(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 543 918**

(51) Int. CI.:

C07D 417/04 (2006.01)
C07D 277/12 (2006.01)
C07D 277/32 (2006.01)
C07D 277/56 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2011 E 11821153 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2612861**

(54) Título: **Tiazoles fluorados útiles para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

02.09.2010 ES 201031314 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.08.2015

(73) Titular/es:

UNIVERSITAT DE BARCELONA (100.0%)
Centro de Patentes de la UB, C/ Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES

(72) Inventor/es:

GIL SANTANO, JOAN;
LAVILLA GRÍFOLS, RODOLFO;
ALBERICIO PALOMERA, FERNANDO;
PÉREZ PERARNAU, ALBA;
PRECIADO GALLEGO, SARA;
GONZÁLEZ GIRONÈS, DIANA Mª;
IGLESIAS SERRET, DANIEL y
RAMÓN ALBALATE, ROSARIO

(74) Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tiazoles fluorados útiles para el tratamiento del cáncer

La presente invención está relacionada con nuevos compuestos tiazólicos, composiciones farmacéuticas que los contienen y su utilización para el tratamiento del cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El cáncer es una enfermedad heterogénea caracterizada por la acumulación de células tumorales, que puede ocasionar la muerte tanto en animales como en humanos. Los métodos convencionales para el tratamiento del cáncer incluyen los tratamientos quirúrgicos, la administración de agentes quimioterapéuticos, y más recientemente los tratamientos basados en la respuesta inmune, los cuales implican la administración de un anticuerpo o un fragmento del anticuerpo que puede ser conjugado con una unidad terapéutica. Sin embargo, hasta el momento, tales tratamientos han tenido un éxito limitado.

La quimioterapia, a pesar de todas sus limitaciones, es todavía hoy uno de los métodos más extendidos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Por esto, el desarrollo de nuevas terapias antitumorales de aplicabilidad general es uno de los principales objetivos de la química médica.

La incapacidad de los agentes químicos para distinguir entre las células normales de división rápida y las células tumorales puede conducir a una depresión del sistema inmune del paciente. Éste ha sido considerado uno de los principales problemas asociados a la quimioterapia, así como los mecanismos de resistencia desarrollados por las células cancerígenas, que incluyen la inactivación de la vía de p53. Aunque la mayoría de fármacos utilizados actualmente en terapia inducen apoptosis en estas células, al menos parcialmente, a través de la activación de la vía de p53, la proteína p53 se encuentra mutada en la mitad de los tumores analizados, demostrando su importancia en el desarrollo del cáncer.

Se están realizando grandes esfuerzos a fin de mejorar los tratamientos antitumorales, intentando conseguir compuestos activos y selectivos que puedan actuar independientemente de la vía de p53, para administrar a pacientes con cáncer incipiente y recurrente o con metástasis.

Diversos productos naturales bioactivos mantienen como característica común la presencia de anillos tiazólicos en sus estructuras, muchos de ellos poseen propiedades antitumorales. Existe una gran diversidad estructural de péptidos cíclicos, alcaloides poliheterocíclicos, y compuestos de origen biogenético mixto que presentan motivos estructurales de naturaleza bis- tris- y politiazólica. El origen biogenético del anillo de tiazol proviene de la ciclodeshidratación generada por el tiol de la cadena lateral de la cisteína y el enlace peptídico vecino. Sin embargo, la síntesis de estos productos naturales suele ser complicada, tanto mediante la síntesis peptídica en fase sólida, como mediante protocolos de condensación (síntesis de Hantszch) o mediante reacciones de acoplamiento de metales de transición, a partir de productos que ya contengan en sus estructuras el anillo tiazólico.

Algunos compuestos bistiazólicos con capacidad de inhibir la proliferación celular se han descrito con anterioridad. Así, en la WO 2004/016622 se describen compuestos 4,4'-bipiridiil-2,2'-bisoxazoles y 4,4'-bipiridil-2,2'-bistiazoles con actividad antiproliferativa, en particular en las células HT-29.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, actualmente no existe una terapia curativa para la mayoría de tumores, por lo que todavía existe la necesidad de encontrar agentes antitumorales eficaces. En particular, sería de gran interés encontrar terapias antitumorales que puedan actuar de manera independiente de p53.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han encontrado una nueva familia de compuestos con el núcleo de tiazolina sustituido por átomos de flúor y por una gran variedad de anillos aromáticos constituyendo compuestos que contienen en sus estructuras hasta tres y cuatro anillos aromáticos. Estos compuestos presentan propiedades antitumorales (propiedades apoptóticas) contra varias líneas de células cancerígenas, y por lo tanto, son útiles para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

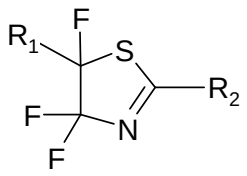
Se ha encontrado que estos compuestos promueven la apoptosis de las células tumorales independientemente de la proteína p53. En condiciones normales, al detectar daño en el ADN, la proteína p53 impide la replicación de la célula parando el ciclo celular en la fase G1, o interfase, permitiendo la reparación del ADN. Sin embargo, induce a la apoptosis si el daño celular es muy extenso y los intentos de reparación fracasan. Cualquier interrupción en la

regulación de la vía de p53, en su funcionamiento o en los genes diana aumenta la posibilidad de formación de tumores.

El hecho de que los compuestos de la presente invención promuevan la apoptosis de las células tumorales independientemente de la proteína p53 es de gran importancia, ya que la alteración de esta vía es una de las principales causas de resistencia en la quimioterapia actual.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son muy ventajosos debido a que reducen los problemas de quimioresistencia asociados a muchos agentes antitumorales y son activos frente a una gran variedad de líneas celulares cancerígenas.

Así, un aspecto de la presente invención está relacionado con la preparación de compuestos de fórmula general (I), o sus sales farmacéuticamente aceptables, o sus estereoisómeros o mezcla de estereoisómeros,



(I)

donde R_1 es un radical seleccionado del grupo que consiste en: fenilo y fenilo mono-, di-, o tri-substituido por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en F, Cl, Br, I, (C_1-C_6)-alquilo, COO-(C_1-C_6)-aquilo y (C_1-C_6)-alcoxilo; y R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además un fenilo substituido en la posición 4 por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en -$O(CH_2)CONH(CH_2)_3CH_3$ y -$OCH_2COOC(CH_3)_3$, bifenil-4-ilo, tiazol-2-ilo y tiazol-2-ilo mono- o di-substituido, en las posiciones 4 o 5, por un radical seleccionado del grupo que consiste en F y fenilo.

El término “bifenilo” significa 1,1’-bifenilo.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" utilizado aquí comprende cualquier sal formada a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluyendo ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. No hay restricción de las sales, excepto que si se utilizan con fines terapéuticos deberán ser farmacéuticamente aceptables.

Todos los compuestos citados pueden tener un centro de asimetría, y por lo tanto, existir en diferentes formas enantioméricas. Todos los isómeros ópticos individuales y estereoisómeros de los compuestos a los que se hace referencia aquí, y las mezclas de ellos, se consideran dentro del ámbito de protección de la presente invención. Así pues, cualquier compuesto referido en el presente documento puede representar a cualquier forma de un racémico, a una o más formas enantioméricas, a una o más formas atropoisoméricas, y a mezclas de ellos.

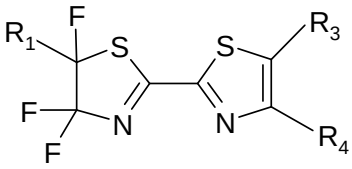
Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que R_2 es un radical seleccionado entre el mismo grupo que R_1, incluyendo además un bifenil-4-ilo, un tiazol-2-ilo y un tiazol-2-ilo mono o di - sustituido, en posiciones 4 o 5, por un radical seleccionado entre el grupo que consiste en F y fenilo.

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_1 se selecciona del grupo que consiste en: fenilo y fenilo mono-sustituido por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en Cl, (C_1-C_4)-alquilo y COO-(C_1-C_4)-alquilo. En una realización más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_1 se selecciona del grupo que consiste en: fenilo, 4-etilfenilo, 4-clorofenilo, 2-metilfenilo, 4-metilfenilo, 2-etoxifenilcarbonilo y 4-etoxifenilcarbonilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en: fenilo y fenilo mono-sustituido por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en Cl, (C_1-C_4)-alquilo y COO-(C_1-C_4)-alquilo. En una realización más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en: fenilo, 4-etilfenilo, 4-clorofenilo, 2-metilfenilo, 4-metilfenilo, 2-etoxifenilcarbonilo y 4-etoxifenilcarbonilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_2 es bifenil-4-ilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_2 se selecciona entre un tiazol-2-ilo y un tiazol-2-ilo substituido, en las posiciones 4 o 5, por un radical seleccionado del grupo que consiste en F y fenilo, teniendo la siguiente fórmula (Ia):



(Ia)

En la fórmula anterior R_1 tiene el mismo significado que en los compuestos de fórmula (I) y R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre F y fenilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_2 es 5-feniltiazol-2-ilo o 4-fluoro-5-feniltiazol-2-ilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos en los que R_2 es fenilo sustituido en la posición 4 por $–O(CH_2)CONH(CH_2)_3CH_3$ o por $-OCH_2COOC(CH_3)_3$.

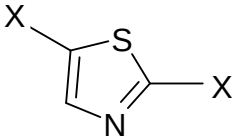
Los compuestos más preferidos de fórmula (I) son los de la Tabla 1:

Tabla 1:

Compuesto (I)	R_1	R_2
I_a	fenilo	4-fluoro-5-feniltiazol-2-ilo
I_b	fenilo	5-feniltiazol-2-ilo
I_c	fenilo	fenilo
I_d	4-clorofenilo	4-clorofenilo
I_e	fenilo	bifenil-4-ilo
I_f	4-metilfenilo	4-etoxicarbonilfenilo

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de manera sencilla y flexible a partir de reactivos comerciales mediante una variedad de procedimientos.

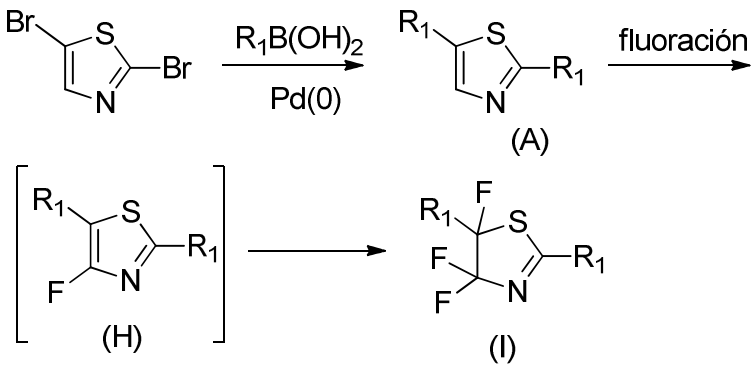
Los compuestos de fórmula (I) donde R_1 es igual a R_2, R_1 y R_2 siendo seleccionados del grupo que consiste en: fenilo, y fenilo mono-, di-, tri-sustituido por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en F, Cl, Br, I, $(C_1$-$C_6)$-alquilo, COO-$(C_1$-$C_6)$-alquilo y $(C_1$-$C_6)$-alcoxilo, se pueden preparar por un procedimiento que comprende en primer lugar llevar a cabo una reacción de acoplamiento de Suzuki de un compuesto de fórmula (II), donde X es un halógeno, con un compuesto de fórmula $R_1B(OH)_2$, donde R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio, seguido por llevar a cabo una reacción de fluoración del compuesto obtenido con un agente de fluoración para dar un compuesto de fórmula (I) con R_1=R_2.



(II)

Preferiblemente, se utiliza el 2,5-dibromotiazol como material de partida, aunque otros 2,5-dihalogenotiazoles también se pueden utilizar como materiales de partida.

El Esquema I ilustra una realización particular del procedimiento de preparación de compuestos simétricos de fórmula (I).



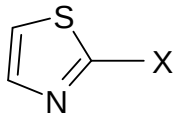
Según el esquema anterior, el 4,4',5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol de fórmula (I) se puede obtener por acoplamiento directo del 2,5-dibromotiazol utilizando un catalizador de paladio tal como $Pd(OAc)_2$, una base tal como carbonato de sodio y un disolvente apropiado tal como un (C_6-C_8)-hidrocarburo aromático, por ejemplo, tolueno. En general, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 90-110 ºC, preferiblemente alrededor de 100 ºC.

La posterior fluoración en el anillo de tiazol del compuesto (A) obtenido con un agente fluorante tal como el bis-(tetrafluoroborato) de 1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabiciclo[2.2.2]octano (Selectfluor®), da lugar a compuestos de fórmula (I) con rendimientos moderados. La fluoración se realiza en un disolvente adecuado tal como acetonitrilo, generalmente a altas temperaturas, en particular a la temperatura de reflujo del disolvente empleado.

El procedimiento de fluoración permite en algunos casos aislar el correspondiente compuesto monofluorado (H).

Preferiblemente, se utiliza un compuesto de fórmula $R_1B(OH)_2$ donde R_1 se selecciona entre fenilo, 4-etilfenilo, 4-metilfenilo, 4-clorofenilo y 2-metilfenilo.

Los compuestos de fórmula (I) con R_1 diferente a R_2; donde R_1 tiene el mismo significado que se menciona anteriormente y R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además bifenil-4-ilo, se pueden preparar a partir de un procedimiento que comprende en primer lugar llevar a cabo un acoplamiento de Suzuki de un compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula $R_2B(OH)_2$, donde R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además bifenil-4-ilo, en presencia de un catalizador de paladio, a continuación, llevar a cabo la halogenación del compuesto obtenido con una fuente de halógeno y el posterior acoplamiento del compuesto obtenido con un compuesto de fórmula $R_1B(OH)_2$, donde R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio y, finalmente, someter el compuesto obtenido a una reacción de fluoración con un agente fluorante para dar el compuesto de fórmula (I) con R_1 diferente a R_2.

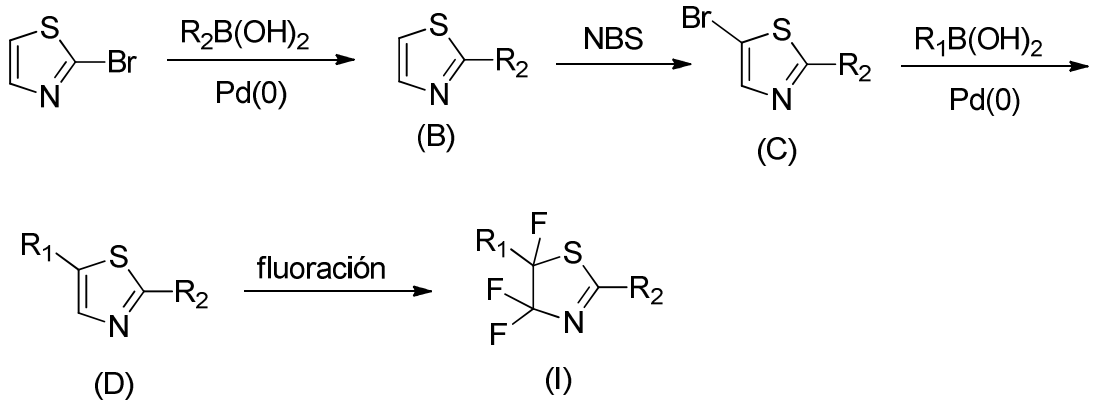


(III)

Preferiblemente, se utiliza el 2-bromotiazol como material de partida, aunque también se pueden utilizar otros 2-halogenotiazoles.

El Esquema II ilustra una realización particular del procedimiento para compuestos no simétricos de fórmula (I)

Esquema II:



Según el esquema anterior, los compuestos no simétricos de fórmula (I) se pueden obtener por acoplamiento de Suzuki del 2-bromotiazol con un ácido borónico de fórmula $R_2B(OH)_2$ utilizando un catalizador de paladio tal como $Pd(OAc)_2$, una base tal como carbonato de sodio y un disolvente apropiado tal como un (C_6-C_8)-hidrocarburo aromático, por ejemplo, tolueno. En general, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 90-110 ºC, preferiblemente a una temperatura cercana a 100 ºC.

El compuesto resultante de formula (B) se puede halogenar en la posición 5. Preferiblemente, la reacción de halogenación es una bromación llevada a cabo con una fuente de bromuro tal como N-bromosuccinimida (NBS), obteniéndose un compuesto fórmula (C).

Seguidamente, se puede introducir un nuevo grupo fenilo en posición 5 por acoplamiento de Suzuki con un compuesto de fórmula $R_1B(OH)_2$, utilizando catalizador de paladio tal como $Pd(OAc)_2$, una base tal como carbonato de sodio y un disolvente apropiado tal como un (C_6-C_8)-hidrocarburo aromático, por ejemplo, tolueno. En general, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 90-110 ºC, preferiblemente a una temperatura cercana a 100 ºC.

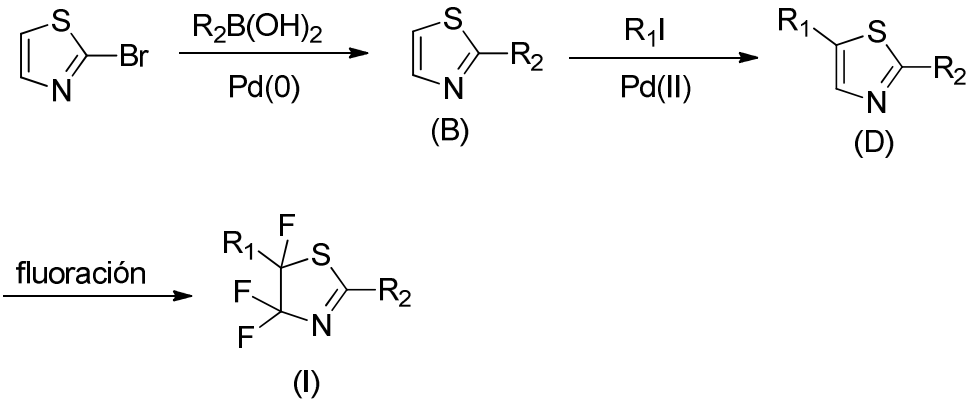
La posterior fluoración en el anillo de tiazol del compuesto (D) obtenido puede llevarse a cabo tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, con un agente fluorante tal como el bis-(tetrafluoroborato) de 1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabiciclo[2.2.2]octano (Selectfluor®), dando lugar a compuestos de fórmula (I) con buenos rendimientos.

Alternativamente, los compuestos de formula (I) con R_1 diferente a R_2 tales como los mencionados anteriormente se pueden preparar por un procedimiento que comprende primero llevar a cabo un acoplamiento de Suzuki del compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula $R_2B(OH)_2$ donde R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además bifenil-4-ilo, donde R_1 tiene el mismo significado que el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio, seguido de someter el compuesto obtenido a una reacción de activación C-H con un compuesto de fórmula R_1I donde R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I); y, finalmente, someter el compuesto obtenido a una reacción de fluoración con un agente fluorante para dar el compuesto de fórmula (I) con R_1 diferente a R_2.

En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) obtenido por este procedimiento es aquél en el que R_1 es 4-metilfenilo y R_2 es 4-etoxicarbonilfenilo.

El Esquema III ilustra una realización particular de este procedimiento.

Esquema III:



Generalmente, el acoplamiento de Suzuki para dar el compuesto (B) se lleva a cabo en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Posteriormente, es posible introducir un nuevo grupo arilo en la posición 5 por reacción de activación C-H con un compuesto de fórmula R_1I según se ha definido anteriormente con un catalizador de paladio como 1,1 'bis (difenilfosfina) ferroceno] dicloropaladio (II), y un base como el carbonato de plata. La reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 50 y 70 ºC, preferiblemente a una temperatura aproximada de 60 ºC.

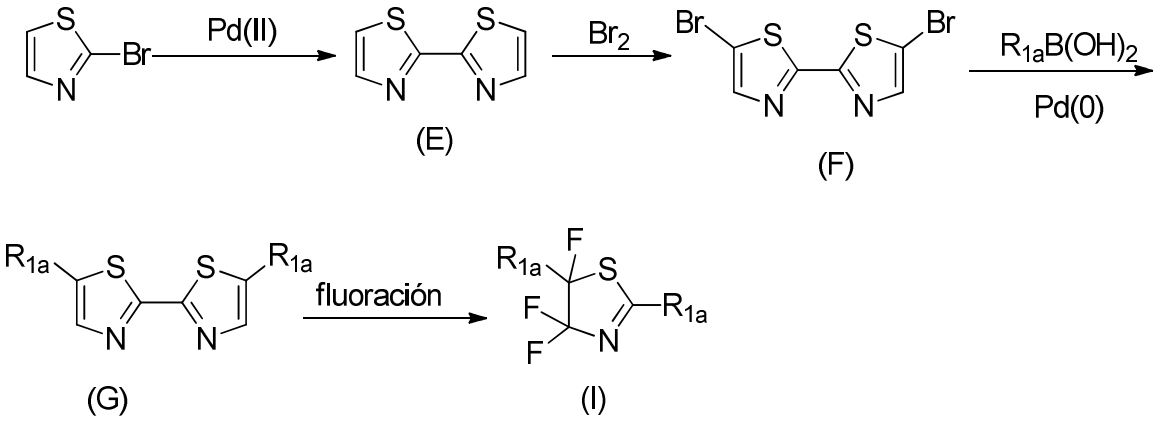
La posterior fluoración en el anillo de tiazol del compuesto (D) obtenido puede llevarse a cabo como se menciona anteriormente.

Finalmente, los compuestos de fórmula (I) donde R_1 es fenilo y R_2 es tiazol-2-ilo substituido por un fenilo se pueden preparar por un procedimiento que comprende llevar a cabo una reacción de homoacoplamiento del compuesto de fórmula (III) en presencia de un catalizador de paladio, la posterior halogenación del compuesto obtenido con una fuente de halogenación, seguido de una reacción de acoplamiento de Suzuki del compuesto obtenido con un compuesto de fórmula $R_{1a}B(OH)_2$, donde R_{1a} es fenilo, en presencia de catalizador de paladio, seguido de llevar a cabo una reacción de fluoración del compuesto obtenido con un agente fluorante para dar el compuesto de fórmula (I) donde R_1 es fenilo y R_2 es tiazol-2-ilo substituido por un fenilo.

Preferiblemente, la reacción de halogenación es una reacción de bromación.

El Esquema (IV) ilustra una realización particular del procedimiento.

Esquema (IV):



Según el esquema anterior, el 4,4',5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol de fórmula (I) puede obtenerse por homoacoplamiento del 2-bromotiazol utilizando un catalizador de paladio, tal como el $Pd(OAc)_2$, una base tal como la diisopropiletilamina y un disolvente apropiado tal como el tolueno. El 2,2'-bistiazol resultante de fórmula (E) se puede halogenar con una fuente de halógeno, tal como una fuente de bromo, por ejemplo, bromo molecular, para dar lugar al compuesto 5,5'-dibromo-2,2'-bistiazol de fórmula (F).

Seguidamente, se lleva a cabo un acoplamiento de Suzuki con un ácido borónico de fórmula $R_{1a}B(OH)_2$ utilizando un catalizador de paladio tal como tetraquis(trifenilfosfina)-paladio (0), una base tal como carbonato de sodio y un disolvente apropiado tal como tolueno, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente para llevar a cabo el acoplamiento de Suzuki.

La posterior fluoración del compuesto (G) obtenido previamente se lleva a cabo en las condiciones descritas anteriormente utilizando un agente fluorante tal como bis-(tetrafluoroborato) de 1-clorometil-4-fluoro-1,4-diazoniabiciclo[2.2.2]octano (Selectfluor®).

Los procedimientos de preparación descritos anteriormente, se pueden modificar para obtener compuestos enantiopuros así como mezclas de estereoisómeros. Es posible preparar estereoisómeros específicos o mezclas específicas por varios métodos, incluyendo entre ellos el uso de reactivos estereoespecíficos o mediante la introducción de centros quirales en los compuestos durante su procedimiento de preparación. Además, es posible separar los estereoisómeros una vez se ha preparado el compuesto por técnicas de resolución estándar bien conocidas por la persona experta en la materia.

La preparación de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) puede llevarse a cabo por métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse a partir de los compuestos primigenios los cuales contienen un centro reactivo básico o ácido, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se preparan al hacer reaccionar las formas ácido o base libres de esos compuestos con la cantidad estequiométrica de una base o un ácido farmacéuticamente aceptables en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los mismos.

Los compuestos de la presente invención pueden encontrarse en forma cristalina, tanto como compuestos libres de disolvente o como solvatos (por ejemplo, hidratos) y se entiende que ambas formas están dentro del ámbito de protección de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos dentro de la técnica.

Una característica importante de los compuestos de la presente invención es su capacidad para inhibir el crecimiento celular en las líneas tumorales testadas, y en particular su capacidad para inducir citotoxicidad promoviendo apoptosis. Tal y como se muestra en los Ejemplos, los compuestos de la presente invención presentan propiedades antitumorales sobre distintas líneas celulares de cáncer así como en células primarias de leucemia linfocítica crónica.

Así, otro aspecto de la presente invención está relacionado con la preparación de compuestos de fórmula general (I), o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus esteroisómeros o mezcla de esteroisómeros para su utilización como medicamento.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con la preparación de compuestos de fórmula (I), o sus sales farmacéuticamente aceptables, o sus esteroisómeros o mezcla de esteroisómeros para uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, ya que son activos frente a todos los tipos de cáncer que han sido testados.

En una realización particular, se proporcionan compuestos de fórmula (I), o sus sales farmacéuticamente aceptables, o sus esteroisómeros o mezcla de esteroisómeros para uso en el tratamiento y/o prevención de tumores con P53 mutada.

Preferiblemente, los compuestos de la presente invención son especialmente activos frente a los siguientes tipos de cáncer: leucemia, linfoma, cáncer cervical, adenocarcinoma de mama, glioblastoma y carcinoma hepatocelular. Más preferiblemente, el cáncer es leucemia o linfoma. Aún más preferiblemente, el tipo de linfoma o de leucemia son las neoplasias de células B.

Este aspecto de la invención también se puede formular como el uso de los compuestos de fórmula (I) tal como se han definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del cáncer en un mamífero, incluyendo el ser humano.

La invención también se refiere a un método de tratamiento del cáncer en un mamífero, incluyendo el ser humano, que sufre o es susceptible de padecer un cáncer, en particular a los tipos de cáncer ya mencionados, dicho método

comprende la administración al citado paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar de la misma manera que otros agentes quimioterapéuticos ya conocidos. Se pueden utilizar solos o en combinación con otros compuestos bioactivos adecuados.

Otro aspecto de la presente invención, está relacionado con una composición farmacéutica que contenga una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención, junto con cantidades apropiadas de excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa aquí, se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar en cierto grado, uno o más de los síntomas de la enfermedad a la que se dirige. La dosis particular de compuesto administrado según esta invención será por supuesto determinada por las condiciones particulares que rodean el caso, incluyendo el compuesto administrado, la ruta de administración, la condición particular que se está tratando, y las consideraciones similares.

La expresión "excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a materiales farmacéuticamente aceptables, composiciones o vehículos. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. Debe ser también apto para el uso en contacto con tejidos u órganos de humanos y animales sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

El tratamiento quimioterapéutico que se deriva de la presente invención es un nuevo enfoque de la terapia del cáncer y tiene la ventaja de ser útil para el tratamiento de varios tipos de cáncer.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 1 µM hasta 10 µM en la línea celular Jurkat (linfocitos T procedentes de una leucemia aguda de tipo T, con TP53 mutado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 2 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 2 µM hasta 40 µM en las células HeLa (línea celular epitelial procedente de un carcinoma cervical, con p53 inactivado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 3 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 2 µM hasta 40 µM en las células TK6 (línea celular linfoblástica humana con TP53 salvaje, no-mutada) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 4 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 2 µM hasta 40 µM en la línea celular Ramos (linfocitos B procedentes de un linfoma de Burkitt, con TP53 mutado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 5 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 2 µM hasta 60 µM en las células MDA-MB-231 (línea celular epitelial de adenocarcinoma de mama, con TP53 mutado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 6 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 2 µM hasta 60 µM en las células T98-G (línea celular procedente de un glioblastoma, con TP53 mutado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 7 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 2 µM hasta 40 µM en las células Hep3B (línea celular de tipo epitelial, diferenciada, procedente de carcinoma hepatocelular, con TP53 delecionado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por el ensayo de cristal violeta y se expresa como el porcentaje de células viables en relación a las células control no tratadas.

La FIG. 8 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 1 µM hasta 20 µM en linfocitos B de Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) con TP53 salvaje (B-LLC p53S), a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas). Se muestra un paciente representativo.

La FIG. 9 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_c desde 5 µM hasta 40 µM en linfocitos B (puntos negros) y linfocitos T (puntos blancos) con TP53 salvaje (B y T p53S), a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexin-V FITC negativas). Se muestra un paciente representativo.

La FIG. 10 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_a desde 1 µM hasta 20 µM en células de LLC con TP53 mutado (B-LLC p53M), a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas). Se muestra un paciente representativo.

La FIG. 11 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_g desde 5 µM hasta 40 µM en la línea celular Jurkat (linfocitos T procedentes de una leucemia aguda de tipo T, con TP53 mutado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 12 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_g desde 5 µM hasta 40 µM en las células HeLa (línea celular epitelial procedente de un carcinoma cervical, con TP53 inactivado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 13 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_h desde 5 µM hasta 40 µM en la línea celular Jurkat (linfocitos T procedentes de una leucemia aguda de tipo T, con TP53 mutado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

La FIG. 14 muestra la dosis-respuesta del compuesto I_h desde 5 µM hasta 40 µM en las células HeLa (línea celular epitelial procedente de un carcinoma cervical, con TP53 inactivado) a las 24 horas de incubación. La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas).

EJEMPLOS

Salvo indicación contraria, todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón y material de vidrio seco. Los reactivos comerciales se utilizaron sin purificación adicional. Las temperaturas de reacción se controlaron mediante un modulador de la temperatura IKA. La cromatografía en capa fina se realizó en cromatofolios de gel sílice 60 F254 (Merck) y el revelado mediante visualización con luz UV o con una solución de $KMnO_4$. Para la purificación en columna cromatográfica flash se utilizó gel sílice (tamaño de partícula 35-70 µm). Se utilizaron columnas de fase reversa Symmetry C18 de dimensiones 4.6 mm × 150 mm, 5 µm (columna A) de HPLC. Los análisis por HPLC se realizaron en un aparato compuesto de dos bombas de suministro de disolvente, un inyector automático y un detector de longitud de onda variable y un controlador del sistema (Breeze V3.20). Los análisis por MALDI-TOF se realizaron utilizando la matriz ACH. Los espectros de IR se obtuvieron con un espectrofotómetro Thermo Nicolet Nexus y las bandas de absorción se indican en cm^{-1}. Los puntos de fusión se realizaron en un aparato Büchi Melting Point B-540.

Ejemplo 1: Preparación del 2,2'-bistiazol (compuesto E)

En un matraz de vidrio (secado en estufa) provisto de un condensador y mantenido bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron 2-bromotiazol (12.88 g, 78.53 mmol), N,N-diisopropiletilamina (13.8 mL, 78.80 mmol), acetato de paladio (0.90 g, 3.93 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (12.67 g, 39.30 mmol). El matraz se purgó tres veces con nitrógeno y seguidamente se adicionó el tolueno (170 mL). La mezcla de reacción se agitó a 105 ºC durante 24h. Una vez completada la reacción, se diluyó con H_2O (150 mL) y se realizaron extracciones con diclorometano(DCM) (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (instantánea) (SiO_2, hexano:AcOEt, 9:1), obteniéndose 8.20 g de 2,2'-bistiazol como un sólido amarillo claro (63% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.90 (d, J = 3.1 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 3.1 Hz, 2H) ppm. EM (IE): m/z (%): 168 (M^+, 100).

Ejemplo 2: Preparación del 5,5'-dibromo-2,2'-bistiazol (compuesto F)

A una solución de 2,2'-bistiazol (84 mg, 0.5 mmol) en DCM anhidro (5 mL) se añadió lentamente Br_2 (103 µL, 2 mmol). La reacción se agitó durante 10 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió $NaHCO_3$ (21 mg, 0.25 mmol) y la mezcla se agitó durante 38 h. Trascurrido este tiempo, se diluyó con DCM (25 mL) y se realizaron lavados con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (4 x 50 mL), con H_2O (4 x 50 mL) y con Na_2SO_3 (4 x 50 mL).

Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 1:1), obteniéndose 138 mg de 5,5'-dibromo-2,2'-bistiazol como un sólido marrón (85% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.75 (s, 2H) ppm. ^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 161.91, 145.12, 112.03 ppm. IR (NaCl): ν 1695, 1468, 1142, 1132, 998, 918, 899, 850, 745, 631, 604, 474 cm^{-1}. UV-Vis. [λ_{max} nm (log ε), MeOH]: 341.50 (4.43). EM (IE): m/z (%): 326 (M^+, 100), 167 (76.13), 83 (4.47), 57 (47.51).

Ejemplo 3: Preparación del 5,5'-difenil-2,2'-bistiazol (compuesto G)

En un matraz de vidrio (secado en estufa) provisto de un condensador y mantenido bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron 5,5'-dibromo-2,2'-bistiazol (440 mg, 1.35 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (94.4 mg, 0.081 mmol). El matraz se purgó tres veces con nitrógeno y seguidamente se adicionó el tolueno (13.5 mL). Se adicionó una solución acuosa de Na_2CO_3 2 M (5.4 mL) y el ácido fenilborónico (373.2 mg, 2.97 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 80 ºC durante 12 h. Cuando se completó la reacción, los sólidos inorgánicos se filtraron sobre un lecho de tierra de diatomeas (Celite®) y el residuo obtenido se lavó varias veces con diclorometano, a continuación se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: acetato de etilo (AcOEt), 8:2). Seguidamente, se realizó una cristalización en tolueno para rendir 356 mg de 5,5'-difenil-2,2'-bistiazol (82% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.06 (s, 2H), 7.63 (m, 4H), 7.45 (m, 4H), 7.38 (m, 2H) ppm. ^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 160.2, 141.4, 139.4, 130.9, 129.3, 128.9, 126.8 ppm. IR (NaCl): ν 3064, 1477, 1442, 1394, 1332 cm^{-1}. UV-Vis. [λ_{max} nm (log ε), MeOH]: 377.50 (4.43), 254.00 (4.05), 201.00 (4.60). Punto de fusión: 237.4-239.0 ºC. EM (IE): m/z (%): 320 (M^+, 100). HRMS (ESI): calculado para $C_{18}H_{13}N_2S_2$: 321.0515; encontrado: 321.0518.

Ejemplo 4: Preparación del 4-fluoro-5-fenil-2-(4,4,5-trifluoro-5-fenil-4,5-dihidrotiazol-2-il)tiazol (compuesto (I) con R_1 = fenilo y R_2 = 4-fluoro-5-feniltiazol-2-ilo, compuesto (I_a))

A una solución de 5,5'-difenil-2,2'-bistiazol (100 mg, 0.31 mmol) en acetonitrilo (ACN) (8 mL) se añadió Selectfluor® (232.8 mg, 0.62 mmol). La reacción se agitó durante 12 h a la temperatura de reflujo. Pasado este tiempo se añadió de nuevo más Selectfluor® (232.8 mg, 0.62 mmol) y se agitó durante 12 h a la temperatura de reflujo. A continuación, se diluyó con éter (50 mL) y se realizaron lavados con H_2O (3 x 25 mL) y una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (3 x 25 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 8:2), obteniéndose 10 mg de 4-fluoro-5-fenil-2-(4,4,5-trifluoro-5-fenil-4,5-dihidrotiazol-2-il)tiazol como un sólido blanco (22% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.70 (m, 4H), 7.48 (m, 6H) ppm. ^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -79.98 (dd, J = 219.06, 9.07 Hz),-103.63 (s), -103.73 (dd, J = 219.05, 7.85 Hz), -131.52 (m) ppm. EM (IE): m/z (%): 395.02 (M^+, 100). HRMS (ESI): calculado para $C_{18}H_{10}F_4N_2S_2$: 395.0294; encontrado: 395.0285.

Ejemplo 5: Preparación del 5-fenil-2-(4,4,5-trifluoro-5-fenil-4,5-dihidrotiazol-2-il)tiazol (compuesto (I) con R_1 = fenilo y R_2 = 5-feniltiazol-2-ilo, compuesto (I_b))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 5,5'-difenil-2,2'-bistiazol (100 mg, 0.31 mmol) y Selectfluor® (465.6 mg, 1.24 mmol), obteniéndose 20 mg de 5-fenil-2-(4,4,5-trifluoro-5-fenil-4,5-dihidrotiazol-2-il)tiazol como un sólido blanco (27% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.24 (s, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.49 (m, 6H) ppm. ^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -79.65 (dd, J = 218.74, 9.14 Hz), -103.39 (dd, J = 218.73, 7.89 Hz), -131.58 (m) ppm. EM (IE): m/z (%): 377.03 (M^+, 100).

Ejemplo 6: Preparación del 2,5-difeniltiazol (compuesto (A) con R_1 = fenilo, compuesto (A_c))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2,5-dibromotiazol (200 mg, 0.80 mmol) y el ácido fenilborónico (220.8 mg, 1.76 mmol) durante 18 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 78 mg de 2,5-difeniltiazol como un sólido amarillento (42% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 237.89 (M^+, 100). HRMS (ESI): calculado para $C_{15}H_{11}NS$: 238.0685; encontrado: 238.0685.

Ejemplo 7: Preparación del 2,5-bis(4-etilfenil)tiazol (compuesto (A) con R_1 = 4-etilfenilo, compuesto (A_h))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2,5-dibromotiazol (250 mg, 1.00 mmol) y el ácido 4-etilfenilborónico (339.6 mg, 2.20 mmol) durante 3 h a 100 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 242 mg de 2,5-bis(4-etilfenil)tiazol como un sólido amarillento (83% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 293 (M^+, 100). HRMS (ESI): $(M+H)^+$ calculado para $C_6H_3N_2S_2I_2$: 294.1311; encontrado: 294.1313.

Ejemplo 8: Preparación del 2,5-bis(4-clorofenil)tiazol (compuesto (A) con R_1 = 4-clorofenilo, compuesto (A_d))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2,5-dibromotiazol (250 mg, 1.00 mmol) y el ácido 4-clorofenilborónico (361.5 mg, 2.20 mmol) durante 3 h a 100 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 236 mg de 2,5-bis(4-clorofenil)tiazol como un sólido blanco (78% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 305.9 (M^+, 100). 307.9 (M^+, 69). HRMS (ESI): calculado para $C_{15}H_9Cl_2NS$: 304.9906; encontrado: 304.9902.

Ejemplo 9: Preparación del 2,5-di-o-toliltiazol (compuesto (A) con R_1 = 2-metilfenilo, compuesto (A_i))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2,5-dibromotiazol (264 mg, 1.08 mmol) y el ácido o-tolilfenilborónico (325.0 mg, 2.39 mmol) durante 3 h a 100 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 8:2), obteniéndose 218 mg de 2,5-di-o-toliltiazol como un sólido amarillo (74% de rendimiento). HRMS (ESI): calculado para $C_{17}H_{16}NS$: 266.0998; encontrado: 266.1005.

Ejemplo 10: Preparación del 2,5-di-p-toliltiazol (compuesto (A) con R_1 = 4-metilfenilo, compuesto (A_g))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2,5-dibromotiazol (250 mg, 1.00 mmol) y el ácido p-tolilfenilborónico (317.3 mg, 2.20 mmol) durante 3 h a 100 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 8:2), obteniéndose 202 mg de 2,5-di-p-toliltiazol como un sólido amarillo (73% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 265.1 (M^+, 100). HRMS (ESI): calculado para $C_{17}H_{16}NS$: 266.0998; encontrado: 266.0999.

Ejemplo 11: Preparación del 4,4,5-trifluoro-2,5-difenil-4,5-dihidrotiazol (compuesto (I) con R_1 = R_2 = fenilo, compuesto (I_c))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 2,5-difeniltiazol (50 mg, 0.18 mmol) y Selectfluor® (164.1 mg, 0.44 mmol) en ACN durante 2 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 9:1), obteniéndose 15 mg de 4,4,5-trifluoro-2,5-difenil-4,5-dihidrotiazol como un sólido blanco (28% de rendimiento). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.04-7.98 (m, 2H), 7.74-7.60 (m, 2H), 7.56-7.52 (m, 2H), 7.50-7.41 (m, 4H) ppm. ^{19}F-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -79.76 (dd, J = 218.04, 10.26 Hz), -103.77 (dd, J = 218.14, 8.32 Hz), -130.96 (m) ppm. HRMS (ESI): calculado para $C_{15}H_{10}F_3NS$: 293.0486; encontrado: 293.0553.

Ejemplo 12: Preparación del 4,4,5-trifluoro-2,5-bis(4-etilfenil)-4,5-dihidrotiazol (compuesto (I) con R_1 = R_2 = 4-etilfenilo, compuesto (I_h))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 2,5-bis(4-etilfenil)tiazol (100 mg, 0.34 mmol) y Selectfluor® (305.0 mg, 0.82 mmol) en ACN durante 1 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 9:1), obteniéndose 21 mg de 4,4,5-trifluoro-2,5-bis(4-etilfenil)-4,5-dihidrotiazol como un sólido blanco (18% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.92 (d, J = 8.24 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 7.96 Hz, 2H), 7.32 (dd, J = 21.08, 8.18 Hz, 4H), 2.73 (qd, J = 15.20, 7.59, 7.59, 7.57 Hz, 4H), 1.28 (td, J = 7.63, 3.81, 3.81 Hz, 6H) ppm. ^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -79.43 (dd, J = 217.43, 9.85 Hz), -103.79 (dd, J = 217.38, 9.14 Hz), -130.03 (m) ppm. HRMS (ESI): calculado para $C_{19}H_{18}F_3NS$: 377.0316; encontrado: 377.0385.

Ejemplo 13: Preparación del 4,4,5-trifluoro-2,5-bis(4-clorofenil)-4,5-dihidrotiazol (compuesto (I) con R_1 = R_2 = 4-clorofenilo, compuesto (I_d))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 2,5-bis(4-clorofenil)tiazol (200 mg, 0.65 mmol) y Selectfluor® (584.5 mg, 1.57 mmol) en ACN durante 3 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 95:5), obteniéndose 47 mg de 4,4,5-trifluoro-2,5-bis(4-clorofenil)-4,5-dihidrotiazol como un sólido blanco (21% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.94-7.92 (m, 2H), 7.6 (d, J=8.1Hz, 2H), 7.50-7.53 (m, 2H), 7.44-7.46 (d, J=8.5Hz, 2H) ppm. ^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -79.70 (dd, J = 218.48, 9.93 Hz), -103.70 (dd, J = 218.44, 8.20 Hz), -131.38 (m) ppm. EM (IE): m/z (%): 361.1 (M^+, 100). 363.1 (M^+, 69.4), 362.1 (M^+, 18.4), 365.0 (M^+, 14.1), 364.1 (M^+, 12.1) HRMS (ESI): calculado para $C_{15}H_8Cl_2F_3NS$: 360.9707; encontrado: 360.9782.

Ejemplo 14: Preparación del 4,4,5-trifluoro-2,5-di-(o-tolil)-4,5-dihidrotiazol (compuesto (I) con R_1 = R_2 = 2-metilfenilo, compuesto (I_i))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 2,5-di-o-toliltiazol (197 mg, 0.74 mmol) y Selectfluor® (632.0 mg, 1.78 mmol) en ACN durante 5 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 95:5), obteniéndose 78 mg de 4,4,5-trifluoro-2,5-di-(o-tolil)-4,5-dihidrotiazol como un sólido blanco (33% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.79 (d, 1H), 7.72 (d, 2H), 7.48 (m, 1H), 7.33 (m, 4H), 7.23 (m,1H) , 2.69 (s,3H), 2.61(d, 3H) ppm. ^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -78.41 (dd, J

= 218.81, 8.88 Hz), -97.51 (dd, J = 218.85, 10.69 Hz), -126.87 (m) ppm. HRMS (ESI): $(M+H)^+$: calculado para $C_{17}H_{15}F3NS$: 322.0872; encontrado: 322.0874.

Ejemplo 15: Preparación del 4,4,5-trifluoro-2,5-di-(p-tolil)-4,5-dihidrotiazol (compuesto (I) con $R_1 = R_2$ = 2-metilfenilo, compuesto (I_g))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 2,5-di-p-toliltiazol (100 mg, 0.36 mmol) y Selectfluor® (304.4 mg, 0.86 mmol) en ACN durante 10 h a 80 ºC. El residuo se purificó por HPLC semipreparativo, obteniéndose 35 mg de 4,4,5-trifluoro-2,5-di-(p-tolil)-4,5-dihidrotiazol como un sólido blanco (30% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.89 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.37 – 7.27 (m, 4H), 2.46 (s, 3H), 2.41 (s, 3H). ^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -79.39 (dd, J = 217.6, 9.7 Hz), -102.69 (dd), -130.08 (m). HRMS (ESI): $(M+H)^+$: calculado para $C_{17}H_{15}F_3NS$: 322.0872; encontrado: 322.0871

Ejemplo 16: Preparación del 2-(bifenil-4-il)tiazol (compuesto (B) con R_2 = bifenil-4-ilo, compuesto (B_e))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2-dibromotiazol (500 µL, 5.61 mmol) y el ácido bifenilborónico (1.22 g, 6.17 mmol) durante 12 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 675 mg de 2-(bifenil-4-il)tiazol como un sólido blanco (51% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 237 (M+, 100). HRMS (ESI): (M+H)+ calculado para $C_{15}H_{11}NS$: 238.0612; encontrado: 238.0683.

Ejemplo 17: Preparación del 2-(bifenil-4-il)-5-bromotiazol (compuesto (C) con R_2 = bifenil-4-ilo, compuesto (C_e))

A una solución de 2-(bifenil-4-il)tiazol (540 mg, 2.28 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 mL) se añadió una solución de N-bromosuccinimida (448 mg, 2.50 mmol) en acetonitrilo anhidro (10 mL). La reacción se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una solución acuosa del 10% de Na_2SO_3 (10 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Trascurrido este tiempo, se realizaron extracciones con acetato de etilo (4 x 25 mL) y los extractos orgánicos se lavaron con una solución acuosa saturada de NaCl (4 x 50 ml), se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 9:1), obteniéndose 500 mg de 2-(bifenil-4-il)-5-bromotiazol como un sólido blanco (69% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 317 (M^+, 100), 315 (M^+, 95), 316 (M^+, 17.1). HRMS (ESI): $(M+H)^+$: calculado para $C_{15}H_{10}BrNS$: 315.9717; encontrado: 315.9786.

Ejemplo 18: Preparación del 2-(bifenil-4-il)-5-feniltiazol (compuesto (D) con R_1 = fenilo y R_2 = bifenil-4-ilo, compuesto (D_e))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2-(bifenil-4-il)-5-bromotiazol (311 mg, 0.98 mmol) y el ácido fenilborónico (955 mg, 1.27 mmol) durante 4 h a 100 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 8:2), obteniéndose 300 mg de 2-(bifenil-4-il)-5-feniltiazol como un sólido blanco (98% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 313 (M^+, 100). HRMS (ESI): $(M+H)^+$: calculado para $C_{21}H_{15}NS$: 314.0925; encontrado: 314.0995.

Ejemplo 19: Preparación del 4,4,5-trifluoro-2-(bifenil-4-il)-5-fenil-4,5-dihidrotiazol tiazol (compuesto (I) con R_1 = fenilo y R_2 = bifenil-4-ilo, compuesto (I_e))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 2-(bifenil-4-il)-5-feniltiazol (150 mg, 0.48 mmol) y Selectfluor® (429 mg, 1.15 mmol) en ACN durante 4.5 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 95:5), obteniéndose 14 mg de 4,4,5-trifluoro-2-(bifenil-4-il)-5-fenil-4,5-dihidrotiazol como un sólido blanco (8% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.11 – 8.04 (m, 2H), 7.78 – 7.70 (m, 4H), 7.68 – 7.63 (m, 2H), 7.53 – 7.40 (m, 6H). ^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -79.45 (dd, J = 218.0, 10.0 Hz), -103.63 (dd, J = 217.9, 8.7 Hz), -130.77 (m). HRMS (ESI): $(M+H)^+$: calculado para $C_{21}H_{14}F_3NS$: 370.0872; encontrado: 370.0868.

Ejemplo 20: Preparación del 4-(tiazol-2-il)benzoato de etilo ((compuesto (B) con R_2 = 4-etoxicarbonilfenilo, compuesto (B_f))

El compuesto del título se preparó de manera análoga al Ejemplo 3 a partir del 2-dibromotiazol (200 µL, 2.24 mmol) y el ácido 4-etoxicarbonilfenilborónico (493 mg, 2.69 mmol) durante 3 h a 100 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 365 mg de 4-(tiazol-2-il)benzoato de etilo como un sólido blanco (70% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 233.1 (M^+, 100).

Ejemplo 21: Preparación del 4-(5-p-toliltiazol-2-il)benzoato de etilo ((compuesto (D) con R_1 = 4-metilfenilo y R_2 = 4-etoxicarbonilfenilo, compuesto (D_f))

En un tubo cerrado se añadieron 4-(tiazol-2-il)benzoato de etilo (100 mg, 0.43 mmol), 4-metiliodobenceno (111 mg, 0.51 mmol), carbonato de plata (236 mg, 0.86 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (11.2 mg, 0.86 mmol). El matraz se purgó tres veces con nitrógeno y seguidamente se adicionó el acetonitrilo (1.8 mL). La mezcla se agitó bajo atmosfera de Ar durante 12 h a 60 ºC. Cuando se completó la reacción, los sólidos inorgánicos se filtraron sobre un lecho de tierra de diatomeas (Celite®) y el residuo obtenido se lavó varias veces con diclorometano, a continuación se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 115.8 mg de 4-(5-p-toliltiazol-2-il)benzoato de etilo como un sólido blanco cristalino del (84% de rendimiento). EM (IE): m/z (%): 323.1 (M^+, 100). HRMS (ESI): calculado para $C_{19}H_{18}NO_2S$: 324.1053; encontrado: 324.1055.

Ejemplo 22: Preparación del 4-(4,4,5-trifluoro-5-(p-tolil)-4,5-dihidrotiazol-2-il) benzoato de etilo ((compuesto (I) con R_1 = 4-metilfenilo y R_2 = 4-etoxicarbonilfenilo, compuesto (I_f))

Preparación de manera análoga al Ejemplo 4 a partir del 4-(5-p-toliltiazol-2-il)benzoato de etilo (50 mg, 0.15 mmol) y Selectfluor® (131.3 mg, 0.35 mmol) en ACN durante 2.5 h a 80 ºC. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 95:5), obteniéndose 10 mg de 4-(4,4,5-trifluoro-5-(p-Tolil)-4,5-dihidrotiazol-2-il) benzoato de etilo como un sólido blanco (17% de rendimiento). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.19 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.06 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.43 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.42 (s, J = 10.9 Hz, 3H), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H).^{19}F-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -80.45 (dd, J = 219.2, 9.7 Hz), -104.41 (dd, J = 219.1, 8.5 Hz), -130.39 (m). HRMS (ESI): calculado para $C_{19}H_{16}F_3NO_2S$: 380,0854; encontrado: 380.0925.

Ejemplo 23: Preparación del 2-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi)acetato de *terc*-butilo

A una solución de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol (440 mg, 2,00 mmol) en THF anhidro (40 mL) se añadió NaH (160 mg, 4.00 mmol). La reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió 2-bromoacetato de *terc*-butilo a la mezcla y se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, se realizaron extracciones con acetato de etilo (4 x 20 mL) y los extractos orgánicos se lavaron con una solución acuosa saturada de NaCl (3 x 20 mL), se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano:AcOEt, 9:1), obteniéndose 96.3 mg de 2-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi) acetato de *terc*-butilo como un sólido blanco (74% de rendimiento). RMN^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 7.86 – 7.59 (m, 2H), 6.95 – 6.78 (m, 2H), 4.53 (s, 2H), 1.33 (s, 12H) ppm.

Ejemplo 24: Preparación del 2-(4-(tiazol-2-il)fenoxi)acetato de *terc*-butilo

A una solución de 2-bromotiazol (265 µL, 2,97 mmol), 2-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi) acetato de *terc*-butilo (1,19 g, 3,56 mmol), KCl (664.7 mg, 8.91 mmol) en una mezcla de 4:1 de tolueno (20 mL) / EtOH (5 mL) se añadió una solución acuosa de Na_2CO_3 2M (11,8 mL). El matraz se purgó tres veces con nitrógeno y seguidamente se adicionó el paladio (0) tetrakis(trifenilfosfina) (346.2 mg, 0.30 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 100 º C durante 4 h. Cuando se completó la reacción, los sólidos inorgánicos se filtraron sobre un lecho de tierra de diatomeas (Celite®) y el residuo obtenido se lavó varias veces con diclorometano, a continuación se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 825.2 mg de 2-(4-(tiazol-2-il)fenoxi)acetato de *terc*-butilo como un sólido blanco (95% de rendimiento). RMN^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.95 – 7.86 (m, 2H), 7.81 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.99 – 6.85 (m, 1H), 4.57 (s, 2H), 1.49 (s, 1H) ppm.

Ejemplo 25: Preparación del 2-(4-(5-(4-clorofenil)tiazol-2-il)fenoxi)acetato de terc-butilo

A una solución de 2-(4-(tiazol-2-il)fenoxi)acetato de terc-butilo (360 mg, 1.23 mmol) y 1-cloro-4-yodobenceno (412.5 mg, 1.73 mmol) en acetonitrilo anhidro (ACN, 5,2 mL), PPh_3 (32.74 mg, 124 µmol) y Ag_2CO3 (685.2 mg, 2.46 mmol). El matraz se purgó tres veces con nitrógeno y seguidamente se adicionó el $PdCl_2$dppf (50.5 mg, 0.062 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 ºC durante 72 h. Cuando se completó la reacción, los sólidos inorgánicos se filtraron sobre un lecho de tierra de diatomeas (Celite®) y el residuo obtenido se lavó varias veces con diclorometano, a continuación se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 322.5 mg de 2-(4-(5-(4-clorofenil)tiazol-2-il)fenoxi) acetato de terc-butilo como un sólido amarillo (76% de rendimiento). RMN^{1}H (CDCl3, 400 MHz): δ 7.94 (s, 1H), 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.56 – 7.46 (m, 2H), 7.42 – 7.35 (m, 2H), 7.01 – 6.93 (m, 2H), 4.57 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 1.50 (s, 9H) ppm.

Ejemplo 26: Preparación del 2-(4-(5-(4-clorofenil)-4,4,5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol-2-il)fenoxi)acetato de *terc*-butilo, (compuesto (I_g))

A una solución de 2-(4-(5-(4-clorofenil)tiazol-2-il) fenoxi)acetato de *terc*-butilo (78 mg, 190 µmol) en ACN anhidro (5 mL) se añadió Selectfluor ® (170.2 mg, 456 µmol). La reacción se agitó durante 3 h a 60 ºC. Cuando se completó la

reacción, se diluyó con éter dietílico (50 mL) y se lavó con H_2O (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 8.6 mg de 2-(4-(5-(4-clorofenil)-4,4,5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol-2-il)fenoxi)acetato de *terc*-butilo como un sólido blanco (10% de rendimiento). RMN^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 1.50 (s, 9H) ppm. RMN^{19}F ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -78.53 (dd, *J* = 217.0, 9.8 Hz), -103.16 (dd, *J* = 217.4, 7.6 Hz), -131.00 (m, *J* = 7.5 Hz) ppm.

Ejemplo 27: Preparación del ácido 2-(4-(5-(4-clorofenil)-4,4,5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol-2-il)fenoxi) acético

A una solución de 2-(4-(5-(4-clorofenil)tiazol-2-il) fenoxi)acetato de *terc*-butilo (160 mg, 370 µmol) en ACN anhidro (7 mL) se añadió Selectfluor ® (327.8 mg, 880 µmol). La reacción se agitó durante 15 h a 80 ºC. Cuando se completó la reacción, se diluyó con éter etílico y se lavó con H_2O (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 9:1), obteniéndose 52.2 mg del ácido 2-(4-(5-(4-clorofenil)-4,4,5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol-2-il)fenoxi) acético como un sólido blanco (35% de rendimiento) RMN^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 4.78 (s, 2H) ppm. RMN^{19}F ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -78.73 (dd, *J* = 217.2, 9.6 Hz), -103.25 (dd, *J* = 217.1, 8.6 Hz), -131.00 (m, *J* = 9.2 Hz) ppm.

Ejemplo 28: Preparación de N-butil-2-(4 -(5-(4-clorofenil)-4,4,5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol-2-il) fenoxi)acetamida, compuesto (I_h))

A una solución del ácido 2-(4-(5-(4-clorofenil) -4,4,5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol-2-il) fenoxi)acético (45.7 mg, 114 µmol) en DMF (5.7 mL) se añadieron los agentes de acoplamiento HOBt (18,4 mg, 136 µmol) y EDC•HCl (26,1 mg, 136 µmol). A continuación, se añadió butilamina (13.6 µL, 136 µmol) y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción, se diluyó con diclorometano (20 mL) y se lavó con H_2O (3 x 5 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica de tipo flash (SiO_2, hexano: AcOEt, 6:4), obteniéndose 18.1 mg de *N*-butil-2-(4-(5-(4-clorofenil)-4,4,5-trifluoro-4,5-dihidrotiazol-2-il) fenoxi)acetamida (35% de rendimiento). RMN^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.03 – 7.93 (m, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.09 – 7.01 (m, 2H), 6.48 (bs, 1H), 4.58 (s,), 3.53 – 3.26 (m, 2H), 1.59 – 1.50 (m, 2H), 1.41 – 1.34 (m, 2H), 0.98 – 0.90 (m, 3H) ppm. RMN^{19}F ($CDCl_3$, 400 MHz): δ -78.81 (dd, *J* = 217.4, 9.8 Hz), -103.30 (dd, *J* = 217.3, 8.8 Hz), -130.96 (m, *J* = 9.3 Hz) ppm.

Ejemplo 29 Ensayos biológicos para la detección de la actividad antitumoral

Se llevó a cabo una exploración de la actividad antitumoral de los compuestos de fórmula (I) en las células Jurkat y se realizó un estudio de los compuestos más activos en las células HeLa, células TK6, células Ramos, células MDA-MB-231, células T98-G, células Hep3B y células procedentes de enfermos con leucemia linfocítica crónica (LLC).

Cultivo celular

Las líneas celulares humanas Jurkat (linfocitos T procedentes de una leucemia aguda de células T), Ramos (linfocitos B de un linfoma de Burkitt) y TK6 (línea celular linfoblástica humana), HeLa (línea celular epitelial de adenocarcinoma cervical), MDA-MB-231 (línea celular epitelial de carcinoma de mama), T98-G (línea celular de glioblastoma) y Hep3B (línea celular epitelial de carcinoma hepatocelular) se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares.

Las líneas celulares Jurkat, Ramos, TK6 y CLL se crecieron en medio RPMI-1640, y las células HeLa en medio DMEM que contiene el 10% de suero fetal inactivado (de ternera), 1% glutamina, y 1% penicilina-estreptomicina. La línea celular MDA-MB-231 se creció en medio DMEM/F-12 que contiene adicionalmente el 1% de piruvato. Las células Hep 3B se mantuvieron en medio MEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal. Todos los tipos celulares fueron cultivados a 37 ºC en atmósfera humedecida y con un 5% de dióxido de carbono.

Pacientes con LLC y aislamiento celular

Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica procedentes de pacientes con LLC de la Unidad de Hematología en el IDIBELL-Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España. Se diagnosticó la LLC de acuerdo con los criterios clínicos y de laboratorio estándares. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes, de acuerdo con el Comité Ético del Hospital de Bellvitge. Se realizó una purificación de los leucocitos mononucleados mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque (Seromed, Berlin, Germany). La pureza de las muestras de LLC fue evaluada por citometría de flujo con anti-CD3 conjugado con aloficocianina (allophycocyanin, APC) y anti-CD19 conjugado con ficoeritrina (phycoerythrin, PE) (Becton Dickinson, Frankiln Lakes, NJ, USA). Se analizaron los resultados por citometría de flujo y el análisis se llevó a cabo con el programa informático adecuado.

Reactivos

Se obtuvo el dimetil sulfóxido (DMSO) de Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). La anexina V-FITC y el yoduro de propidio ("propidium iodine", PI) se obtuvieron de Bender MedSystems (Vienna, Austria). La anexina V-APC se obtuvo de eBioscience (St Diego, USA). Cristal violeta se obtuvo de Sigma-Aldrich

Análisis de la apoptosis por citometría de flujo

Se lavaron 0.25-0.3x10^6 células en tampón fosfato salino ("phosphate-buffered saline", PBS), se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión de anexina y se incubaron con 1 µl de Anexina V-Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) o Anexina V-Allophycocyanin (APC). Después de una incubación de 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se añadió 100 µl de tampón de unión de anexina con 5 µl de yoduro de propidio ("propidium iodide", PI) (20 µg/ml) justo antes del análisis por citometría de flujo. Los datos se analizaron con el programa adecuado. La viabilidad celular se midió por el análisis de la externalización de la fosfatidilserina y la incorporación de PI y se expresa como el porcentaje de células anexina-V y PI doble negativas.

La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo general del sistema inmune para la eliminación de células no deseadas. Está caracterizada por la condensación de la cromatina, una reducción del volumen celular, y un corte del ADN llevado a cabo por endonucleasas que da lugar a fragmentos de longitud oligonucleosomal. La apoptosis va también acompañada por una pérdida de la asimetría de la membrana fosfolipídica, resultando en la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular. La expresión de fosfatidilserina en la superficie celular juega un papel importante en el reconocimiento y eliminación de las células apoptóticas que llevan a cabo los macrófagos. Éste es uno de los eventos más tempranos del proceso apoptótico. El método para la detección de células apoptóticas mediante la citometría de flujo utiliza la unión de la anexina V marcada con un fluorocromo a la fosfatidilserina.

Además, la membrana plasmática se perturba durante la apoptosis tardía pero también durante la necrosis, ya que se vuelve permeable a sustancias como el PI. El PI se intercala entre los ácidos nucleicos de doble cadena y es una molécula fluorescente con un peso molecular de 668.4 Da que se puede usar para teñir el ADN. El PI es excluido por las células viables pero puede penetrar las membranas celulares de células moribundas y muertas.

Por lo tanto, las células viables son anexina-V y PI doble negativas, las apoptóticas tempranas son anexina-V positivas y PI negativas mientras que las células apoptóticas tardías son anexina-V y PI doble positivas. Estas tres poblaciones son indicativas de apoptosis. Una cuarta población de células PI positivas correlaciona con las células necróticas.

Ensayo de la viabilidad celular por la técnica de cristal violeta

Esta técnica permite cuantificar las células viables después de ser sometidas a un tratamiento tóxico y consiste en la tinción celular con el colorante cristal violeta. El cristal violeta solamente penetra en células vivas, por lo que es una buena técnica para determinar viabilidad celular de células de crecimiento en adhesión.

Después de la incubación de las células en placas de 12 o 24 pozos con el correspondiente tratamiento, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con PBS. Las células se tiñieron y fijaron con 0.2% (p/v) de cristal violeta en etanol al 2% durante 30 minutos. Tras unos cuantos lavados con PBS o agua destilada para eliminar el exceso de colorante, las placas se secaron y las células se lisaron con SDS al 10%. Mediante un análisis de espectrofotometría, se midió la absorbancia a 595 nm.

Los resultados se calcularon como el porcentaje de células viables tratadas en relación a las células control (células incubadas en ausencia de tratamiento) a los tiempos indicados.

Resultados

1. Ensayo exploratorio de la viabilidad celular en células Jurkat

Se realizó una exploración del efecto de los compuestos I_a – I_f en la línea celular Jurkat (linfocitos T procedentes de una leucemia aguda de células T) a una única dosis de 40 µM durante una incubación de 24 horas. La estructura de los compuestos I_a – I_f se indica en la Tabla 1.

Se ensayaron dos compuestos adicionales como compuestos comparativos: compuesto (A_d) se trata de un compuesto con la fórmula (A) con R_1 = R_2 = 4-clorofenilo, y el compuesto (H_d) que corresponde a la monofluoración del compuesto (A) donde R_1 = R_2 = 4-clorofenilo.

Se escogieron las células Jurkat entre otras líneas celulares tumorales leucémicas porque tienen la proteína TP53 mutada.

Todos los compuestos mencionados se disolvieron en la mínima cantidad de DMSO necesario para que quedaran totalmente disueltos. Se midió la viabilidad celular por citometría de flujo. Se verificó que el DMSO por sí solo no disminuía la viabilidad celular. De esta manera, todos los efectos observados en la viabilidad celular eran debidos a la actividad de estos compuestos.

Los resultados se resumen en la Tabla 2: "+" significa baja actividad; "++" significa buena actividad y "+++" significa muy buena actividad; "-" significa que no es activo.

Tabla 2:

Compuesto	Actividad biológica
I_a	+++
I_b	+++
I_c	++
I_d	+++
I_e	+
I_f	++
comparativo H_d	-
comparativo A_d	-

2. Estudio de la dosis-respuesta de los compuestos I_a, I_b, I_c, I_d, I_e y I_f.

El efecto de los compuestos I_a, I_b, I_c, I_d, I_e y I_f se estudió en mayor profundidad en diferentes líneas celulares tumorales.

Se realizó un análisis de la dosis-respuesta en las células Jurkat con TP53 mutado y en las células HeLa con p53 inactivado.

La viabilidad celular se midió por citometría de flujo y se expresa como porcentaje de células no apoptóticas (anexina-V negativas) respecto a las células no tratada a las 24 horas de incubación. Por lo tanto, valores por debajo del 100% son indicativos de apoptosis o pérdida de viabilidad celular.

Las células Jurkat (que son linfocitos T procedentes de una leucemia aguda tipo T, con TP53 mutado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 1 µM a 40 µM para cada compuesto durante 24 horas. Todos los compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 1).

Las células HeLa (línea celular epitelial de adenocarcinoma cervical con p53 inactivado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 2 µM a 40 µM para cada compuesto durante 24 horas. Todos los compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 2).

La IC_{50} a las 24 horas se calculó para cada compuesto usando el análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan en la Tabla 3 como el porcentaje de células no apoptóticas (anexina-V negativas) respecto a las células no tratadas a las 24 horas.

Tabla 3:

Compuesto	IC_{50} (µM)	
	Jurkat	HeLa
I_a	4	20
I_b	3	8
I_c	8	10
I_d	3,5	1,75
I_e	20	3,5
I_f	8	17

Además, dos compuestos representativos (I_a y I_d) se ensayaron en las líneas celulares con TP53 mutado Ramos, MDA-MB-231, T98-G y Hep3B, y en la línea celular tumoral TK6 con TP53 salvaje. El estudio se completó utilizando células B primarias procedentes de pacientes de LLC.

Las células TK6 (línea celular linfoblástica humana con TP53 salvaje) se incubaron con un intervalo de dosis desde 2 µM hasta 40 µM de los compuestos I_a y I_d durante 24 horas. Estos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 3).

Las células Ramos (linfocitos B procedentes de un linfoma de Burkitt con TP53 mutado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 2 µM hasta 40 µM de los compuestos I_a y I_d durante 24 horas. Estos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 4).

Las células MDA-MB-231 (línea celular epitelial de carcinoma de mama con TP53 mutado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 2 µM hasta 60 µM de los compuestos I_a y I_d durante 24 horas. Estos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 5).

Las células T98-G (línea celular de glioblastoma con TP53 mutado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 2 µM hasta 60 µM de los compuestos I_a y I_d durante 24 horas. Estos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 6).

Las células Hep3B (línea celular de carcinoma hepatocelular con TP53 delecionado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 2 µM hasta 40 µM de los compuestos I_a y I_d durante 24 horas. Estos compuestos indujeron una pérdida de la viabilidad celular de una forma dosis-dependiente medida por la técnica de cirstal violeta (cf. FIG. 7).

Los linfocitos B procedentes de pacientes de LLC con TP53 salvaje se incubaron con un intervalo de dosis desde 1 µM hasta 20 µM de los compuestos I_a y I_d durante 24 horas. Estos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 8).

Los linfocitos procedentes de pacientes de LLC con p53 salvaje se incubaron con un intervalo de dosis desde 5 µM hasta 40 µM del compuesto I_c durante 24 horas. Estos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo, en los linfocitos B mientras que los linfocitos T fueron menos sensibles (cf. FIG. 9).

Los linfocitos B procedentes de pacientes de LLC con TP53 mutado se incubaron con un intervalo de dosis desde 1 µM hasta 20 µM de los compuestos I_a y I_d durante 24 horas. Estos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 10).

La IC_{50} de los compuestos I_a y I_d se calculó a las 24 horas usando el análisis por citometría de flujo, excepto para las células Hep3B que se midió por el ensayo de cristal violeta. Los resultados se expresan en la Tabla 4 como el porcentaje de células viables respecto a las células no tratadas a las 24 horas.

Tabla 4:

Compuesto	IC_{50} (µM)					
	TK6	Ramos	MDA-MB-231	T98-G	Hep3B	Células de LLC
I_a	8	4,5	16	50	14	4
I_d	2,5	3,5	4	7,5	5	5

Estos resultados demuestran que la familia de compuestos tiazólicos de la presente invención tiene actividad antitumoral. Además, la apoptosis inducida por estos tiazoles es independiente de p53, una diferencia importante respecto a la mayoría de fármacos utilizados en terapia de cáncer, los cuales inducen parada de ciclo celular y apoptosis a través de la activación de p53.

Ejemplo 30: Ensayos biológicos para la detección de la actividad antitumoral de los compuestos I_g y I_h.

El efecto de los compuestos I_g y I_h ha sido estudiado en dos líneas celulares de cáncer. Se realizó un análisis de dosis-respuesta en la línea celular Jurkat con TP53 mutado y en las células HeLa con p53 inactivado.

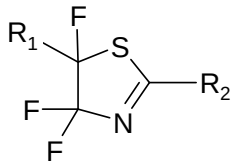
La viabilidad se midió por citometría de flujo y se expresa como el porcentaje de células no apoptóticas (annexina-V APC negativas) en relación a las células control no tratadas. Por esto, valores inferiores al 100% son indicativos de apoptosis o pérdida de viabilidad celular.

Las células Jurkat (que son linfocitos T procedentes de una leucemia aguda tipo T, con TP53 mutado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 5 µM a 40 µM para cada compuesto durante 24 horas. Ambos compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 11 y 13).

Las células HeLa (línea celular epitelial de adenocarcinoma cervical con p53 inactivado) se incubaron con un intervalo de dosis desde 5 µM a 40 µM para cada compuesto durante 24 horas. Todos los compuestos indujeron apoptosis de una forma dosis-dependiente medida por citometría de flujo (cf. FIG. 12 y 14).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un estereoisómero del mismo, o una mezcla de estereoisómeros,



(I)

donde:

R_1 es un radical seleccionado del grupo que consiste en: fenilo y fenilo mono-, di-, o tri-substituido por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en F, Cl, Br, I, (C_1-C_6)-alquilo, COO-(C_1-C_6)-aquilo y (C_1-C_6)-alcoxilo; y

R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además un fenilo substituido en la posición 4 por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en $-O(CH_2)CONH(CH_2)_3CH_3$ y $-OCH_2COOC(CH_3)_3$, bifenil-4-ilo, tiazol-2-ilo y tiazol-2-ilo mono- o di-substituido, en las posiciones 4 o 5, por un radical seleccionado del grupo que consiste en F y fenilo.

2. Compuesto de fórmula (I) definido en la reivindicación 1, donde R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además un bifenil-4-ilo, un tiazol-2-ilo, y un tiazol-2-ilo mono o di-sustituido, en posiciones 4 o 5, por un radical seleccionado entre el grupo que consiste en F y fenilo.

3. Compuesto según la reivindicación 2, donde R_1 se selecciona del grupo que consiste en: fenilo y fenilo mono-substituido por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en Cl, (C_1-C_4)-alquilo y COO-(C_1-C_4)-alquilo.

4. Compuesto según la reivindicación 3, donde R_1 se selecciona del grupo que consiste en: fenilo, 4-etilfenilo, 4-clorofenilo, 2-metilfenilo, 4-metilfenilo, 2- etoxifenilcarbonilo y 4-etoxifenilcarbonilo.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en: bifenil-4-ilo, 5-feniltiazol-2-ilo, 4-fluoro-5-feniltiazol-2-ilo, fenilo y fenilo mono- substituido por un radical independientemente seleccionado del grupo que consiste en Cl, (C_1-C_4)-alquilo y COO-(C_1-C_4)-alquilo.

6. Compuesto según la reivindicación 5, donde R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en: fenilo, 4-etilfenilo, 4-clorofenilo, 2-metilfenilo, 4-metilfenilo, 2-etoxifenilcarbonilo y 4-etoxifenilcarbonilo.

7. Compuesto según la reivindicación 1, donde R_2 es fenilo sustituido en la posición 4 por $–O(CH_2)CONH(CH_2)_3CH_3$ o por $-OCH_2COOC(CH_3)_3$.

8. Compuesto según la reivindicación 2, que se selecciona de la siguiente tabla:

Compuesto (I)	R_1	R_2
I_a	fenilo	4-fluoro-5-feniltiazol-2-ilo
I_b	fenilo	5-feniltiazol-2-ilo
I_c	fenilo	fenilo
I_d	4-clorofenilo	4-clorofenilo
I_e	fenilo	Bifenil-4-ilo
I_f	4-metilfenilo	4-etoxicarbonilfenilo

9. Compuesto de fórmula (I), definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso como medicamento.

10. Compuesto del compuesto de fórmula (I), definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero, incluyendo el ser humano.

11. Compuesto para uso según la reivindicación 10, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, linfoma, cáncer cervical, cáncer de mama, glioblastoma y carcinoma hepatocelular.

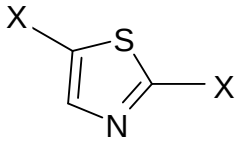
12. Compuesto para uso según la reivindicación 11, donde el cáncer es leucemia o linfoma.

13. Compuesto para uso según la reivindicación 12, donde la leucemia o linfoma son las neoplasias de células B.

14. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica efectiva del compuesto de fórmula (I), definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, junto con cantidades suficientes de excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

15. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I), definido en la reivindicación 1, que comprende:

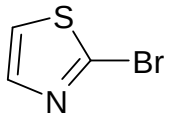
a) primero someter compuesto de fórmula (II) donde X es un halógeno,



(II)

a un acoplamiento de Suzuki con un compuesto de fórmula $R_1B(OH)_2$, donde R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio, seguido por someter el compuesto obtenido a una reacción de fluoración con un agente fluorante para obtener el compuesto de fórmula (I) con $R_1 = R_2$; o alternativamente,

b) primero someter el compuesto de formula (III)



(III)

a un acoplamiento de Suzuki con un compuesto de fórmula $R_2B(OH)_2$, donde R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además bifenil-4-ilo, y R_1 tiene el mismo significado para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio, seguido de halogenación del compuesto obtenido con una fuente de halógeno, posterior acoplamiento del compuesto obtenido con un compuesto de fórmula $R_1B(OH)_2$ donde R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio y, finalmente, someter el compuesto obtenido a una reacción de fluoración con un agente fluorante para obtener el compuesto de fórmula (I) con R_1 diferente a R_2; o alternativamente,

c) primero someter el compuesto de fórmula (III) a un acoplamiento de Suzuki con un compuesto de fórmula $R_2B(OH)_2$, donde R_2 es un radical seleccionado del mismo grupo que R_1, incluyendo además bifenil-4-ilo y R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio, a continuación someter el compuesto obtenido a una reacción de activación C-H con un compuesto de fórmula R_1I donde R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio y, finalmente, someter el compuesto obtenido a una reacción de fluoración con un agente fluorante para obtener el compuesto de fórmula (I) con R_1 diferente a R_2; o alternativamente,

d) someter el compuesto de fórmula (III) a una reacción de homoacoplamiento en presencia de un catalizador de paladio, halogenar después el compuesto obtenido con una fuente de halógeno, a continuación someter el compuesto obtenido a un acoplamiento de Suzuki con un compuesto de fórmula $R_1B(OH)_2$, donde R_1 tiene el mismo significado que para el compuesto (I), en presencia de un catalizador de paladio y, finalmente, someter el compuesto obtenido a una reacción de fluoración con un agente fluorante para dar el compuesto de fórmula (I) donde R_1 es fenilo y R_2 es tiazol-2-ilo sustituido por fenilo: y

e) opcionalmente, convertir los compuestos obtenidos en cualquiera de los procesos a) a d) en sales farmacéuticamente aceptables por reacción del compuesto (I) con un ácido farmacéuticamente aceptable o una base farmacéuticamente aceptable para obtener la correspondiente sal farmacéuticamente aceptable.

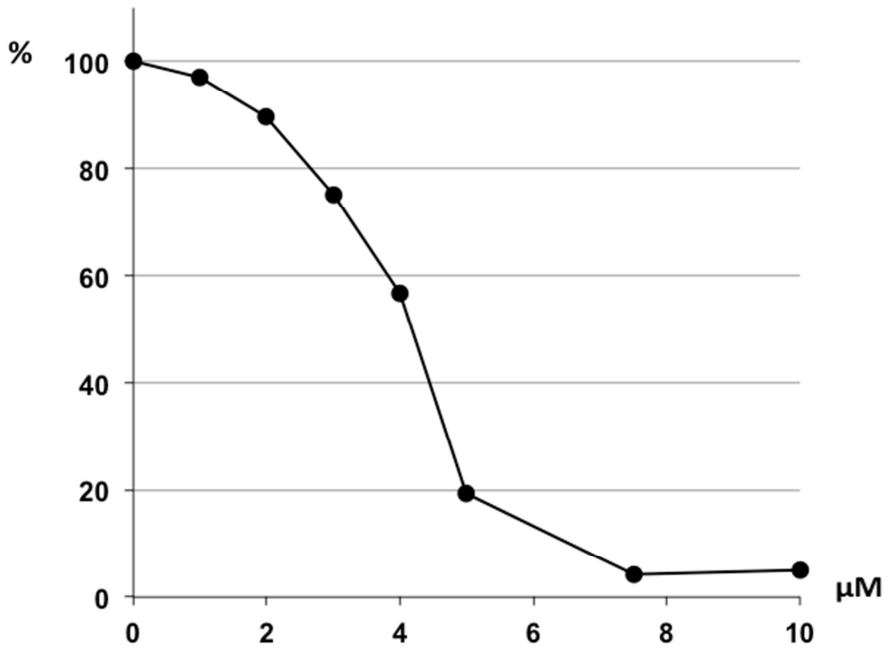


FIG. 1: **Jurkat**

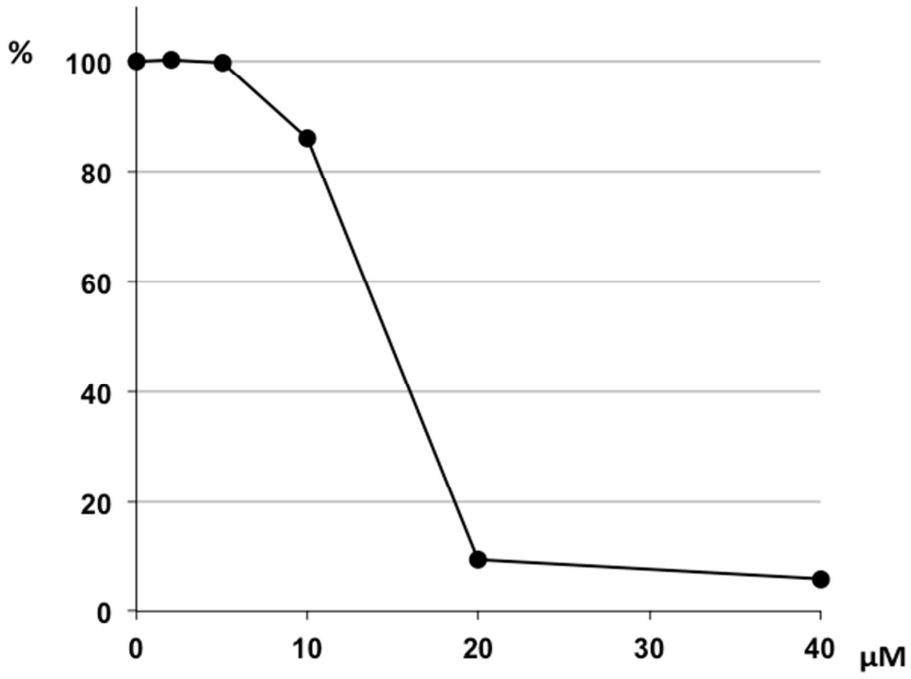


FIG. 2: HeLa

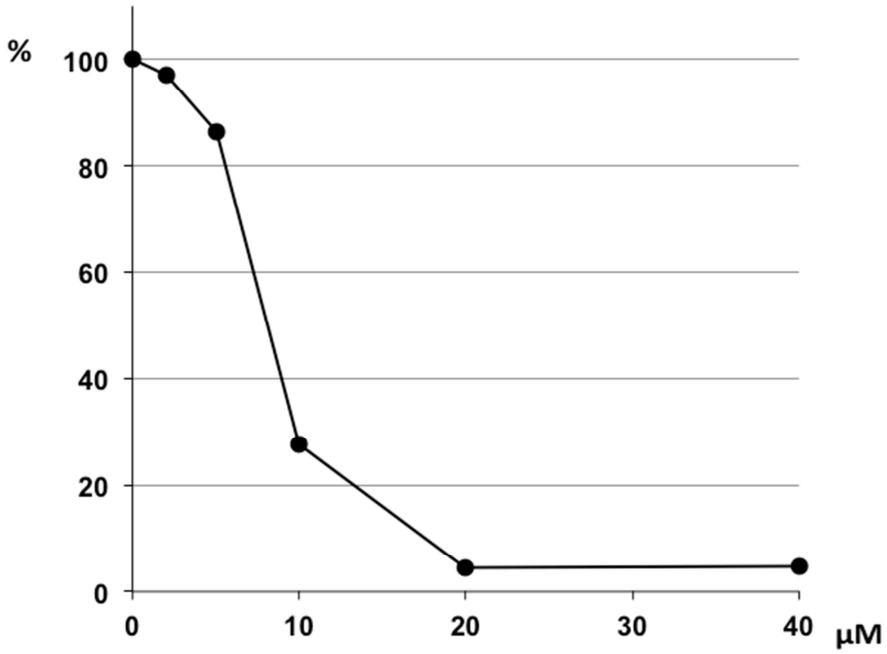


FIG. 3: TK6

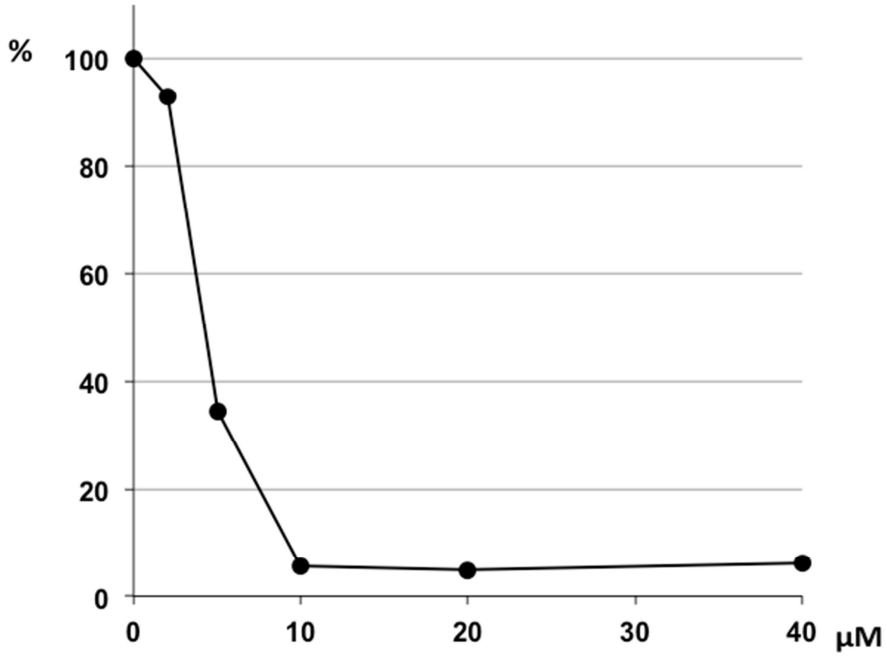


FIG. 4: Ramos

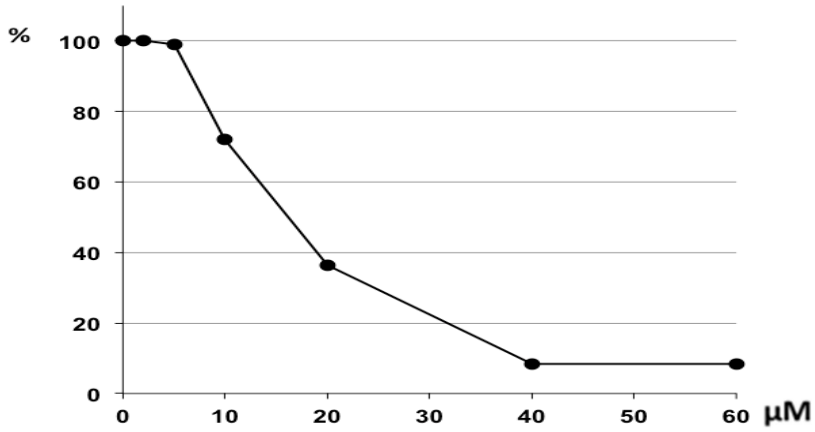


FIG. 5: MDA-MB-231

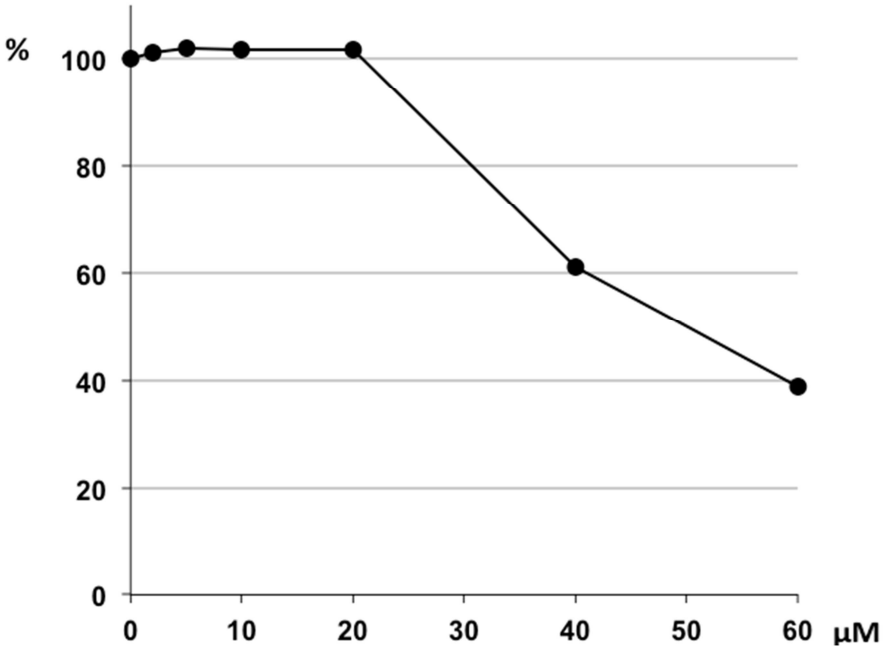


FIG. 6: T98-G

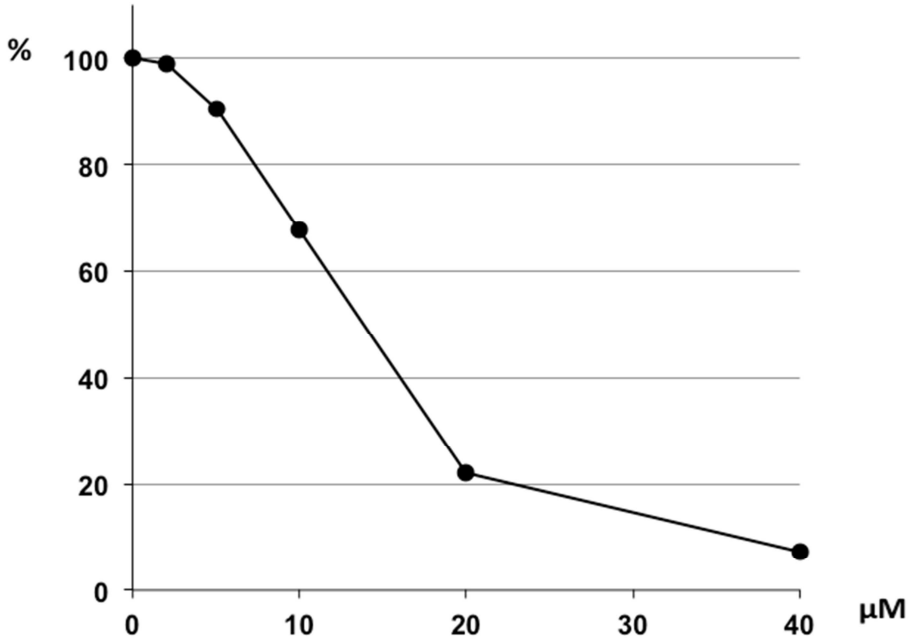


FIG. 7: Hep3B

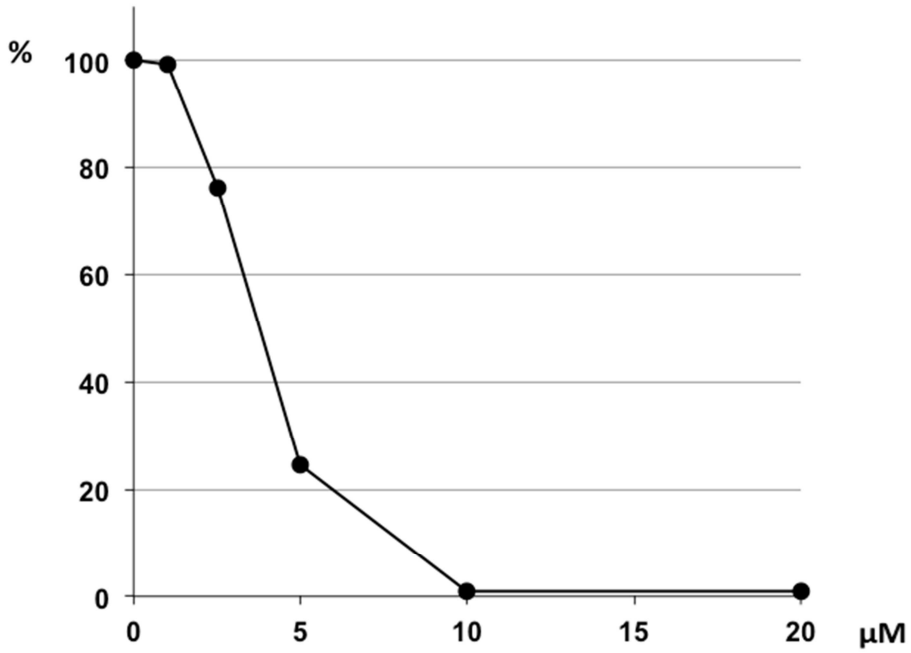


FIG. 8: B-LLC TP53S

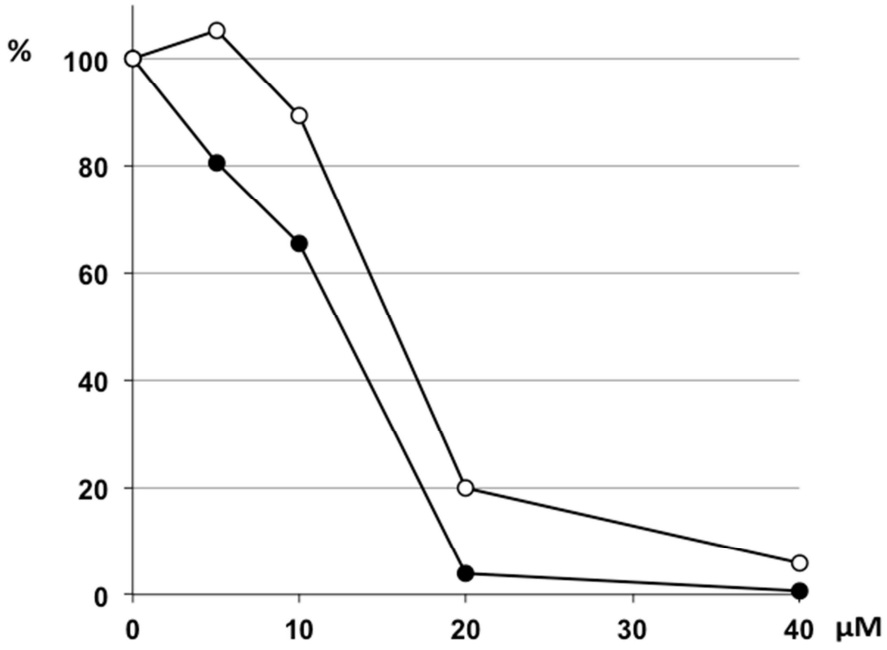


FIG. 9: B y T TP53S

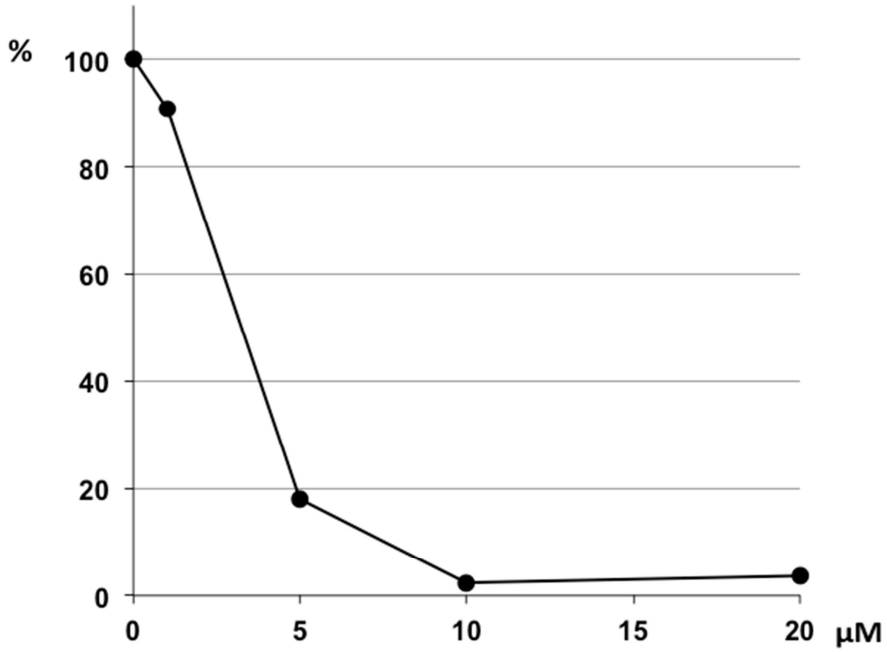


FIG. 10: B-LLC TP53M

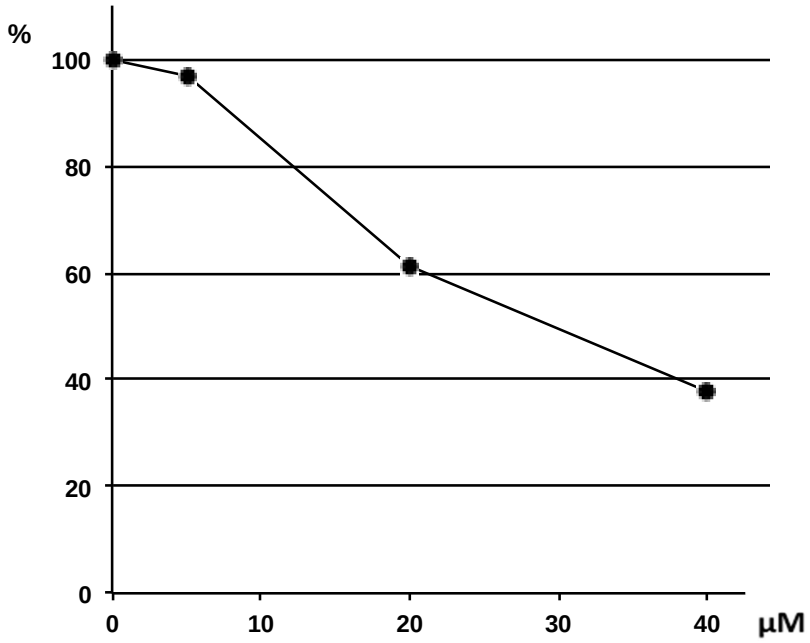


FIG. 11 Jurkat

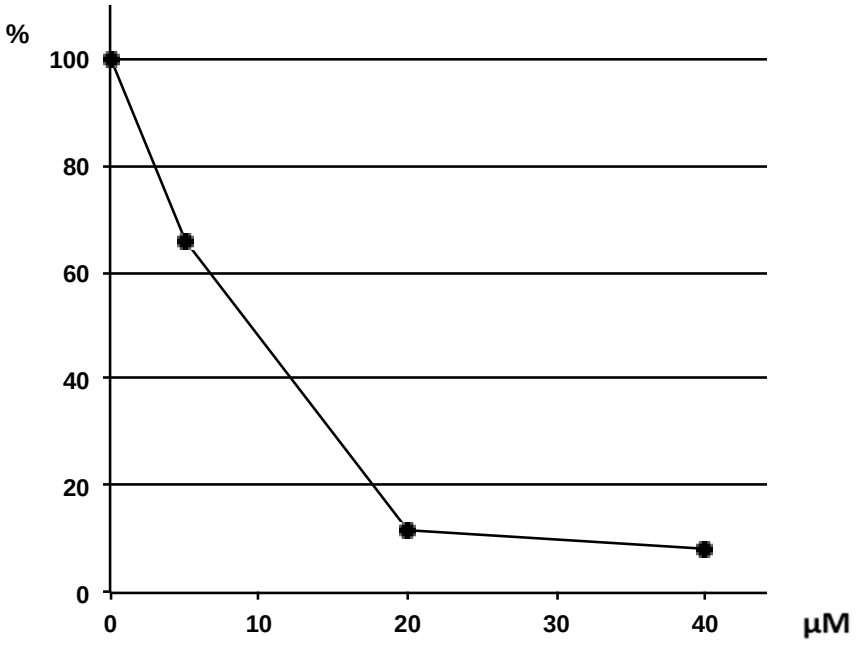


FIG. 12 HeLa

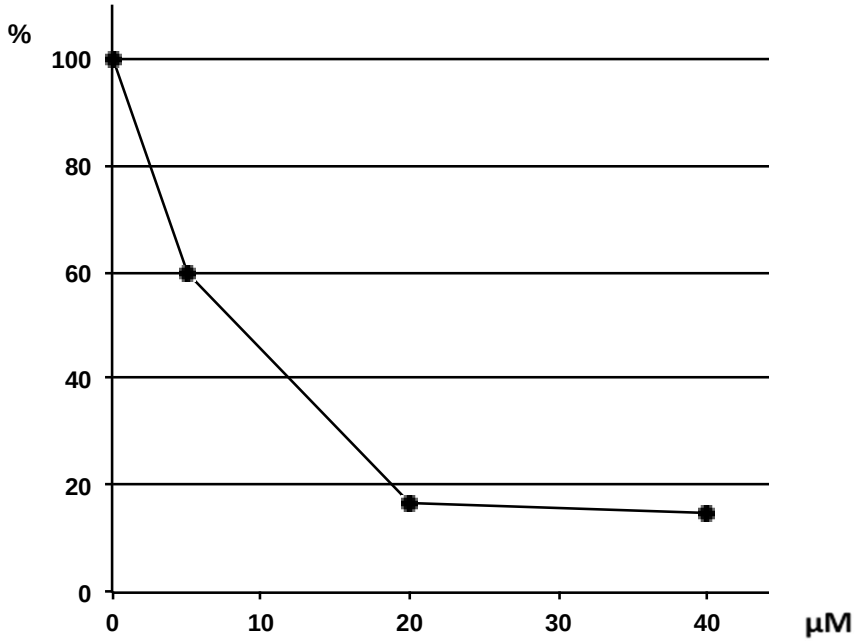


FIG. 13 Jurkat

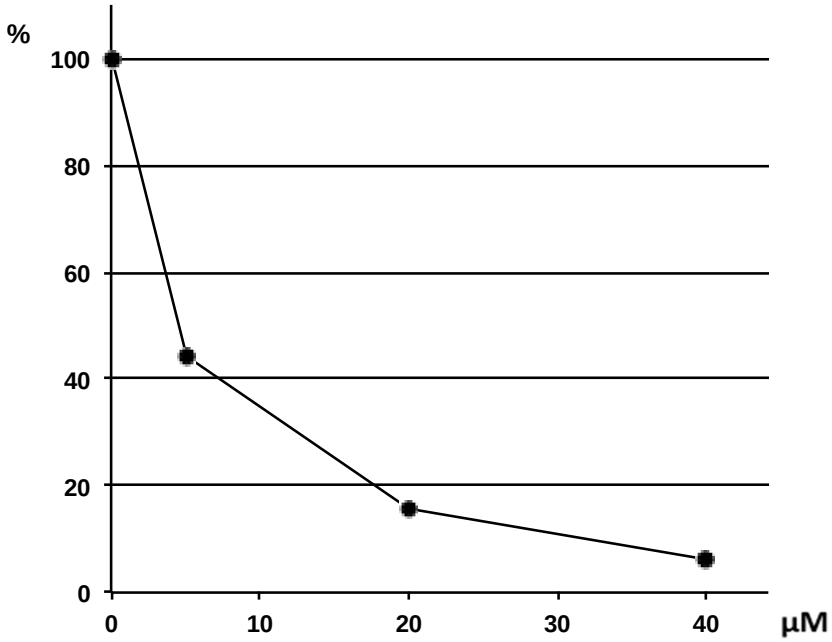


FIG. 14 HeLa

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- **WO2004016622 A [0007]**