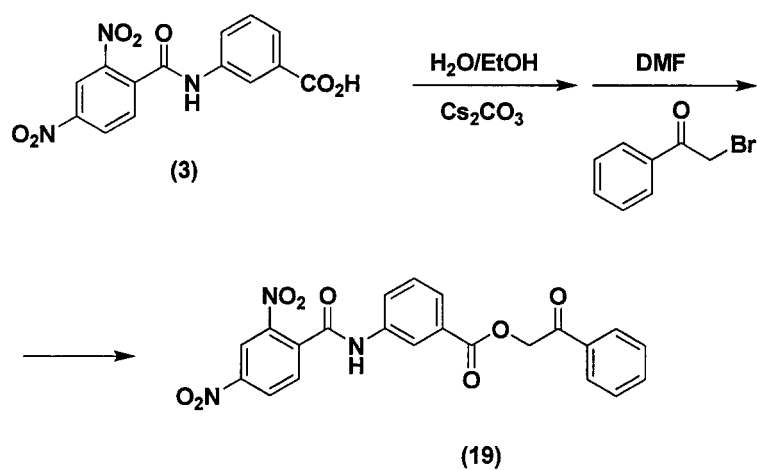
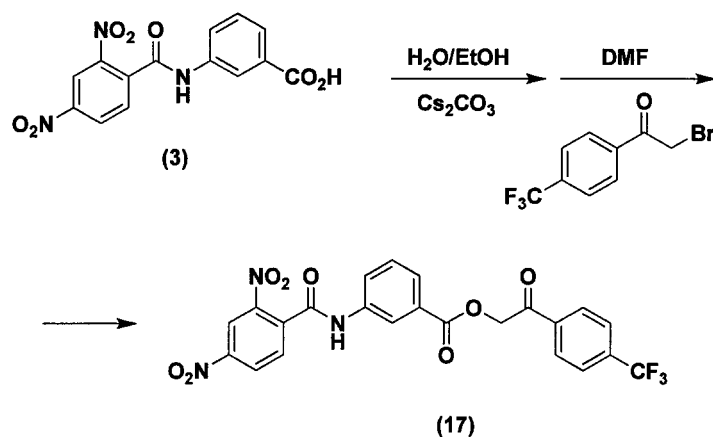
En la Figura 1 se resume la preparación de los compuestos de la invención.

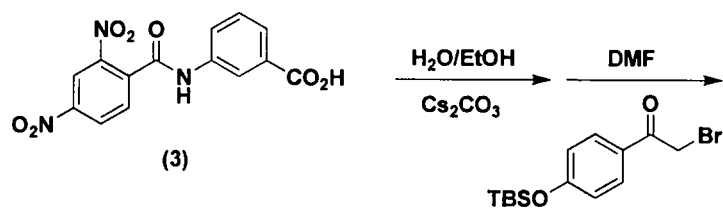
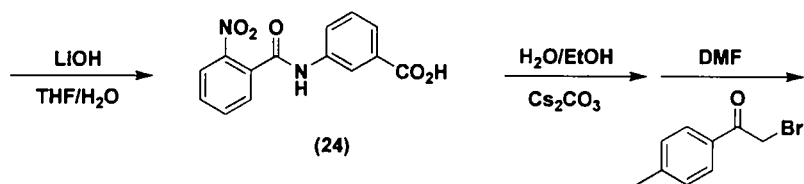
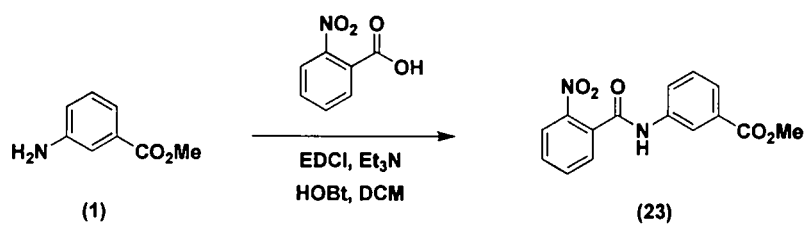
Figura 1

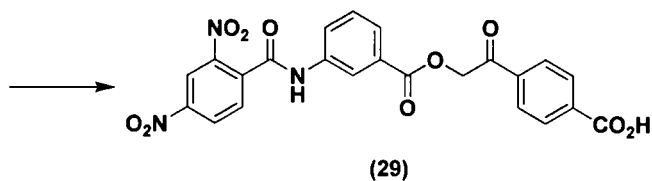
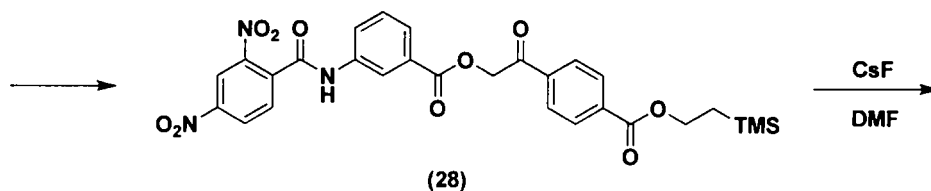
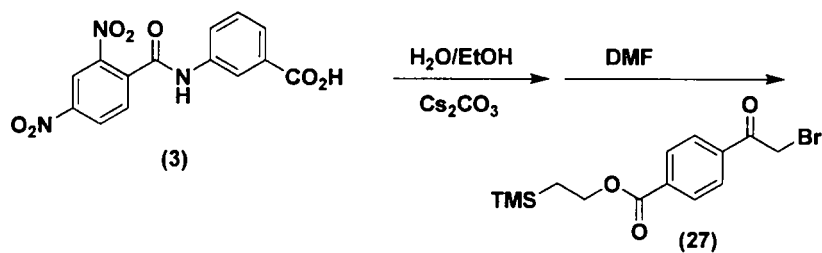
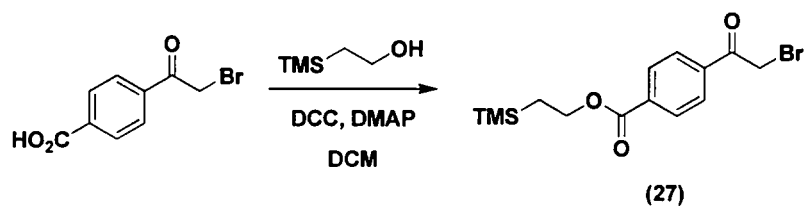




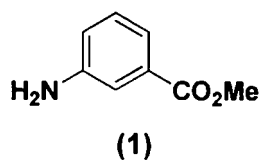








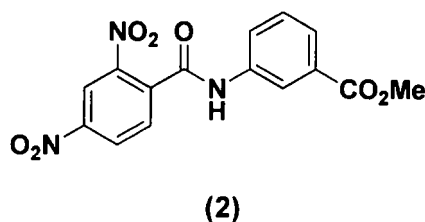
Ejemplo 3

Síntesis de 3-aminobenzoato de metilo

A una disolución del ácido 3-aminobenzoico (0.3 g, 2.18 mmol) en MeOH seco (3.26 mL) a 0°C se añadió lentamente cloruro de tionilo (0.37 mL, 3.27 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se utilizó en las siguientes fases sin purificación (rendimiento: 90%).

Ejemplo 4

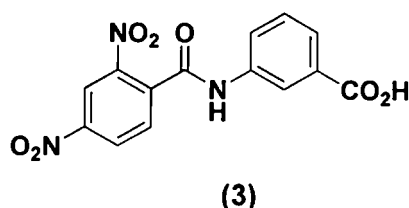
Síntesis de 3-((2,4-dinitro)benzamido)benzoato de metilo



A una disolución del ácido 2,4-dinitrobenzoico (0.17 g, 0.82 mmol) en CH_2Cl_2 seco (4 mL) se añadió 1 (0.11 g, 0.82 mmol), EDCI (0.23 g, 1.24 mmol), HOBt (0.25 g, 1.65 mmol) y Et_3N (0.23 mL, 1.65 mmol). Después de agitar durante 3 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl . El crudo se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (2:1) como eluyente (rendimiento: 61%). mp: 140-143°C. ^1H NMR (300 MHz, CD_3COCD_3) δ 3.94 (s, 3H), 7.59 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.86 (dt, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 8.02 (dc, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.45 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.76 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, 1H), 8.94 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 10.2 (s ancho, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3COCD_3) δ 51.6, 119.8, 120.5, 124.1, 125.2, 128.3, 129.2, 130.9, 137.5, 138.8, 147.0, 148.6, 162.7, 166.0. HRMS (EI) calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_7$ (M^+): 345.0597, experimental: 345.0570.

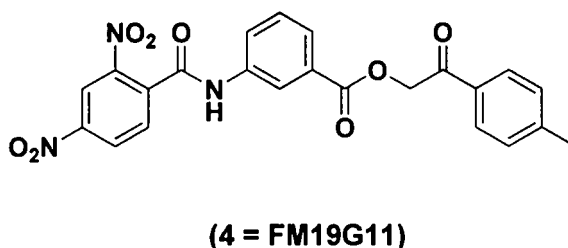
Ejemplo 5

Síntesis del ácido 3-((2,4-dinitro)benzamido)benzoico



A una disolución de 2 (0.1 g, 0.28 mmol) en $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ 4:1 (15 mL) se añadió $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.036 g, 0.86 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se hidrolizó con HCl 1M. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se empleó sin purificación posterior (rendimiento: 99%). mp: 260-263°C. ^1H NMR (300 MHz, CD_3COCD_3) δ 2.90 (s ancho, 1H), 7.58 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.90 (dt, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.1$ Hz, 1H), 8.0 (dt, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 8.2 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.4 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.7 (dd, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H), 8.9 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 10.2 (s ancho, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 121.5, 122.7, 125.8, 127.2, 130.1, 130.8, 132.5, 133.1, 139.3, 140.5, 148.7, 150.2, 164.4, 168.0. HRMS (EI) calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_7$ (M^+): 331.0440, experimental: 331.0430.

Ejemplo 6

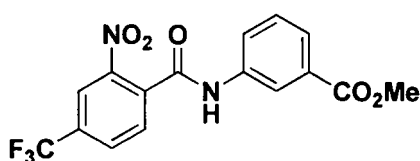
Síntesis de 3-((2,4-dinitro)benzamido)benzoato de 2-oxo-2-(*p*-tolil)etilo

ES 2 325 724 B1

A una disolución del ácido 3 (0.2 g, 0.6 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (6 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (3.2 mL), y se añadió bromometil-*p*-tolilcetona (0.141 g, 0.66 mmol). Después de agitar durante 3 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (3:1) como eluyente (rendimiento: 54%). mp: 168-170°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.37 (s, 3H), 5.41 (s, 2H), 7.18-7.25 (m, 3H), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.69 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 8.30 (dd, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.95 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 21.9, 66.4, 120.0, 121.3, 125.2, 126.6, 127.8, 128.2, 129.4, 129.7, 130.6, 131.1, 137.3, 137.4, 145.7, 146.3, 148.1, 162.6, 165.3, 173.9, 192.8. HMRS (EI) calculada para C₂₃H₁₇N₃O₈ (M⁺): 463.1015, experimental: 463.0999.

Ejemplo 7

Síntesis de 3-(2-nitro-4-(trifluorometil)benzamido)benzoato de metilo

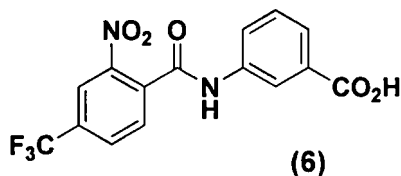


(5)

A una disolución del ácido 2-nitro-4-(trifluorometil)benzoico (0.14 g, 0.62 mmol) en CH₂Cl₂ seco (3 mL) se añadió 1 (0.08 g, 0.62 mmol), EDCI (0.17 g, 0.93 mmol), HOBt (0.19 g, 1.24 mmol) y Et₃N (0.17 mL, 1.24 mmol). Después de agitar durante 16 h la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 90%). mp: 133-136°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.75 (s, 3H), 7.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.66 (s, 1 H), 7.69 (s, 1 H), 7.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.81 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.46 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 52.6, 121.5, 122.0 (c, ³*J*_{CF} = 3.7 Hz), 122.5 (c, ¹*J*_{CF} = 275.4 Hz), 125.3, 126.5, 129.5, 130.0, 130.8 (c, ³*J*_{CF} = 3.2 Hz), 131.0, 133.4 (c, ²*J*_{CF} = 34.8 Hz), 135.4, 137.5, 146.4, 163.9, 167.0. ¹⁹F RMN (282.4 MHz, CDCl₃) δ -63.1 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₁₆H₁₁F₃N₂O₅ (M⁺): 368.0620, experimental: 368.0620.

Ejemplo 8

Síntesis del ácido 3-(2-nitro-4-(trifluorometil)benzamido)benzoico

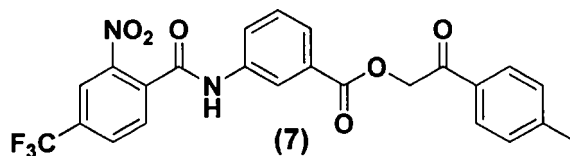


(6)

A una disolución de 5 (0.1 g, 0.33 mmol) en THF:H₂O 4:1 (20 mL) se añadió LiOH·H₂O (0.56 g, 1.6 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se hidrolizó con HCl 1M. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se empleó sin purificación posterior (rendimiento: 83%). mp: 264-267°C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ 7.40 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.71 (dt, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz, 1H), 7.88 (dc, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.1 Hz), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.14 (dd, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 0.9 Hz, 1H), 8.30 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 9.97 (s ancho, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 121.8, 122.5 (c, ³*J*_{CF} = 4.1 Hz), 124.9, 126.3, 123.8 (c, ¹*J*_{CF} = 272.7 Hz), 130.0, 131.5, 132.3, 133.0 (c, ²*J*_{CF} = 35.3 Hz), 136.9, 139.7, 148.0, 163.9, 167.2. ¹⁹F RMN (282.4 MHz, CD₃COCD₃) δ -111.6 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₁₅H₉F₃N₂O₅ (M⁺): 354.0463, experimental: 354.0473.

Ejemplo 9

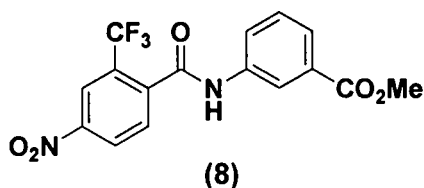
Síntesis de 3-(2-nitro-4-(trifluorometil)benzamido)benzoato de 2-oxo-2-(p-tolil)etilo



A una disolución del ácido 6 (0.06 g, 0.2 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (2 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (1.0 mL), y se añadió bromometil-*p*-tolilcetona (0.03 g, 0.18 mmol). Después de agitar durante 4 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 32%). mp: 179-181°C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ 2.29 (s, 3H), 5.58 (s, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.77 (dt, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.91 (dc, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 1.1 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.37 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H), 10.04 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 20.2, 66.2, 120.2, 122.4 (c, ¹*J*_{CF} = 272.1 Hz), 121.1 (c, ³*J*_{CF} = 3.9 Hz), 123.9, 124.9, 127.3, 128.8, 128.9, 130.1, 130.2, 131.3, 131.5, 135.6, 138.5, 144.2, 146.6, 162.7, 164.7, 191.0. ¹⁹F NMR (282.4 MHz, CD₃COCD₃) δ -63.06 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₂₄H₁₇F₃N₂O₆ (M⁺): 486.1038, experimental: 486.1033.

Ejemplo 10

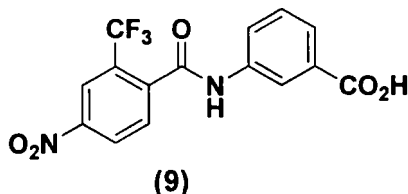
Síntesis de 3-(4-nitro-2-(trifluorometil)benzamido)benzoato de metilo



A una disolución del ácido 4-nitro-2-(trifluorometil)benzoico (0.17 g, 0.74 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2 mL) se añadió 1 (0.1 g, 0.74 mmol), EDCI (0.21 g, 1.11 mmol), HOBt (0.22 g, 1.48 mmol) y Et₃N (0.20 mL, 1.48 mmol). Después de agitar durante 16 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (5:1) como eluyente (rendimiento: 69%). mp: 102-104°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.74 (s, 3H), 7.27 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.63-7.72 (m, 3H), 7.96 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.21 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.80 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 52.5, 121.4, 122.3 (c, ³*J*_{CF} = 4.9 Hz), 122.5 (c, ¹*J*_{CF} = 273.6 Hz), 125.1, 126.6, 127.1, 129.3 (c, ²*J*_{CF} = 25.1 Hz), 129.5, 130.3, 131.2, 137.4, 140.8, 148.3, 164.1, 166.8. ¹⁹F RMN (282.4 MHz, CDCl₃) δ -59.6 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₁₆H₁₁F₃N₂O₅ (M⁺): 368.0620, experimental: 368.0618.

Ejemplo 11

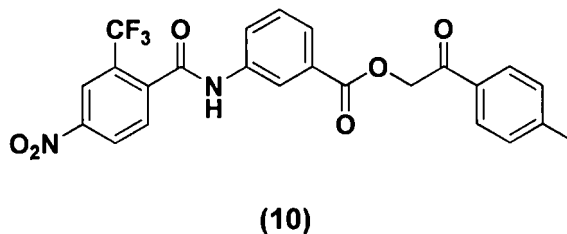
Síntesis del ácido 3-(4-nitro-2-(trifluorometil)benzamido)benzoico



A una disolución de 8 (0.08 g, 0.23 mmol) en THF:H₂O 4:1 (13 mL) se añadió LiOH·H₂O (0.039 g, 0.94 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se hidrolizó con HCl 1M. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se empleó sin purificación posterior (rendimiento: 99%). mp: 250-255°C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.72 (dt, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz, 1H), 7.89 (dc, *J*₁ = 9.0 Hz, *J*₂ = 1.1 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.32 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.47-8.52 (m, 2H), 9.96 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 122.6, 123.4 (c, ³*J*_{CF} = 5.3 Hz), 125.8, 127.1, 129.0, 130.0 (c, ²*J*_{CF} = 32.9 Hz), 130.7, 132.2, 133.1, 140.5, 143.1, 149.9, 165.6, 168.1. ¹⁹F RMN (282.4 MHz, CDCl₃) δ -59.3 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₁₅H₉F₃N₂O₅ (M⁺): 354.0463, experimental: 354.0475.

Ejemplo 12

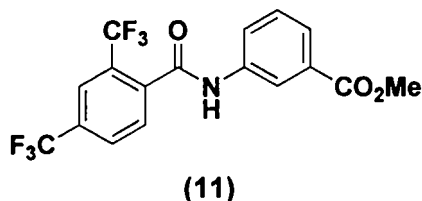
Síntesis de 3-(4-nitro-2-(trifluorometil)benzamido)benzoato de 2-oxo-2-(p-tolil)etilo



A una disolución del ácido 9 (0.07 g, 0.2 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (2 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (1.0 mL), y se añadió bromometil-*p*-tolilcetona (0.04 g, 0.20 mmol). Después de agitar durante 48 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 28%). mp: 165-166°C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ 2.28 (s, 3H), 5.59 (s, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.45 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.93 (dd, *J*₁ = 7.2 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.39 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.48 (s ancho, 1H), 8.50-8.53 (m, 1H), 10.0 (s ancho, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 20.2, 66.3, 120.3, 121.4 (c, ³*J*_{CF} = 4.6 Hz), 123.9, 125.0, 126.9, 127.3, 128.0 (c, ³*J*_{CF} = 6.3 Hz), 128.8, 128.9, 129.5 (c, ¹*J*_{CF} = 285.8 Hz), 130.0, 130.2, 138.4, 140.8, 144.1, 147.9, 163.5, 164.6, 190.9. ¹⁹F NMR (282.4 MHz, CDCl₃) δ -59.60 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₂₄H₁₇F₃N₂O₆ (M⁺): 486.1039, experimental: 486.1026.

Ejemplo 13

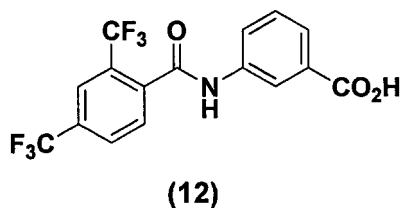
Síntesis de 3-(2,4-bis-(trifluorometil)benzamido)benzoato de metilo



A una disolución del ácido 2,4-bis-(trifluorometil)benzoico (0.32 g, 1.25 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) se añadió 1 (0.16 g, 1.25 mmol), EDCI (0.35 g, 1.87 mmol), HOBt (0.38 g, 2.50 mmol) y Et₃N (0.34 mL, 2.50 mmol). Después de agitar durante 16 h la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (3:1) como eluyente (rendimiento: 50%). mp: 130-132°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.82 (s, 3H), 7.41 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.61 (s ancho, 1H), 7.73-7.81 (m, 2H), 7.85-7.94 (m, 3H), 8.02 (s ancho, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 52.5, 121.2 (c, ³*J*_{CF} = 5.1 Hz), 121.4, 124.0, 124.8, 125.1, 126.5, 128.6 (c, ²*J*_{CF} = 34.5 Hz), 129.3, 129.6, 131.2, 132.8 (c, ²*J*_{CF} = 32.1 Hz), 137.6, 138.8. ¹⁹F RMN (282.4 MHz, CDCl₃) δ -59.2 (s, 3F), -63.1 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₁₇H₁₁F₆NO₃ (M⁺): 391.0643, experimental: 391.0645.

Ejemplo 14

Síntesis del ácido 3-(2,4-bis-(trifluorometil)benzamido)benzoico

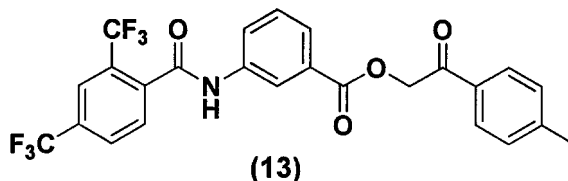


ES 2 325 724 B1

A una disolución de 11 (0.2 g, 0.51 mmol) en THF:H₂O 4:1 (29 ml) se añadió LiOH·H₂O (0.085 g, 2.04 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se hidrolizó con HCl 1M. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se empleó sin purificación posterior (rendimiento: 97%). mp: 238-241°C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.72 (dt, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.2 Hz, 1H), 7.90 (dc, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 0.9 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.04 (m, 2H), 8.33 (t, *J* = 1.7, 1H), 9.84 (s ancho, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 120.4, 123.0, 123.5, 124.9, 127.4 (c, ²*J*_{CF} = 31.9 Hz), 128.6, 129.0, 129.3, 130.8, 130.9 (c, ²*J*_{CF} = 33.5 Hz), 138.4, 139.2, 163.9, 165.9. ¹⁹F RMN (282.4 MHz, CDCl₃) δ -59.2 (s, 3F), -63.1 (s, 3F).

Ejemplo 15

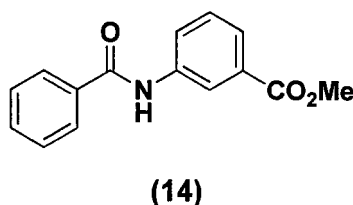
Síntesis de 3-(2,4-bis(trifluorometil)benzamido)benzoato de 2-oxo-2-(*p*-tolil)etilo



A una disolución del ácido 12 (0.07 g, 0.2 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (2 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (1.0 mL), y se añadió bromometil-*p*-tolilcetona (0.04 g, 0.20 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (3:1) como eluyente (rendimiento: 31%). mp: 161-163°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.36 (s, 3H), 5.46 (s, 2H), 7.20-7.23 (m, 2H), 7.38 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.77-7.85 (m, 4H), 7.89-7.94 (m, 2H), 8.11 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 21.8, 66.5, 121.3, 123.7, 125.1, 126.6, 127.8, 128.1, 128.9 (c, ²*J*_{CF} = 40.7 Hz), 129.4, 129.5, 129.6, 130.2, 131.4, 137.4, 138.7, 142.5, 145.1, 164.3, 165.4, 191.8. ¹⁹F NMR (282.4 MHz, CDCl₃) δ -59.2 (s, 3F), -63.1 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₂₅H₁₇F₆NO₄ (M⁺): 509.1061, experimental: 509.1062.

Ejemplo 16

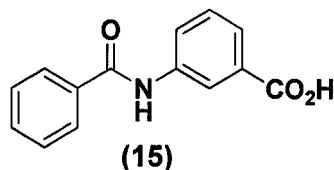
Síntesis de 3-(benzamido)benzoato de metilo



A una disolución del ácido benzoico (0.4 g, 3.6 mmol) en CH₂Cl₂ seco (8 mL) se añadió 1 (0.2 g, 1.8 mmol), EDCI (0.5 g, 2.7 mmol), HOBt (0.5 g, 3.7 mmol) y Et₃N (0.5 mL, 3.7 mmol). Después de agitar durante 16 h la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. El crudo se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (5:1) como eluyente (rendimiento: 20%).

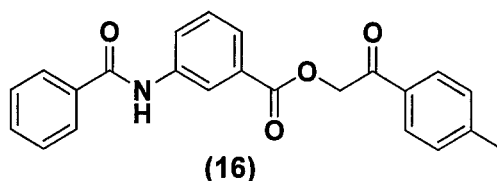
Ejemplo 17

Síntesis del ácido 3-(benzamido)benzoico



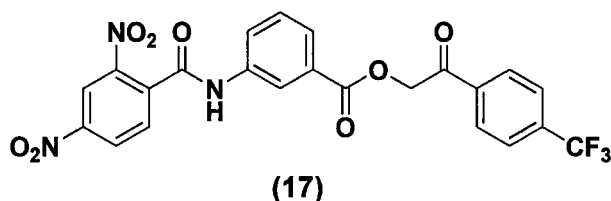
A una disolución de 14 (0.05 g, 0.2 mmol) en THF:H₂O 4:1 (14 ml) se añadió LiOH·H₂O (0.03 g, 0.8 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se hidrolizó con HCl 1M. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se empleó sin purificación posterior (rendimiento: 90%).

Ejemplo 18

Síntesis de 3-(benzamido)benzoato de 2-oxo-2-(p-tolil)etilo

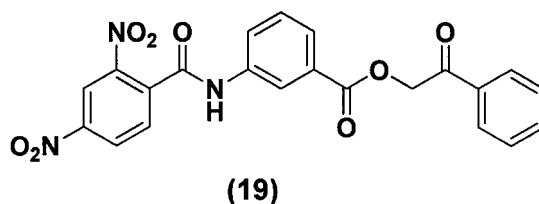
A una disolución del ácido 15 (0.04 g, 0.2 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (2 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (1.0 mL), y se añadió bromometil-*p*-tolilcetona (0.04 g, 0.2 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (3:1) como eluyente (rendimiento: 52%). mp: 158-160°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.40 (s, 3H), 5.51 (s, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.41-7.55 (m, 4H); 7.81 (s, 1H); 7.84-7.88 (m, 4H); 8.02 (s, 1H); 8.11-8.14 (m, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 22.1, 66.9, 121.6, 125.5, 126.2, 127.4, 128.2, 129.1, 129.6, 129.9, 132.0, 132.3, 134.9, 138.6, 145.3, 165.9, 166.2, 192.1. HRMS (EI) calculada para C₂₃H₁₉NO₄ (M⁺): 373.1314, experimental: 373.1299.

Ejemplo 19

Síntesis de 3-(2,4-(dinitro)benzamido)benzoato de 2-oxo-2-(4-trifluorometil)etilo

A una disolución del ácido 3 (0.2 g, 0.6 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (2 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (1.0 mL), y se añadió bromuro de 4-(trifluorometil)fenacilo (0.06 g, 0.2 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (1:1) como eluyente (rendimiento: 34%). mp: 198-200°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.53 (s, 2H), 7.41-7.47 (m, 1H), 7.74 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 7.85-7.93 (m, 3H), 8.01 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.10-8.18 (m, 2H), 8.50 (dd, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 2.7 Hz, 1H), 8.87 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 67.9, 120.8, 121.8, 125.5, 126.5, 126.8 (c, ¹*J*_{CF} = 3.5 Hz), 129.3, 129.5, 130.3, 131.3, 131.8, 135.0 (c, ²*J*_{CF} = 32.4 Hz), 138.4, 139.9, 147.9, 149.5, 163.7, 166.0, 192.6. ¹⁹F RMN (282.4 MHz, CDCl₃) δ -63.30 (s, 3F). HRMS (EI) calculada para C₂₃H₁₄F₃N₃O₈ (M⁺): 517.0733, experimental: 517.0759.

Ejemplo 20

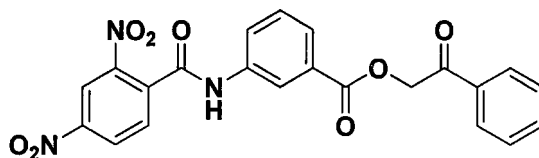
Síntesis de 3-(2,4-(dinitro)benzamido)benzoato de 2-fenil-2-oxoetilo

A una disolución del ácido 3 (0.1 g, 0.3 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (4 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (2 mL), y se añadió 2-bromoacetofenona (0.07 g, 0.35 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (2:1) como eluyente

(rendimiento: 63%). mp: 124-126°C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.41 (s, 2H), 7.25 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.57 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.72 (m, 4H), 7.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.86 (s ancho, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 61.0, 66.9, 120.2, 121.5, 125.5, 126.7, 128.1, 128.6, 129.4, 129.7, 129.9, 131.0, 133.8, 134.9, 137.6, 137.7, 146.5, 148.3, 163.2, 165.8, 193.8. HRMS (EI) calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_8$ (M^+): 449.0859, experimental: 449.0871.

Ejemplo 21

Síntesis de 3-(4-nitrobenzamido)benzoato de metilo

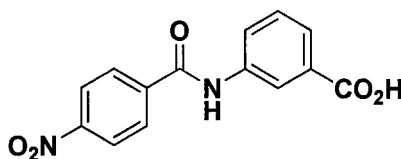


(20)

A una disolución del ácido 4-nitrobenzoico (0.33 g, 2.0 mmol) en CH_2Cl_2 seco (9 mL) se añadió 1 (0.27 g, 2.0 mmol), EDCI (0.57 g, 3.0 mmol), HOBT (0.61 g, 4.0 mmol) y Et_3N (0.55 mL, 4.0 mmol). Después de agitar durante 16 h la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl . El crudo se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 37%).

Ejemplo 22

Síntesis del ácido 3-(4-nitrobenzamido)benzoico

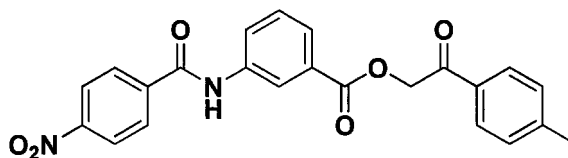


(21)

A una disolución de 20 (0.16 g, 0.55 mmol) en $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ 4:1 (12 mL) se añadió $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.092 g, 2.19 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se hidrolizó con HCl 1M. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se empleó sin purificación posterior (rendimiento: 80%).

Ejemplo 23

Síntesis de 3-(4-nitrobenzamido)benzoato de 2-oxo-2-(p-tolil)etilo

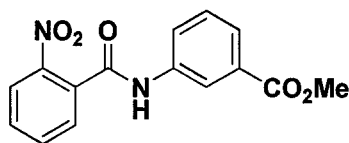


(22)

A una disolución del ácido 21 (0.1 g, 0.3 mmol) en $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 1:1 (2 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs_2CO_3 hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (1.0 mL), y se añadió bromometil-p-tolilcetona (0.7 g, 0.35 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl . El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 31%). mp: 172-173°C. ^1H NMR (300 MHz, CD_3COCD_3) δ 2.29 (s, 3H), 5.58 (s, 2H), 7.25 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 8.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.24 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.42 (s ancho, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3COCD_3) δ 22.4, 68.4, 122.9, 125.2, 126.5, 126.9, 129.5, 130.6, 130.7, 131.1, 132.1, 133.6, 141.1, 142.2, 146.3, 151.5, 165.6, 166.9, 193.1. HRMS (EI) calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+): 418.1179, experimental: 418.1164.

Ejemplo 24

Síntesis de 3-(2-nitrobenzamido)benzoato de metilo

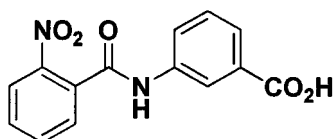


(23)

A una disolución del ácido 2-nitrobenzoico (0.33 g, 2.0 mmol) en CH_2Cl_2 seco (9 mL) se añadió 1 (0.27 g, 2.0 mmol), EDCI (0.57 g, 3.0 mmol), HOBt (0.61 g, 4.0 mmol) y Et_3N (0.55 mL, 4.0 mmol). Después de agitar durante 16 h la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl . El crudo se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 25%). mp: 175-176°C. ^1H NMR (300 MHz, CD_3COCD_3) δ 3.90 (s, 3H), 7.53 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.77-7.85 (m, 2H), 7.87-7.93 (m, 2H), 8.02 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.45 (s ancho, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3COCD_3) δ 53.6, 122.2, 125.6, 125.9, 126.5, 130.7, 130.7, 132.6, 134.5, 135.4, 141.1, 148.6, 166.1, 167.7. HRMS (EI) calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ (M^+): 300.0746, experimental: 300.0754.

Ejemplo 25

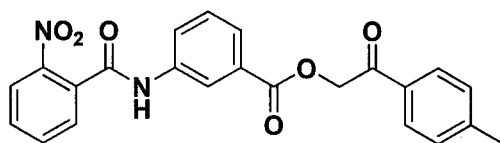
Síntesis del ácido 3-(2-nitrobenzamido)benzoico



(24)

A una disolución de 23 (0.12 g, 0.43 mmol) en THF:H₂O 4:1 (9.5 mL) se añadió LiOH·H₂O (0.072 g, 1.72 mmol). La reacción se agitó durante 16 h y después se trató con HCl 1M. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se empleó sin purificación posterior (rendimiento: 75% rendimiento). mp: 262-265°C. ^1H NMR (300 MHz, CD_3COCD_3) δ 7.39 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 7.63-7.78 (m, 4H), 7.90 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.32 (s ancho, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3COCD_3) δ 121.7, 124.8, 125.2, 126.1, 129.9, 131.8, 132.2, 133.8, 134.8, 140.2, 147.9, 165.3, 167.3.

Ejemplo 26

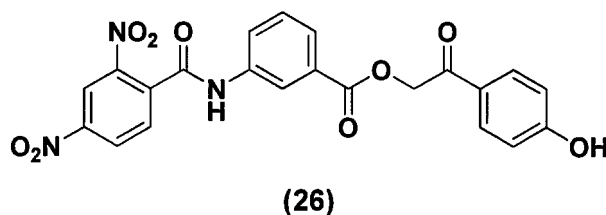
Síntesis de 3-(2-nitrobenzamido)benzoato de 2-oxo-2-(*p*-tolil)etilo

(25)

A una disolución del ácido 24 (0.04 g, 0.1 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (2 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs_2CO_3 hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (1.0 mL), y se añadió bromometil-*p*-tolilcetona (0.03 g, 0.1 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 34%). mp: 166-168°C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.35 (s, 3H), 5.41 (s, 2H), 7.21 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.41-7.47 (m, 1H), 7.56-7.63 (m, 2H), 7.71-7.77 (m, 2H), 7.88 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.07 (s ancho, 1H), 8.58 (s ancho, 1H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 21.8, 53.5, 66.5, 121.3, 124.5, 125.1, 126.2, 128.0, 128.8, 129.2, 129.6, 129.9, 130.6, 131.4, 132.6, 133.9, 137.9, 145.2, 146.1, 164.7, 165.4, 192.1. HRMS (EI) calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+): 418.1169, experimental: 418.1164.

Ejemplo 27

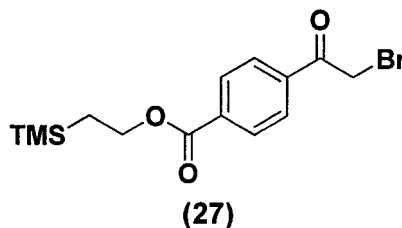
Síntesis de 3-(2,4-(dinitro)benzamido)benzoato de 2-(4-hidroxifenil)-2-oxoetilo



A una disolución del ácido 3 (0.2 g, 0.6 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (12 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (6 mL), y se añadió bromuro de 4-(((tert-butil)dimetil)sililoxi)fenacilo (0.2 g, 0.6 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 59%). mp 229-230°C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ 5.53 (s, 2H), 6.85 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.45 (t, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.61 (d, *J* = 8.2, 1H), 8.77 (s ancho, 1H), 9.22 (s, 1H), 10.11 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 68.2, 117.2, 121.6, 122.4, 122.5, 125.9, 126.1, 127.2, 128.2, 130.0, 131.0, 131.9, 132.6, 139.1, 140.6, 148.8, 150.2, 164.0, 164.4, 166.7, 191.7. HRMS (EI) calculada para C₂₂H₁₅N₃O₆ (M⁺): 465.0808, experimental: 465.0814.

Ejemplo 28

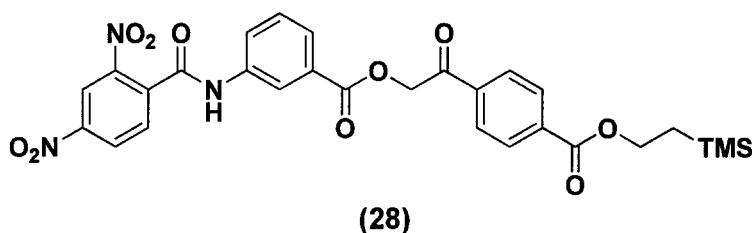
Síntesis de 4-(2-(bromo)acetil)benzoato de 2-((trimetil)silil)etilo



A una disolución del ácido 4-(2-(bromo)acetil)benzoico (0.15 g, 0.62 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) a 0°C, se añadió DMAP (0.01 g, 0.12 mmol), DCC (0.14 g, 0.68 mmol) y 2-trimetilsililetanol (0.11 mL, 0.80 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, y después se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (3:1) como eluyente (rendimiento: 47%). mp 60-61°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.02 (s, 9H), 1.05-1.11 (m, 2H), 4.35-4.41 (m, 4H), 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ -1.5, 17.3, 30.6, 63.9, 128.7, 129.7, 135.1, 137.1, 165.5, 190.7. HRMS (EI) calculada para C₁₄H₁₉BrO₃Si (M⁺): 342.0286, experimental: 342.0206.

Ejemplo 29

Síntesis de 3-(2,4-(d in itro)benzamido)benzoato de 2-oxo-2-(4-(((2-(trimetil)silil)etoxi)carbonil)fenil)etilo

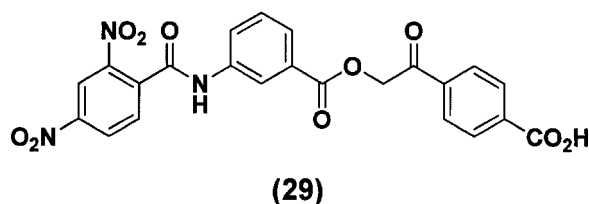


ES 2 325 724 B1

A una disolución del ácido 3 (0.07 g, 0.21 mmol) en H₂O/EtOH 1:1 (4 mL) se añadió una disolución acuosa de Cs₂CO₃ hasta alcanzar un pH de 6.5 para obtener la sal de cesio. Esta sal se concentró a presión reducida, se redisolvió en DMF (2 mL), y se añadió 27 (0.07 g, 0.2 mmol). Después de agitar durante 12 h, la reacción se hidrolizó con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con hexano-EtOAc (4:1) como eluyente (rendimiento: 56%). mp: 86-87°C. ¹H NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ -0.6 (s, 9H), 1.05-1.10 (m, 2H), 4.33-4.39 (m, 2H), 5.68 (s, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.78-7.82 (m, 1H), 7.91-7.95 (m, 1H), 8.06 (s, 4H), 8.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.39 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.61 (dd, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 2.1 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 10.53 (s ancho, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ -0.6, 18.6, 64.9, 68.6, 121.5, 122.5, 126.2, 127.2, 129.6, 130.0, 131.0, 131.2, 132.1, 132.6, 136.6, 139.1, 139.2, 140.6, 148.7, 150.2, 164.6, 166.7, 193.7.

Ejemplo 30

Síntesis del ácido 4-(2-(3-(2,4-dinitrobenzamido)benzoiloxi)-acetil)benzoico



A una disolución de 28 (0.04 g, 0.07 mmol) en DMF (1 mL) se añadió CsF (0.06 g, 0.4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, y después se hidrolizó con HCl 1 M. El crudo se extrajo con Et₂O, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía *flash* con un 3% de AcOH en EtOAc como eluyente (rendimiento: 77%). mp: 284-286°C. ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 5.65 (s, 2H), 7.48 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.84-7.88 (m, 1H), 7.91 (s, 1 H), 7.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.02-8.11 (m, 4H), 8.33 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.60 (dd, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃COCD₃) δ 66.9, 119.8, 121.1, 121.3, 124.7, 125.5, 127.9, 128.3, 129.3, 129.9, 130.6, 130.9, 136.0, 137.6, 137.8, 139.0, 147.2, 148.8, 155.0, 162.7, 165.1, 192.1.

Ejemplo 31

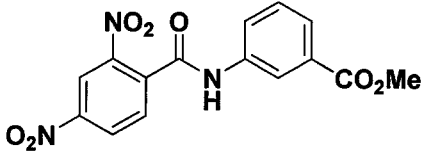
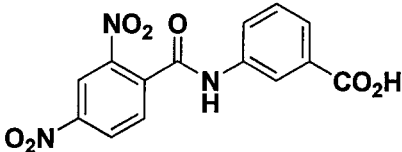
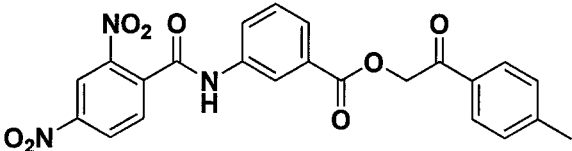
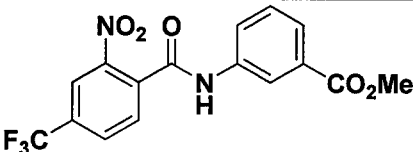
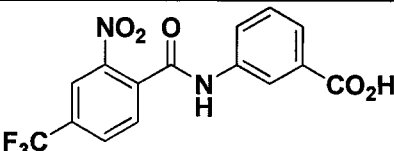
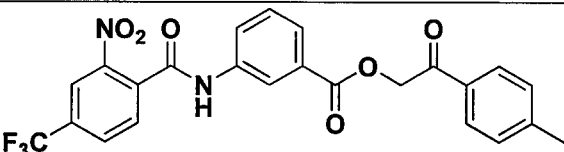
Inhibición de la actividad de HIF por FM19G11 y sus análogos estructurales

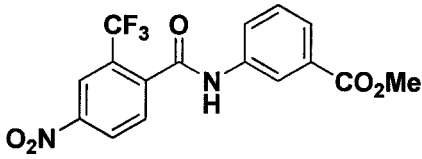
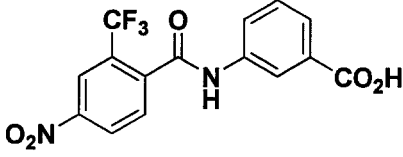
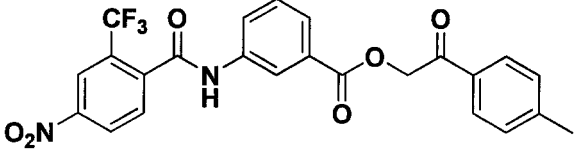
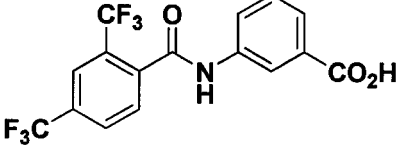
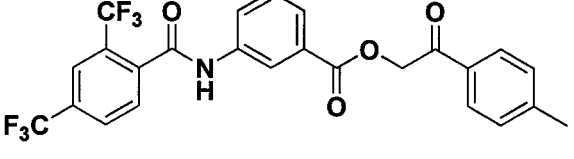
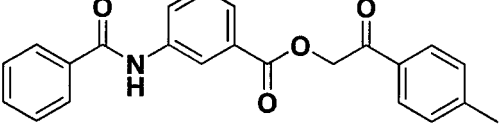
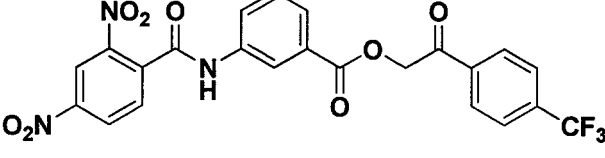
De acuerdo a la metodología del ensayo celular basado en los elementos de respuesta de HIF (Ejemplo 1), se probaron los compuestos intermediarios de la síntesis y algunos análogos sintetizados para obtener el SAR de FM19G11. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2:

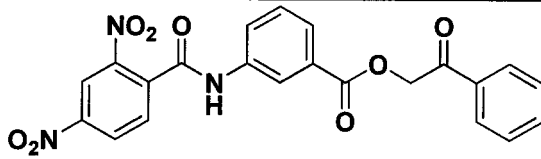
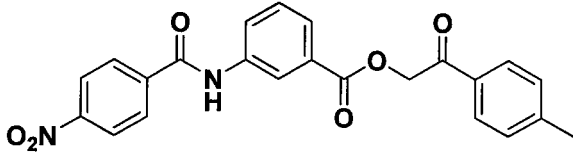
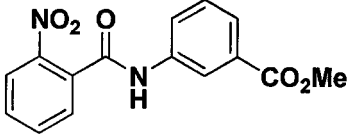
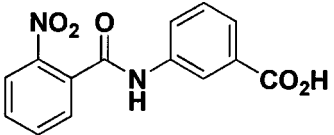
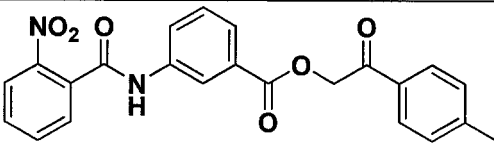
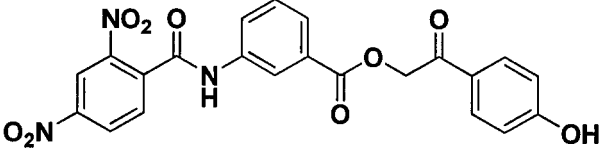
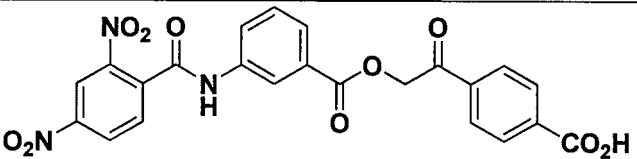
(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 325 724 B1

TABLA 2

	Estructura	IC50 HRE (μM)
2		>1
3		>1
4 (FM19G11)		0.08
5		>1
6		>1
7		0.084

8		>1
9		>1
10		0.14
12		>1
13		0.3
16		>1
17		1

19		>1
22		2.5
23		>1
24		1.4
25		2.8
26		0.36
29		1.4

Ejemplo 32

Inhibición de los genes diana de HIF por FM19G11 en la línea tumoral HeLa

32.1 Análisis de la expresión génica de los genes Diana de HIF-1 por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La reacción de qPCR se llevaba a cabo en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 1 μ l de cDNA; 1 μ l de cebador FW 300 nM; 1 μ l de cebador Rev 300 nM; 10 μ l de SYBR Green I y 7 μ l de H₂O. Se realizó en el GeneAmp 5700 Sequence Detection System de Applied BioSystems, con los siguientes pasos:

50°C 2 minutos 1 ciclo

95°C 10 minutos 1 ciclo

95°C 15 segundos

60°C 1 minuto- 40 ciclos

5

La cuantificación mediante qPCR se basa en la determinación del ciclo umbral (Ct) para cada cDNA en cada experimento de qPCR. El Ct para una muestra se define como el número de ciclos de PCR mínimos a partir del cual la señal de fluorescencia es mayor que el nivel mínimo de detección del aparato. Así los valores de Ct de diferentes muestras son usados para calcular la abundancia de cDNA molde en cada muestra, ya que los valores de Ct son directamente proporcionales a la cantidad de cDNA inicial y son por tanto la base para calcular los niveles de mRNA.

10

Los niveles relativos de expresión de los genes vienen expresados por el incremento de Ct (ΔCt) = Ct (Gen) - Ct (GAPDH). Debido a la naturaleza exponencial de la reacción de PCR, el incremento de Ct se convierte a forma lineal mediante la ecuación $2^{-\Delta Ct}$. A partir de los resultados obtenidos se calculó el ciclo umbral (Ct) para el gen VEGF y GAPDH como control interno. El software fue el Gene Amp 5700 SDS.

15

Se llevó a cabo el análisis de los niveles de expresión de los genes VEGF y GAPDH. Los cebadores fueron diseñados con el programa Primer3 y las secuencias son:

20

Nombre del cebador

Secuencia

25

VEGF FW

5' CCTCCGAAACCATGAACTTT 3'

30

VEGF Rev

5' ATCTGCATGGTGATGTTGGAC 3'

35

GAPDH FW ^a

5' CATCTTCCAGGAGCGAGATC 3'

GAPDH Rev ^a

5' GTTCACACCCATGACGAACAT 3'

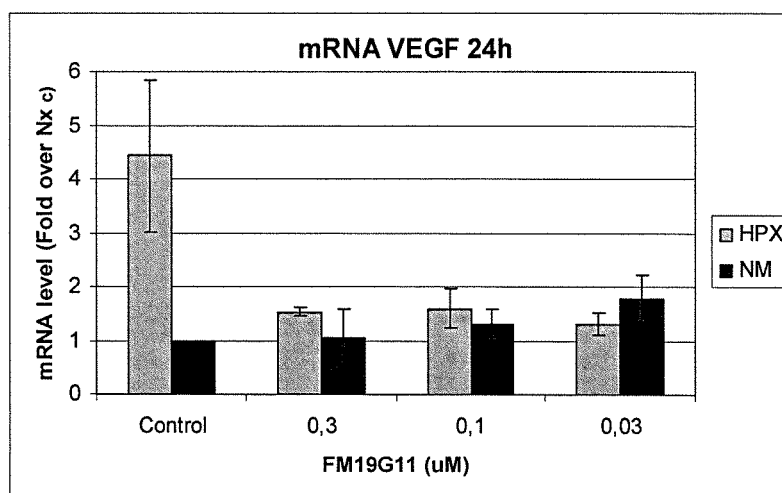
40

a.- El gen del GAPDH, usado como control interno.

45

Los niveles de mRNA de VEGF se midieron por qPCR en células HeLa 9xHRE en condiciones de Hipoxia o Normoxia, durante 24 horas para VEGF y en presencia o ausencia del compuesto FM19G11 a 0,3, 0,1 y 0,03 μ M utilizando como control interno GAPDH. Como se observa en la siguiente figura, existe una disminución de los niveles de mRNA de VEGF en presencia del compuesto FM19G11 a las concentraciones utilizadas.

50



65

32.2. Análisis de la expresión proteica de los genes diana de HIF-1 por análisis inmunológico (Western Blot)

Las células HeLa9XHRE/LUC se lisaron con un Tampón hipotónico (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, KC10 mM, DTT 2 mM, Pefabloc 1 mM, vanadato sódico 2 mM, pepstatina 4 µg/ml, leupeptina 4 µg/ml, y aprotinina 4 µg/ml), se conservaron 20 minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron 10 min a 1,200 rpm, recogiendo el sobrenadante y conservándose a -20°C hasta su uso. La cuantificación de las proteínas se realizó con el método colorimétrico de azul de Coomassie descrito por Bradford. Se utilizó un sistema comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (PIERCE Chem Co., Rockford III. EUA). Se utilizó albúmina de suero de bovino (A-7906, SIGMA Chem Co., St. Louis MO, EUA) para generar una curva estándar (0-200 µg de proteína). Cinco microlitros de cada muestra se pipetearon en una placa de 96 pocillos y se agregaron 150 µL de la solución de Coomassie y se mantuvo en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recogió la absorbancia a OD 595 nm en un espectrofotómetro. Mediante el programa estadístico Graph-Pad se calculó la recta patrón y se extrapolaron los valores para cada una de las muestras. Los valores finales fueron expresados como mcg/mcl de proteína. La electroforesis de proteínas del extracto se llevo a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Como patrón de tamaño molecular se utilizó una mezcla comercial de proteínas para polipéptidos de baja masa molecular (Amersham). La transferencia de las proteínas desde los geles de poliacrilamida a membrana de nitrocelulosa (Millipore) se llevó a cabo utilizando un sistema de transferencia Trans-Blot SD (Bio-Rad). El segundo anticuerpo está acoplado a la enzima peroxidasa, cuya actividad se utilizaba para detectar la unión antígeno-anticuerpo. Para revelar se usó el sistema de quimioluminiscencia de gran sensibilidad (ECL por análisis de western blot, Amersham-Pharmacia). Las membranas se incubaron durante 2 minutos en una mezcla recién preparada de las soluciones de detección 1 y 2 del sistema de inmunodetección ECL en relación 1:1, según las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos primarios usados fueron: Monoclonal anti-HIF-1α (BD Biosciences) Monoclonal anti-HIF-1α (BD Biosciences), monoclonal anti-HIF-2α (Abcam, Cambridge Science Park) dilución 1:500, monoclonal anti-PHD-3 dilución 1:1000 (Abcam, Cambridge Science Park), monoclonal anti-VEGF (R&D systems) y GAPDH dilución 1:5000 como proteína housekeeping. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron, Monoclonal anti-ratón IgG anticuerpo para HIF-1α, burro anti-conejo IgG para HIF-2α y PHD-3 y GAPDH, burro anti-cabra IgG para VEGF, todos a una dilución 1:5000.

La siguiente figura muestra la inhibición de las proteínas diana PHD3, HIF1α y HIF2α por FM19GI 1 en la línea celular HeLa9XHRE-LUC. A., por análisis de Western blot. Las células HeLa 9xHRE se sometieron en condiciones de Hipoxia o Normoxia durante 9 horas, en presencia y ausencia del compuesto FM19GI1 (0,3 mM). Se usaron los anticuerpos anti-HIF-1α, anti-HIF-2α y anti-PHD3. Como control interno se usó GAPDH. Se observa una disminución en la expresión de HIF1α y 2α, así como de PHD3 en presencia del compuesto FM19GI1.

FM19G11 (300nM)
1%O₂

	-	+	-
	-	+	+

HIF-1 alpha



HIF-2 alpha



PHD3



GAPDH



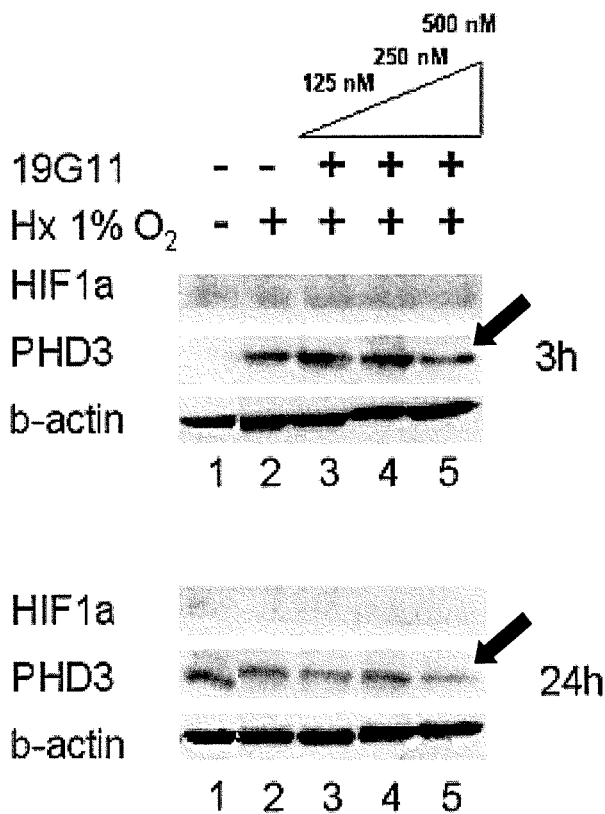
Ejemplo 33

Inhibición de la actividad de HIF en la célula troncal C17.2

C17.2 fueron cultivadas en estado indiferenciado usando un medio alto en glucosa modificado de Dulbecco's (DMEM) suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 5% de suero de caballo, 1% glutamina (2 mM), 1% Penicilina/Estreptomycin/Fungazona. Las células se sembraron a 1500 cél./cm², tanto para condiciones de normoxia como de hipoxia. El cultivo de células en normoxia se llevó a cabo en un incubador con 20% O₂, 5% CO₂, 37°C y el porcentaje de humedad estándar (94%). Las condiciones de baja concentración de O₂ se crearon utilizando una cámara de hipoxia (*In vivo* 2 400, Ruskinn Life Sciences), con la mezcla de gases 1% O₂, 5% CO₂, y 94% N₂ a 37°C. Las células se mantuvieron en las condiciones de normoxia e hipoxia a diferentes tiempos 3, 6, 9, 24, 48 h.

Posteriormente fueron recogidas y se extrajeron las proteínas y el RNAm utilizando un kit comercial, NucleoSpin RNA/protein (Macherey Nagel) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Las concentraciones de 19G11 utilizadas durante los estudios realizados son 125, 250 y 500 nM. Las concentraciones se emplearon en función de los resultados obtenidos tras la evaluación de la toxicidad de las C17.2 debido a la presencia del compuesto, ya que la IC₅₀ >1 μM.

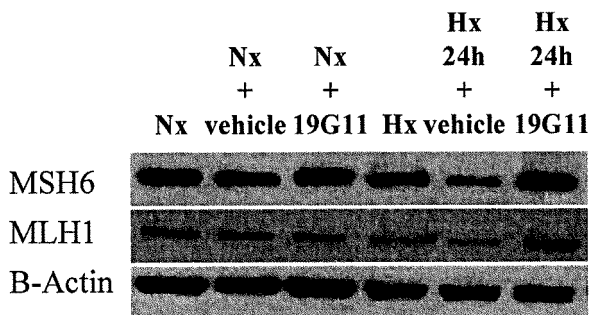
La siguiente figura muestra la inhibición de los genes diana de HIF1α por FM19G11 en la línea celular troncal neural C.17.2. El compuesto FM19G11 se utilizó a diferentes concentraciones en nanomolar (nM) tanto en condiciones de hipoxia (Hx se refiere a condiciones de hipoxia al 1% de O₂) como de normoxia (20% O₂).



Ejemplo 34

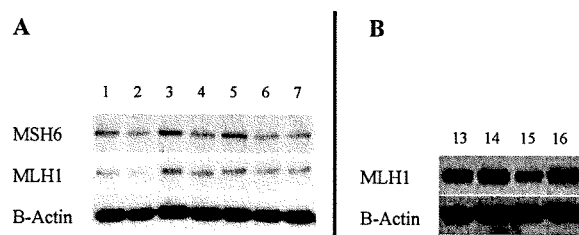
Restauración de las proteínas reparadoras (Mismatch Repair-MMRs) en modelos de célula troncal murina y humana

De acuerdo a los resultados obtenidos, la célula troncal neural C17.2 sometida a hipoxia experimentó represión en el sistema reparador de ADN (mismatch repair, MMR). En la siguiente figura se muestra el western blotting realizado con extractos proteicos nucleares de célula troncal neural C17.2 cultivadas en condiciones de normoxia o hipoxia en presencia de 19G11 (500 nM) o vehículo (DMSO) en el que se disolvió el 19G11. En el análisis se emplearon los anticuerpos monoclonales anti MLH1 y MSH6, haciendo Nx referencia a Normoxia y Hx a Hipoxia.



En la anterior figura se muestra cómo el 19G11 es capaz de reestablecer la expresión de estas proteínas re-
paradoras que podría evitar que células troncales propuestas en terapia celular, experimenten una indeseada onco-
transformación. La recuperación de la expresión de MMRs no es debida al vehículo (DMSO) ya que incluso 19G11
rescata de la posible represión producida por éste. El aumento de la expresión de los genes reparadores no sólo tiene
lugar en hipoxia sino también en condiciones de normoxia.

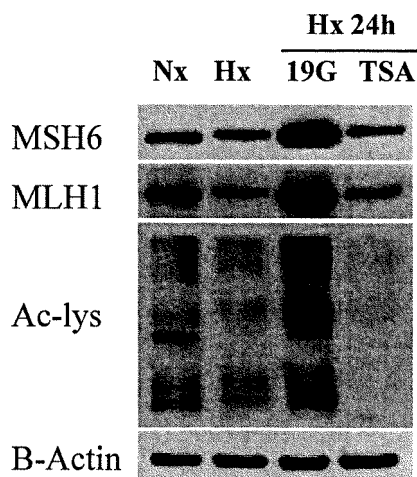
Estos estudios se extrapolaron a otras células troncales humanas como las células mesenquimales de médula ósea
o pulpa dentaria. Así la siguiente figura muestra el Western blotting realizado con extractos protéicos nucleares de
células troncales mesenquimales cultivadas en normoxia o hipoxia en presencia de 19G11 (500 nM). En el análisis se
emplearon los anticuerpos monoclonales anti MLH1 y MSH6. El panel A de la Figura hace referencia a los resultados
obtenidos en células troncales mesenquimales de médula ósea, siendo las condiciones del experimento 1-Nx 3h; 2-
Hx 3h; 3-Hx 3h+19G11; 4-Hx 18h; 5-Hx 18h+19G11; 6- Hx 24h; 7-Hx 24h+19G11, donde Nx hace referencia a
normoxia y Hx hace referencia a Hipoxia. El panel B hace referencia a los resultados obtenidos en células troncales
mesenquimales de pulpa dentaria siendo las condiciones del experimento 13-Nx 72h; 14-Nx 72h+19G11; 15-Hx 72h;
16-Hx 72h+19G11; Nx.-Normoxia; Hx.-Hipoxia.



Así también en este caso se observó una recuperación como la descrita para C17.2.

Atendiendo a resultados científicos previamente publicados, se sabe que tras la represión, la expresión de los
genes reparadores puede ser recuperada por un inhibidor de las histonas deacetilasas conocido como Trichostatin A
(TSA) (Cameron EE, *et al.* "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes
silenced in cancer" Nat Genet. 1999 Jan; 21(1):103-107). Esta droga es capaz de aumentar el grado de acetilación de
las histonas localizadas en la región promotora de esos genes, esto confiere a la cromatina una conformación accesible
a los factores de transcripción que regulan estos genes. Así los resultados obtenidos mediante uso de un anticuerpo
anti-acetil-lisina muestran que 19G11 aumenta el grado de acetilación global de diferentes proteínas y rescata la
expresión de los MMR incluso más eficazmente que el propio TSA. El hecho de que una droga recupere genes que
frenan o evitan el cáncer la convierte en un posible candidato como agente antitumoral; en este sentido, el TSA es
una droga que se encuentra actualmente en fase pre-clínica para tratamiento de cáncer de mama (Vigushin DM, *et al.*
"Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer *in vivo*", Clin
Cancer Res. 2001 Apr;7(4):971-6.).

La siguiente figura muestra el Western blotting realizado con extractos protéicos nucleares de célula troncal neural
C17.2 cultivadas en normoxia o hipoxia en presencia de 19G11 (500 nM) o vehículo (DMSO) en el que se disolvió
el 19G11. En el análisis se emplearon los anticuerpos monoclonales anti -acetil-lisina, anti-MLH1 y MSH6 así co-
mo frente a beta-actina usado como control de carga.; donde Nx hace referencia a Normoxia y Hx a Hipoxia. Los
resultados muestran que FM19G11 es capaz de recuperar la expresión de los MMRs de una forma más eficaz que el
TSA.



Ejemplo 35

Regulación por FM19G11 de los niveles de expresión de genes diana de HIF en un cultivo primario de células troncales adultas de origen ependimario (epNSCs)

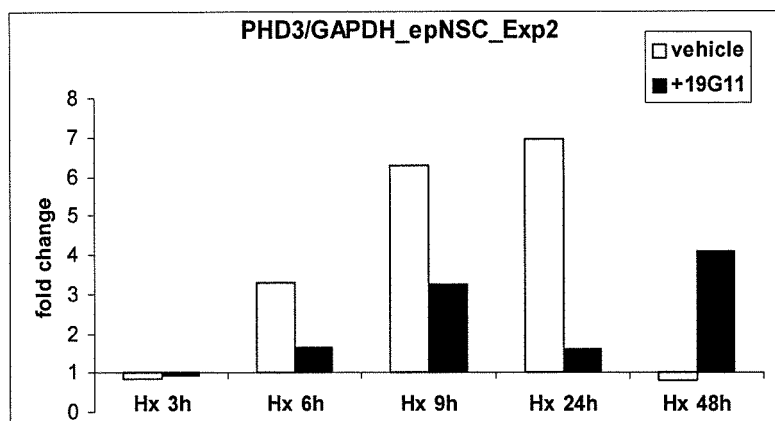
35.1 Cultivo primario de progenitores neurales de origen ependimario de médula espinal adulta (epNSC)

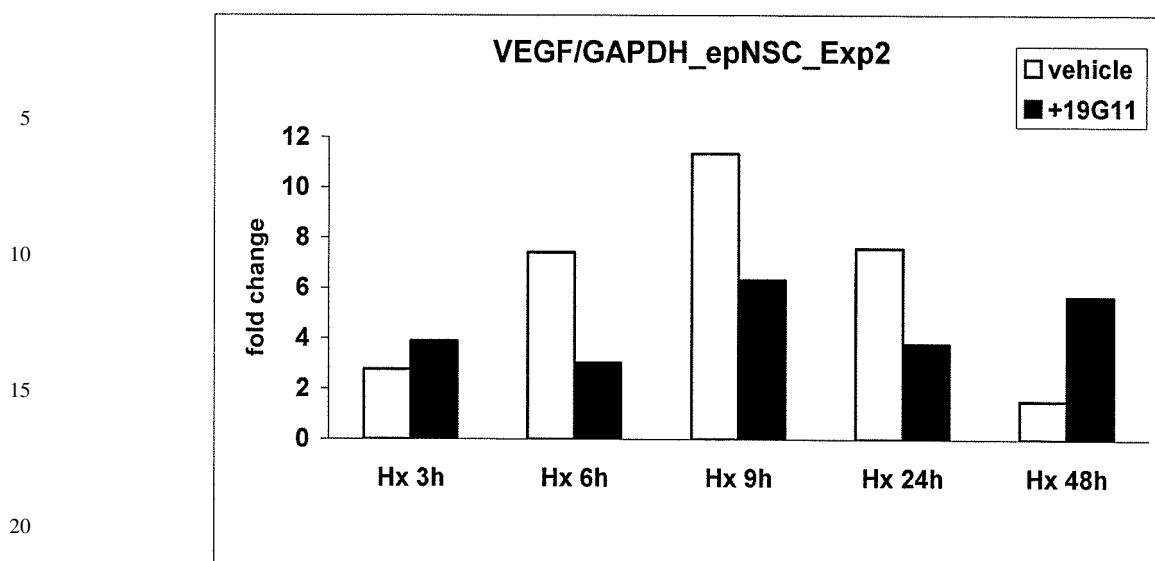
Se utilizaron ratas Wistar adultas, de entre 2 a 3 meses (la manipulación de los animales se realizó siguiendo el modo de actuación que se ajusta al punto 2.1 (métodos aceptables de eutanasia) del documento elaborado para la DGXI de la Comisión Europea respecto a la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Nº L358, ISSN 0378-6978) y tras la aprobación de los protocolos por el Comité de Cuidado y Bienestar Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, SPAIN). Una vez sacrificados los animales se diseccionó la parte dorsal de la médula espinal y el tejido se mantuvo, a 4°C, en *medio de lavado* (DPBS-glucosa) durante su procesamiento. Para reducir el porcentaje de células de tejido conectivo se eliminaron las meninges así como los vasos sanguíneos más superficiales. Bajo condiciones de esterilidad, se troceó el tejido medular en porciones cercanas a 1 mm³, se incubó durante 10 minutos a 37°C en medio de lavado, y se lavó 2 veces, empleando el mismo medio, por centrifugación suave (1000 rpm, 10 min). El tejido fue finalmente homogeneizado en medio completo [DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado con HEPES 5 mM, NaHCO₃ 3 mM, Glucosa 0.6%, Progesterona 20 nM, Selenito Na 3 mM, Apotransferrina 100 µg/ml, Putrescina 10 µM, Penicilina-estreptomicina, L-Glutamina, Insulina 25 µg/ml, EGF (20 ng/ml), FGF (20 ng/ml), 2 gr de BSA, Heparina 357U/ml]. La suspensión de tejido se hizo pasar, repetidas veces, a través de pipetas de vidrio siliconizadas, reduciendo su diámetro con mechero bunsen, hasta obtener una suspensión celular. 7 días después, los progenitores neurales formaron neuroesferas (NSC). Se recogieron las NSC que flotan en el cultivo primario, separándolas de los restos celulares, células muertas y otros tipos celulares adheridos a la placa de cultivo (ej. fibroblastos, microglia, astrogliia). Las NSC fueron entonces cultivadas en placas *low attach* (Nunc), que evita su adhesión al plástico y consecuentemente su diferenciación, y se mantuvieron a 37°C en incubador con 94% humedad y 5% de CO₂ (*condiciones de normoxia*). Las condiciones de baja concentración de O₂ (*condiciones de hipoxia*) se crearon utilizando una cámara de hipoxia (Invivo₂ 400, Ruskinn Life Sciences), con la mezcla de gases 1% O₂, 5% CO₂, y 94% N₂ a 37°C. Las NSC se mantuvieron en las condiciones de normoxia e hipoxia a diferentes tiempos 3, 6, 9, 24, 48 h en presencia o no del compuesto 19G11, a una concentración final de 500 nM (dosis por debajo de su IC₅₀ > 1 µM y más efectiva en la línea celular C17.2).

35.2. Detección de los niveles de expresión transcripcional de VEGF, PHD3 y GAPDH

El RNA total se aisló utilizando el kit comercial RNAeasy (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. 1 µg de RNA total de cada muestra se retro-transcribió utilizando el kit comercial Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystem). La reacción cuantitativa de la polimerasa en cadena (qPCR) se llevó a cabo utilizando sondas y cebadores Taqman diseñadas por Applied Biosystem para rVEGF (Ref Rn00582935_m1), rPHD3 (Ref Rn00571341_m1) y rGAPDH (Ref Rn01775763_g1). La qPCR se desarrolló en duplicado en el 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µl, utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 1x, 40 ng de cDNA (cantidad equivalente de RNA total), y 250 nM de cada sonda y cebador. El programa elegido para la amplificación fue: 50°C, 2 min x 1, 95°C, 10 min x 1, 95°C 15 segundos y 60°C 1 minuto x 40. Los niveles de expresión de VEGF y PHD3 se expresaron como el incremento de Ct con respecto a los niveles de expresión de GAPDH (gen de expresión constitutiva): Ct (ΔCt)=Ct (VEGF ó PHD3)-Ct (GAPDH). Cada ΔCt en condiciones de hipoxia (Hx) se normalizó con su valor en condiciones de normoxia (Nx): ΔΔCt=Ct(hx)-Ct(Nx). Debido a la naturaleza exponencial de la reacción de PCR, el incremento de Ct se convirtió en forma lineal mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

El estudio de los niveles de expresión de PHD3 y VEGF (por RT-PCR cuantitativa), en el cultivo primario de epNSC, en condiciones de hipoxia (barras blancas), muestra un aumento tiempo dependiente desde 3 a 24 horas en el primer caso y, hasta 9 horas en el segundo, que revierte a partir de dichos tiempos hasta 48 horas respecto a los niveles en normoxia. En presencia de 500 nM de FM19G11 (barras negras) el incremento de ambos, PHD3 y VEGF, se muestra significativamente inhibido desde la 6 a las 24 horas de exposición en hipoxia.





Ejemplo 36

Regulación por FM19G11 de los niveles de expresión de genes diana de HIF en un cultivo primario de células troncales humanas adultas de pulpa dentaria

- Condiciones de cultivo primario

El medio de cultivo utilizado fue Low-Glucose DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal. La línea troncal humana mesenquimal de pulpa dentaria [Gronthos S, *et al*, "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000 Dec 5; 97(25):13625-30.; Gronthos S *et al*., "Stem cell properties of human dental pulp stem cells" *J Dent Res*, 2002 Aug; 81(8):531-5], obtenida a partir de terceros molares humanos procedentes de adultos (19-29 años), fue cedida por el Dpto. de Cardiorregeneración del CIPF. Las células fueron sembradas a densidad de 2000 células/cm², y cuando alcanzaron una confluencia del 90% fueron subcultivadas de nuevo mediante tripsinización.

- Estudio de la actividad de FM19G11 sobre la expresión de HIF-1 alpha

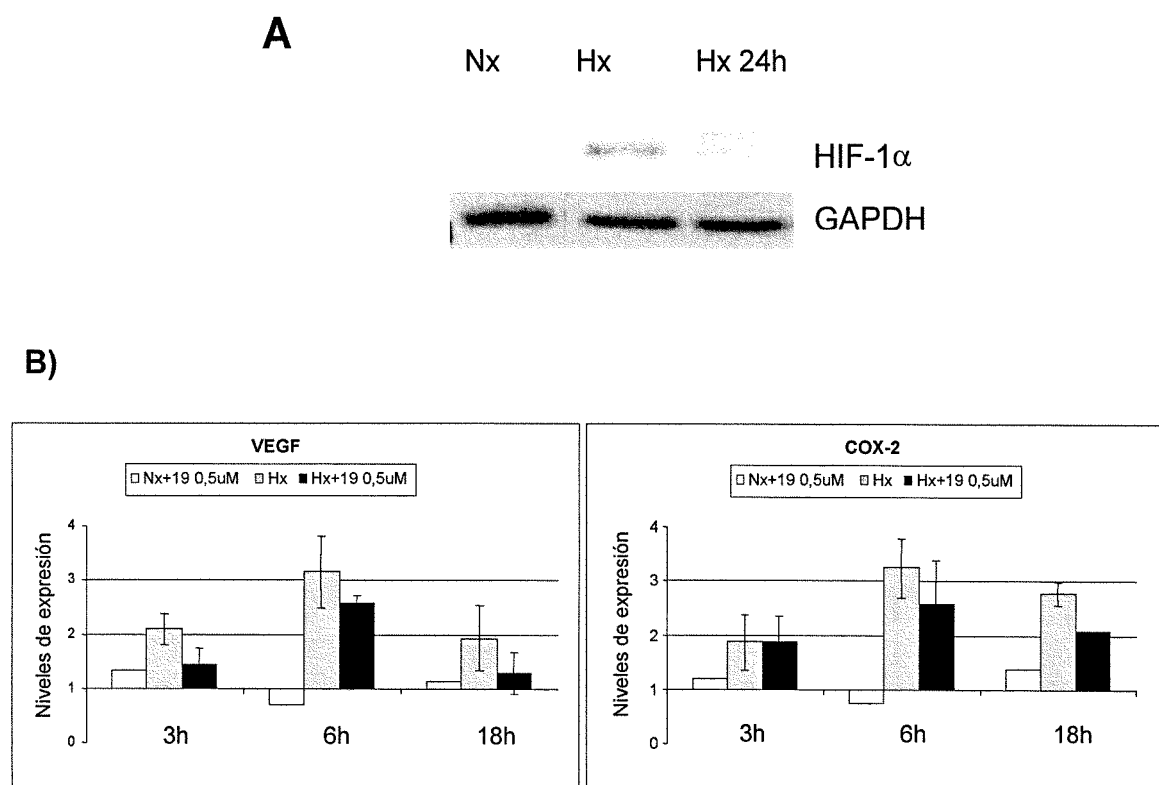
Las células de pulpa dentaria se sembraron a 2000 cels/cm² en placas de 21 cm². Cuando los cultivos alcanzaron subconfluencia se adicionó el compuesto FM19G11 a la concentración de 0.5 μM, durante 24 horas, en ensayos paralelos en condiciones de normoxia e hipoxia física (1% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂). A continuación las proteínas se extrajeron en tampón de Tisis (50 mM tris-HCL pH8, 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% NP40, 0.5% DOC, inhibidor de proteasas 1x (Complete, Sigma-Aldrich)), se cuantificaron por la técnica de Bradford, y 30 μg se cargaron en gel SDS-PAGE al 12% para determinar la expresión de HIF-1 alfa (120KDa). Para la detección, se utilizaron anticuerpos primarios anti-HIF-1α (BD Biosciences) y anti-GAPDH (Trevigen), seguido por anticuerpos secundarios cabra anti-ratón (para HIF-1α) y burro anti-conejo (para GAPDH) conjugados con HRP (Amersham, dilución 1:5000) y el sistema de detección quimioluminiscente (ECL; Amersham, dilución 1:5000) y película autorradiográfica (Kodak) (ver Figura panel A).

- Detección de los niveles de expresión transcripcional de VEGF, COX-2 y GAPDH

El RNA total se aisló utilizando el kit comercial RNAeasy (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. 1 μg de RNA total de cada muestra se retro-transcribió utilizando el kit comercial Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystem). La reacción cuantitativa de la polimerasa en cadena (qPCR) se llevó a cabo utilizando sondas y cebadores Taqman diseñadas por Applied Biosystem para hsVEGF (Ref HS00173626_m1), hsCOX-2 (Ref Hs00153133_m1) y hsGAPDH (Ref HS 99999905_m1). La qPCR se desarrolló en duplicado en el 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 μl, utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 1x, 40 ng de cDNA (cantidad equivalente de RNA total), y 250 nM de cada sonda y cebadores. El programa elegido para la amplificación fue: 50°C, 2 min x 1, 95°C, 10 min x 1, 95°C 15 segundos y 60°C 1 minuto x 40. Los niveles de expresión de VEGF y COX-2 se expresaron como el incremento de Ct con respecto a los niveles de expresión de GAPDH (gen de expresión constitutiva): Ct (ΔCt)=Ct (VEGF ó PHD3)-Ct (GAPDH). Cada ΔCt en condiciones de hipoxia (Hx) se normalizó con su valor en condiciones de normoxia (Nx): ΔΔCt=Ct(hx)-Ct(Nx). Debido a la naturaleza exponencial de la reacción de PCR, el incremento de Ct se convirtió en forma lineal mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

ES 2 325 724 B1

La siguiente figura muestra la inducción de la expresión de HIF-1 α tras 24 horas de exposición a hipoxia física. Como puede observarse en el panel A, el compuesto FM19G11 a la concentración de 0.5 μ M inhibió la expresión de HIF-1 α , se utilizó GAPDH como control interno de carga. Según muestra el panel B el estudio de los niveles de expresión de VEGF y COX-2 (por RT-PCR cuantitativa) a 3, 6 y 18 horas, en el cultivo de células troncales de pulpa dentaria, en condiciones de hipoxia (barras grises), mostró una máxima expresión a 6 horas para ambos genes diana de HIF respecto a los niveles en normoxia. En presencia de 1 μ M y 0.5 μ M de FM19G11 (barras negras y blancas respectivamente) el incremento de ambos, VEGF y COX-2, se mostró significativamente inhibido a 6 y a 18 horas.



Ejemplo 37

Regulación por FM19G11 de los niveles de expresión de Sox2 y Oct3/4, genes responsables del mantenimiento del estado indiferenciado de células madre, en un cultivo primario de células troncales adultas de origen endodermico (epNSCs)

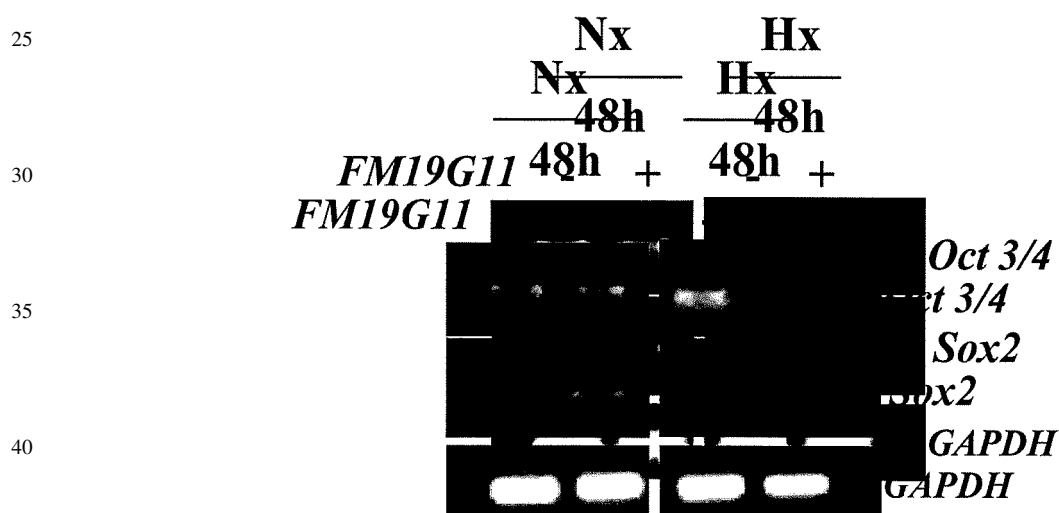
El cultivo primario de progenitores neurales de origen endodermico de médula espinal adulta (epNSC) se realizó según las condiciones ya expuestas en el ejemplo 34.1

- Detección de los niveles de expresión transcripcional de Sox2, Oct4 y GAPDH

El RNA total se aisló utilizando el kit comercial RNAeasy (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. 1 μ g de RNA total de cada muestra se retro-transcribió utilizando el kit comercial Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystem). La reacción semi-cuantitativa de la polimerasa en cadena (sqPCR) se llevó a cabo utilizando los cebadores abajo detallados, para la amplificación de los RNAs mensajeros de Sox2, Oct4 y GAPDH. La sqPCR se desarrolló en un termociclador Eppendorf en un volumen final de 50 μ l, utilizando 1 U de Taq Polimerasa, 40 ng de cDNA (cantidad equivalente de RNA total), y 300 nM de cada cebador. El programa elegido para la amplificación fue: [95°C, 3 min] x1, [50°C, 30 seg, 72°C, 5 min, 95°C 30 seg] x 35 y 72°C 10 min. Los niveles de expresión de Sox2 y Oct4 se visualizaron en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1 x teñido con bromuro de etidio. Los cambios de expresión debidos a la diferencia de carga se corrigieron por la expresión diferencial del gen de expresión constitutiva GAPDH. Los experimentos se realizaron en triplicado (con células procedentes de animales distintos).

	Nombre del cebador	Secuencia
5	rSox2 sentido	5' GGATGGTTGTCTATTAACCTT 3'
	rSox2 antisentido	5' CTCCATCATGTTATACATGC 3'
10	rOct4 sentido	5' GCTGGACACCTGGCTTCAGA 3'
	rOct4 antisentido	5' TCTGAAGCCAGGTGTCCAGC 3'
15	rGAPDH sentido	5' AGCGGCATCTTCTTGTGCAG 3'
	rGAPDH antisentido	5' TTGCCGTGGGTAGAGTCATA 3'

La presencia durante 48 horas del compuesto FM19G11, en un cultivo expuesto a bajo nivel de oxígeno -hipoxia (1% O₂)-, muestra una regulación opuesta entre Sox2 y Oct4, genes responsables del mantenimiento del estado indiferenciado de la célula. En condiciones de normoxia o alto nivel de oxígeno (~ 20%) la presencia de FM19G11 durante 48 horas indujo significativamente la expresión de Sox2 y, sin embargo los niveles de expresión de Oct 3/4 estaban reprimidos en estas mismas condiciones.



Ejemplo 38

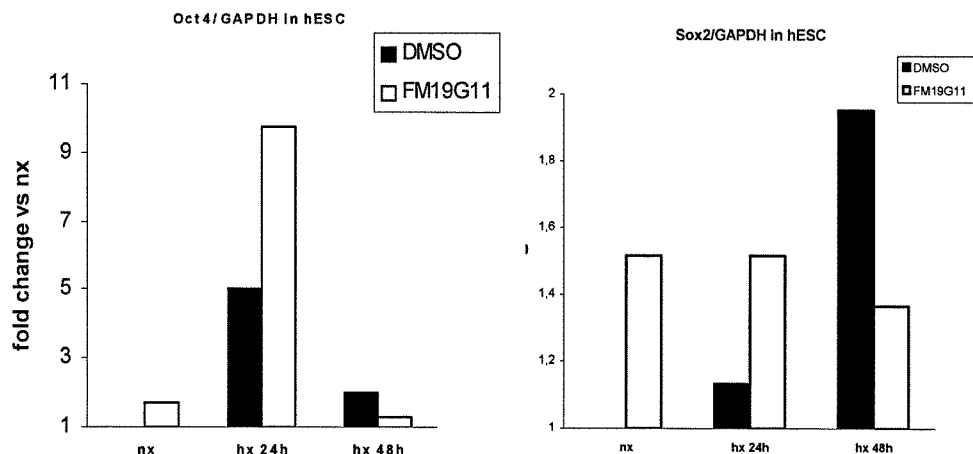
Regulación por FM19G11 de los niveles de expresión de Sox2 y Oct3/4, genes responsables del mantenimiento del estado indiferenciado de células madre, en células madre embrionarias humanas (hESC)

- Cultivo de la línea H9 de células embrionarias humanas (hESC)

Para mantener y propagar la línea (hasta no más de 70 pases) de hESC, éstas se cultivaron sobre una monocapa de fibroblastos de ratón inactivados con Mitomicina C (Sigma Aldrich, Sweden) (Thomson *et al.*, [1998]). Para el estudio de los cambios transcripcionales de Sox2 y Oct3/4, las colonias no diferenciadas de hESC fueron transferidas, por disociación mecánica, a una placa de cultivo cubierta con una fina capa de Matrigel® y se cultivaron en presencia de medio condicionado. El medio condicionado fue obtenido del cultivo de fibroblastos de ratón confluentes e inactivados, sembrados sobre placas cubiertas con gelatina (0.1%; Sigma).

- Detección de los niveles de expresión transcripcional de Sox2, Oct3/4 y GAPDH

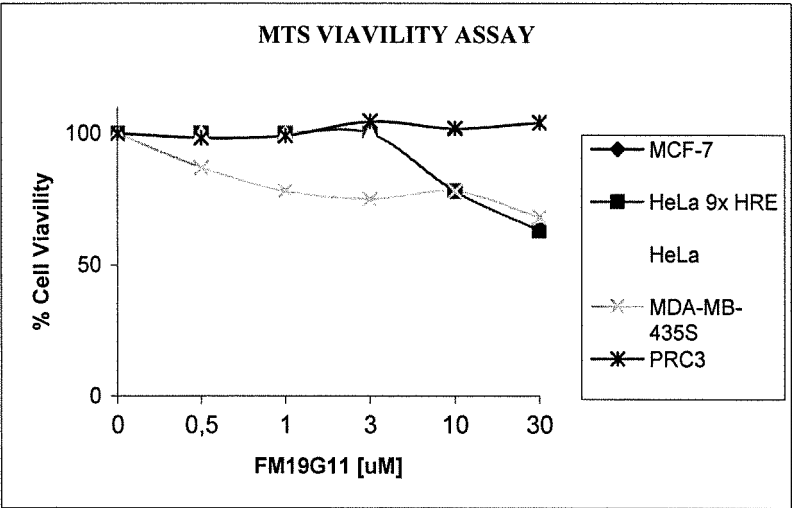
Utilizando las condiciones experimentales descritas en el ejemplo 34, se procedió de igual forma incluyendo en este caso las sondas TaqMan para Sox2, Oct3/4 y GAPDH humanas (Sox2: Hs01053049_s1; Oct4: Hs01895061_u1; GAPDH: Hs99999905_m1). Como muestra las figuras siguientes, la presencia del compuesto FM19G11 en condiciones de cultivo de bajo oxígeno, hipoxia (1% O₂), indujo la expresión de ambos genes Sox2 y Oct3/4 a 24 h y la inhibió significativamente a 48 h. Los niveles de expresión de ambos ARNs mensajeros se indujeron en condiciones de hipoxia versus normoxia (condiciones de cultivo de alto oxígeno ~ 20% O₂) en todos los tiempos.



Ejemplo 39

Estudios de toxicidad de FM19G11 frente a un panel celular

Los estudios de citotoxicidad se realizaron en las líneas celulares HeLa 9x-HRE-Luc, PRC3, HeLa, MCF-7 y MDA-MB 435-S. Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% Suero Bovino Fetal inactivado, penicilina (50 IU/ml), estreptomycin (50 µg/ml) (Invitrogen-Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Las células se cultivaron a 37°C con una atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO₂. El efecto citotóxico de los compuestos se ensayó en el rango de dosis entre 0,5 a 30 µM. Se sembraron las células a 5.000 cels/pocillo en el caso de las HeLa 9x HRE y en placas de 96 pocillos transparente, 50 µl por pocillo, se cultivaron 72 h a 37°C con una atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO₂, procediendo posteriormente al ensayo colorimétrico del MTS según instrucciones del proveedor (Cell Titer 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin TB169, Promega Corporation). Las células vivas y metabólicamente activas fueron capaces de reducir el MTS a formazano, un producto soluble en el medio de cultivo. La absorbancia del formazano puede medirse a 490 nm y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Como puede apreciarse en la figura siguiente, en ninguna de las líneas celulares utilizadas se alcanzó la Dosis Letal 50 a concentraciones superiores a 500 veces la IC50 - en el rango de 100 nM- de FM19G11 en el ensayo de los elementos de respuesta de HIF.



Ejemplo 40

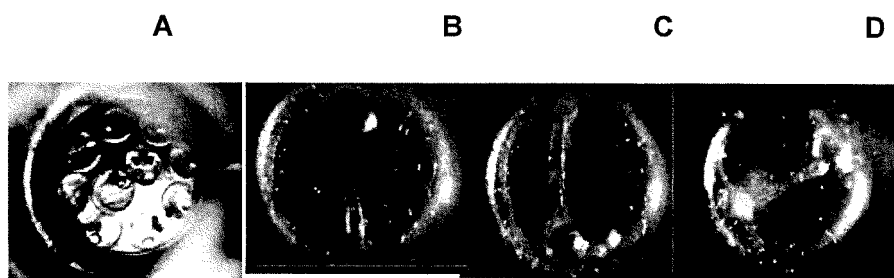
Estudio de toxicidad de FM19G11 frente a embriones de peces zebrafish (Danio rerio) y medaka (Oryzias latipes)

Los embriones de peces presentan una serie de características que los convierten en modelos ideales para ensayos de evaluación de drogas en animales vertebrados (Zon, L.I. & Peterson, R (2005). “*In vivo drug discovery in the zebrafish*”. *Nature Rev Drug Disc*, 4, 35-44; Medaka, *Oryzias latipes*. Development of test methods and Suitability of Medaka as Test Organism for Detection of Endocrine Disrupting Chemicals, February 2003, Ministry of Environment, Japan Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan). Por un lado, son transparentes y de desarrollo ex utero, por lo que se pueden observar fácilmente los fenotipos inducidos son mucho más baratos y fáciles de mantener, siendo además más rápida la obtención de resultados, que los ratones que son el modelo más usado en ensayos de toxicidad. La toxicidad del compuesto se ha probado en dos modelos de peces, zebrafish y medaka, solidamente establecidos como modelos animales para el estudio del desarrollo en vertebrados.

En primer lugar, para los embriones de zebrafish se realizaron diversos experimentos con 10, 6 y 4 embriones por pocillo en un volumen de 100 microl, en estadios tempranos (entre 1 y 8) y tardíos (más de 20) de tampón Yamamoto 1x, cultivando los embriones a 26°C durante 24 h y posteriormente se añadió el compuesto FM19G11 a concentraciones de 10 microM y 50 microM con controles negativos sin aditivos para analizar la mortalidad endógena de los embriones y con DMSO al 1% y 5% (disolvente del compuesto) para analizar la mortalidad del disolvente. En todos los casos el disolvente inducía una letalidad alta entre el 60% y el 90%.

Los mismos experimentos se realizaron usando embriones de medaka para los que el DMSO no tiene efectos letales a concentraciones menores del 5%. Utilizamos 6 embriones por pocillo, un volumen final de 100 ul y experimentos independientes con embriones en estadios de blástula y de neurula. A las concentraciones empleadas de 10 microM y 50 microM no observamos letalidad significativa (mayor del 10%). Los resultados obtenidos mostraron que FM19G11 no afecta a la viabilidad de los embriones- todos permanecieron viables - ni se observaron alteraciones morfológicas visibles que pudieran ser interpretadas como organotoxicidad durante el desarrollo del embrión.

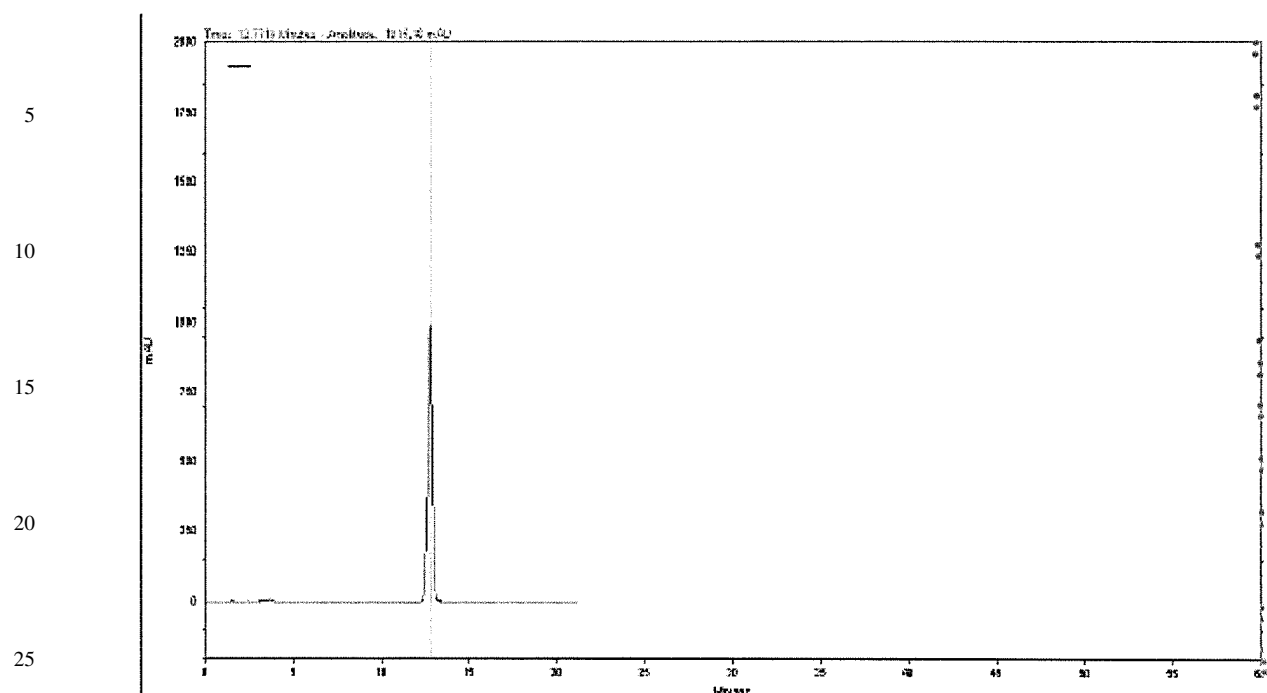
Para evitar la posibilidad que FM19G11 pudiera no estar atravesando la capa protectora del embrión (corión), se microinyectó el compuesto a una concentración de 0,5 mM en el espacio coriónico (entre el embrión y el corion). Experimento 1: n=15, mortalidad inducida del 20%, control DMSO= 0%. El resultado fue el mismo, no observándose ninguna anomalía en el desarrollo del embrión, ni tampoco ningún efecto en la viabilidad de los embriones inyectados. Las siguientes imágenes muestran embriones de medaka sometidas al tratamiento con FM19G11 a 50 microM durante 4 días (A) 10 embriones de medaka en un pocillo de placa multipocillo; B y C, a fotos de embriones tratados con FM19G11 50 microM durante 1 día; y D a una foto de embrión de medaka sin tratar con el compuesto.



Ejemplo 41

Método analítico para la detección de FM19G11

El análisis del compuesto FM19G11 se realizó por HPLC utilizando una columna analítica RP18 Lichrocart 250-4 (5 µm), con un método isocrático 59:41 MeCN/H₂O, y con un flujo de 0.8 mL/min. El tiempo de retención del compuesto es de 12.7 minutos.

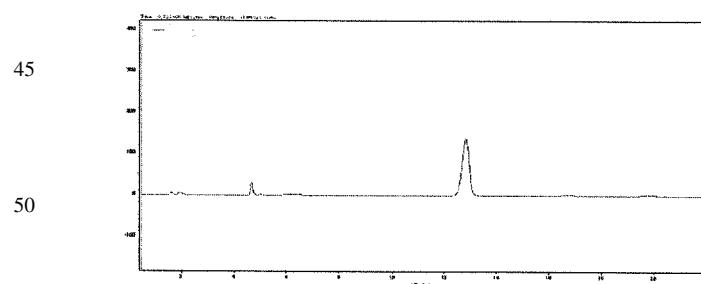


30 Ejemplo 42

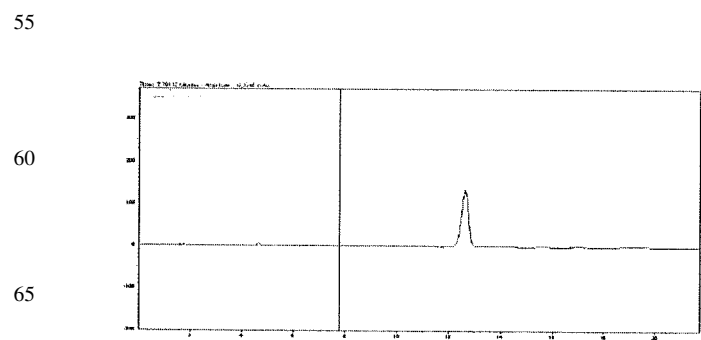
Estabilidad de FM19G11 en suero bovino

35 La estabilidad de FM19G11 se determinó por incubación en suero bovino (estabilizado con 10% PBS) y posterior análisis por HPLC. Se prepararon muestras con concentraciones 0.5 mM y 1.0 mM en el suero y se extrajeron alícuotas de 100 μ L a distintos tiempos de incubación (0, 0.5, 1, 2 y 3 horas). Las muestras se conservaron a -80°C. Para llevar a cabo la extracción en cada muestra, se adicionaron 800 μ L de H₂O, 900 μ L de CHCl₃ y una gota de isopropanol, a continuación la mezcla se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El extracto se concentró y el residuo se suspendió en la fase móvil utilizada para el análisis por HPLC (59:41 MeCN/H₂O). De cada muestra se inyectaron 25 μ L.

40

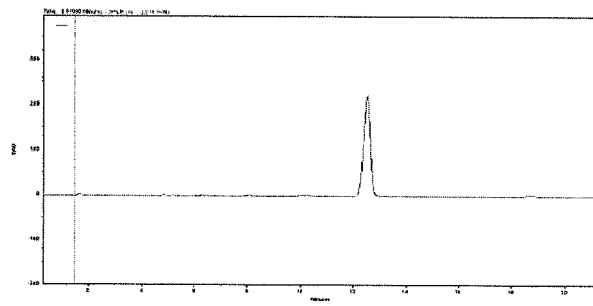


T=0; FM19G11 500- nM

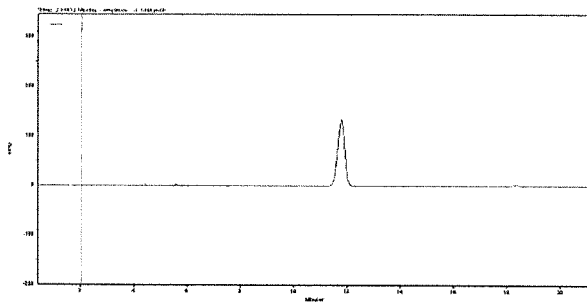


T=30 min; FM19G11- 500 nM

ES 2 325 724 B1



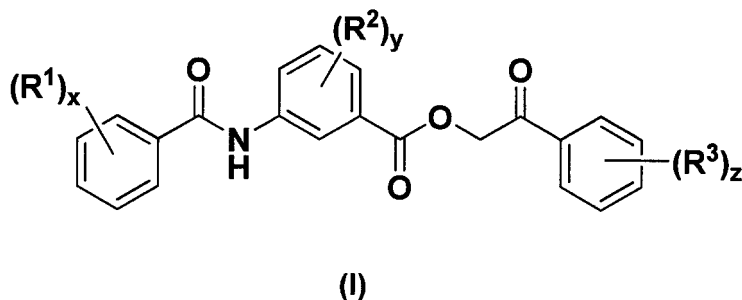
T=60 min; FM19G11- 500 nM



T=120 min; FM19G11- 500 nM

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I):



en la que: R^1 , R^2 y R^3 pueden ser independientemente:

- (vii) hidrógeno;
 - (viii) un grupo alquilo $-(CH_2)_n-H$, lineal o ramificado, opcionalmente con una insaturación donde $n = 1-10$, preferiblemente metilo o etilo;
 - (ix) un ácido carboxílico $-COOH$ o un éster de fórmula $-COOR$, siendo R un grupo alquilo $-(CH_2)_n-H$, lineal o ramificado, opcionalmente con una insaturación, donde $n = 1-10$, preferiblemente metilo o etilo;
 - (x) grupo hidroxilo $-OH$, grupo $-NO_2$;
 - (xi) halógeno; grupo $-CHa_3$, donde Ha = halógeno, preferiblemente CF_3 ;
 - (xii) $-NHCOR$ siendo R un grupo alquilo $-(CH_2)_n-H$, lineal o ramificado, opcionalmente con una insaturación, donde $n = 1-10$, preferiblemente metilo o etilo;
- siendo $x, y, z = 1-4$;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a excepción del 3-(2,4-(dinitro)benzamido)benzoato de 2-4-(metoxi)fenil)-2-oxoetilo ($R^1 = 2,4-di-NO_2$, $R^2 = H$, $R^3 = 4-OMe$), y el 3-(4-bromo)benzamido)benzoato de 2-4-(nitro)fenil)-2-oxoetilo ($R^1 = 4-Br$, $R^2 = H$, $R^3 = 4-NO_2$).

2. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, denominado FM19G11, en el que $R^1 = 2,4-di-NO_2$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CH_3$ (4).

3. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2-NO_2$, $4-CF_3$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CH_3$ (7).

4. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2-CF_3$, $4-NO_2$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CH_3$ (10).

5. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2-4-CF_3$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CH_3$ (13).

6. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = -H$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CH_3$ (16).

7. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2-4-NO_2$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CF_3$ (17).

8. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2-4-NO_2$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -H$ (19).

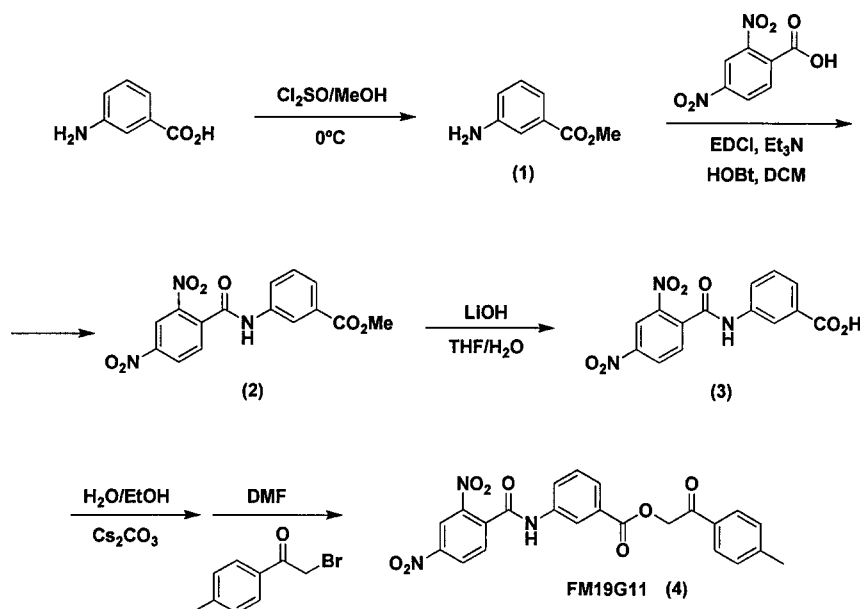
9. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 4-NO_2$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CH_3$ (22).

10. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2-NO_2$, $R^2 = -H$, y $R^3 = -CH_3$ (25).

11. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2\text{-}4\text{-NO}_2$, $R^2 = \text{-H}$, y $R^3 = \text{-OH}$ (26).

12. El compuesto de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que $R^1 = 2\text{-}4\text{-NO}_2$, $R^2 = \text{-H}$, y $R^3 = \text{-CO}_2\text{H}$ (29).

13. Método de obtención del compuesto de la fórmula general (I) denominado FM19G11, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, que comprende los pasos del siguiente esquema:



14. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con las reivindicaciones 1-12, para la preparación de un medicamento para regular la transcripción de genes modulados por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF).

15. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 14 para la preparación de un medicamento que regula la transcripción de uno o más genes seleccionados del grupo: HIF, VEGF, PHD3, MMRs, Sox2 y Oct3/4.

16. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento que inhibe la transcripción de HIF en su regulación autocrina en condiciones de hipoxia.

17. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 16 para la preparación de un medicamento que inhibe significativamente la transcripción de $\text{HIF}1\alpha$ y $\text{HIF}2\alpha$ en condiciones de hipoxia.

18. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento que inhibe significativamente la transcripción de VEGF y/o PHD3 en condiciones de hipoxia.

19. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento que induce la expresión de los genes reparadores MMRs en condiciones de hipoxia y normoxia.

20. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 19 para la preparación de un medicamento que induce la expresión de los genes reparadores MMRs en condiciones de hipoxia y normoxia donde dichos genes son MSH6 y MLH1.

21. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento que induce la expresión de Sox2 y disminuye los niveles de expresión de Oct3/4 en condiciones de normoxia.

22. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento que disminuye los niveles de expresión de Sox2 y Oct3/4 en condiciones de hipoxia.

ES 2 325 724 B1

23. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-22, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de patologías angiogénicas.

5 24. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-23, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

10 25. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-24, en el que el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de útero, cáncer de tiroides, cáncer gástrico, cáncer de hígado, linfoma, o melanoma.

15 26. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-23, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores.

20 27. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con las reivindicaciones 14-23, para la preparación de medicamentos para el tratamiento de patologías que producen inflamación.

28. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con las reivindicaciones 14-23, para su uso en medicina regenerativa.

25 29. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 28 relacionados con la diferenciación de células troncales.

30 30. Uso de uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con las reivindicaciones 14-23, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de patologías que producen degeneración de los tejidos.

35 31. Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con las reivindicaciones 1-12, en una cantidad farmacéuticamente eficaz, un vehículo o diluyente y/o un adyuvante fisiológicamente aceptable.

32. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 31, en la que el compuesto de fórmula general (I) es el FM19G11 (4) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 33. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 31-32, que se puede utilizar para tratar o prevenir patologías angiogénicas de acuerdo con las reivindicaciones 14-30.

45 34. Kit que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 31-32 con uno o más compuestos de la fórmula general (I), un vehículo o diluyente y/o uno o más adyuvantes, que pueden estar juntos o separados en uno o más contenedores dependiendo de la vía de administración de la composición en cada caso.

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 325 724

⑫ Nº de solicitud: 200800708

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 11.03.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TimTec Stock Library. Base de datos CHEMCATS [recuperado 23.06.2009]. Recuperado de STN International, Columbus, Ohio (EE.UU.). Nº de acceso 2004816591. Fecha de publicación 20.11.2007 & Base de datos Registry [recuperado el 22.06.2009]. Fecha de entrada en Registry 04.04.2001. Compuesto con CAS Registry Number 329932-55-0.	1,2
X	Base de datos Registry [recuperado el 22.06.2009]. Fecha de entrada en Registry 26.07.2001. Compuesto con CAS Registry Number 348599-88-2.	1,6
X	Base de datos Registry [recuperado el 22.06.2009]. Fecha de entrada en Registry 26.07.2001. Compuesto con CAS Registry Number 348599-84-8.	1,9
A	US 2006223812 A1 (MANDELKOW ECKHARD y col.) 05.10.2006, página 47, compuesto B1C11.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.06.2009

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 233/64 (2006.01)

C07C 231/00 (2006.01)

A61K 31/194 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, REGISTRY, BEILSTEIN, CA, CHEMCATS, WPI, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.06.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3-5, 7, 8, 10-34	SÍ
	Reivindicaciones	1,2,6,9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3-5, 7, 8, 10-34	SÍ
	Reivindicaciones	1,2,6,9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de datos CHEMCATS RN 329932-55-0	20.11.2007
D02	Base de datos Registry RN 348599-88-2.	26.07.2001
D03	Base de datos Registry RN 348599-84-8	26.07.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto los compuestos representados por la fórmula general (I), en especial el compuesto 3-((2,4-dinitro) benzamido) benzoato de 2-oxo-2- (p-tolil) etilo denominado FM19G11, las composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso para regular la transcripción de genes modulados por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), involucrados en procesos patológicos relacionados con cáncer, inflamación, reparación de tejidos, diferenciación de células troncales y terapia regenerativa.

La cita reseñada como D01 corresponde al compuesto 3-((2,4-dinitro) benzamido) benzoato de 2-oxo-2- (p-tolil) etilo con CAS Registry Number 329932-55-0 y aparece en las bases de datos CHEMCATS y REGISTRY. Este compuesto corresponde al ejemplo 6 (compuesto 4 de la tabla 2) y reivindicación 2 de la presente solicitud.

La cita D02 corresponde al compuesto 3-(benzamido) benzoato de 2-oxo-2- (p-tolil) etilo con CAS Registry Number 348599-88-2 y aparece en la base de datos REGISTRY. Este compuesto corresponde al ejemplo 18 (compuesto 16 de la tabla 2) y reivindicación 6 de la presente solicitud.

La cita D03 corresponde al compuesto 3-(4-nitrobenzamido) benzoato de 2-oxo-2- (p-tolil) etilo con CAS Registry Number 348599-84-8 y aparece en la base de datos REGISTRY. Este compuesto corresponde al ejemplo 23 (compuesto 22 de la tabla 2) y reivindicación 9 de la presente solicitud.

Por lo tanto se considera que las reivindicaciones 1, 2, 6 y 9 de la presente solicitud carecen de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica ni las composiciones ni el uso de los compuestos representados por la fórmula (I) para el tratamiento de procesos patológicos relacionados con cáncer, inflamación, reparación de tejidos, diferenciación de células troncales y terapia regenerativa.

En consecuencia se considera que las reivindicaciones 3-5, 7, 8, 10- 34 tienen novedad y actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1LP 11/1986).