

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 121**

51 Int. Cl.:
C07D 401/12 (2006.01) **A61P 17/06** (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/5355 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07703885 .9**
96 Fecha de presentación: **16.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1981871**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **DERIVADOS DE HETEROCICLILALQUILO COMO NUEVOS INHIBIDORES DE HISTONA DEACETILASA.**

30 Prioridad:
19.01.2006 EP 06100561

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2012

73 Titular/es:
JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V.
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE

72 Inventor/es:
ROUX, Bruno y
ANGIBAUD, Patrick René

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

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).

ES 2 376 121 T3

DESCRIPCIÓN

Derivados de heterociclicilalquilo como nuevos inhibidores de histona deacetilasa

- 5 La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad enzimática inhibidora de histona deacetilasa (HDAC). También se refiere a procesos para su preparación, a composiciones que los comprenden y a su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, para inhibir HDAC y como medicina, por ejemplo como medicina para inhibir afecciones proliferativas, tales como cáncer y soriasis.
- 10 Las histonas nucleares son conocidas como componentes integrales y dinámicos de la maquinaria responsable de la regulación de la transcripción génica y otros procesos basados en ADN tales como replicación, reparación, recombinación y segregación cromosómica. Son objeto de modificaciones postraslacionales que incluyen acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ribosilación de ADP.
- 15 La(s) histona deacetilasa(s), denominadas en el presente documento "HDAC", son enzimas que catalizan la eliminación de la modificación de acetilo en residuos de lisina de proteínas, incluidas las histonas nucleosomales nucleares H2A, H2B, H3 y H4. Junto con la(s) histona acetiltransferasa(s), denominadas en el presente documento "HAT", las HDAC regulan el nivel de acetilación de las histonas. El equilibrio de acetilación de histonas nucleosomales tiene un papel importante en la transcripción de muchos genes. La hipoacetilación de histonas está asociada con la estructura de cromatina condensada que provoca la represión de la transcripción génica, mientras que las histonas acetiladas están asociadas con una estructura de cromatina más abierta y la activación de la transcripción.
- 20 Se han descrito once HDAC relacionadas estructuralmente que se dividen en dos clases. Las HDAC de clase I constan de HDAC 1, 2, 3, 8 y 11 mientras que las HDAC de clase II constan de HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10. Los miembros de una tercera clase de HDAC no están relacionados estructuralmente con las HDAC de clase I y de clase II. Las HDAC de clase I/II operan mediante mecanismos dependientes de cinc, mientras que las HDAC de clase III son dependientes de NAD.
- 25 Además de histonas, otras proteínas también han sido sustrato para acetilación, en particular factores de transcripción tales como p53, GATA-1 y E2F; receptores nucleares tales como el receptor de glucocorticoides, los receptores de tiroides, los receptores de estrógeno; y proteínas reguladoras del ciclo celular tales como pRb. La acetilación de proteínas se ha asociado con estabilización de proteínas, tal como la estabilización de p53, reclutamiento de cofactores y la unión aumentada a ADN. La p53 es un supresor tumoral que puede inducir la detención del ciclo celular o apoptosis en respuesta a una diversidad de señales de estrés, tales como daño a ADN.
- 30 La diana principal para la detención del ciclo celular inducido por p53 parece ser el gen p21. Además de por su activación por p53, el p21 se ha identificado en virtud de su asociación con complejos de ciclina/quinasa dependiente de ciclina en la detención del ciclo celular en las fases G1 y G2, su regulación al alza durante la senescencia y su interacción con el antígeno nuclear de proliferación celular.
- 35 El estudio de inhibidores de HDAC indica que tienen un papel importante en la detención del ciclo celular, la diferenciación celular, la apoptosis y la inversión de fenotipos transformados.
- 40 El inhibidor tricostatina A (TSA), por ejemplo, provoca la detención del ciclo celular en las fases G 1 y G2, revierte el fenotipo transformado de distintas líneas celulares e induce la diferenciación de células de leucemia de Friend y otras. Se ha informado de que la TSA (y el ácido suberoilánilida hidroxámico SAHA) inhiben el crecimiento celular, inducen diferenciación terminal y previenen la formación de tumores en ratones (Finnin y col., Nature, 401: 188-193, 1999).
- 45 También se ha informado de que la tricostatina A es útil en el tratamiento de fibrosis, por ejemplo, fibrosis hepática y cirrosis hepática (Geerts y col., solicitud de patente europea EP 0 827 742, publicada el 11 de marzo de 1998).
- 50 El farmacóforo para inhibidores de HDAC consta de un dominio de unión a metal que interactúa con el sitio activo que contiene cinc de las HDAC, un dominio enlazante y un dominio de reconocimiento de superficie o región caperuza que interactúa con residuos del borde del sitio activo.
- 55 También se ha informado de que los inhibidores de HDAC inducen la expresión del gen p21. La activación transcripcional del gen p21 mediante estos inhibidores está promovida por la remodelación de cromatina, seguida de la acetilación de histonas H3 y H4 en la región del promotor de p21. La activación de p21 tiene lugar de un modo independiente de p53 y, de este modo, los inhibidores de HDAC son operativos en células con genes p53 mutados, una característica de numerosos tumores.
- 60 Además los inhibidores de HDAC pueden tener actividades indirectas tales como el aumento de las respuestas inmunitarias del huésped y la inhibición de angiogénesis tumoral y, de este modo pueden suprimir el crecimiento de tumores primarios e impedir la metástasis (Mai y col., Medicinal Research Reviews, 25: 261-309, 2005).
- 65

En vista de lo anterior, los inhibidores de HDAC pueden tener un gran potencial en el tratamiento de enfermedades o afecciones proliferativas celulares, incluidos tumores con genes p53 mutados.

La solicitud de patente EP 1472216, publicada el 14 de agosto de 2003, divulga hidroxamatos bicíclicos como inhibidores de histona deacetilasa.

Las solicitudes de patente EP 1485099, EP 1485348, EP 1485353, EP 1485354, EP 1485364, EP 1485365, EP 1485370, EP 1485378, publicadas el 18 de septiembre de 2003, entre otras, divulgan ácidos piperazinilpirimidinilhidroxámicos sustituidos como inhibidores de histona deacetilasa; además el documento EP 1485365 divulga R306465.

La solicitud de patente EP 1492534, publicada el 9 de octubre de 2003, divulga compuestos de ácido carbámico que comprenden una unión a piperazina como inhibidores de HDAC.

La solicitud de patente EP 1495002, publicada el 23 de octubre de 2003, divulga compuestos de piperazinil fenil benzamida sustituidos como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1501508, publicada el 13 de noviembre de 2003, divulga benzamidas como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente WO 04/009536, publicada el 29 de enero de 2004, divulga derivados que contienen un enlazador a alquilo entre el grupo arilo y el hidroxamato como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1525199, publicada el 12 de febrero de 2004, divulga hidroxamatos bicíclicos sustituidos con (hetero)arilalquenilo como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1572626, publicada el 24 de junio de 2004, divulga derivados de (2-amino-fenil)-amida de ácidos arileno-carboxílico como agentes farmacológicos.

La solicitud de patente EP 1581484, publicada el 29 de julio de 2004, divulga derivados de derivados de N-hidroxibenzamida con actividad antiinflamatoria y antitumoral.

La solicitud de patente EP 1585735, publicada el 29 de julio de 2004, divulga derivados de hidroxamato de arilo sustituidos como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1592667, publicada el 19 de agosto de 2004, divulga derivados de O-fenilendiaminas monoacetiladas como agentes farmacológicos.

La solicitud de patente EP 1590340, publicada el 19 de agosto de 2004, divulga derivados de diaminofenileno como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1592665, publicada el 26 de agosto de 2004, divulga derivados de benzamida como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente WO 04/072047, publicada el 26 de agosto de 2004, divulga indoles, benzimidazoles y naftimidazoles como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1608628, publicada el 30 de septiembre de 2004, divulga hidroxamatos enlazados a sistemas anulares heterocíclicos no aromáticos como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1613622, publicada el 14 de octubre de 2004, divulga derivados de oxima como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente EP 1611088, publicada el 28 de octubre de 2004, divulga derivados de hidroxamato como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente WO 05/028447, publicada el 31 de marzo de 2005, divulga benzimidazoles como inhibidores de histona deacetilasa.

Las solicitudes de patente WO 05/030704 y WO 05/030705, publicadas el 7 de abril de 2005, divulgan benzamidas como inhibidores de histona acetilasa.

La solicitud de patente WO 05/040101, publicada el 6 de mayo de 2005, divulga hidroxamatos conectados a acilurea y conectados a sulfonilurea como inhibidores de histona acetilasa.

La solicitud de patente WO 05/040161, también publicada el 6 de mayo de 2005, divulga hidroxamatos enlazados a

biarilos como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente WO 05/075469, publicada el 18 de agosto de 2005, divulga ácidos tiazolil hidroxámicos y ácidos tiadiazolil hidroxámicos como inhibidores de histona deacetilasa.

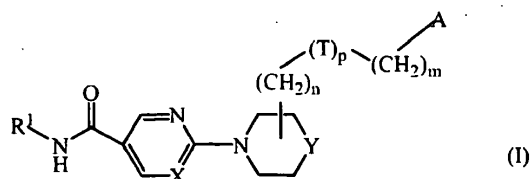
La solicitud de patente WO 05/086898, publicada el 22 de septiembre de 2005, divulga ácidos hidroxámicos heteropentacíclicos como inhibidores de histona deacetilasa.

La solicitud de patente WO 05/092899, publicada el 6 de octubre de 2005, divulga alqueniilbencimidias como de histona deacetilasas. Los compuestos de la presente invención difieren de los de la técnica anterior en estructura, en su actividad farmacológica y/o potencia farmacológica.

El problema que hay que resolver es proporcionar inhibidores de histona deacetilasa con gran actividad enzimática y celular que tengan una biodisponibilidad y/o potencia *in vivo* aumentadas.

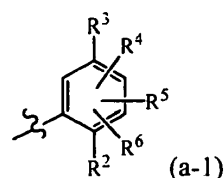
Los compuestos nuevos de la presente invención solucionan el problema descrito anteriormente. Los compuestos de la presente invención pueden mostrar una actividad enzimática y celular de inhibición de histona acetilasa excelente. Los compuestos de la invención pueden tener también una capacidad elevada de activación del gen p21, tanto en el nivel celular como en el nivel *in vivo*. Características ventajosas de los presentes compuestos son estabilidad metabólica, solubilidad y/o capacidad de inducción de p21. Más particularmente, los compuestos de la presente invención pueden tener semividas prolongada en hepatocitos de rata, tienen una solubilidad aumentada en soluciones acuosas y/o tienen una capacidad de inducción del promotor de p21 *in vivo* potenciada.

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



a sus formas *N*-óxido, a sus sales de adición farmacéuticamente aceptables y a sus formas estereoquímicamente isómeras, en la que:

R^1 es hidroxilo o un radical de la fórmula (a-1)



en la que:

R^2 es hidroxilo o amino;

R^3 es hidrógeno, tienilo, furanilo o fenilo y cada tienilo, furanilo o fenilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o dos halo, amino, nitro, ciano, hidroxilo, fenilo, alquilo C_{1-6} , (dialquilo C_{1-6})amino, alquil C_{1-6} -oxi, fenil-alquilo C_{1-6} -oxi, hidroxialquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} -carbonilo, hidroxycarbonilo, alquil C_{1-6} -carbonilo, polihaloalquil C_{1-6} -oxi, polihaloalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -sulfonilo, hidroxycarbonilalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -carbonilamino, aminosulfonilo, aminosulfonilalquilo C_{1-6} , isoxazolilo, aminocarbonilo, fenilalqueno C_{2-6} , fenilalquinilo C_{3-6} o piridinilalquinilo C_{3-6} ; R^4 , R^5 y R^6 son cada uno independientemente, amino, nitro, furanilo, halo, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -oxi, trifluorometilo, tienilo, fenilo, alquil C_{1-6} -carbonilamino, aminocarbonilalquilo C_{1-6} o $-C\equiv C-CH_2-R^7$;

en la que R^7 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , hidroxilo, amino o alquil C_{1-6} -oxi;

X es N o CH,

Y es O, N, NH, CH o CH_2 y cuando Y es N o CH entonces el sustituyente está unido al átomo Y de la estructura anular;

T es O o NR^8 en la que R^8 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , hidroxialquilo C_{1-6} , cianoalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -

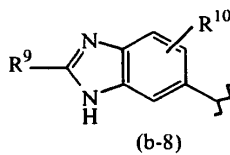
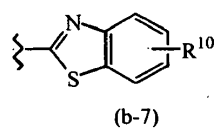
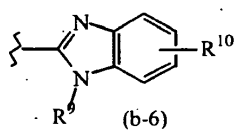
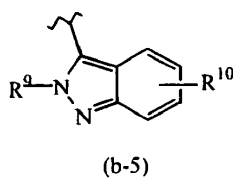
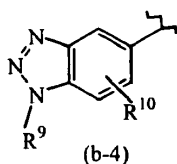
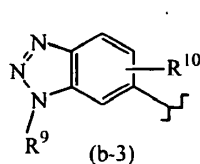
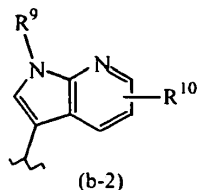
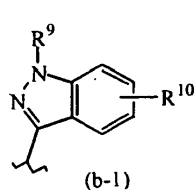
oxalquilo C₁₋₆, hidroxiaminocarbonilalquilo C₁₋₆, alquil C₁₋₆-sulfonilalquilo C₁₋₆-carbonilo, alquil C₁₋₆-aminocarbonilo o mono- o di-(alquil C₁₋₆)aminosulfonilo;

n es 0 ó 1 y cuando n es 0 se quiere decir un enlace directo;

m es 1 ó 2;

p es 0 ó 1 siempre que cuando p sea 0 entonces n es 0, $-(CH_2)_n-(T)_p-$ es un enlace directo e Y es N;

A es un radical seleccionado de entre:



en los que R⁹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₆; y R¹⁰ es hidrógeno, hidroxilo, amino, halo, alquilo C₁₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, alquil C₁₋₆-oxicarbonilo, hidroxicarbonilo, alquil C₁₋₆-carbonilamino, alquil C₁₋₆-oxi, o mono- o di-(alquil C₁₋₆)amino.

Las líneas dibujadas en los sistemas anulares bicíclicos de los sustituyentes indican que los enlaces pueden unirse a cualquiera de los átomos anulares adecuados del sistema anular bicíclico.

La expresión "inhibidor de histona deacetilasa" o se usa para identificar un compuesto que es capaz de interactuar con una histona deacetilasa en inhibir su actividad, más particularmente su actividad enzimática. La inhibición de la actividad enzimática de histona deacetilasa significa la reducción de la capacidad de una histona deacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona. Preferentemente, dicha inhibición es específica, es decir, el inhibidor de histona deacetilasa reduce la capacidad de una histona deacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona en una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir algún otro efecto biológico no relacionado.

Tal como se usan en las definiciones precedentes y en adelante, halo es una denominación genérica para flúor, cloro, bromo y yodo; alquilo C₁₋₂ define radicales hidrocarburo saturados de cadena lineal que tienen 1 ó 2 átomos de carbono tales como, por ejemplo, metilo o etilo; alquilo C₁₋₆ define alquilo C₁₋₂ y radicales hidrocarburo saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 3 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, propilo, butilo, 1-metiletilo, 2-metilpropilo, pentilo, 2-metilbutilo, hexilo, 2-metilpentilo y similares; polihaloalquilo C₁₋₆ define alquilo C₁₋₆ que contiene tres sustituyentes halo iguales o diferentes, por ejemplo trifluorometilo; alqueno C₂₋₆ define radicales hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contienen un doble enlace y que tienen de 2 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, etenilo, 2-propenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 3-metil-2-butenilo y similares; alquino C₃₋₆ define radicales hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contienen un triple enlace y que tienen de 3 a 6 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, 2-propinilo, 3-butenilo, 2-butenilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 3-hexinilo y similares; cicloalquilo C₃₋₇ incluye grupos hidrocarburo cíclicos que tienen de 3 a 7 carbonos, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo y similares.

Las sales de adición farmacéuticamente aceptables abarcan sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables tal como se han mencionada anteriormente se pretende que comprenden las formas

de sales de adición de ácidos no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos de la fórmula (I) son capaces de formar. Los compuestos de la fórmula (I) que tienen propiedades básicas pueden convertirse en sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables tratando dicha forma de base con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos halohídricos, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico; sulfúrico; nítrico; fosfórico y ácidos similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, trifluoroacético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanesulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, cicláxico, salicílico, *p*-amino-salicílico, pamoico y ácidos similares.

Los compuestos de la fórmula (I) que tienen propiedades ácidas pueden convertirse en sus sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables tratando dicha forma de ácido con una base orgánica o inorgánica adecuada. Las formas de sales de bases apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, por ejemplo las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales como bases orgánicas, por ejemplo las sales de benzatrina, N-metil-D-glutamina, bidrabamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

La expresión "sales de adición de ácidos o de bases" también comprenden los hidratos y las formas de adición de disolvente que los compuestos de la fórmula (I) sean capaces de formar. Ejemplos de dichas formas son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

La expresión "formas estereoquímicamente isómeras de compuestos de fórmula (I)", tal como se usa en el presente documento, define todos los compuestos posibles formados por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces pero que tienen diferentes estructuras tridimensionales, que no son intercambiables, que la que pueden tener los compuestos de fórmula (I). Mientras no se mencione o se indique lo contrario, la denominación química de un compuesto abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isómeras que pueda poseer dicho compuesto. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos de fórmula (I) tanto en forma pura como en mezcla con la otra se pretende que estén incluidas dentro del ámbito de la presente invención.

Las formas de N-óxido de los compuestos de fórmula (I) se pretende que abarquen los compuestos de fórmula (I) en los que uno o varios átomos de nitrógeno se oxidan dando la forma denominada N-óxido, en particular los N-óxidos en los que uno o varios de los nitrógenos de piperidina, piperazina o piridazino están N-oxidados.

Algunos de los compuestos de fórmula (I) también pueden estar presentes en sus formas tautómeras. Dichas formas, aunque no se indique explícitamente en la fórmula anterior, se pretende que estén incluidas dentro del ámbito de la presente invención.

Siempre que se use en adelante, la expresión "compuestos de fórmula (I)" se pretende que incluya también las sales de adición farmacéuticamente aceptables y todas las formas estereoisómeras.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "histona deacetilasa" y "HDAC" se pretende que se refieran a cualquiera de una familia de enzimas que eliminan los grupos acetilo de los grupos α -amino de residuos de lisina en el extremo N de una histona. A menos que se indique lo contrario con el contexto, el término "histona" se pretende que se refiera a cualquier proteína histona, incluidas H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5, de cualquier especie. Las proteínas o productos génicos HDAC humanas, incluyen, pero no están limitadas a, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9 HDAC-10 y HDAC-11. La histona deacetilasa también puede derivarse de una fuente protozoica o fúngica.

Un primer grupo de compuestos de interés consta de los compuestos de fórmula (I) en la que R^1 es hidroxilo.

Un segundo grupo de compuestos de interés consta de los compuestos de fórmula (I) en la que R^3 es distinto de hidrógeno.

Un tercer grupo de compuestos de interés consta de los compuestos de fórmula (I) en la que se aplica una o varias de las restricciones siguientes:

a) R^1 es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1) en la que R^2 es amino, R^3 es hidrógeno o tienilo y R^4 , R^5 y R^6 son cada uno hidrógeno;

b) X es N o CH;

c) Y es O, N o CH;

d) T es O o NR^8 en la que R^8 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cianoalquilo C_{1-6} , hidroxiaminocarbonilalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -carbonilo o alquil C_{1-6} -sulfonilo;

e) n es 0 ó 1;

f) m es 1

5

g) p es 0 ó 1; y

h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-2), b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7) y (b-8) en el que R⁹ es alquilo C₁₋₆ y R¹⁰ es hidrógeno.

10

Un cuarto grupo de compuestos de interés consta de los compuestos de fórmula (I) en la que se aplica una o varias de las restricciones siguientes:

a) R¹ es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1) en la que R² es amino, R³ es hidrógeno y R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno hidrógeno;

15

b) X es N o CH;

c) Y es O, N o CH;

20

d) T es NR⁸ en la que R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cianoalquilo C₁₋₆, hidroxiaminocarbonilalquilo C₁₋₆, alquil C₁₋₆-carbonilo o alquil C₁₋₆-sulfonilo;

e) n es 1;

25

f) m es 1

g) p es 1; y

h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-2), b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7) y (b-8) en el que R⁹ es alquilo C₁₋₆ y R¹⁰ es hidrógeno.

30

Un quinto grupo de compuestos de interés consta de los compuestos de fórmula (I) en la que se aplica una o varias de las restricciones siguientes:

a) R¹ es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1) en la que R² es amino, R³ es hidrógeno o tienilo y R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno hidrógeno;

35

b) X es N o CH;

c) Y es O, N o CH;

40

d) T es NR⁸ en la que R⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cianoalquilo C₁₋₆, hidroxiaminocarbonilalquilo C₁₋₆, alquil C₁₋₆-carbonilo o alquil C₁₋₆-sulfonilo;

45

e) n es 1;

f) m es 1

g) p es 1; y

50

h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-2), b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7) y (b-8) en el que R⁹ es alquilo C₁₋₆ y R¹⁰ es hidrógeno.

Un sexto grupo de compuestos de interés consta de los compuestos de fórmula (I) en la que se aplica una o varias de las restricciones siguientes:

55

a) R¹ es hidroxilo;

b) X es N;

60

c) Y es O, N o CH;

d) T es O;

65

e) n es 1;

- f) m es 1
- g) p es 1; y
- 5 h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-2), (b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7) y (b-8) en el que R⁹ es alquilo C₁₋₆ y R¹⁰ es hidrógeno.
- Un séptimo grupo de compuestos de interés consta de los compuestos de fórmula (I) en la que se aplica una o varias de las restricciones siguientes:
- 10 a) R¹ es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1) en la que R² es amino, R³ es hidrógeno o tienilo y R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno hidrógeno;
- 15 b) X es CH;
- c) Y es N;
- d) n es 0;
- 20 e) m es 1;
- g) p es 0; y
- 25 h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-2), (b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7) y (b-8) en el que R⁹ es alquilo C₁₋₆ y R¹⁰ es hidrógeno.
- Un grupo de compuestos preferentes consta de los compuestos de fórmula (I) en la que se aplica una o varias de las restricciones siguientes:
- 30 a) R¹ es hidroxilo;
- b) X es N;
- 35 c) Y es CH;
- d) T es NR⁸ en la que R⁸ es hidrógeno;
- e) n es 1;
- 40 f) m es 1
- g) p es 1; y
- 45 h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-2), (b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7) y (b-8) en el que R⁹ es alquilo C₁₋₆ y R¹⁰ es hidrógeno.
- Un grupo de compuestos más preferentes consta de los compuestos de fórmula (I) en la que se aplica una o varias de las restricciones siguientes:
- 50 a) R¹ es hidroxilo;
- b) X es N;
- 55 c) Y es CH;
- d) T es NR⁸ en la que R⁸ es hidrógeno;
- e) n es 1;
- 60 f) m es 1
- g) p es 1; y
- 65 h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-3) y (b-4), en los que R⁹ es alquilo C₁₋₆ y R¹⁰ es hidrógeno.

Compuestos especialmente preferentes de la fórmula (I) son el Compuesto N° 1, el Compuesto N° 2 y el Compuesto N° 3 que se muestran a continuación:

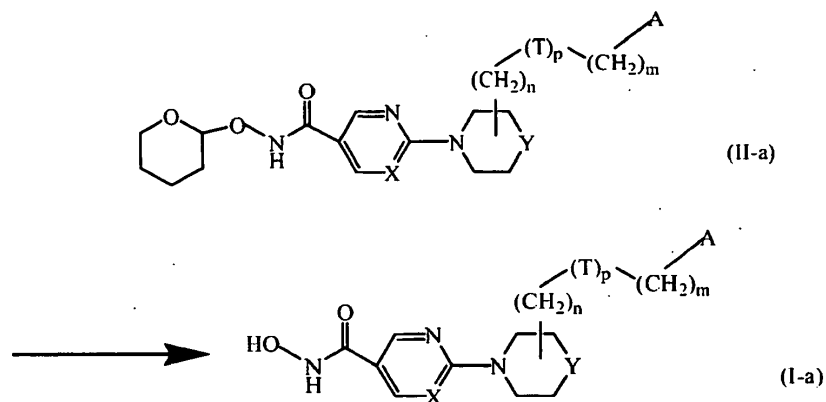
1,07 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 1	0,89 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 2
0,87 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 3	

Los compuestos de fórmula (I), sus sales y N-óxidos farmacéuticamente aceptables y las formas esterequímicamente isómeras de los mismos pueden prepararse de un modo convencional. Los materiales de partida y algunos de los intermedios son compuestos conocidos y están disponibles comercialmente o pueden prepararse de acuerdo con procedimientos de reacción convencionales tal como se conoce en general en la técnica o tal como se describe en las solicitudes de patente EP 1485099, EP 1485348, EP 1485353, EP 1485354, EP 1485364, EP 1485365, EP 1485370 y EP 1485378.

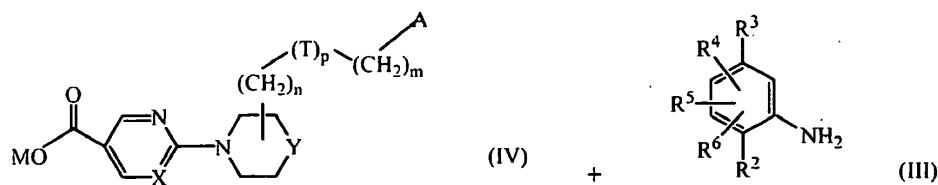
Algunos métodos de preparación se describirán en el presente documento con más detalle. Otros métodos para obtener compuestos finales de fórmula (I) se describen en los ejemplos.

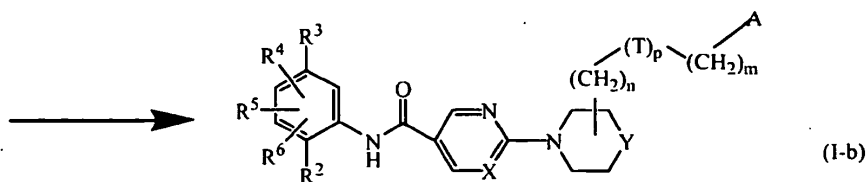
A continuación se describen procedimientos específicos para la preparación de compuestos de fórmula (I):

a) Pueden prepararse ácidos hidroxámicos de fórmula (I) en la que R¹ es hidroxilo, denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-a), haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (II-a) con un ácido apropiado, tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético. dicha reacción se realiza en un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, metanol o diclorometano.



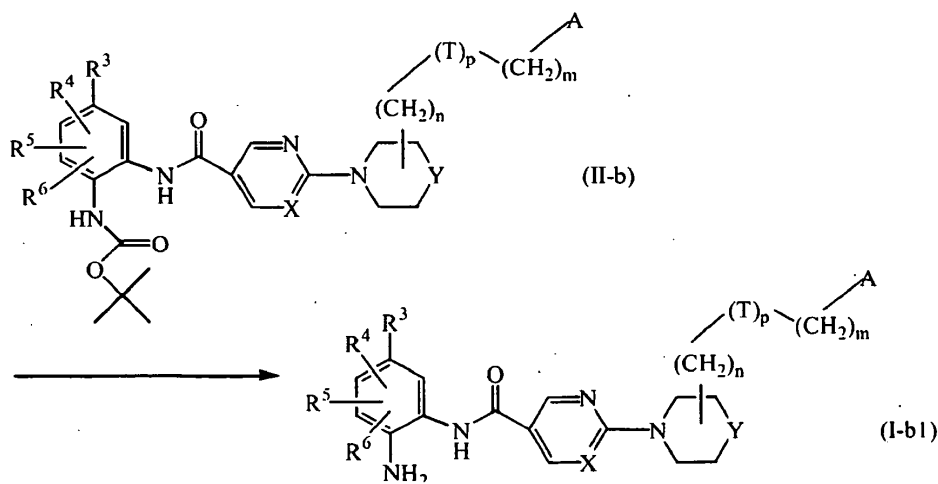
b) Pueden prepararse compuestos de fórmula (I) en la que R¹ es un radical de fórmula (a-1), denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-b), haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (IV) en la que M representa hidrógeno o un metal alcalino, por ejemplo sodio o litio, con un compuesto de fórmula (III), en presencia de una base tal como, por ejemplo, trietilamina, y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidino-fosfonio (PyBOP). dicha reacción se realiza en un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano o diclorometano o una mezcla de los mismos.



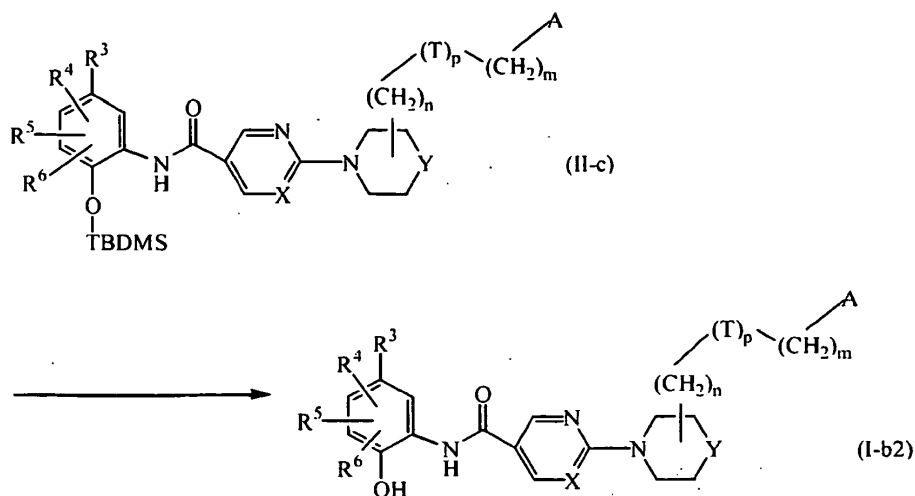


Alternativamente, pueden prepararse compuestos de fórmula (I-b) convirtiendo un producto de fórmula (IV) en un cloruro ácido por ejemplo por tratamiento con cloruro de sulfonilo (SOCl_2) en un disolvente adecuado tal como diclorometano y después haciendo reaccionar el compuesto de cloruro ácido resultante con un compuesto de fórmula (III) en presencia de una base tal como piridina en un disolvente adecuado tal como diclorometano o THF.

Pueden prepararse compuestos de fórmula (I-b) en la que R^2 es amino, denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-b1), haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (II-b) con un ácido apropiado, tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético. dicha reacción se realiza en un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, metanol o diclorometano.



Pueden prepararse compuestos de fórmula (I-b) en la que R^2 es hidroxilo, denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-b2), haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (II-c) con fluoruro de tetrabutilamonio en un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano. TBDMS en el intermedio de fórmula (II-c) significa terc-butil(dimetil)silano.

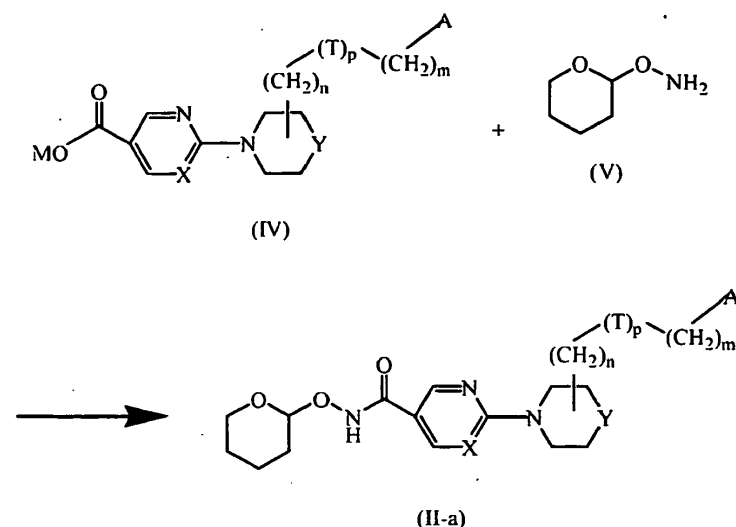


Los compuestos de fórmula (I) también pueden convertirse uno en otro mediante reacciones o transformaciones de grupos funcionales conocidas en la técnica, dependiendo de la sensibilidad de otros grupos de la molécula, por ejemplo hidrólisis de ésteres carboxílicos para dar el correspondiente ácido o alcohol carboxílico; los alcoholes pueden convertirse en ésteres y éteres; las aminas primarias pueden convertirse en aminas secundarias o terciarias;

las aminas primarias o secundarias pueden convertirse en amidas o sulfonamidas; un radical yodo en un grupo fenilo puede convertirse en un grupo éster por inserción de monóxido de carbono en presencia de un catalizador de paladio adecuado.

- 5 Pueden prepararse intermedios de fórmula (II-a) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (IV) en la que M representa hidrógeno o un catión de metal alcalino tal como sodio con un intermedio de fórmula (V) en presencia de reactivos apropiados tales como *N*'-(etilcarbonimidoil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina, monoclorhidrato (EDC) y 1-hidrox-1*H*-benzotriazol (HOBT). La reacción puede realizarse en presencia de una base tal como trietilamina en un disolvente adecuado tal como una mezcla de diclorometano y tetrahidrofurano.

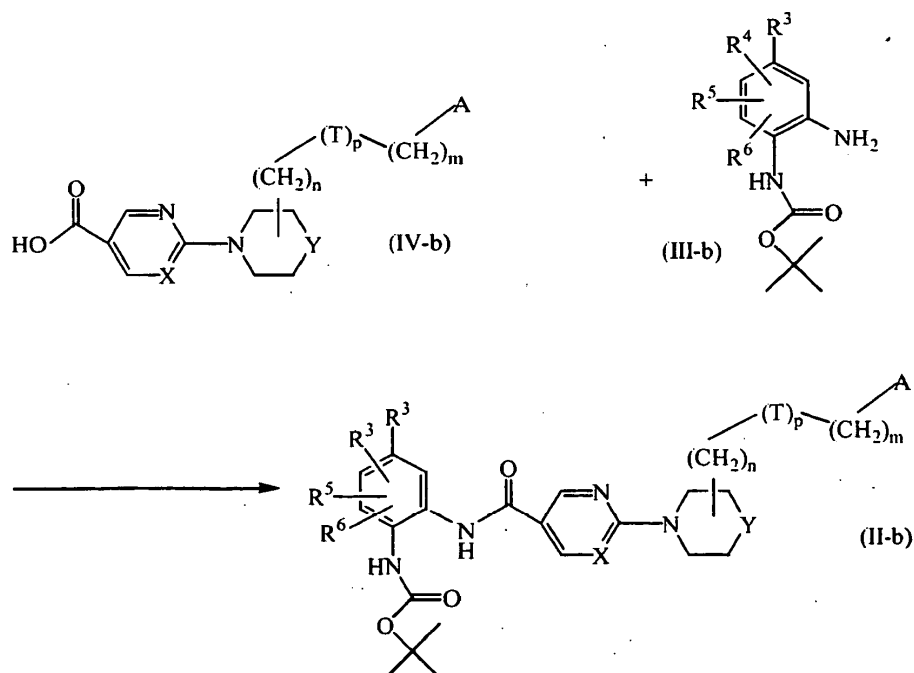
10



15

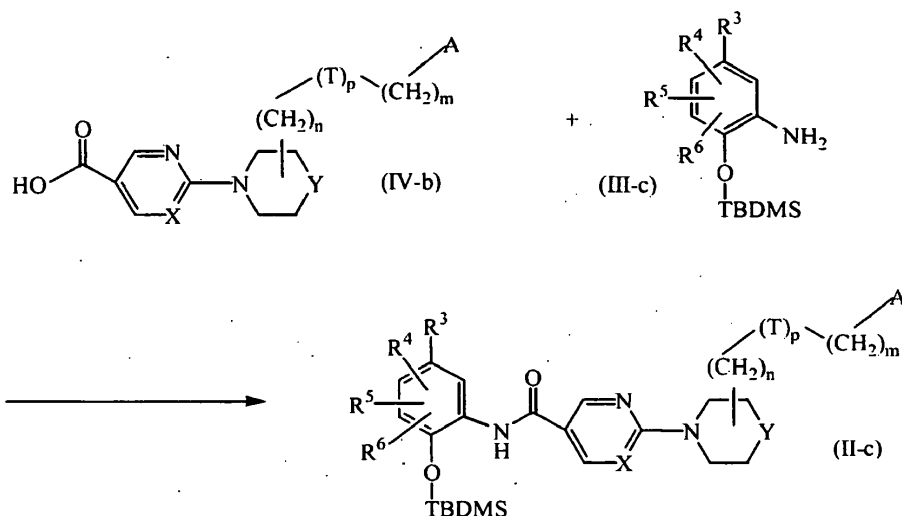
Pueden prepararse intermedios de fórmula (II-b) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (IV) en la que M es hidrógeno, denominados en el presente documento intermedios de fórmula (IV-b), con una fenilamina de fórmula (III-b) protegida con terc-butiloxicarbonilo (Boc) en presencia de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP) e hidruro de sodio. Dicha reacción puede realizarse en un disolvente adecuado tal como, por ejemplo, piridina,

20

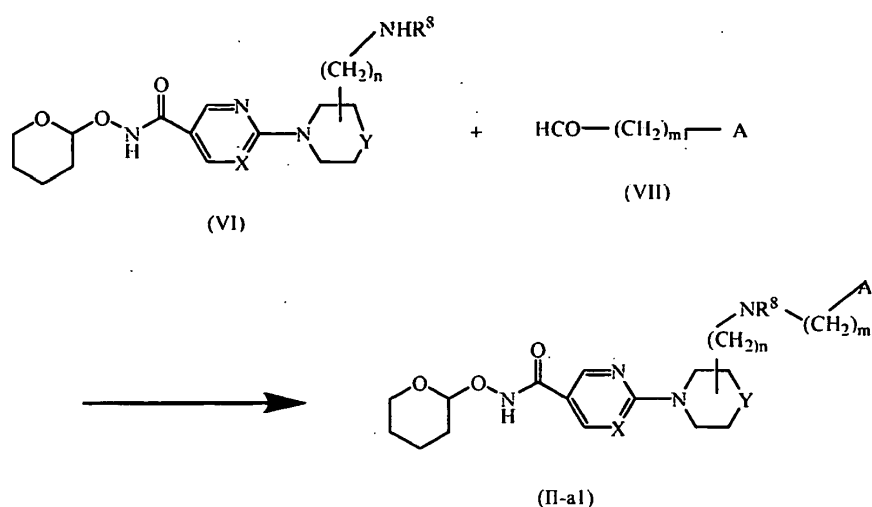


25

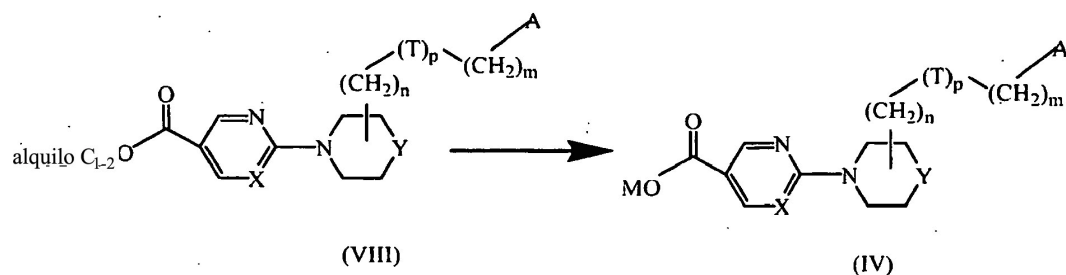
Pueden prepararse intermedios de fórmula (II-c) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (IV-b) con una fenilamina de fórmula (III-c) protegida con terc-butil(dimetil)silanilo (TBDMS) en presencia de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP) y trietilamina. Dicha reacción se realiza en un disolvente adecuado tal como, por ejemplo, *N,N*-dimetilformamida.



- 5 También pueden prepararse intermedios de fórmula (II-a) en la que p es 1 y T es NR^8 , denominados en el presente documento intermedios de fórmula (II-a1) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (VI) con un carboxaldehído apropiado de fórmula (VII) en la que m es 0 ó 1, en presencia de un reactivo apropiado, tal como un borohidruro de sodio, en un disolvente adecuado tal como dicloroetano o metanol. Alternativamente, la reacción puede efectuarse usando $NaBH_3CN$ en condiciones ácidas, por ejemplo usando ácido acético en un disolvente adecuado tal como metanol, o en condiciones de hidrogenación usando un catalizador de paladio-carbono en un disolvente adecuado tal como metanol.
- 10

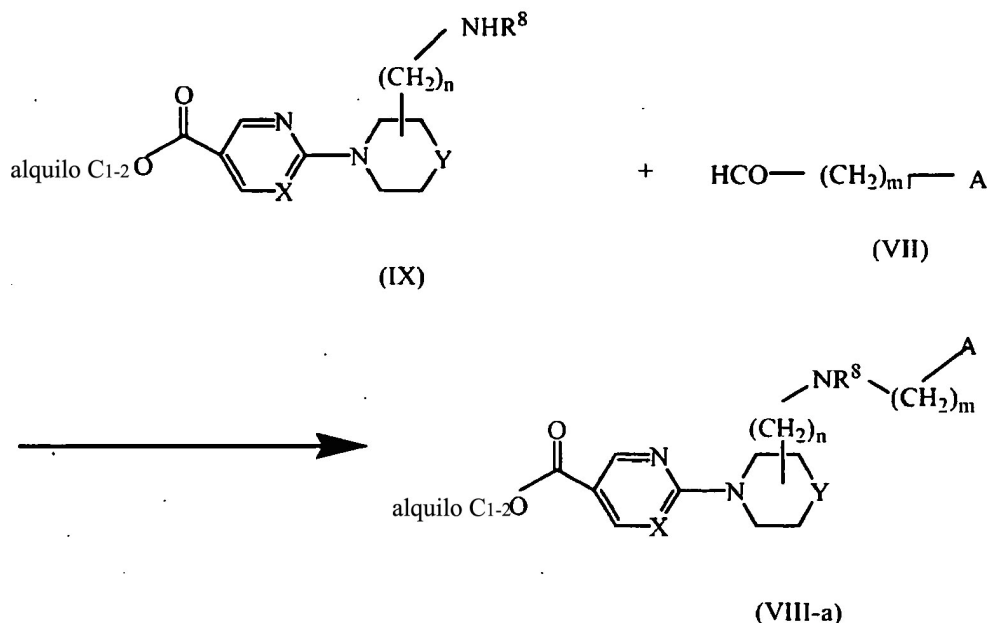


- 15 Pueden prepararse intermedios de fórmula (IV) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (VIII) con una solución ácida apropiada, por ejemplo ácido clorhídrico, o una base de metal alcalino apropiada, por ejemplo hidróxido de sodio o hidróxido de litio, en un disolvente adecuado tal como etanol o una mezcla de tetrahidrofurano y agua, generalmente a reflujo.

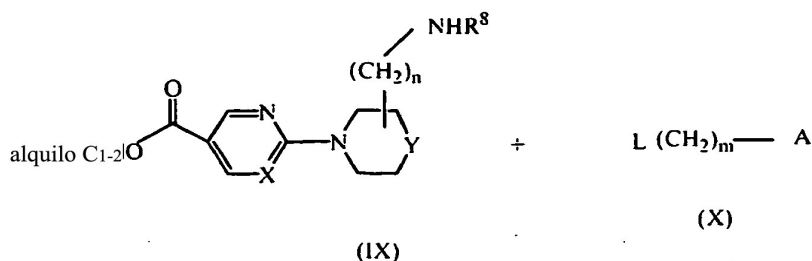


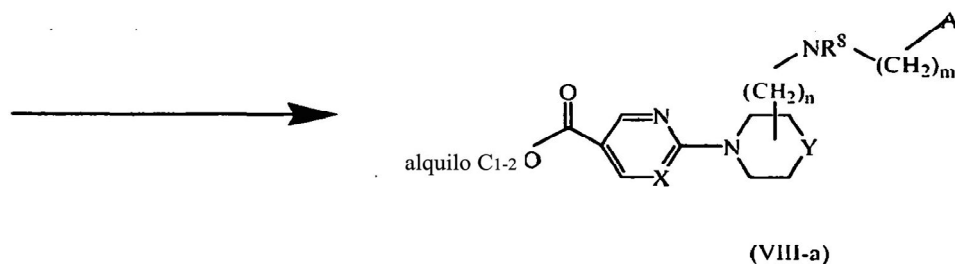
Pueden prepararse intermedios de fórmula (II-a) y (VIII) en las que p es 1 y T es NR^8 en la que R^8 es como se ha definido anteriormente excepto hidrógeno haciendo reaccionar un compuesto correspondiente de fórmula (II-a) o (VIII) en las que R^8 es hidrógeno, con un reactivo funcional apropiado que sirva para introducir el grupo R^8 apropiado. Por ejemplo, cuando R^8 es un grupo alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , hidroxialquilo C_{1-6} , cianoalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -oxialquilo C_{1-6} o hidroxiaminocarbonilalquilo C_{1-6} , entonces el reactivo es un agente alquilante apropiado, por ejemplo un haluro de alquilo apropiado, por ejemplo un cloruro, efectuándose la reacción en condiciones básicas, por ejemplo usando trietilamina, en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida. Cuando R^8 es un alquil C_{1-6} -carbonilo o alquil C_{1-6} -aminocarbonilo, entonces el reactivo es un agente alquilante apropiado, por ejemplo un haluro de acilo apropiado, por ejemplo un cloruro, efectuándose la reacción en condiciones básicas, por ejemplo usando trietilamina, en un disolvente adecuado tal como diclorometano. Cuando R^8 es un grupo alquil C_{1-6} -sulfonilo o mono- o di-(alquil C_{1-6})aminosulfonilo, entonces el reactivo es un agente de sulfonilación apropiado, por ejemplo un haluro de sulfonilo apropiado, por ejemplo un cloruro, efectuándose la reacción en condiciones convencionales.

También pueden prepararse intermedios de fórmula (VIII) en la que p es 1 y T es NR^8 , denominados en el presente documento intermedios de fórmula (VIII-a) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (IX) con un intermedio de la fórmula (VII) anterior en presencia de un reactivo apropiado, tal como un borohidruro de sodio, en un disolvente adecuado tal como dicloroetano o metanol. Alternativamente, la reacción puede efectuarse usando NaBH_3CN en condiciones ácidas, por ejemplo usando ácido acético en un disolvente adecuado tal como metanol, o en condiciones de hidrogenación usando un catalizador de paladio-carbono en un disolvente adecuado tal como metanol.

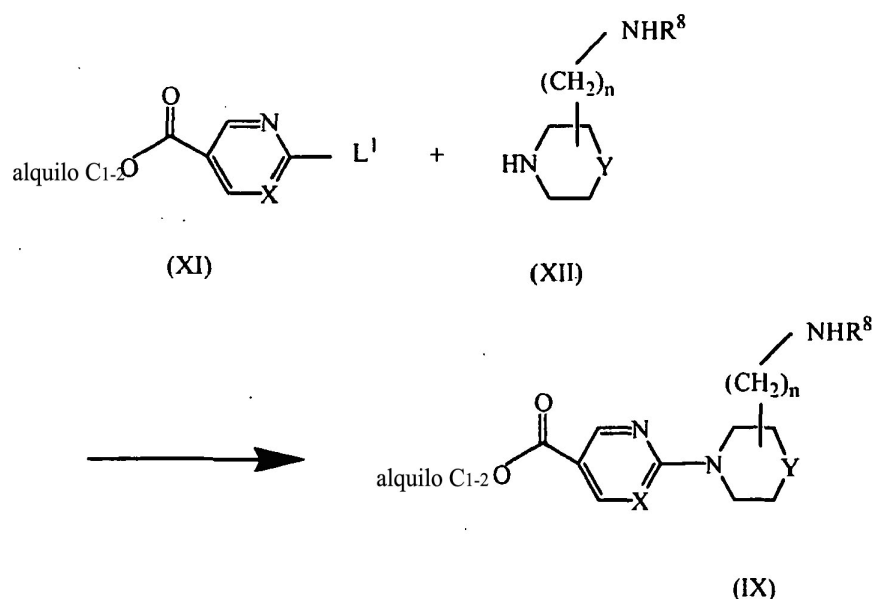


Pueden prepararse alternativamente intermedios de fórmula (VIII-a) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (IX) con un intermedio de fórmula (X) en la que L representa un grupo saliente tal como un grupo metilsulfonilo en presencia de una base tal como K_2CO_3 en un disolvente adecuado tal como acetonitrilo.

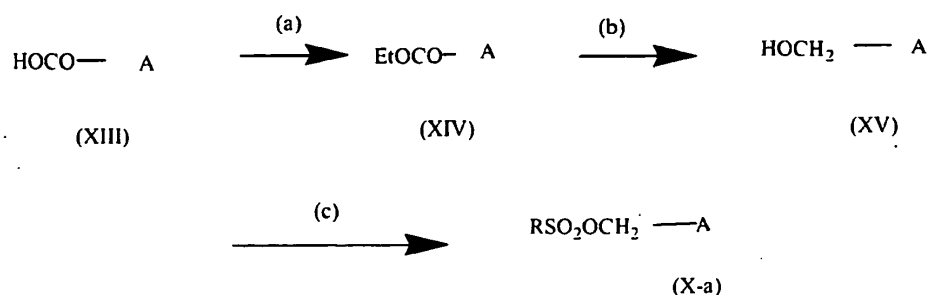




Se pueden preparar intermedios de fórmula (IX) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XI) en la que L¹ es un grupo saliente, por ejemplo halo, por ejemplo cloro, con un intermedio de fórmula (XII) en N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) y dimetilacetamida o en K₂CO₃ y acetonitrilo.



Se pueden preparar intermedios de fórmula (X) en la que L es un grupo organosulfonilo RSO₂O y m es 1, denominados en el presente documento intermedios de fórmula (X-a), de acuerdo con el esquema siguiente:



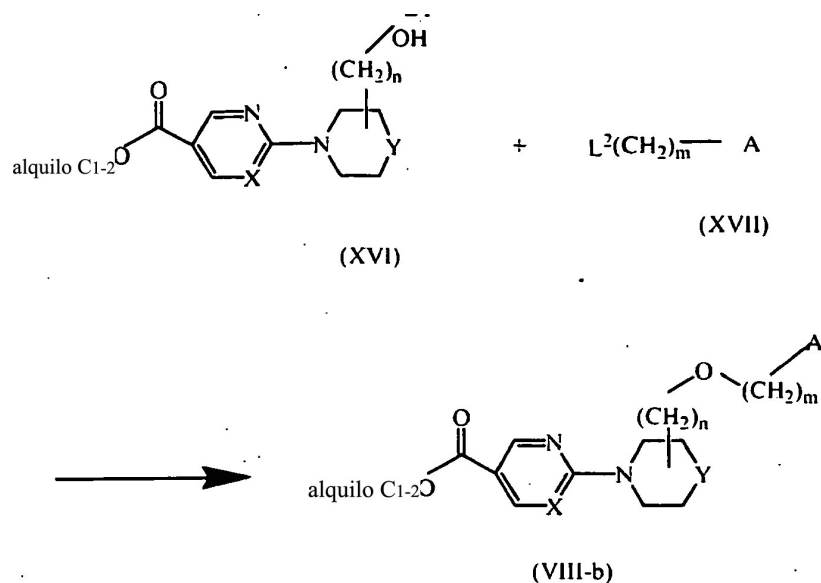
Etapa (a): Se hace reaccionar un intermedio de fórmula (XIII) con un agente de cloración, por ejemplo cloruro de sulfonilo, en un disolvente adecuado tal como etanol para formar un intermedio de fórmula (XIV);

Etapa (b): Se reduce un intermedio de fórmula (XIV) por ejemplo usando hidruro de litio y aluminio en un disolvente adecuado tal como tetrahidrofurano para formar un intermedio de fórmula (XV);

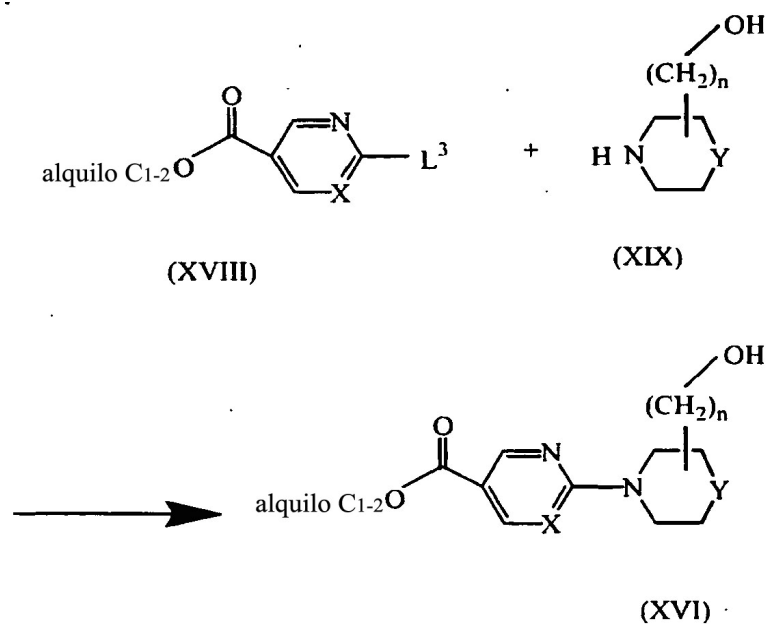
Etapa (c): Se hace reaccionar un intermedio de fórmula (XV) con un agente de sulfonilación apropiado, por ejemplo un cloruro, tal como cloruro de metanosulfonilo, en condiciones básicas, por ejemplo usando trietilamina, en un disolvente adecuado tal como diclorometano.

Pueden prepararse intermedios de fórmula (VIII) en la que p es 1 y T es O, denominados en el presente documento intermedios de fórmula (VIII-b) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XVI) con un intermedio de la fórmula

(XVII) en la que L^2 es un grupo saliente tal como un halo, por ejemplo bromo, en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida.

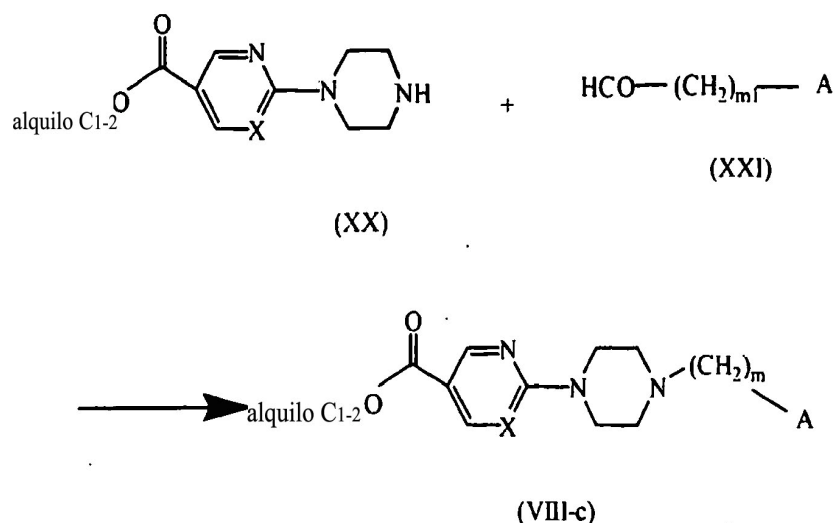


5 Se pueden preparar intermedios de fórmula (XVI) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XVIII) en la que L^3 es un grupo saliente tal como halo, por ejemplo cloro, con un intermedio de fórmula (XIX) en N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) y diclorometano.

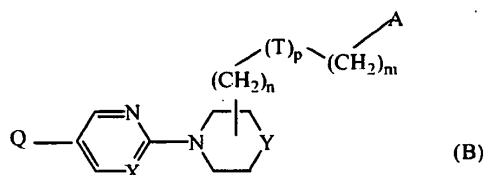


10 Pueden prepararse intermedios de fórmula (VIII) en la que Y es N y p es 0, denominados en el presente documento intermedios de fórmula (VIII-c) haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XX) con un intermedio de la fórmula (XXI) en la que m1 es 0 ó 1 en presencia de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ y en un disolvente adecuado tal como dicloroetano.

15



La presente invención también se refiere a intermedios de fórmulas (IIa), (IV) y (VIII), denominados colectivamente compuestos de fórmula (B) en la que Q es alquil C₁₋₂-oxycarbonilo, MO₂C (en la que M es hidrógeno o un metal alcalino) o tetrahidropiraniioxiaminocarbonilo y n, m, p, X, Y, T y A son como se definen para la fórmula (I), y las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isómeras de los mismos.



Pueden definirse grupos de compuestos de interés, preferentes, más preferentes y los más preferentes para los intermedios anteriores, de acuerdo con los grupos definidos para los compuestos de fórmula (I).

Los compuestos de fórmula (I) y algunos de los intermedios pueden tener al menos un centro estereogénico en su estructura. El centro estereogénico pueden presentar una configuración R o una S.

Los compuestos de fórmula (I) tal como se preparan en los procesos descritos anteriormente son generalmente mezclas racémicas de enantiómeros, que pueden separarse uno de otro usando procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I) pueden convertirse en las formas de sal diastereómeras correspondientes mediante reacción con un ácido quiral adecuado. Dichas formas de sal diastereómeras se separan subsiguientemente, por ejemplo mediante cristalización selectiva o fraccionada y los enantiómeros se liberan de las mismas mediante una base. Un modo alternativo de separar formas enantiómeras de los compuestos de fórmula (I) implica cromatografía líquida usando una fase estacionaria quiral. Dichas formas estereoquímicamente isómeras puras también pueden derivarse de las formas estereoquímicamente isómeras puras de los materiales de partida, siempre que la reacción tenga lugar estereoespecíficamente. Preferentemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizaría mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y las formas estereoisómeras de los mismos tienen propiedades farmacéuticas valiosas respecto a que tienen un efecto inhibidor de histona acetilasa (HDAC).

Se divulga un método de inhibición del crecimiento anormal de células, incluidas células transformadas, administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. El crecimiento anormal de células se refiere al crecimiento celular independiente de mecanismos reguladores normales (por ejemplo, pérdida de inhibición por contacto). Esto incluye la inhibición del crecimiento de tumores tanto directamente, provocando la detención del crecimiento, por diferenciación terminal y/o apoptosis de células cancerosas, como indirectamente, inhibiendo la neovascularización de tumores.

También se divulga un método de inhibición del crecimiento tumoral mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano), con necesidad de dicho tratamiento. En particular, se divulga un método de inhibición del crecimiento

de tumores mediante la administración de una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención. Ejemplos de tumores que pueden inhibirse, pero sin estar limitados a, son cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma e incluido cáncer de pulmón amicrocítico), cánceres pancreáticos (por ejemplo carcinoma pancreático tal como, por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino), cánceres de colon (por ejemplo carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer de próstata, incluida la enfermedad avanzada, tumores hematopoyéticos de linaje linfóide (por ejemplo leucemia linfocítica aguda, linfoma de linfocito B, linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML)), cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimal (por ejemplo fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumores benignos de la piel (por ejemplo queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo cáncer de mama avanzado), carcinoma de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico.

El compuesto según la invención puede usarse para otros fines terapéuticos, por ejemplo:

- a) la sensibilización de tumores a radioterapia administrando el compuesto según la invención antes, durante o después de la irradiación del tumor para tratar cáncer;
- b) tratar artropatías y afecciones osteopatológicas tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, gota, poliartritis, artritis sorbiática, espondilitis anquilosante y lupus eritematoso sistémico;
- c) inhibir la proliferación de células del músculo liso incluidos trastornos proliferativos vasculares, aterosclerosis y restenosis;
- d) tratar afecciones inflamatorias y afecciones dérmicas tales como colitis ulcerante, enfermedad de Crohn, rinitis alérgica, enfermedad del injerto contra el huésped, conjuntivitis, asma, SDRA, enfermedad de Behçets, rechazo de trasplante, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, esclerodermia, exantema, eczema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis quística y bronquitis crónica;
- e) tratar la endometriosis, fibroides uterinos, hemorragia uterina disfuncional e hiperplasia del endometrio;
- f) tratar la vascularización ocular, incluida la vasculopatía que afecta a los vasos de la retina y la coroides;
- g) tratar una disfunción cardíaca
- h) inhibir afecciones inmunosupresoras tales como el tratamiento de infecciones por VIH;
- i) tratar la disfunción renal;
- j) reprimir trastornos endocrinos;
- k) inhibir la disfunción de gluconeogénesis;
- l) tratar una neuropatología, por ejemplo la enfermedad de Parkinson o una neuropatología que provoque un trastorno cognitivo, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer o enfermedades neuronales relacionadas con poliglutamina;
- m) tratar trastornos psiquiátricos, por ejemplo esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, ansiedad y psicosis;
- n) inhibir una patología neuromuscular, por ejemplo esclerosis lateral amiotrófica;
- o) tratar la atrofia muscular espinal;
- p) tratar otras afecciones patológicas susceptibles de tratamiento potenciando la expresión de un gen;
- q) mejorar la terapia génica;
- r) inhibir la adipogénesis;
- s) tratar parasitosis tales como la malaria.

Por consiguiente, la presente invención divulga los compuestos de fórmula (I) para su uso como medicina y también el uso de estos compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar una o varias de las afecciones mencionadas anteriormente.

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y las formas

estereoisómeras de los mismos tienen propiedades de diagnóstico valiosas en el sentido de que pueden usarse para detectar o identificar una HDAC en una muestra biológica que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto marcado y una HDAC.

- 5 Los métodos de detección o de identificación pueden usar compuestos que están marcados con agentes marcadores tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc. Los ejemplos de radioisótopos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C . Las enzimas se fabrican generalmente detectables por conjugación de un sustrato apropiado, el cual, a su vez, cataliza una reacción detectable. Los ejemplos de los mismos incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato dehidrogenasa, preferentemente peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aequorina y luciferasa.

Las muestras biológicas pueden definirse como tejidos corporales o fluidos corporales. Ejemplos de fluidos corporales son fluido cerebroespinal, sangre, plasma, suero, orina, esputo, saliva y similares.

- 15 En vista de sus propiedades farmacéuticas útiles, los compuestos objeto pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración.

- 20 Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención se combina en una mezcla íntima una cantidad eficaz de un compuesto particular, en forma de sal de adición de bases o ácidos, como ingrediente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable, pudiendo tomar el vehículo una amplia variedad de formas dependiendo de su forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en una forma de dosificación unidad deseada, preferentemente, para administración oral, rectal, percutánea o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de composiciones en forma de dosificación oral puede usarse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones, o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos.

- 30 Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan la forma de unidad de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se usan obviamente los vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros ingredientes para fomentar la solubilidad, por ejemplo. Pueden prepararse soluciones inyectables, por ejemplo, en las que el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y de glucosa. Se pueden preparar también suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden usar vehículos líquidos apropiados, agentes suspensores y similares. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente promotor de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinados opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones secundarias, no causando los aditivos un efecto perjudicial significativo en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse usando diversas vías, por ejemplo, en forma de un parche transdérmico, en forma de vertido puntual o en forma de pomada.

- 45 Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de dosificación unidad para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unidad, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones del presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de dichas formas de dosificación unidad son comprimidos (incluidos comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, obleas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas soperas y similares, y segregados múltiples de las mismas.

- 50 Los expertos en la técnica podrían determinar fácilmente la cantidad eficaz a partir de los resultados de ensayo que se presentan más adelante. En general, se considera que una cantidad terapéuticamente eficaz sería de 0,005 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, y en particular de 0,005 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida en forma de dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis pueden formularse como formas de dosificación unidad, por ejemplo, que contengan de 0,5 a 500 mg y, en particular, de 10 mg a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unidad.

- 60 Como otro aspecto de la presente invención se prevé una combinación de un inhibidor de HDAC con otro agente anticanceroso, especialmente para su uso como medicina, más específicamente en el tratamiento de cáncer o enfermedades relacionadas.

- 65 Para el tratamiento de las afecciones anteriores, los compuestos de la invención pueden usarse ventajosamente en combinación con uno o varios agentes medicinales adicionales, más particularmente con otros agentes anticancerosos. Ejemplos de agentes anticancerosos son:

- compuestos de coordinación de platino, por ejemplo cisplatino, carboplatino o oxaliplatino;
- compuestos de taxano, por ejemplo paclitaxel o docetaxel;
- 5 - inhibidores de topoisomerasa I tales como camptotecina, por ejemplo irinotecan o topotecan;
- inhibidores de topoisomerasa II tales como derivados de podofilotoxina antitumoral, por ejemplo etopósido o tenipósido;
- 10 - alcaloides de la vinca antitumorales, por ejemplo vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- derivados de nucleósido antitumorales, por ejemplo 5-fluorouracilo, gemcitabina o capecitabina;
- agentes alquilantes tales como mostaza de nitrógeno o nitrosourea, por ejemplo ciclofosfamida, clorambucilo,
- 15 carmustina o lomustina;
- derivados de antraciclina antitumorales, por ejemplo daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina o mitoxantrona;
- anticuerpos HER2, por ejemplo trastuzumab;
- 20 - antagonistas del receptor de estrógenos o moduladores selectivos del receptor de estrógenos, por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, droloxifeno, faslodex o raloxifeno;
- inhibidores de aromatasas tales como exemestano, anastrozol, letrozol y vorozol;
- 25 - agentes de diferenciación tales como retinoides, vitamina D y agentes que bloquean el metabolismo de ácido retinoico (RAMBA), por ejemplo Accutane;
- inhibidores de ADN metil transferasa, por ejemplo azacitidina;
- 30 - inhibidores de quinasa, por ejemplo flavoperidol, mesilato de imatinib o gefitinib;
- inhibidores de farnesiltransferasa;
- 35 - otros inhibidores de HDAC;
- inhibidores de la ruta de ubiquitina-proteasoma, por ejemplo Velcade; o
- Yondelis.
- 40 La expresión "compuesto de coordinación de platino" se usa en el presente documento para denotar cualquier compuesto de coordinación de platino que inhibe el crecimiento de células tumorales que proporciona platino en forma de ion.
- 45 La expresión "compuestos de taxano" indica una clase de compuestos que tienen un sistema anular de taxano y está relacionado con, o derivado de, extractos de determinadas especies de tejo (Taxus).
- La expresión "inhibidores de topoisomerasa" se usa para indicar enzimas que son capaces de alterar la topología de ADN en células eucarióticas. Son críticos para funciones celulares importantes y la proliferación celular. Hay dos clases de topoisomerasas en células eucarióticas, concretamente el tipo I y el tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monomérica de un peso molecular de aproximadamente 100.000. La enzima se une al ADN e introduce una rotura monocatenaria transitoria, desenrolla la doble hélice (o permite que se desenrolle) y subsiguientemente sella de nuevo la rotura antes de la disociación de la cadena de ADN. La topoisomerasa II tiene un mecanismo de acción similar que implica la inducción de roturas de cadenas de ADN o la formación de radicales libres.
- 50
- 55 La expresión "compuestos de camptotecina" se usa para indicar compuestos que están relacionados con, o derivados de, un compuesto de camptotecina parental, que es un alcaloide insoluble en agua derivado del árbol chino Camptothecin acuminata y del árbol indio Nothapodytes foetida.
- 60 La expresión "compuestos de podofilotoxina" se usa para indicar compuestos que están relacionados con, o derivados de, la podofilotoxina parental, que se extrae de la mandrágora.
- La expresión "alcaloides de la vinca antitumorales" se usa para indicar compuestos que están relacionados con, o derivados de, extractos de pervinca (Vinca rosea).
- 65 La expresión "agentes alquilantes" abarca diversos grupos de productos químicos que tienen la característica común

- de que tiene la capacidad de contribuir, en condiciones fisiológicas, con grupos alquilo a macromoléculas biológicamente vitales tales como el ADN. Con la mayor parte de los agentes más importantes tales como mostaza de nitrógeno y las nitrosoureas, los restos alquilantes activos se generan *in vivo* después de reacciones de degradación de complejos, algunas de las cuales son enzimáticas. Las actividades farmacológicas más importantes de los agentes alquilantes son las que perturban los mecanismos fundamentales con relación a la proliferación celular, en particular la síntesis de ADN y la división celular. La capacidad de los agentes alquilantes para interferir con la función y la integridad del ADN en tejidos rápidamente proliferativos proporciona la base para sus aplicaciones terapéuticas y para muchas de sus propiedades tóxicas.
- 10 La expresión "derivados de antraciclina antitumorales" comprende antibióticos obtenidos del hongo *Strep. peuticus* var. *caesi*us y sus derivados, caracterizados por tener una estructura anular de tetraciclina con un azúcar no habitual, daunosamina, unido por una unión glucosídica.
- 15 La amplificación de la proteína del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER 2) en carcinomas de mama primarios se ha demostrado que está relacionada con una prognosis clínica pobre para determinados pacientes. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 humanizado derivado de ADN que se une con gran afinidad y especificidad al dominio extracelular del receptor HER2.
- 20 Muchos cánceres de mama tienen receptores de estrógenos y el crecimiento de estos tumores puede estimularse con estrógeno. Las expresiones "antagonista del receptor de estrógenos" y "moduladores selectivos del receptor de estrógenos" se usan para indicar inhibidores competitivos de estradiol que se unen al receptor de estrógenos (ER). Los moduladores selectivos del receptor de estrógenos, cuando se unen al ER, inducen un cambio en la forma tridimensional del receptor, modulando su unión al elemento de respuesta de estrógenos (ERE) en ADN.
- 25 En mujeres postmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos en circulación es a partir de la conversión de andrógenos suprarrenales y de ovario (androstenediona y testosterona) a estrógenos (estronas y estradiol) mediante la enzima aromatasa en tejidos periféricos. La privación de estrógenos mediante la inhibición o inactivación de aromatasa es un tratamiento eficaz y selectivo para algunas pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama dependiente de hormonas.
- 30 La expresión "agente antiestrogénico" se usa en el presente documento para incluir no sólo antagonistas del receptor de estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos, sino también inhibidores de aromatasa tal como se ha tratado anteriormente.
- 35 La expresión "agentes de diferenciación" engloba compuestos que pueden, de diversos modos, inhibir la proliferación celular e inducir diferenciación. La vitamina D y los retinoides son conocidos por tener un papel principal en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares normales y tumorales. Los agentes que bloquean el metabolismo de ácido retinoico (RAMBA) aumentan los niveles de ácidos retinoicos endógenos inhibiendo el metabolismo mediado por citocromo P450 de ácido retinoico.
- 40 Los cambios de metilación de ADN están entre las anormalidades más comunes en neoplasia humana. La hipermetilación dentro de los promotores de genes seleccionados se asocia con la inactivación de los genes implicados. La expresión "inhibidores de la ADN metil transferasa" se usa para indicar compuestos que actúan inhibiendo farmacológicamente la ADN metil transferasa y reactivando la expresión génica de supresores tumorales.
- 45 La expresión "inhibidores de quinasa" comprende inhibidores potentes de quinasas que están implicados en la progresión del ciclo celular y la muerte celular programada (apoptosis).
- 50 La expresión "inhibidores de farnesiltransferasa" se usa para indicar compuestos que se han diseñado para evitar la farnesilación de Ras y otras proteínas intracelulares. Se ha demostrado que tienen un efecto sobre la proliferación y la supervivencia de células tumorales.
- La expresión "otros inhibidores de HDAC" comprende, pero no está limitada a:
- 55 - carboxilatos, por ejemplo butirato, ácido cinámico, 4-fenilbutirato o ácido valproico;
- ácidos hidroxámicos, por ejemplo ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), piperazina que contiene análogos de SAHA, biaril hidroxamato A-161906 y sus análogos de carbozolid éter, tetrahidropiridina y tetralona, aril-N-hidroxicarboxamides bicíclicas, piroxamida, CG-1521, PXD-101, ácido sulfonamida hidroxámico, LAQ-824, LBH-589, tricostatina A (TSA), oxamflatina, scriptaid, moléculas tricíclicas relacionadas con scriptaid, ácido m-carboxi cinámico, ácido bishidroxámico (CBHA), ácidos hidroxámicos similares a CBHA, análogos de ácido trapoxina-hidroxámico, CRA-024781, R306465 y ácidos benzoil- y heteroaril-hidroxámicos relacionados, aminosuberatos y malonildiamidas;
- 60 - tetrapéptidos cíclicos, por ejemplo trapoxina, apidicina, depsipéptido, compuestos relacionados con espirucostatina, RedFK-228, tetrapéptidos cíclicos que contienen sulfhidrilo (SCOP), tetrapéptidos cíclicos que contienen ácido
- 65

hidroxámico (CHAP), TAN-174s y azumamidas;

- benzamidas, por ejemplo MS-275 o CI-994, o

5 - depudecina.

La expresión "inhibidores de la ruta de ubiquitina-proteasoma" se usa para identificar compuestos que inhiben la destrucción dirigida de proteínas celulares en las proteasoma, incluidas proteínas reguladoras del ciclo celular.

10 Para el tratamiento de cáncer, los compuestos según la presente invención pueden administrarse a un paciente tal como se ha descrito anteriormente, junto con irradiación. Irradiación significa la radiación de ionización y en particular radiación gamma, especialmente la emitida por aceleradores lineales o por radionúclidos que son de uso común actualmente. La irradiación del tumor por radionúclidos puede ser externa o interna.

15 La presente invención también se refiere a una combinación según la invención de un agente anticanceroso y un inhibidor de HDAC según la invención.

La presente invención también se refiere a una combinación según la invención para su uso en terapia médica, por ejemplo para inhibir el crecimiento de células tumorales.

20 La presente invención también se refiere a una combinación según la invención para inhibir el crecimiento de células tumorales.

25 También se divulga un método de inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una combinación según la invención.

Adicionalmente se divulga un método para inhibir el crecimiento anormal de células, incluidas células transformadas, administrando una cantidad eficaz de un compuesto según la invención.

30 El otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo en composiciones separadas o unitarias) o secuencialmente en cualquier orden. En este último caso, los dos compuestos se administrarán dentro de un periodo y en una cantidad y de una manera que sea suficiente para asegurar que se logra un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el método y el orden de administración preferentes y las cantidades de dosificación y regímenes respectivos para cada componente de la combinación dependerán del agente medicinal adicional particular y el inhibidor de HDAC que se administran, de su vía de administración, del tumor particular que se va a tratar y del huésped particular que se va a tratar. El método y el orden de administración óptimos y las cantidades de dosificación y el régimen pueden determinarse por los expertos en la técnica usando métodos convencionales y con la información que se proporciona en el presente documento.

40 El compuesto de coordinación de platino se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo de 50 a 400 mg/m^2 , particularmente para cisplatino en una dosis de aproximadamente 75 mg/m^2 y para carboplatino de aproximadamente 300 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

45 El compuesto de taxano se administra ventajosamente en una dosis de 50 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo de 75 a 250 mg/m^2 , particularmente para paclitaxel en una dosis de aproximadamente 175 a 250 mg/m^2 y para docetaxel de aproximadamente 75 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

50 El compuesto de camptotecina se administra ventajosamente en una dosis de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo de 1 a 300 mg/m^2 , particularmente para irinotecan en una dosis de aproximadamente 100 a 350 mg/m^2 y para topotecan de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

55 El derivado de pofilotoxina antitumoral se administra ventajosamente en una dosis de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo de 50 a 250 mg/m^2 , particularmente para etopósido en una dosis de aproximadamente 35 a 100 mg/m^2 y para tenipósido de aproximadamente 50 a 250 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

60 El alcaloide de vinca antitumoral se administra ventajosamente en una dosis de 2 a 30 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, particularmente para vinblastina en una dosis de aproximadamente 3 a 12 mg/m^2 , para vincristina en una dosis de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 y para vinorelbina en una dosis de aproximadamente 10 a 30 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

65 El derivado de nucleósido antitumoral se administra ventajosamente en una dosis de 200 a 2.500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo de 700 a 1.500 mg/m^2 , particularmente para 5-FU en una dosis de aproximadamente 200 a 500 mg/m^2 , para gemcitabina en una dosis de aproximadamente 800 a 1200 mg/m^2 y para capecitabina de aproximadamente 1000 a 2.500 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El agente alquilante tal como mostaza de nitrógeno o nitrosourea se administra ventajosamente en una dosis de 100 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo de 120 a 200 mg/m^2 , particularmente para ciclofosfamida en una dosis de aproximadamente 100 a 500 mg/m^2 , para clorambucilo en una dosis de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg, para carmustina en una dosis de aproximadamente 150 a 200 mg/m^2 y para lomustina en una dosis de aproximadamente 100 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El derivado de antraciclina antitumoral se administra ventajosamente en una dosis de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo de 15 a 60 mg/m^2 , particularmente para doxorubicina en una dosis de aproximadamente 40 a 75 mg/m^2 , para daunorrubicina en una dosis de aproximadamente 25 a 45 mg/m^2 y para idarrubicina de aproximadamente 10 a 15 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El trastuzumab se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, particularmente de 2 a 4 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El agente antiestrogénico se administra ventajosamente en una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg diarios dependiendo del agente particular y de la afección que se va a tratar. El tamoxifeno se administra ventajosamente oralmente en una dosis de 5 a 50 mg, preferentemente de 10 a 20 mg dos veces al día, continuando la terapia durante el tiempo suficiente como para lograr y mantener el efecto terapéutico. El toremifeno se administra ventajosamente oralmente en una dosis de aproximadamente 60mg una vez al día, continuando la terapia durante el tiempo suficiente como para lograr y mantener el efecto terapéutico. El anastrozol se administra ventajosamente oralmente en una dosis de aproximadamente 1 mg una vez al día. El droloxifeno se administra ventajosamente oralmente en una dosis de aproximadamente 20 – 100 mg una vez al día. El raloxifeno se administra ventajosamente oralmente en una dosis de aproximadamente 60 mg una vez al día. El exemestano se administra ventajosamente oralmente en una dosis de aproximadamente 25 mg una vez al día.

Estas dosis pueden administrarse, por ejemplo, una vez, dos veces o más por ciclo de tratamiento, que puede repetirse, por ejemplo, cada 7, 14, 21 ó 28 días.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los componentes de las combinaciones según la invención, es decir, el agente medicinal adicional y el inhibidor de HDAC, pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Los componentes pueden formularse por separado en composiciones farmacéuticas individuales o en una composición farmacéutica unitaria que contenga ambos componentes.

Por lo tanto, la presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende el agente medicinal adicional y el inhibidor de HDAC junto con uno o varios vehículos farmacéuticos.

La presente invención también se refiere a una combinación según la invención en forma de una composición farmacéutica que comprende un agente anticanceroso y un inhibidor de HDAC según la invención junto con uno o varios vehículos farmacéuticos.

La presente invención también se refiere al uso de una combinación según la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para la inhibición del crecimiento de células tumorales.

La presente invención también se refiere a un producto que contiene como primer ingrediente activo un inhibidor de HDAC según la invención y como segundo ingrediente activo un agente anticanceroso, en forma de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

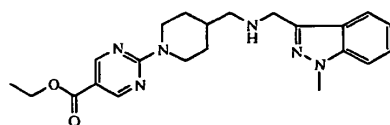
Parte experimental

En adelante, "DCM" significa diclorometano, "DIPE" significa diisopropil éter, "DMA" significa N,N-dimetilacetamida, "DMF" significa N,N-dimetilformamida, "EDC" significa N'-(etilcarbonimidiloil)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina, monohidrato, "EtOAc" significa acetato de etilo, "EtOH" significa etanol, "HOBT" significa 1-hidroxí-1H-benzotriazol, "MeOH" significa metanol, "TFA" significa ácido trifluoroacético, "THF" significa tetrahidrofurano y "PyBOP" significa hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidino-fosfonio.

A. Preparación de compuestos intermedios

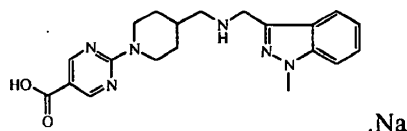
Ejemplo A1

a) Preparación del intermedio 1



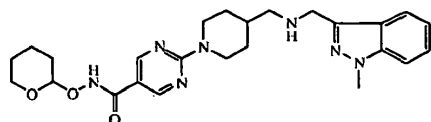
Una mezcla de éster etílico del ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinacarboxílico (0,0045 mol), 1-metil-1*H*-indazol-3-carboxaldehído (0,0048 mol) y sulfato de magnesio (c.s.) en MeOH (80 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió tetrahidroborato de sodio (0,0073 mol) en porciones. La mezcla se agitó durante 5 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. Después se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (2 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 1,3 g (70 %) del intermedio 1.

b) Preparación del intermedio 2



Una mezcla del intermedio 1 (0,0032 mol) e hidróxido de sodio (0,0064 mol) en EtOH (100 ml) se agitó a 75 °C durante 12 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad, rindiendo 1,28 g (100 %) del intermedio 2.

c) Preparación del intermedio 3

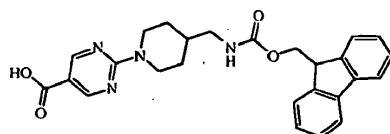


Se añadieron en porciones EDC (0,0048 mol) y HOBT (0,0048 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 2 (0,0032 mol) en DCM (60 ml) y THF (60 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió O-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0064 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM.

Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (2 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 93/7/0,5). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,6 g, 39 %) se cristalizó a partir de CH₃CN/dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,45g del intermedio 3, punto de fusión 153 °C.

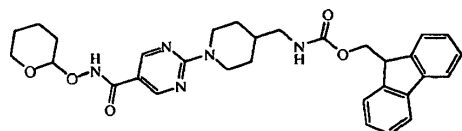
Ejemplo A2

a) Preparación del intermedio 4



Una mezcla de éster etílico del ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinacarboxílico (0,0072 mol) en THF (40 ml) y hidróxido de sodio 1 N (40 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió ácido clorhídrico 1 N (40 ml). La reacción se agitó durante 10 minutos. Se añadió carbonato de sodio (0,0216 mol). La reacción se agitó durante 10 minutos. Se añadió en porciones 1-[(9*H*-fluoroen-9-ilmetoxi)carbonil]oxi]-2,5-pirrolidinadiona (0,0072 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, después se enfrió a 0 °C y se acidificó con ácido clorhídrico. El precipitado se filtró, se lavó con dietil éter y se secó, rindiendo 4,1 g (100 %) del intermedio 4.

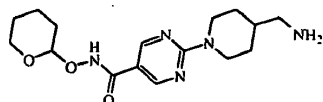
b) Preparación del intermedio 5



Se añadió una mezcla de EDC (0,0455 mol) y HOBT (0,0455 mol) a 10 °C a una mezcla del intermedio 4 (0,0379

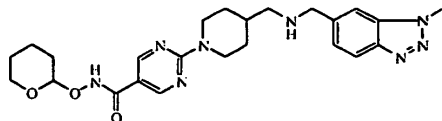
mol) y trietilamina (0,114 mol) en DCM/HOBT (800 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0455 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (23 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (20-45 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 9,3 g (100 %) del intermedio 5.

c) Preparación del intermedio 6



Una mezcla del intermedio 5 (0,0355 mol) y piperidina (0,089 mol) en DCM (400 ml) se agitó a 35 °C durante 72 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó. El residuo (25g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 80/20/2). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 6,7 g (56 %) del intermedio 6, punto de fusión 129 °C.

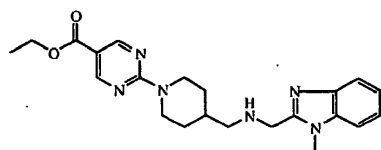
d) Preparación del intermedio 7



Una mezcla del intermedio 6 (0,0009 mol) y 1-metil-1H-benzotriazol-6-carboxaldehído (0,001 mol) en MeOH (40 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después se agitó a 50 °C durante 12 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió tetrahidrobórato de sodio (0,0013 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añadió un mínimo de agua. La mezcla se extrajo con DCM. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,5 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 90/10/1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,28 g, 65 %) se cristalizó a partir de DIPE. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,15 g del intermedio 7, punto de fusión 140 °C.

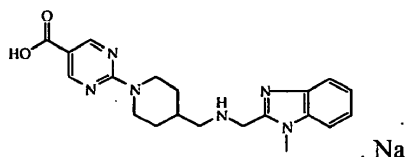
Ejemplo A3

a) Preparación del intermedio 8



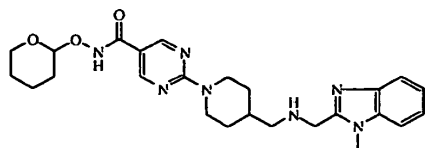
Una mezcla de éster etílico del ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinacarboxílico (0,0038 mol), 1-metil-1H-indazol-2-carboxaldehído (0,0045 mol) y sulfato de magnesio (c.s.) en MeOH (80 ml) se agitó a 60 °C, después se enfrió de nuevo a temperatura ambiente. Se añadió tetrahidrobórato de sodio (0,0064 mol) en porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se enfrió de nuevo a temperatura ambiente, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (1 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (20-45 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,3). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,32 g (100 %) del intermedio 8.

b) Preparación del intermedio 9



Una mezcla del intermedio 8 (0,0024 mol) e hidróxido de sodio (0,0049 mol) en EtOH (80 ml) se agitó a 80 °C durante 6 horas, después se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado se filtró, se lavó con EtOH, después con dietil éter y se secó, rindiendo 0,8 g (82 %) del intermedio 9.

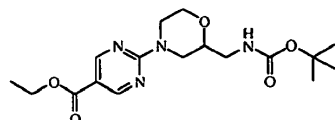
c) Preparación del intermedio 10



5 Se añadieron a porciones EDC (0,003 mol) y HOBt (0,41 g) a temperatura ambiente a una mezcla del intermedio 9 (0,002 mol) en DCM (80 ml) y THF (80 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió O-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)-hidroxilamina (0,004 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (1,8 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,5). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,63 g, 66 %) se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,5 g del intermedio 10, punto de fusión 196 °C.

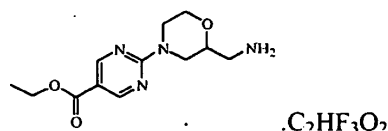
Ejemplo A4

a) Preparación del intermedio 11



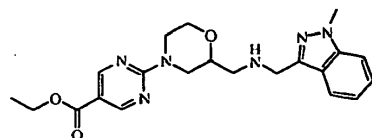
20 Una solución de éster etílico del ácido 2-(metilsulfonil)-5-pirimidinacarboxílico (0,0118 mol) en acetonitrilo (30 ml) se añadió gota a gota a una solución de éster 1,1-dimetilético de ácido (2-morfolinilmetil)-carbámico (0,0098 mol) y carbonato de potasio (0,0196 mol) en acetonitrilo (80 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo (5,6 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-35 μm) (eluyente: DCM/MeOH 90/1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,75 g, 75 %) se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,3 g del intermedio 11, punto de fusión 100 °C.

b) Preparación del intermedio 12



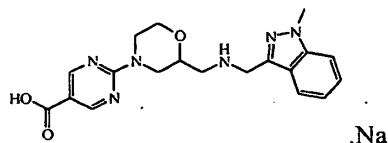
35 Se añadió TFA (7,5 ml) a 0 °C a una mezcla del intermedio 11 (0,037 mol) en DCM (150 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El disolvente se evaporó. Se añadió dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 13,5 g del intermedio 12, punto de fusión 180 °C.

c) Preparación del intermedio 13



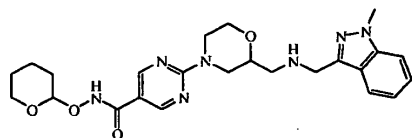
40 Una mezcla del intermedio 12 (0,0087 mol) y 1-metil-1H-indazol-3-carboxaldehído (0,013 mol) en MeOH (100 ml) se agitó a 60 °C durante la noche, después se enfrió a 10 °C. Se añadió tetrahidrobórato de sodio (0,0015 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (4,6 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄O 97/3/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 1,9 g (62 %) del intermedio 13.

d) Preparación del intermedio 14



Una mezcla del intermedio 13 (0,0054 mol) e hidróxido de sodio (0,0108 mol) en EtOH (80 ml) se agitó a 80 °C durante la noche, después se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó, rindiendo 2,1 g (100 %) del intermedio 14.

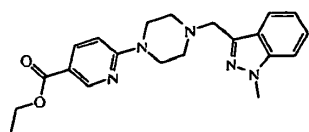
e) Preparación del intermedio 15



Se añadió trietilamina (0,0075 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 14 (0,0025 mol) en THF/DCM (20 ml) con flujo de N₂. Se agitó la mezcla durante 15 minutos. Se añadió O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,005 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (1,7 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/H₂O 95/5/0,9). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,34 g (29 %) del intermedio 15.

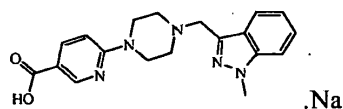
Ejemplo A5

a) Preparación del intermedio 16



Una mezcla de éster etílico del ácido 6-(1-piperazinil)-3-piridinacarboxílico (0,0094 mol) y 1-metil-1H-indazol-3-carboxaldehído (0,0131 mol) en 1,2-dicloro-etano (60 ml) se agitó a 60 °C durante 24 horas, después se enfrió a 10 °C. Se añadió tris(acetato-α-O) borohidrato (1-) de sodio (0,016 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (5,5 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 98/2/0,1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,725 g, 75 %) se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,43 g del intermedio 16, punto de fusión 237 °C.

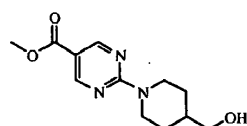
b) Preparación del intermedio 17



Una mezcla del intermedio 16 (0,0008 mol) e hidróxido de sodio (0,0017 mol) en EtOH (100 ml) se agitó a 80 °C durante la noche, después se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado se filtró, se lavó con EtOH, después con dietil éter y se secó, rindiendo 3 g (94 %) del intermedio 17.

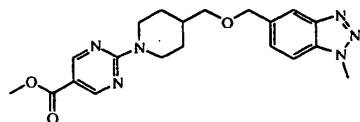
Ejemplo A6

a) Preparación del intermedio 18



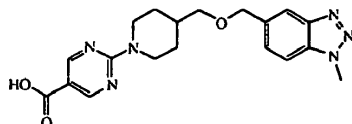
Se añadió una solución de éster metílico del ácido 2-cloro-5-pirimidinacarbóxico (0,033 mol) en DCM (80 ml) a temperatura ambiente a una solución de 4-piperidinametanol (0,066 mol) y *N*-etil-*N*-(1-metiletil)-2-propanoamina (0,083 mol) en DCM (100 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y 30 minutos, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se recogió en pentano. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 7,88 g (95 %) del intermedio 18.

b) Preparación del intermedio 19



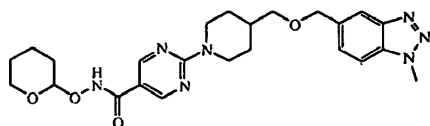
Una mezcla del intermedio 18 (0,01 mol) y 5-(bromometil)-1-metil-1*H*-benzotriazol (0,0035 mol) en DMF (30 ml) se agitó a 140 °C durante 6 horas. El disolvente se evaporó. El residuo se recogió en EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, después con cloruro de sodio saturado, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se combinó con otra fracción obtenida de un modo similar, rindiendo 4 g, y después se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH 90/1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,9 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH 90/1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,22 g (100 %) del intermedio 19.

c) Preparación del intermedio 20



Una mezcla del intermedio 19 (0,0011 mol) e hidróxido de litio (0,0021 mol) en THF (10 ml) y agua (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evaporó. Se añadió agua (10 ml). La mezcla se lavó dos veces con dietil éter. La capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico 3 N hasta que se ajustó el pH a 4. El precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó, rindiendo 0,29 g (71 %) del intermedio 20.

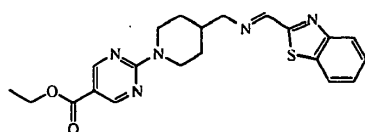
d) Preparación del intermedio 21



Se añadieron EDC (0,001 mol) y HOBt (0,001 mol) a temperatura ambiente a una mezcla del intermedio 20 (0,0007 mol), *O*-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-hidroxilamina (0,001 mol) y trietilamina (0,003 mol) en DCM/THF (50/50) (40 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,28 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH 98/2). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, rindiendo: 0,28 g (80 %). Una parte (0,04g) del residuo resultante se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,032 g del intermedio 21, punto de fusión 159 °C.

Ejemplo A7

a) Preparación del intermedio 22

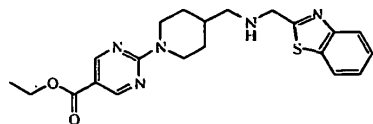


Se añadió sulfato de magnesio (c.s.) a temperatura ambiente a una solución de éster etílico del ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinacarbóxico (0,0013 mol) y 2-benzotiazolcarboxaldehído (0,0015 mol) en MeOH (15 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó y se sometió a reflujo durante 48 horas, después se enfrió a 10 °C. Se

añadió tetrahidroborato de sodio (0,0026 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió DCM (15 ml). La mezcla se agitó durante la noche, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,5 g del intermedio 22. Este producto se usó directamente en la siguiente etapa de reacción.

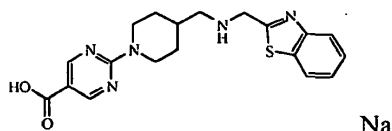
5

b) Preparación del intermedio 23



10 Se hidrogenó a temperatura ambiente durante 48 horas a 300 kPa de presión una mezcla del intermedio 22 (0,0012 mol) y Pd/C (0,5 g) en MeOH (40 ml), después se filtró a través de celite. El filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo (0,46 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5 µm) (eluyente: DCM/MeOH 100/0 a 95/5). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,143 g (30 %) del intermedio 23.

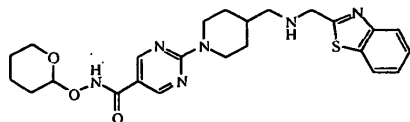
15 c) Preparación del intermedio 24



20 Una mezcla del intermedio 23 (0,0003 mol) e hidróxido de sodio (0,0014 mol) en EtOH (15 ml) se agitó y se sometió a reflujo durante 4 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo se recogió en dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,14 g (100 %) del intermedio 24, punto de fusión > 260 °C.

d) Preparación del intermedio 25

25

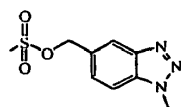


30 Se añadieron EDC (0,0007 mol) y HOBT (0,0007 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 24 (0,0003 mol) en THF (15 ml) y DCM (15 ml) con flujo de N₂. Se agitó la mezcla durante 15 minutos. Se añadió O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0007 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,24 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (10 µm) (eluyente: DCM/MeOH 98/2). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,075 g (17 %) del intermedio 25.

35

Ejemplo A8

Preparación del intermedio 26



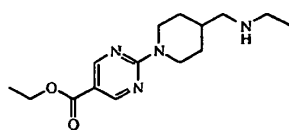
40

45 Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,0046 mol) a 5 °C a una mezcla de 1-metil-1H-benzotriazol-5-metanol (0,0031 mol) y trietilamina (0,0092 mol) en DCM (50 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a 10 °C durante 2 horas y 30 minutos, después se evaporó hasta sequedad, rindiendo el intermedio 26. Este producto se usó directamente en la etapa de reacción siguiente.

Ejemplo A9

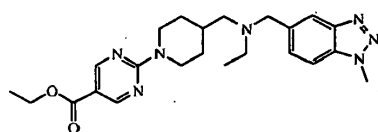
a) Preparación del intermedio 27

50



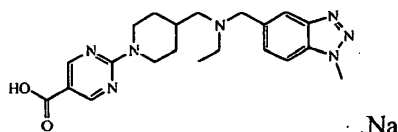
Una mezcla de éster etílico del ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinacarboxílico (0,0038 mol), acetaldehído (0,0076 mol) y Pd/C (0,2 g) en MeOH (100 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente durante 24 horas, después se filtró a través de celite. El filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo (2,35 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μ m) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 90/10/0,5). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,66 g (30 %) del intermedio 27.

b) Preparación del intermedio 28



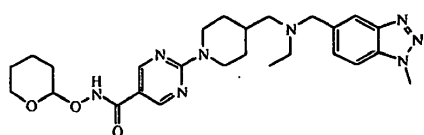
Una mezcla del intermedio 27 (0,002 mol), el intermedio 26 (0,0031 mol) y carbonato de potasio (0,0061 mol) en acetonitrilo (60 ml) se agitó y se sometió a reflujo durante la noche, después se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,76 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5 μ m) (eluyente: DCM/MeOH 100/0 a 98/2). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,42 g (47 %) del intermedio 28.

c) Preparación del intermedio 29



Una mezcla del intermedio 28 (0,0009 mol) e hidróxido de sodio (0,0038 mol) en EtOH (50 ml) se agitó y se sometió a reflujo durante 4 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y se recogió en dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,35 g (85 %) del intermedio 29, punto de fusión > 2,60 °C.

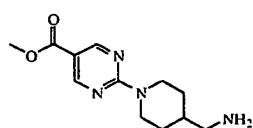
d) Preparación del intermedio 30



Se añadieron EDC (0,0016 mol) y HOBT (0,0016 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 29 (0,0008 mol) en THF (40 ml) y DCM (40 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió O-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)-hidroxilamina (0,0016 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 días, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,6 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5 μ m) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 99/1/0,05 a 93/7/0,35). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,285 g (70 %) del intermedio 30.

Ejemplo A10

a) Preparación del intermedio 31

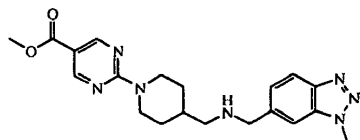


Se añadió gota a gota una solución de éster metílico del ácido 2-cloro-5-pirimidinacarboxílico (0,058 mol) en DMA (80 ml) a temperatura ambiente a una solución de 4-piperidinametanoamina (0,116 mol) y N-etil-N-(1-metiletil)-2-

propanoamina (0,145 mol) en DMA (150 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 horas y 30 minutos, se vertió en agua con hielo y se extrajo con EtOAc, después con DCM. La capa orgánica se lavó con agua, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se cristalizó a partir de DIPE. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 10 g (65 %) del intermedio 31.

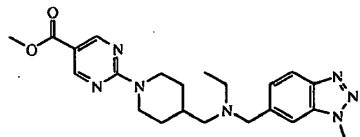
5

b) Preparación del intermedio 32



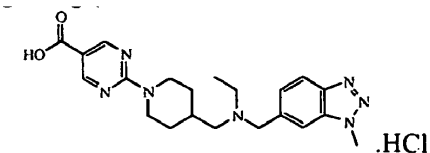
- 10 Una mezcla del intermedio 31 (0,008 mol) y 1-metil-1H-benzotriazol-6-carboxaldehído (0,0087 mol) en MeOH (250 ml) se agitó y se sometió a reflujo durante 15 horas, después se enfrió a 5 °C. Se añadió en porciones tetrahidrobórato de sodio (0,0112 mol). La mezcla se agitó a 5 °C durante 1 hora, después se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se vertió en hielo. El precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó. El residuo (3,1 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,2).
- 15 Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 2 g (63 %) del intermedio 32.

c) Preparación del intermedio 33



- 20 Una mezcla del intermedio 32 (0,0018 mol), yodo-etano (0,0037 mol) y trietilamina (0,0056 mol) en DMF (3,5 ml) se agitó a 70 °C durante 24 horas. El disolvente se evaporó. El residuo se recogió en agua. La mezcla se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,9 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 µm) (eluyente: DCM/MeOH 98/2). Las fracciones puras
- 25 se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,41 g (51 %) del intermedio 33.

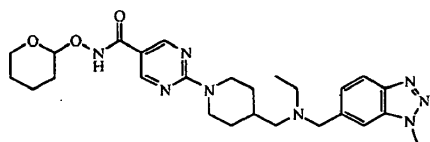
d) Preparación del intermedio 34



- 30 Una mezcla del intermedio 33 (0,0009 mol) e hidróxido de litio (0,0018 mol) en THF (25 ml) y agua (12,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió ácido clorhídrico 3 N hasta un pH de 4. La mezcla se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,35 g (83 %) del intermedio 34.

35

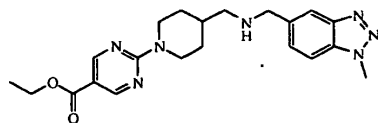
e) Preparación del intermedio 35



- 40 Se añadieron EDC (0,0012 mol) y HOBT (0,0012 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 34 (0,0007 mol), O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0012 mol) y trietilamina (0,0025 mol) en DCM/THF (60 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,55 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 99/1/0,1 a 93/7/0,7). Las fracciones
- 45 puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,31 g (72 %) del intermedio 35.

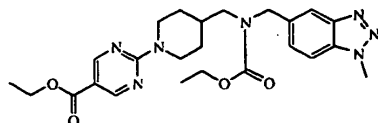
Ejemplo A11

a) Preparación del intermedio 36



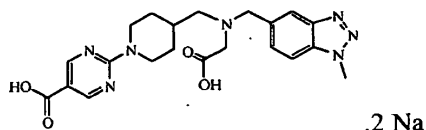
- 5 Una mezcla de éster etílico del ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinacarboxílico (0,0013 mol), 1-metil-1H-benzotriazol-5-carboxaldehído (0,0015 mol) y Pd/C (0,1 g) en MeOH (40 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente durante 4 horas a 300 kPa de presión, después se filtró a través de celite. El filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo (0,6 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5 µm) (eluyente: DCM/MeOH 100/0 a 95/5). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,23 g (43 %) del intermedio 36.

b) Preparación del intermedio 37



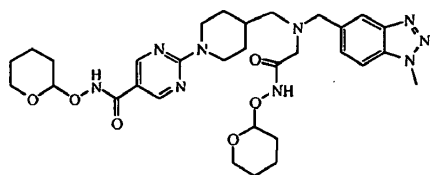
- 15 Una mezcla del intermedio 36 (0,0012 mol), éster etílico del ácido cloroacético (0,0018 mol) y trietilamina (0,0036 mol) en DMF (10 ml) se agitó a 50 °C durante 24 horas, después se agitó a 80 °C durante 24 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,56 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (10 µm) (eluyente: DCM/MeOH 99,5/0,5). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,21 g (35 %) del intermedio 37.

c) Preparación del intermedio 38



- 25 Una mezcla del intermedio 37 (0,0004 mol) e hidróxido de sodio (0,0017 mol) en EtOH (20 ml) se agitó y se sometió a reflujo durante 6 horas, después se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se evaporó hasta sequedad. El residuo se recogió en dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,2 g (100 %) del intermedio 38, punto de fusión > 260 °C.

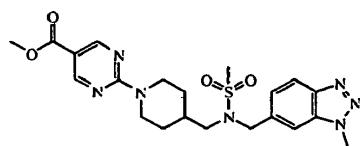
d) Preparación del intermedio 39



- 35 Se añadieron EDC (0,0016 mol) y HOBT (0,0016 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 38 (0,0004 mol) en THF (25 ml) y DCM (25 ml) con flujo de N₂. Se agitó la mezcla durante 15 minutos. Se añadió O-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)-hidroxilamina (0,0016 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,5 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (5 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 99/1/0,05 a 92/8/0,4). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,18 g (71 %) del intermedio 39.

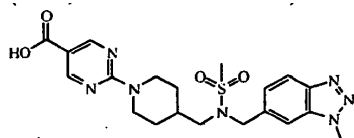
Ejemplo A12

a) Preparación del intermedio 40



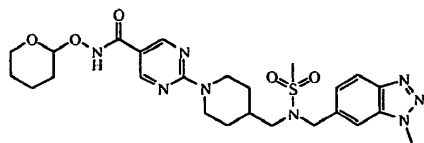
Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (0,0018 mol) a 5 °C a una solución del intermedio 32 (0,0012 mol) y trietilamina (0,0037 mol) en DCM (20 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se cristalizó a partir de DIPE. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,53 g (88 %) del intermedio 40, punto de fusión 190 °C.

b) Preparación del intermedio 41



Una mezcla del intermedio 40 (0,001 mol) e hidróxido de litio (0,002 mol) en THF (30 ml) y agua (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas, después se neutralizó añadiendo ácido clorhídrico 3 N. El disolvente se evaporó. El precipitado se filtró, se lavó con agua, después con dietil éter y se secó, rindiendo 0,3 g (64 %) del intermedio 41.

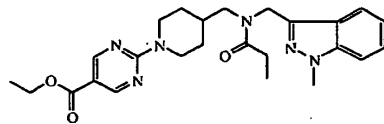
c) Preparación del intermedio 42



Se añadieron EDC (0,0009 mol) y HOBT (0,0009 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 41 (0,0006 mol), O-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)-hidroxilamina (0,0009 mol) y trietilamina (0,0019 mol) en DCM/THF (50/50) (30 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,5 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 µm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,33 g (92 %) del intermedio 42.

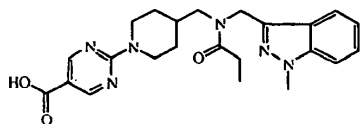
Ejemplo A13

a) Preparación del intermedio 43



Se añadieron gota a gota trietilamina (0,011 mol) y después cloruro de propanoilo (0,0049 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 1 (0,0038 mol) en DCM (80 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se vertió en agua con hielo y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (2 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 µm) (eluyente: DCM/MeOH 99/1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. Esta fracción (1,4 g, 80 %) se cristalizó a partir de dietil éter/DIPE. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 1,05 g del intermedio 43, punto de fusión 116 °C.

b) Preparación del intermedio 44

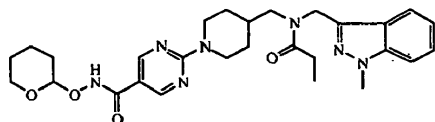


.Na

Una mezcla del intermedio 43 (0,0021 mol) e hidróxido de sodio (0,017 mol) en EtOH (80 ml) se agitó a 60 °C durante 15 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó. El residuo se recogió en dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 1,1 g (100 %) del intermedio 44.

5

c) Preparación del intermedio 45

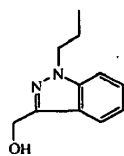


- 10 Se añadieron EDC (0,0032 mol) y HOBT (0,0032 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 44 (0,0021 mol) y trietilamina (0,0065 mol) en DCM/THF (120 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió O-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)-hidroxilamina (0,0043 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (1,8 g) se purificó mediante cromatografía de columna
- 15 en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,3). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,87 g, 75 %) se cristalizó a partir de dietil éter/DIPE. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,565 g del intermedio 45.

Ejemplo A14

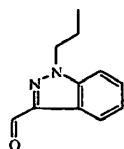
20

a) Preparación del intermedio 46



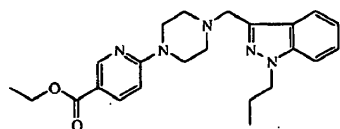
- 25 Se añadió hidrobis(2-metilpropil)-aluminio (0,0344 mol) a -70 °C a una solución de éster metílico del ácido 1-propil-1H-indazol-3-carboxílico (0,0138 mol) en THF (140 ml) con flujo de N₂. La mezcla se agitó a -70 °C, después se llevó a temperatura ambiente durante 1 hora, se vertió en HCl 1 N y hielo y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó, rindiendo 2,8 g (100 %) del intermedio 46.

b) Preparación del intermedio 47



- 35 Una mezcla del intermedio 46 (0,0138 mol) y óxido de manganeso (0,097 mol) en DCM (150 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después se filtró a través de celite. El celite se lavó con MeOH. El filtrado se evaporó, rindiendo 2,2 g (85 %) del intermedio 47.

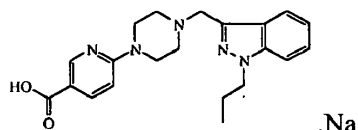
c) Preparación del intermedio 48



40

- Una mezcla de éster etílico del ácido 6-(1-piperazinil)-3-piridinacarboxílico (0,0057 mol) y el intermedio 47 (0,008 mol) en 1,2-dicloro-etano (30 ml) se agitó a 60 °C durante 24 horas, después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió en porciones NaBH(OAc)₃ (0,0096 mol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (3 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 1,4 g (61 %) del intermedio 48.
- 45

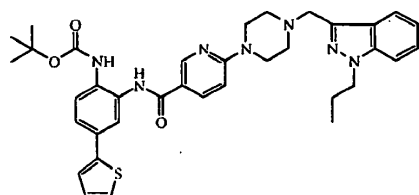
d) Preparación del intermedio 49



- 5 Una mezcla del intermedio 48 (0,0025 mol) e hidróxido de sodio (0,0049 mol) en EtOH (60 ml) se agitó a 80 °C durante 4 horas, después se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado se filtró y se lavó con EtOH. El filtrado (0,25 g) se evaporó hasta sequedad, rindiendo 0,7 g del intermedio 49.

e) Preparación del intermedio 50

10



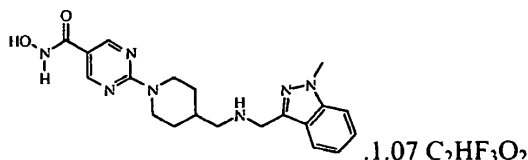
- 15 Se añadió trietilamina (0,002 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 49 (0,0005 mol), éster 1,1-dimetiletilico del ácido [2-amino-4-(2-tienil)fenil]-carbámico (0,001 mol) y PyBOP (0,0011 mol) en THF (3 ml) y DCM (3 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (1 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 93/7/0,5). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,14 g (43 %) del intermedio 50.

20 B. Preparación de los compuestos finales

Ejemplo B1

Preparación del compuesto 1

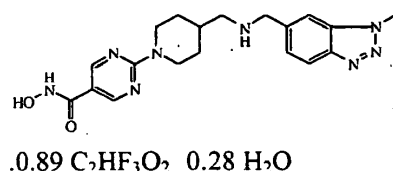
25



- 30 Se añadió gota a gota TFA (2 ml) a temperatura ambiente a una mezcla del intermedio 3 (0,001 mol) en MeOH (40 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, después se evaporó hasta sequedad. El residuo se cristalizó a partir de CH₃CN/dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,336 g (65 %) del compuesto 1, punto de fusión 197 °C.

Ejemplo B2

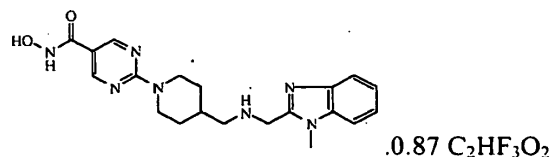
35 Preparación del compuesto 2



- 40 Se añadió TFA (1,7 ml) a 5 °C a una solución del intermedio 7 (0,0007 mol) en MeOH (34 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, después se evaporó hasta sequedad. El residuo se cristalizó a partir de dietil éter/CH₃CN. El precipitado se filtró, se lavó con dietil éter y se secó, rindiendo 0,32 g (90 %) del compuesto 2, punto de fusión 206 °C.

Ejemplo B3

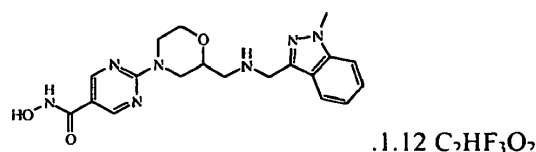
45

Preparación del compuesto 3

- 5 Se agitó una mezcla del intermedio 10 (0,001 mol) en TFA (2,5 ml) y MeOH (50 ml) a temperatura ambiente durante 72 horas, después se evaporó. El residuo se cristalizó a partir de CH₃CN/dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,5 g (96 %) del compuesto 3, punto de fusión 209 °C.

Ejemplo B4

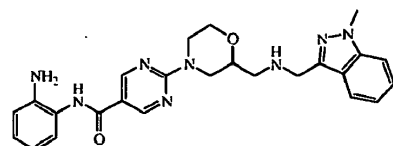
10

Preparación del compuesto 4

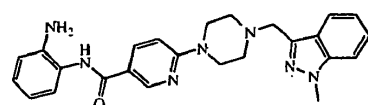
- 15 Se agitó una mezcla del intermedio 15 (0,0007 mol) en TFA (2 ml) y MeOH (40 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas, después se evaporó. El residuo se cristalizó a partir de CH₃CN/dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,241 g (65 %) del compuesto 4, punto de fusión 193 °C.

Ejemplo B5

20

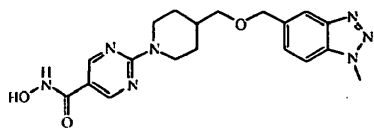
Preparación del compuesto 5

- 25 Se añadió trietilamina (0,01 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 14 (0,0025 mol), 1,2-bencenodiamina (0,0058 mol) y PyBOP (0,005 mol) en THF (30 ml) y DCM (30 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (4,3 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,5 a 93/7/0,5). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,4 g, 34 %) se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,288 g del compuesto 5, punto de fusión 152 °C.
- 30

Ejemplo B6Preparación del compuesto 6

- 40 Se añadió trietilamina (0,022 mol) a temperatura ambiente a una solución del intermedio 17 (0,0054 mol), 1,2-bencenodiamina (0,0124 mol) y PyBOP (0,0108 mol) en THF (50 ml) y DCM (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (8,3 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 96/4/0,4). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,48 g, 21 %) se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,314 g del compuesto 6, punto de fusión 219 °C.
- 45

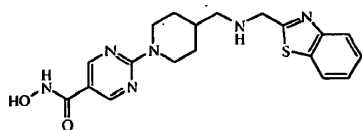
Ejemplo B7Preparación del compuesto 7



Se añadió gota a gota TFA (0,9 ml) a 5 °C a una solución del intermedio 21 (0,0003 mol) en MeOH (18 ml) y DCM (6 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El disolvente se semievolaporó. El precipitado se separó por filtración, se lavó con dietil éter y se secó, rindiendo 0,135 g (71 %) del compuesto 7, punto de fusión 197 °C.

Ejemplo B8

Preparación del compuesto 8

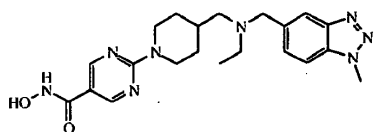


.0.91 C₂HF₃O₂

Se agitó una mezcla del intermedio 25 (0,0001 mol) en TFA (0,3 ml) y MeOH (8 ml) a temperatura ambiente durante 3 días, después se evaporó hasta sequedad. El residuo se cristalizó a partir de MeOH/CH₃CN/dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,049 g (64 %) del compuesto 8, punto de fusión 208 °C.

Ejemplo B9

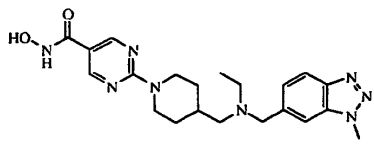
Preparación del compuesto 9



Se agitó una mezcla del intermedio 30 (0,0005 mol) en TFA (1,5 ml) y MeOH (30 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas, después se evaporó hasta sequedad. El residuo (0,38 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (25-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/agua 80/20/2). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,185 g, 78 %) se cristalizó a partir de CH₃CN/dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,15 g (63 %) del compuesto 9, punto de fusión 168 °C.

Ejemplo B10

Preparación del compuesto 10

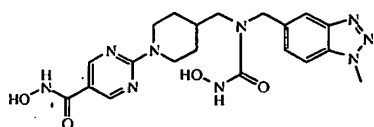


.1.1 C₂HF₃O₂

Se añadió TFA (1,5 ml) a 5 °C a una solución del intermedio 35 (0,0005 mol) en MeOH (30 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, después se evaporó hasta sequedad. El residuo se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,295 g (93 %) del compuesto 10, punto de fusión 110 °C.

Ejemplo B11

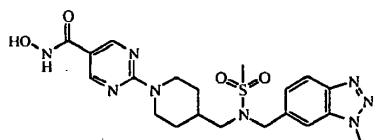
Preparación del compuesto 11



Se agitó una mezcla del intermedio 39 (0,0002 mol) en TFA (1 ml) y MeOH (20 ml) a temperatura ambiente durante 7 días, después se evaporó hasta sequedad. El residuo (0,2 g) se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice (25-40 μ m) (eluyente: DCM/MeOH/ NH_4OH 80/20/2). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,073 g) se cristalizó a partir de dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,061 g (46 %) del compuesto 11, punto de fusión 130 °C.

Ejemplo B12

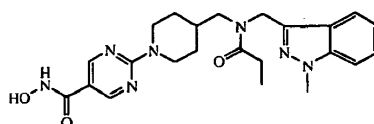
Preparación del compuesto 12



Se añadió gota a gota TFA (1,6 ml) a 5 °C a una solución del intermedio 42 (0,0005 mol) en MeOH (32 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió DCM (20 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Se evaporó el DCM. El precipitado se filtró, se lavó con MeOH, después con dietil éter y se secó, rindiendo 0,24 g (88 %) del compuesto 12, punto de fusión 206 °C.

Ejemplo B13

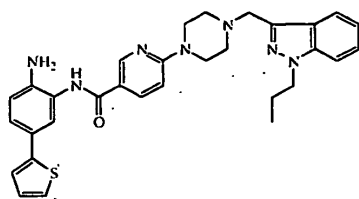
Preparación del compuesto 13



Se agitó una mezcla del intermedio 45 (0,0014 mol) en TFA (4 ml) y MeOH (80 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas, después se evaporó. El residuo se cristalizó a partir de CH_3CN /dietil éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, rindiendo 0,449 g (71 %) del compuesto 13, punto de fusión 199 °C.

Ejemplo B14

Preparación del compuesto 31



Una mezcla del intermedio 50 (0,0002 mol) en TFA (0,5 ml) y DCM (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, se vertió en agua con hielo, se basificó con carbonato de potasio al 10 % y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO_4), se filtró y el disolvente se evaporó, rindiendo 0,073 g (63 %) del compuesto 31, punto de fusión 138 °C.

La tabla F-1 enumera los compuestos que se han preparado según uno de los ejemplos anteriores. En la tabla se usan las siguientes abreviaturas: $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$ representa la sal de trifluoro acetato.

Tabla F-1:

.1.07 $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$; Co. N° 1; Ej. [B1]; pf. 197 °C	.0.89 $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$; Co. N° 2; Ej. [B2]; pf. 206 °C

.0.87 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 3; Ej. [B3]; pf. 209 °C	.1.12 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 4; Ej. [B4]; pf. 193 °C
Co. N° 5; Ej. [B5]; pf. 152 °C	Co. N° 6; Ej. [B6]; pf. 219 °C
Co. N° 7; Ej. [B7]; pf. 197 °C	.0.91 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 8; Ej. [B8]; pf. 208 °C
Co. N° 9; Ej. [B9]; pf. 168 °C	1.1 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 10; Ej. [B10] pf. 110 °C
Co. N° 11; Ej. [B11]; pf. 130 °C	Co. N° 12; Ej. [B12]; pf. 260 °C
Co. N° 13; Ej. [B13]; pf. 199 °C	Co. N° 31; Ej. [B14]
.1.26 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 14; Ej. [B1]; pf. 217 °C	.0.46 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 15; Ej. [B1]; mp: 160 °C
.0.37 C ₂ HF ₃ O ₃ ; Co. N° 16; Ej. [B1]; pf. 100 °C	.1.31 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 17; Ej. [B1]; pf. 166 °C

C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 18; Ej. [B1]; pf. 80 °C	.0.88 C ₂ HF ₃ O ₂ . 0.56 H ₂ O; Co. N° 19; Ej. [B2]; pf. 206 °C
.1.05 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 20; Ej. [B2]; pf. 227 °C	.0.89 C ₂ HF ₃ O ₂ . 1.71 H ₂ O; Co. N° 21; Ej. [B2]; pf. 81 °C
.1.27 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 22; Ej. [B2]; pf. 235 °C	.2 C ₂ HF ₃ O ₂ . 2H ₂ O; Co. N° 23; Ej. [B2]; pf. 165 °C
Co. N° 24; Ej. [B9]; pf. 193 °C	.0.51 H ₂ O; Co. N° 25; Ej. [B10]; pf. > 300 °C
Co. N° 26; Ej. [B13]; pf. 174 °C	Co. N° 27; Ej. [B13]; pf. 240 °C
Co. N° 28; Ej. [B13]; pf. 160 °C	Co. N° 29; Ej. [B 13]; pf. 204 °C
Co. N° 30; Ej. [B9]	

C. Ejemplos farmacológicos:

5 El ensayo *in vitro* para la inhibición de histona deacetilasa (véase el ejemplo C.I) mide la inhibición de la actividad enzimática de HDAC obtenida con los compuestos de fórmula (I).

10 La actividad celular de los compuestos de fórmula (I) se determinó sobre células tumorales A2780 usando un ensayo colorimétrico para evaluar la toxicidad o la supervivencia celular (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983) (véase el ejemplo C.2).

La solubilidad de un compuesto mide la capacidad del compuesto para estar presente en solución.

15 En un primer método se mide la capacidad de un compuesto para estar presente en solución acuosa después de una dilución (véase el ejemplo C.3.a). Se diluyen soluciones madre en DMSO con un único disolvente tampón acuoso en 3 etapas consecutivas. Para cada dilución se mide la turbidez con un nefelómetro.

A continuación, en un segundo método (C.3.b) se realiza un barrido de las mezclas en el escáner de solubilidad BD Gentest para analizar la existencia de precipitación.

En un tercer método, puede medirse la solubilidad de un compuesto a diferentes valores de pH usando un detector de nitrógeno quimioluminiscente (véase el ejemplo C.3.c).

La permeabilidad de un fármaco expresa su capacidad para moverse de un medio a, o a través de, otro. Específicamente, su capacidad para moverse a través de la membrana intestinal en el torrente sanguíneo y/o del torrente sanguíneo a la diana. La permeabilidad (véase el ejemplo C.4) puede medirse mediante la formación de una membrana artificial inmovilizada con filtro compuesta por una bicapa fosfolipídica. En el ensayo de la membrana artificial inmovilizada por filtro, se forma un "bocadillo" con una placa de microvaloración de 96 pocillos y una placa de filtro de 96 pocillos, de tal modo que cada pocillo compuesto se divide en dos cámaras con una solución donante en el fondo y una solución aceptora en la parte superior, separadas por un disco de microfiltro de 125 µm (poros de 0,45 µm), se recubre con solución al 2 % (p/v) en dodecano de dioleoilfosfatidil-colina, en condiciones que forman bicapas multilamelares dentro de los canales del filtro cuando el sistema entra en contacto con la solución tampón acuosa. La permeabilidad de los compuestos a través de esta membrana artificial se mide en cm/s. El propósito es observar la permeación de los fármacos a través de una membrana artificial paralela a 2 valores de pH diferentes: 4,0 y 7,4. La detección del compuesto se realiza mediante espectrometría UV a una longitud de onda óptima de entre 250 y 500 nm.

El metabolismo de fármacos significa que un compuesto xenobiótico o endobiótico soluble en lípidos se transforma enzimáticamente en (a) metabolito(s) polar(es) soluble(s) en agua y excretable(s). El órgano principal para el metabolismo de fármacos es el hígado. Los productos metabólicos son frecuentemente menos activos que los fármacos parentales o son inactivos. No obstante, algunos metabolitos pueden haber mejorado su actividad o sus efectos tóxicos. De este modo, el metabolismo de fármacos puede incluir tanto los procesos de "desintoxicación" como de "intoxicación". Uno de los sistemas enzimáticos principales que determinan la capacidad del organismo para encargarse de fármacos y productos químicos se representa por las citocromo P450 monooxigenasas, que son enzimas dependientes de NADPH. La estabilidad metabólica de compuestos puede determinarse *in vitro* usando el tejido humano subcelular (véase el ejemplo C.5.a.). En el presente documento, la estabilidad metabólica de los compuestos se expresa como % de fármaco metabolizado después de 15 minutos de incubación de estos compuestos con microsomas. La cuantificación de los compuestos se determina mediante análisis por CL-EM. La estabilidad metabólica de compuestos también puede determinarse calculando la semivida de compuestos en células hepatocíticas de rata (véase el ejemplo C.5.b.).

Se ha demostrado que una amplia diversidad de agentes antitumorales activan la proteína p21, incluidos agentes que dañan el ADN e inhibidores de histona deacetilasa. Los agentes que dañan el ADN activan el gen p21 a través del supresor tumoral p53, mientras que los inhibidores de histona deacetilasa activan transcripcionalmente el gen p21 mediante el factor de transcripción Sp1. De este modo, los agentes que dañan el ADN activan el promotor de p21 a través del elemento de respuesta de p53, mientras que los inhibidores de histona deacetilasa activan el promotor de p21 a través de los sitios sp1 (localizados en la región -60 pb a +40 pb con relación a la caja TATA) conduciendo ambos al aumento de la expresión de la proteína p21. Cuando el promotor de p21 en una célula consta de un fragmento de promotor de p21 de 1300 pb que no comprende los elementos de respuesta de p53 no responde, en consecuencia, a agentes que dañan el ADN. La capacidad de compuestos para inducir p21 puede evaluarse de varios modos.

Un primer método es tratar células tumorales con el compuesto de interés y después de la lisis de las células detectar la inducción de p21 con el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (WAF1 ELISA de Oncogene) para p21. El ensayo de p21 es un ensayo inmunológico enzimático "bocadillo" que se usa tanto en anticuerpos monoclonales de ratón como en anticuerpos policlonales de conejo. Un anticuerpo policlonal de conejo, específico para la proteína p21 humana, se ha inmovilizado sobre la superficie de los pocillos de plástico que proporciona el kit. Cualquier p21 presente en la muestra que se va a analizar se une al anticuerpo de captura. El anticuerpo monoclonal detector biotinilado también reconoce la proteína p21 humana y se unirá a cualquier p21 que haya sido retenido por el anticuerpo de captura. El anticuerpo detector, a su vez, se une mediante estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. La peroxidasa de rábano picante cataliza la conversión de la tetrametilbencidina del sustrato cromogénico de una solución incolora a una solución azul (o amarilla después de la adición de reactivo de detención), la intensidad de la cual es proporcional a cantidad de proteína p21 unida a la placa. El producto de reacción coloreado se cuantifica usando un espectrofotómetro. La cuantificación se logra mediante la construcción de una curva patrón usando concentraciones conocidas de p21 (proporcionada liofilizada). Este ensayo puede medir la inducción de p21 como consecuencia del daño a ADN o como consecuencia de la inhibición de histona deacetilasa (véase el ejemplo C.6.a.).

Otro método evalúa la capacidad de compuestos para inducir p21 como consecuencia de la inhibición de HDAC a nivel celular. Estas células pueden transfectarse de forma estable con un vector de expresión que contiene un fragmento del promotor de p21 con 1300 pb que no comprende los elementos de respuesta de p53 y en el que un aumento de la expresión de un gen comunicador, en comparación con los niveles de control, identifica que el compuesto tiene capacidad inductora de p21. El gen comunicador es una proteína fluorescente y la expresión del gen comunicador se mide como la cantidad de luz fluorescente emitida (véase el ejemplo C.6.b.). Este último método es un método *in vivo* en el que se usan ratones para analizar la actividad farmacéutica de un compuesto. Las células tumorales transformadas de forma estable descritas anteriormente pueden administrarse a ratones en

una cantidad suficiente para efectuar la producción de un tumor. Después de que las células tumorales han tenido suficiente tiempo para formar un tumor, puede administrarse un compuesto potencialmente activo a los animales y se evalúa el efecto de dicho compuesto sobre las células tumorales para medir la expresión del gen comunicador. La incubación con los compuestos farmacéuticamente activos dará como resultado un aumento de la expresión del gen comunicador en comparación con los niveles de control (véase el ejemplo C.6.c.)

Los inhibidores específicos de HDAC no deberían inhibir otras enzimas como las proteínas CYP P450 abundantes. Las proteínas CYP P450 (expresadas en *E.coli*) 3A4, 2D6 en 2C9 convierten sus sustratos específicos en una molécula fluorescente. La proteína CYP3A4 convierte 7-benciloxi-trifluorometil coumarina (BFC) en 7-hidroxi-trifluorometil coumarina. La proteína CYP2D6 convierte 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil]-7-metoxi-4-metilcoumarina (AMMC) en clorhidrato de 3-[2-(N,N-dietilamino)etil]-7-hidroxi-4-metilcoumarina y la proteína CYP2C9 convierte 7-metoxi-4-trifluorometil coumarina (MFC) en 7-hidroxi-trifluorometil coumarina. Los compuestos que inhiben la reacción enzimática darán como resultado un aumento de la señal fluorescente (véase el ejemplo C.7).

Ejemplo C.1: Ensayo *in vitro* de inhibición de histona deacetilasa con sustratos marcados fluorescentemente

Se usó el kit de ensayo de actividad fluorescente de HDAC/descubrimiento de fármacos de Biomol (Nº de cat.: AK-500-0001). El ensayo de actividad fluorescente de HDAC se base en el sustrato Fluor de Lys (Fluorogenic Histone deAcetylase Lysyl (histona deacetilasa lisilo fluorogénico) y combinación reveladora. El sustrato Fluor de Lys comprende una cadena lateral de lisina acetilada. La desacetilación del sustrato sensibiliza el sustrato de tal modo que, en la segunda etapa, el tratamiento con el revelador Fluor de Lys produce un fluoróforo.

Se incubaron extractos nucleares de HeLa (proveedor: Biomol) a 60 µg/ml con una concentración 75 µM de sustrato. Se añadió el sustrato Fluor de Lys a un tampón que contenía Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y MgCl₂·6H₂O 1 mM a un pH de 7,4. Después de 30 minutos se añadió 1 volumen del revelador. El fluoróforo se excitó con luz de 355 nm y la luz emitida (450 nm) se detectó en un lector de placa fluorométrico.

Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que contenían extracto nuclear de HeLa y tampón), incubación del blanco (que contenía tampón pero no extracto nuclear de HeLa) y muestras (que contenían compuesto disuelto en DMSO y además diluido en tampón y extracto nuclear de HeLa). En primer lugar se analizaron los compuestos a una concentración de 10⁻⁵ M. Cuando los compuestos mostraron actividad a una concentración 10⁻⁵ M, se realizó una curva de concentración-respuesta en la que los compuestos se analizaron a concentraciones de entre 10⁻⁵ M y 10⁻⁹ M. Todas las muestras se analizaron 4 veces. En cada ensayo se sustrajeron los valores del blanco tanto de los valores control como de los valores de la muestra. La muestra control representó el 100 % de desacetilación de sustrato. Para cada muestra la fluorescencia se expresó como porcentaje del valor promedio de los controles. Cuando fue apropiado se calcularon valores de CI₅₀ (concentración del fármaco necesaria para reducir la cantidad de metabolitos al 50 % del control) usando análisis de Probit para datos clasificados. En el presente documento los efectos de los compuestos de ensayo se expresaron como pCI₅₀ (el valor logarítmico negativo del valor de CI₅₀) (véase la tabla F-2).

Ejemplo C.2: Determinación de actividad antiproliferativa en células A2780

Todos los compuestos analizados se disolvieron en DMSO y se realizaron diluciones posteriores en medio de cultivo. Las concentraciones finales de DMSO nunca excedieron el 0,1 % (v/v) en los ensayos de proliferación celular. Los controles contenían células A2780 y DMSO sin compuesto y los blancos contenían DMSO pero no células. Se disolvió MTT a una concentración de 5 mg/ml en PBS. Se preparó un tampón de glicina que comprendía glicina 0,1 M y NaCl 0,1 M tamponado a pH 10,5 con NaOH (1 N) (todos los reactivos eran de Merck).

Las células A2780 de carcinoma de ovario humano (un amable regalo del Dr. T.C. Hamilton [Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, Estados Unidos]) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, 50 µg/ml de gentamicina y suero de carnero fetal al 10 %. Las células se mantuvieron rutinariamente como cultivos monocapa a 37 °C en atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂. Las células se pasaron una vez a la semana usando una solución de tripsina/EDTA a una relación de división 1:40. Todos los medios y suplementos se obtuvieron de Life Technologies. Las células estaban exentas de contaminación por micoplasma tal como se determinó usando el kit de cultivo histórico de micoplasma Gen-Probe (proveedor: BioMérieux).

Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos NUNC® (proveedor: Life Technologies) y se dejó que se adhirieran al plástico durante la noche. Las densidades usadas para el plaqueo fueron de 1500 células por pocillo en un volumen total de 200 µl de medio. Después de la adhesión a las placas, el medio se cambió y se añadieron fármacos y/o disolventes hasta un volumen final de 200 µl. Después de cuatro días de incubación, el medio se reemplazó por 200 µl de medio nuevo y se evaluó la densidad y la viabilidad celular usando un ensayo basado en MTT. Para cada pocillo se añadieron 25 µl de solución de MTT y las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C. A continuación, el medio se aspiró cuidadosamente y el producto azul MTT-formazan se solubilizó mediante la adición de 25 µl de tampón de glicina seguido de 100 µl de DMSO. Las placas de microensayo se agitaron durante 10 min en un agitador de microplacas y se midió la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro de 96 pocillos Emax

(proveedor: Sopachem). Dentro de un experimento, los resultados para cada condición experimental son el promedio de 3 pocillos replicados. Para fines de análisis inicial, los compuestos se analizaron a una única concentración fija de 10^{-6} M. Para los compuestos activos, los experimentos se repitieron para establecer las curvas de concentración-respuesta completas. Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que no contenían fármaco) y una incubación del blanco (que no contenía células o fármacos). El valor del blanco se sustrajo de todos los valores del control y de la muestra. Para cada muestra, el valor promedio del crecimiento celular (en unidades de absorbancia) se expresó como el porcentaje del valor promedio para el crecimiento celular del control. Cuando fue apropiado, se computaron valores de CI_{50} (concentración del fármaco necesaria para reducir el crecimiento celular al 50 % del control) usando análisis de Probit para datos clasificados (Finney, D.J., Probit Analyses, 2ª edición, capítulo 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge, R.U., 1962). En el presente documento los efectos de los compuestos de ensayo se expresaron como pCI_{50} (el valor logarítmico negativo del valor de CI_{50}) (véase la tabla F-2).

Ejemplo C.3: Solubilidad/estabilidad

C.3.a. Solubilidad cinética en medios acuosos

En la primera etapa de dilución se añadieron 10 μ l de una solución madre concentrada del compuesto activo solubilizada en DMSO (5 mM) a 100 μ l de tampón de fosfato citrato a pH 7,4 y se mezclaron. En la segunda etapa de dilución, se dispensó adicionalmente una parte alícuota (20 μ l) de la primera etapa de dilución a 100 μ l de tampón de fosfato citrato a pH 7,4 y se mezclaron. Finalmente, en la tercera etapa de dilución, se diluyó adicionalmente una muestra (20 μ l) de la segunda etapa de dilución a 100 μ l de tampón de fosfato citrato a pH 7,4 y se mezclaron. Todas las diluciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Inmediatamente después de la última etapa de dilución se midió la turbidez de las tres etapas de dilución consecutivas con un nefelómetro. La dilución se realizó por triplicado para cada compuesto para excluir errores ocasionales. En base a las mediciones de turbidez se realizó una clasificación en 3 clases. Los compuestos con alta solubilidad obtuvieron una puntuación de 3 y para estos compuestos la primera dilución es transparente. Los compuestos con solubilidad media obtuvieron una puntuación de 2. Para estos compuestos la primera dilución no es transparente y la segunda dilución es transparente. Los compuestos con solubilidad baja obtuvieron una puntuación de 1 y para estos compuestos tanto la primera dilución como la segunda son no transparentes. El compuesto N° 2 y el compuesto N°3 tienen ambos una puntuación de 3.

C.3.b. Solubilidad cinética en medios acuosos

Se realizaron soluciones madre de DMSO a partir de 5000-9,8 μ M (diluciones 1/2) en DMSO en una placa de solución madre de 96 pocillos (200 μ l por pocillo). Después de cada dilución las muestras se mezclaron. Se transfirieron partes alícuotas de estas soluciones de DMSO (2 μ l) en 2 placas de tampón adicionales de 96 pocillos que contenían 200 μ l por pocillo de tampón acuoso. Cada una de las placas de tampón contienen bien tampón acuoso a pH 7,4 o bien tampón acuoso a pH 4,0. Después de la última dilución las placas de tampón se mezclaron y las muestras se estabilizaron a temperatura ambiente durante media hora. La dilución se realizó por duplicado para cada compuesto para excluir errores ocasionales. Se realizó un barrido de las mezclas en el escáner de solubilidad BD Gentest para evaluar la presencia de precipitación. Sobre la base de la ausencia/presencia de precipitado en las mezclas se calcula la solubilidad cinética por interpolación. Se realiza una clasificación en las 3 clases. Los compuestos con alta solubilidad obtuvieron una puntuación de 3 y tienen una solubilidad superior a igual a 50 μ M. Los compuestos con solubilidad media obtuvieron una puntuación de 2 y tienen una solubilidad superior a 10 μ M e inferior a 50 μ M. Los compuestos con solubilidad baja obtuvieron una puntuación de 1 y para esos compuestos la solubilidad es inferior o igual a 10 μ M. Se han analizado cuatro compuestos y tuvieron una puntuación de 2 a pH=7,4.

C.3.c. Solubilidad a pH 2,3

La solubilidad de un compuesto a pH 2,3 también puede medirse usando un detector de nitrógeno quimioluminiscente (véase la tabla F-2).

Ejemplo C.4: Análisis de permeabilidad de membrana artificial paralela

Las muestras de soluciones madre (partes alícuotas de 10 μ l de una solución madre 5 mM en DMSO al 100 %) se diluyeron en una placa de pocillos profundos o pre-mix que contenía 2 ml de un sistema tampón a pH 4 o pH 7,4 (concentrado de solución de sistema PSR4 (pION)).

Después de añadir las muestras a la placa de referencia se añadieron 150 μ l de tampón a los pocillos y se realizó la medición UV del blanco. Después se descartó el tampón y la placa se usó como placa de referencia. Todas las mediciones se realizaron en placas resistentes a UV (proveedor: Costar o Greiner).

Después de la medición del blanco de la placa de referencia se añadieron 150 μ l de las muestras diluidas a la placa de referencia y 200 μ l de las muestras diluidas se añadieron a la placa donante 1. Una placa de filtro aceptora 1

(proveedor: Millipore, tipo:MAIP N45) se recubrió con 4 µl de la solución formadora de membrana artificial (1,2-dioleoil-sn-glicer-3-fosfolina en dodecano que contenía 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol al 0,1 % y se situaron sobre la parte superior de la placa donante 1 para formar un "bocadillo". Se dispensó tampón (200 µl) a los pocillos aceptores en la parte superior. El "bocadillo" se cubrió con una tapa y se almacenó durante 18 h a temperatura ambiente en oscuridad.

La medición del blanco de la placa aceptora 2 se realizó mediante la adición de 150 µl de tampón a los pocillos, seguido por una medición UV. Después de la medición del blanco de la placa aceptora 2 el tampón se desechó y se transfirieron 150 µl de solución aceptora de la placa de filtro aceptora 1 a la placa aceptora 2. A continuación, la placa de filtro aceptora 1 se retiró del "bocadillo". Después de la medición del blanco de la placa donante 2 (véase anteriormente), se transfirieron 150 µl de la solución donante de la placa donante 1 a la placa donante 2. Los espectros UV de los pocillos de la placa donante 2, la placa aceptora 2 y la placa de referencia se escanearon (con un SpectraMAX 190). Todos los espectros se procesaron para calcular la permeabilidad con el programa informático PSR4p Command. Todos los compuestos se midieron por triplicado. Se usaron como patrones en cada experimento carbamazepina, griseofulvina, acicloguanisina, atenolol, furosemida y clorotiazida. Los compuestos se clasificaron en 3 categorías dependiendo de si tenían una permeabilidad baja (efecto promedio $< 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; puntuación 1), una permeabilidad media (1×10^{-6} cm/s $>$ efecto promedio $\geq 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; puntuación 2) o una permeabilidad alta ($\geq 1 \times 10^{-6}$ cm/s; puntuación 3).

Ejemplo C.5: Estabilidad metabólica

Ejemplo C.5.a.

Se realizaron preparaciones de tejido subcelular según Gorrod y col. (Xenobiotica 5: 453-462, 1975) mediante separación por centrifugación después de la homogeneización mecánica del tejido. El tejido hepático se enjuagó con tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) enfriado con hielo para lavar el exceso de sangre. A continuación se secó el tejido con material absorbente, se pesó y se trocó de forma burda con tijeras quirúrgicas. Los trozos de tejido se homogeneizaron en 3 volúmenes de tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,4) enfriado con hielo usando bien un Potter-S (Braun, Italia) equipado con un mortero de teflón o bien un homogeneizador Sorvall Omni-Mix, durante 7 x 10 segundos. En ambos casos, el recipiente se mantuvo en/sobre hielo durante el proceso de homogeneización.

Los homogeneizados hísticos se centrifugaron a 9000 x g durante 20 minutos a 4 °C usando una centrifugadora Sorvall o una ultracentrifugadora Beckman. Los sobrenadantes resultantes se almacenaron a -80 °C y se denominaron 'S9'.

La fracción S9 puede centrifugarse adicionalmente a 100.000 x g durante 60 minutos (4 °C) usando una ultracentrifugadora Beckman. El sobrenadante resultante se aspiró cuidadosamente, se dividió en partes alícuotas y se denominó "citosol". La pella se resuspendió en tampón de fosfatos 0,1 M (pH 7,4) en un volumen final de 1 ml por 0,5 g de peso de tejido original y se denominó "microsomas".

Todas las fracciones subcelulares se dividieron en partes alícuotas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para las muestras que se van a analizar, la mezcla de incubación contenía PBS (0,1 M), compuesto (5 µM), microsomas (1 mg/ml) y un sistema generador de NADPH (glucosa-6-fosfato 0,8 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM y 0,8 unidades de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa). La muestras control contenían el mismo material pero los microsomas se reemplazaron por microsomas termoinactivados (10 min a 95 grados Celsius). La recuperación de los compuestos en las muestras control fue siempre del 100 %.

Las mezclas se preincubaron durante 5 min a 37 grados Celsius. La reacción se inició en el punto temporal cero (t = 0) mediante la adición de NADP 0,8 mM y las muestras se incubaron durante 15 min (t = 15). La reacción se terminó mediante la adición de 2 volúmenes de DMSO. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 900 x g y los sobrenadantes se almacenaron a temperatura ambiente durante no más de 24 h antes del análisis. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado. El análisis de los sobrenadantes se realizó por análisis por CL-EM. La elución de las muestras se realizó en un Xterra MS C18 (50 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, Estados Unidos). Se usó un sistema de HPLC Alliance 2790 (proveedor: Waters, Estados Unidos). La elución fue con tampón A (acetato de amonio 25 mM (pH 5,2) en H₂O/acetonitrilo (95/5)), siendo el disolvente B acetonitrilo y el disolvente C metanol con un caudal de 2,4 ml/min. El gradiente usado aumentó la concentración de la fase orgánica del 0 % a más del 50 % de B y el 50 % de C en 5 min hasta el 100 % de B en 1 min de un modo lineal y la concentración de la fase orgánica se mantuvo estacionaria durante 1,5 minutos adicionales. El volumen de inyección total de las muestras fue de 25 µl.

Se usó como detector un espectrómetro de masas con cuadrupolo triple Quattro (proveedor: Micromass, Manchester, R.U.) equipado con una fuente de IES. Las temperaturas de la fuente y de desolvatación se ajustaron a 120 y 350 °C respectivamente y se usó como nebulizador y gas de secado nitrógeno. Los datos se recogieron en modo de barrido positivo (reacción de ion único). El cono de voltaje se ajustó a 10 V y el tiempo de residencia fue de

1 s.

La estabilidad metabólica se expresó como % de metabolismo del compuesto después de 15 min de incubación en presencia de microsomas activos (E(act)) (% de metabolismo = 100 % - corriente iónica total (CIT) de E(act) a t= 15) x 100)

5 CIT de E(act) a t= 0 . Los compuestos que tenían un porcentaje de metabolismo inferior al 20 % se definieron como muy estables metabólicamente y se les dio una puntuación de 3. Los compuestos que tenían un metabolismo entre el 20 y el 70 % se definieron como con estabilidad intermedia y se les dio una puntuación de 2. Los compuestos que mostraron un porcentaje de metabolismo superior a 70 se definieron como poco estables metabólicamente y se les dio una puntuación de 1. Se
10 incluyeron siempre tres compuestos de referencia cuando se realizó un análisis de estabilidad metabólica. Se incluyó verapamilo como compuestos con baja estabilidad metabólica (% de metabolismo = 73 %). Se incluyó cisaprida como compuesto con estabilidad metabólica media (% de metabolismo = 45 %) y se incluyó propanol como compuesto con estabilidad metabólica de intermedia a alta (25 % de metabolismo). Estos compuestos de referencia se usaron para validar el ensayo de estabilidad metabólico. Se analizaron quince compuestos, nueve tuvieron una
15 puntuación de 3 y seis tuvieron una puntuación de 2.

C.5.b: Estabilidad metabólica con cultivos celulares de hepatocitos de rata

20 Se aislaron hepatocitos de rata a partir de ratas Sprague Dowley macho. Los compuestos se disolvieron en una solución madre 5 mM en DMSO al 100 % y se incubaron a una concentración final 5 µM durante 0, 15, 30, 60 y 120 min con cultivos celulares de hepatocitos de rata (0,5 millones de células viables/0,5 ml) usando placas de 24 pocillos.

25 Las muestras se prepararon para CL-EM mediante la adición de dos volúmenes de DMSO. Las muestras se agitaron minuciosamente y se centrifugaron subsiguientemente a 900 g durante 10 min (temperatura ambiente). Todas las incubaciones se realizaron por triplicado. Del sobrenadante resultante se analizaron 50 µl por CL-EM.

30 Para la CL-EM se realizó la elución de las muestras en una columna Hypersil BDS C18 (50 x 4,6 mm, 5 µm, Thermohypersil, R.U.). El sistema de HPLC comprendía un sistema suministrador Surveyor (Surveyor Inc., San Jose, Estados Unidos) equipado con un dispositivo automuestreador Surveyor. La elución se realizó con tampón A (acetato de amonio 10 mM (pH 6,9) en H₂O/acetonitrilo (95:5)) y disolvente B (acetonitrilo) a un caudal de 1,2 ml/min. El gradiente usado fue de 0,5 min disolvente A como condición inicial seguido por un aumento de la concentración de la fase orgánica de 0 % de B hasta el 95 % de B en 2 min de un modo lineal. Esta fase se mantuvo estacionaria durante 2 min adicionales y se redujo de nuevo al 0 % de B en 0,5 min.

35 El volumen total de inyección de muestra fue de 50 µl. La temperatura del horno de columna se mantuvo a 40 °C. El flujo de CL se separó para la detección MS y se permitió la entrada en la fuente de 0,1 ml. Se usó para la detección un espectrómetro de masas con cuadrupolo triple TSQ Quantum (ThermoFinnigan, LaJolla, Estados Unidos) equipado con fuente de IES. La fuente de voltaje se ajustó a 3800 voltios, la temperatura capilar a 300 °C. El
40 espectrómetro de masas se operó en modo de ion positivo en SIM ajustado a la masa de M+H con una amplitud de barrido de 1 Da para fines de cuantificación. El control del instrumento, el registro de datos y el procesamiento se realizaron usando el programa informático Xcalibur (ThermoFinnigan, San Jose, CA, Estados Unidos). La estabilidad metabólica de los compuestos en hepatocitos de rata se expresó como semividas *in vitro*.

45 Como referencia se usó el compuesto R306465 (documento WO 03/76422) (semivida *in vitro*: 8 min). El compuesto N° 22 y el compuesto N° 3 se analizaron y tuvieron semividas *in vitro* en el intervalo de 30-55 min.

Ejemplo C.6: Capacidad de inducción de p21

Ejemplo C.6.a: Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima de p21

50 El protocolo siguiente se ha aplicado para determinar los niveles de expresión de proteína p21 en células A2780 de carcinoma de ovario humano. Las células A2780 (20000 células/180 µl) se sembraron en placas de 96 micropocillos en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM , 50 µg/ml de gentamicina y suero de carnero fetal al 10
55 %. 24 horas antes de la lisis de las células, los compuestos se añadieron a concentraciones finales 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M. Todos los compuestos analizados se disolvieron en DMSO y se realizaron diluciones posteriores en medio de cultivo. 24 horas después de la adición del compuesto, los sobrenadantes se retiraron de las células. Las células se lavaron con 200 µl de PBS enfriado con hielo. Los pocillos se aspiraron y se añadieron 30 µl de tampón de lisis (Tris.HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, Nonidet p40 al 1 % y glicerina al 10 %). Las placas se incubaron durante la
60 noche a -70 °C.

El número apropiado de pocillos de microvaloración se retiró de la bolsa de lámina metálica y éstos se dispusieron en un soporte de pocillos vacío. Se preparó una solución de trabajo (1x) del tampón de lavado (20 x concentrado de

lavado de placa: 100 ml de solución de PBS concentrada 20 veces y tensioactivo. contiene cloroacetamida al 2 %). El patrón p21 WAF se reconstituyó con H₂O destilada y se diluyó posteriormente con diluyente de muestra (proporcionado en el kit)

- 5 Las muestras se prepararon diluyendolas 1:4 con diluyente de muestra. Las muestras (100 µl) y los patrones p21WAF1 (100 µl) se pipetearon en los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron 3 veces con 1x tampón de lavado y, a continuación, se pipetearon a cada pocillo 100 µl de reactivo de anticuerpo detector (una solución de anticuerpo monoclonal biotinilado p21WAF1). Los pocillos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavaron tres veces con 1x tampón de lavado. El
- 10 conjugado 400x (conjugado de peroxidasa estreptavidina: solución concentrada 400 veces) se diluyó y se añadieron a los pocillos 100 µl de la solución 1x. Los pocillos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y, a continuación, se lavaron 3 veces con 1x tampón de lavado y 1 vez con H₂O destilada. Se añadió solución de sustrato (sustrato cromogénico)(100 µl) a los pocillos y los pocillos se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se añadió solución de detención a cada pocillo en el mismo orden que se ha añadido
- 15 previamente la solución de sustrato. La absorbancia en cada pocillo se midió usando un lector de placa espectrofotométrico a longitudes de onda duales de 450/595 nm.

- Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que no contenían fármaco) y una incubación del blanco (que no contenía células o fármacos). El valor del blanco se sustrajo de todos los valores del control y de la muestra.
- 20 Para cada muestra, el valor de la inducción para p21WAF1 (en unidades de absorbancia) se expresó como el porcentaje del valor para p21WAF1 presente en el control. El porcentaje de inducción superior al 130 % se definió como inducción significativa. Un compuesto se analizó y mostró inducción significativa a una concentración 10⁻⁶ M.

Ejemplo C.6.b: Método celular

- 25 Se cultivaron células A2780 (ATCC) en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM y gentamicina a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Todas las soluciones de cultivo celular se proporcionaron por Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Otros materiales se proporcionaron por Nunc.

- 30 Se extrajo ADN genómico de células A2780 proliferativas y se usó como plantilla para el aislamiento por PCR anidada del promotor de p21. La primera amplificación se realizó durante 20 ciclos a una temperatura de apareamiento de 55 °C usando el par de oligonucleótidos GAGGGCGCGGTGCTTGG y TGCCGCCGCTCTCTCACC con el ADN genómico como plantilla. El fragmento de 4,5 kb que contenía el fragmento -4551 a +88 con relación a la caja TATA se volvió a amplificar con los oligonucleótidos TCGGGTACCGAGGGCGCGGTGCTTGG y
- 35 ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACC durante 20 ciclos con apareamiento a 88 °C dando como resultado un fragmento de 4,5 kb y subsiguientemente con el par de oligonucleótidos TCGGGTACCGGTAGTGGGAGCGGATAGACACATC y ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACC durante 20 ciclos con apareamiento a 88 °C dando como resultado un fragmento de 1,3 kb que contenía el fragmento -1300 a +88 con relación a la caja TATA. Los sitios de restricción XhoI y KpnI presentes en los oligonucleótidos (secuencia subrayada) se usaron para la subclonación.
- 40

- El comunicador de luciferasa se eliminó del pGL3-basic y se reemplazó por el comunicador ZsGreen (del plásmido pZsGreen1-N1) en los sitios de restricción KpnI y XbaI. Se contruyó pGL3-basic-ZsGreen-1300 mediante inserción del fragmento de 1,3 kb mencionado anteriormente de la región del promotor p21 en pGL3-basic-ZsGreen en los
- 45 sitios XhoI y KpnI. Todas las enzimas de restricción se proporcionaron por Boehringer Mannheim (Alemania). Se plaquaron células A2780 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 2 x 10⁵ células, se incubaron durante 24 horas y se transfectaron con 2 µg de pGL3-basic-ZsGreen-1300 y 0,2 µg de vector pSV2neo usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Bruselas, Bélgica) tal como describe el fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10 días con G418 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) y se cultivaron suspensiones de una
- 50 única célula. Después de tres semanas se obtuvieron clones únicos.

- Los clones seleccionados A2780 se expandieron y se sembraron a 10000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. 24 horas después de sembrar, las células se trataron durante 24 horas adicionales con compuestos (afectando a los sitios sp1 en la región del promotor de p21 próxima). Subsiguientemente, las células se fijaron con
- 55 PFA al 4 % durante 30' y se tizaron para el recuento con tinción de Hoechst. La activación del promotor de p21 que conduce a la producción de ZsGreen y, de este modo, a fluorescencia, se realizó un seguimiento mediante el Ascent Fluoroskan (Thermo Labsystems, Bruselas, Bélgica).

- Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que no contenían fármaco) y una incubación del blanco (que no contenía células o fármacos). El valor del blanco se sustrajo de todos los valores del control y de la muestra. Para cada muestra, el valor de la inducción para p21WAF1 se expresó como el porcentaje del valor para p21WAF1 presente en el control. El porcentaje de inducción superior al 130 % se definió como inducción significativa.

- 65 Veinticinco compuestos mostraron inducción significativa a una concentración de 10⁻⁶ M.

Ejemplo C.6.c: Método *in vivo*

Se inyectó subcutáneamente un clon seleccionado (10^7 células/200 μ l) en el costado de ratones pelados y se obtuvo un tumor de calibre medible después de 12 días. A partir del día 12 se dosificaron los animales, oralmente o intravenalmente, diariamente durante 6 días con disolvente y compuesto 20-40 mpk (4-10 animales cada uno). Los tumores se evaluaron por fluorescencia mediante un sistema de obtención de imágenes de cuerpo entero automático (estereomicroscopio fluorescente Olympus® SZX12 equipado con un filtro GFP y acoplado a una cámara de CCD tipo JAI® CV-M90 controlado por un paquete de programas informáticos basado en el programa informático de visión IMAQ de National Instruments®). Como referencia se usó el compuesto R306465 (documento WO 03/76422). Los compuestos se clasificaron como inactivos (no hay fluorescencia medible), más débiles, idénticos o mejores que R306465. El compuesto N° 1 se analizó y fue mejor que R306465.

Ejemplo C.7: Capacidad de inhibición de P450

Todos los compuestos analizados se disolvieron en DMSO (5 mM) y se realizó una dilución adicional a 5×10^{-4} M en acetonitrilo. Las diluciones posteriores se realizaron en tampón de ensayo (tampón de fosfato NaK 0,1 M, pH 7,4) y la concentración de disolvente final nunca fue inferior al 2 %.

El ensayo de la proteína CYP3A4 comprende por pocillo 15 pmol de P450/mg de proteína (en tampón de fosfato NaK 0,01 M + KCl al 1,15 %), un sistema generador de NADPH (glucosa-6-fosfato 3,3 mM, 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, NADP 1,3 mM y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.3 mM en tampón de ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 μ l. Después de 5 min de pre-incubación a 37 °C la reacción enzimática se inició con la adición de una concentración 150 μ M del sustrato de prueba fluorescente BFC en tampón de ensayo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se terminó después de la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Las determinaciones de fluorescencia se realizaron a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Se incluyó cetoconazol (valor de $\text{CI}_{50} = 3 \times 10^{-8}$ M) como compuesto de referencia en este experimento. El ensayo de la proteína CYP2D6 comprende por pocillo 6 pmol de P450/mg de proteína (en tampón de fosfato NaK 0,01 M + KCl al 1,15 %), un sistema generador de NADPH (glucosa-6-fosfato 0,41 mM, 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, NADP 0,0082 mM y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,41 mM en tampón de ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 μ l. Después de 5 min de pre-incubación a 37 °C la reacción enzimática se inició con la adición de una concentración 3 μ M del sustrato de prueba fluorescente AMMC en tampón de ensayo. Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, la reacción se terminó después de la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Las determinaciones de fluorescencia se realizaron a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Se incluyó quinidina (valor de $\text{CI}_{50} = 5 \times 10^{-8}$ M) como compuesto de referencia en este experimento.

El ensayo de la proteína CYP2D9 comprende por pocillo 15 pmol de P450/mg de proteína (en tampón de fosfato NaK 0,01 M + KCl al 1,15 %), un sistema generador de NADPH (glucosa-6-fosfato 3,3 mM, 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, NADP 1,3 mM y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3,3 mM en tampón de ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 μ l. Después de 5 min de pre-incubación a 37 °C la reacción enzimática se inició con la adición de una concentración 200 μ M del sustrato de prueba fluorescente MFC en tampón de ensayo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se terminó después de la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Las determinaciones de fluorescencia se realizaron a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Se incluyó sulfafenazol (valor de $\text{CI}_{50} = 6,8 \times 10^{-7}$ M) como compuesto de referencia en este experimento.

Para fines de análisis inicial, los compuestos se analizaron a una única concentración fija de 1×10^{-5} M. Para los compuestos activos, los experimentos se repitieron para establecer las curvas de concentración-respuesta completas. Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que no contenían fármaco) y una incubación del blanco (que no contenía enzimas o fármacos). Todos los compuestos se analizaron por cuadruplicado. El valor del blanco se sustrajo de todos los valores de control y muestra. Para cada muestra, el valor promedio de la actividad de P450 de la muestra (en unidades de fluorescencia relativa) se expresó como el porcentaje del valor promedio de la actividad de P450 del control. El porcentaje de inhibición se expresó como el 100 % menos el valor promedio de la actividad de P450 de la muestra. Cuando fue apropiado, se calcularon los valores de CI_{50}

(concentración de fármaco necesaria para reducir la actividad de P450 al 50 % del control).

Tabla F-2: Listas de resultados de los compuestos que se analizaron según los ejemplos C.1, C.2 y C.3.c (un blanco indica que no hay valores disponibles par el compuesto relevante)

Compuesto N°.	Actividad enzimática pCI_{50} C.1	Actividad celular pCI_{50} C.2	Solubilidad C.3.c. pH = 2,3 (mg/ml)
1	8,4	7,7	2,5
2	8,1	6,6	2,1

3	8,1	7,0	
4	7,8	6,7	
7	7,8	6,7	
8	8,2	7,0	2,5
9	8,3	6,7	2,4
10	8,7	7,3	2,7
11	8,5	6,1	
12	7,8	5,9	<0,01
13	7,6	6,6	<0,01
14	7,5	6,8	
15	8,2	7,4	
16	7,5	7,0	
17	9,0	7,5	3,8
18	7,6	6,8	
19	8,1	5,8	2,5
20	7,8	6,8	2,5
21	7,5	6,1	1,9
22	9,4	7,1	2,2
23	8,0	6,0	
24	8,4	7,3	4,6
25	7,7	6,9	
26	7,4	5,8	
27	6,9	5,7	<0,01
28	7,4	6,6	0,01
29	7,2	6,1	0,4

D. Ejemplo de composición: Comprimidos recubiertos con película

Preparación del núcleo del comprimido

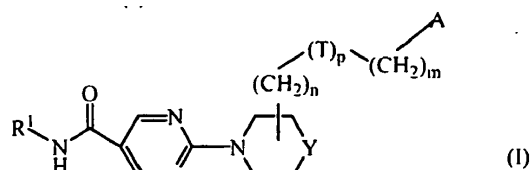
- 5 Una mezcla de 100 g de un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón se mezclan bien y después se humidifican con una solución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinil-pirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. La mezcla de polvos húmeda se criba, se seca y se criba de nuevo. A
- 10 continuación se añaden 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. Se mezcla todo bien y se prensa para formar comprimidos, dando 10.000 comprimidos que comprenden cada uno 10 mg de un compuesto de fórmula (I).

Recubrimiento

- 15 A una solución de 10 g de metilcelulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se añade una solución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. A continuación se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol. Se funden 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. La última solución se
- 20 añade a la anterior y a continuación se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinil-pirrolidona y 30 ml de suspensión colorante concentrada y se homogeneiza todo. Los núcleos de los comprimidos se recubren con la mezcla obtenida de este modo en un aparato de recubrimiento.

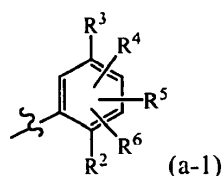
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



sus formas *N*-óxido, sus sales de adición farmacéuticamente aceptables y sus formas estereoquímicamente isómeras, en la que:

10 R^1 es hidroxilo o un radical de la fórmula (a-1)



en la que:

15 R^2 es hidroxilo o amino;

R^3 es hidrógeno, tienilo, furanilo o fenilo y cada tienilo, furanilo o fenilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o dos halo, amino, nitro, ciano, hidroxilo, fenilo, alquilo C_{1-6} , (dialquilo C_{1-6})amino, alquil C_{1-6} -oxi, fenil-alquilo C_{1-6} -oxi, hidroxialquilo C_{1-6} ,

20

alcoxi C_{1-6} -carbonilo, hidroxycarbonilo, alquil C_{1-6} -carbonilo, polihaloalquil C_{1-6} -oxi, polihaloalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -sulfonilo, hidroxycarbonylalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -carbonilamino, aminosulfonilo, aminosulfonilalquilo C_{1-6} , isoxazolilo, aminocarbonilo, fenilalquenilo C_{2-6} , fenilalquinilo C_{3-6} o piridinilalquinilo C_{3-6} ; R^4 , R^5 y R^6 son cada uno independientemente, amino, nitro, furanilo, halo, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -oxi, trifluorometilo, tienilo, fenilo, alquil C_{1-6} -carbonilamino, aminocarbonilalquilo C_{1-6} o $-C\equiv C-CH_2-R^7$;

25

en la que R^7 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , hidroxilo, amino o alquil C_{1-6} -oxi;

30 X es N o CH;

Y es O, N, NH, CH o CH_2 y cuando Y es N o CH entonces el sustituyente está unido al átomo Y de la estructura anular;

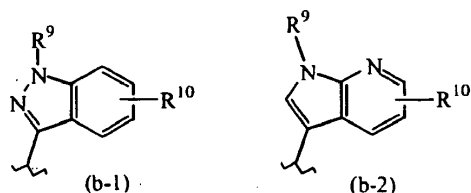
35 T es O o NR^8 en la que R^8 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , hidroxialquilo C_{1-6} , cianoalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -oxialquilo C_{1-6} , hidroxiaminocarbonilalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -sulfonilalquilo C_{1-6} -carbonilo, alquil C_{1-6} -aminocarbonilo o mono- o di-(alquil C_{1-6})aminosulfonilo;

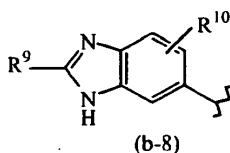
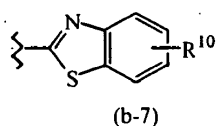
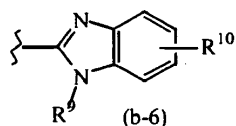
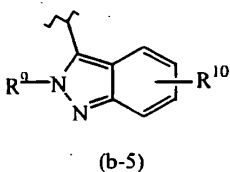
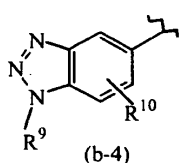
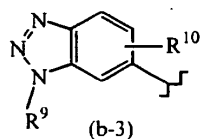
n es 0 ó 1 y cuando n es 0 se quiere decir un enlace directo;

40 m es 1 ó 2;

p es 0 ó 1 siempre que cuando p sea 0 entonces n es 0, $-(CH_2)_n-(T)_p-$ es un enlace directo e Y es N;

45 A es un radical seleccionado de entre:





5 en los que R^9 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} o cicloalquil C_{3-7} -alquilo C_{1-6} ; y R^{10} es hidrógeno, hidroxilo, amino, halo, alquilo C_{1-6} , polihaloalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -oxicarbonilo, hidroxicarbonilo, alquil C_{1-6} -carbonilamino, alquil C_{1-6} -oxi, o mono- o di-(alquil C_{1-6})amino.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que:

a) R^1 es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1) en la que R^2 es amino, R^3 es hidrógeno o tienilo y R^4 , R^5 y R^6 son cada uno hidrógeno;

b) X es N o CH;

c) Y es O, N o CH;

d) T es O o NR^8 en la que R^8 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cianoalquilo C_{1-6} , hidroxiaminocarbonilalquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -carbonilo o alquilo C_{1-6} -sulfonilo;

e) n es 0 ó 1;

f) m es 1

g) p es 0 ó 1; y

h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-2), (b-3), (b-4), (b-5), (b-6), (b-7) y (b-8) en el que R^9 es alquilo C_{1-6} y R^{10} es hidrógeno.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que:

a) R^1 es hidroxilo;

b) X es N;

c) Y es CH;

d) T es NR^8 en la que R^8 es hidrógeno;

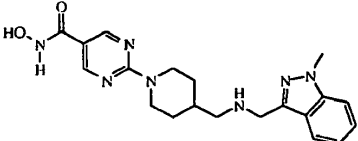
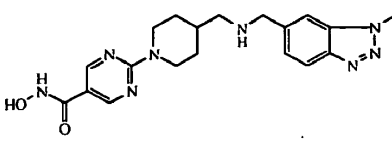
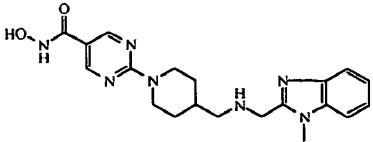
e) n es 1;

f) m es 1

g) p es 1; y

h) A es un radical seleccionado de entre (b-1), (b-3) y (b-4), en los que R^9 es alquilo C_{1-6} y R^{10} es hidrógeno.

4. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionándose dicho compuesto de entre el Compuesto N° 1, el Compuesto N° 2 y el Compuesto N° 3 descritos a continuación:

	
1,07 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 1	0,89 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 2
	
0,87 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. N° 3	

5. Una composición farmacéutica que comprende vehículos farmacéuticamente aceptables y como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5 6. Un proceso de preparación de una composición farmacéutica tal como se ha reivindicado en la reivindicación 5, en la que los vehículos farmacéuticamente aceptables y un compuesto tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se mezclan íntimamente.

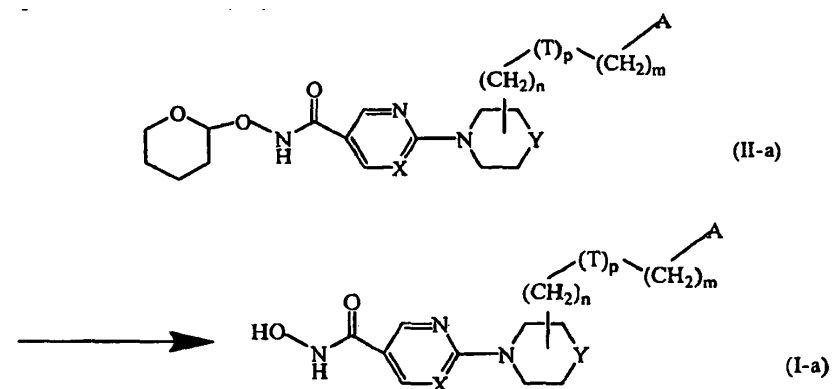
10 7. Un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicina.

8. Uso de un compuesto tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

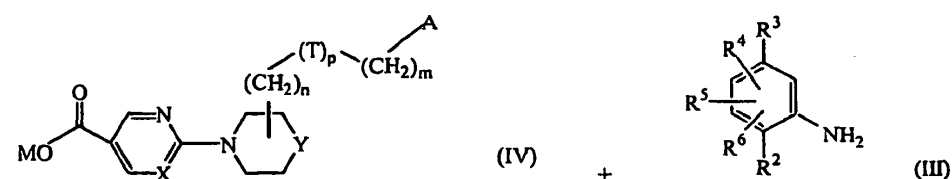
15 9. Una combinación de un agente anticanceroso y un compuesto tal como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

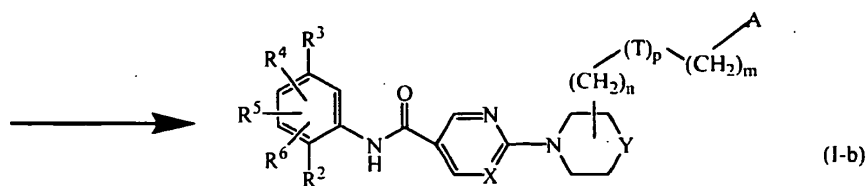
10. Un proceso de preparación de un compuesto tal como se ha reivindicado en la reivindicación 1, caracterizado porque:

a) se hace reaccionar un compuesto de fórmula (II-a) con un ácido apropiado para formar un compuesto de fórmula (I-a),



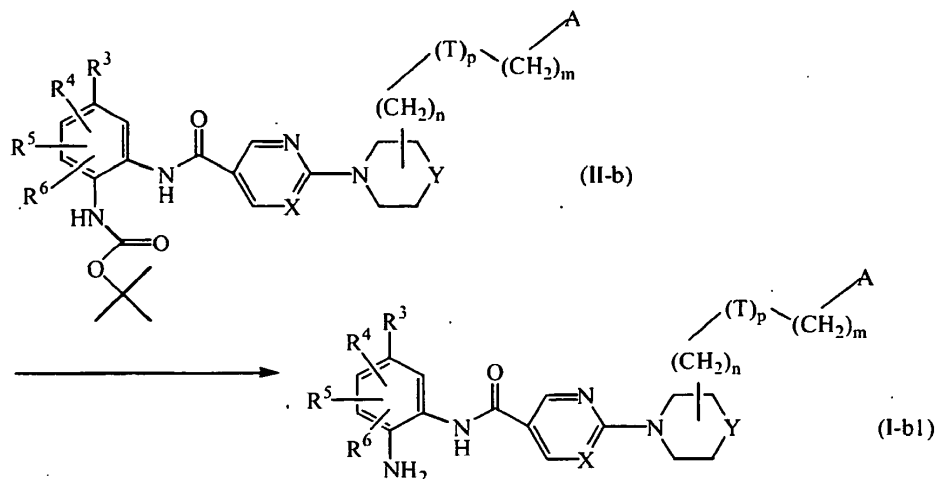
b) se hace reaccionar un compuesto de fórmula (IV) en la que M representa catión de metal alcalino con un compuesto de fórmula (III), en presencia de una base para formar un compuesto de fórmula (I-b)





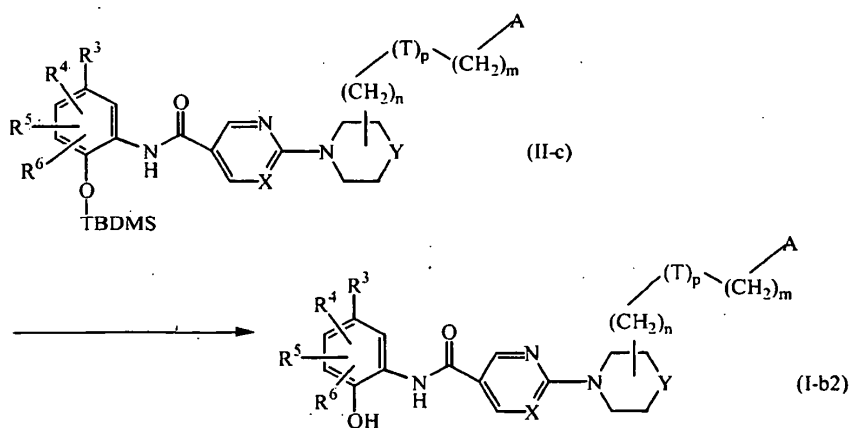
c) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (II-b) con un ácido en un disolvente con formación de un compuesto de fórmula (I-b1), o

5



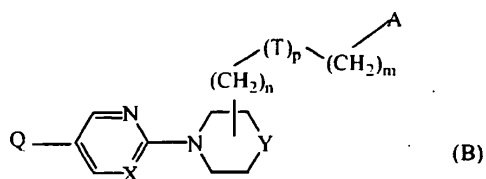
d) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (II-c), en la que TBDMS significa terc-butil(dimetil)silano, en un disolvente, con formación de un compuesto de fórmula (I-b2).

10



11. Un compuesto de fórmula (B) en la que Q es alquil C₁₋₂-oxycarbonilo, MO₂C (en la que M es hidrógeno o un metal alcalino) o tetrahidropiraniloxiaminocarbonilo y n, m, p, X, Y, T y A son como se definen para la fórmula (I), y las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isómeras de los mismos.

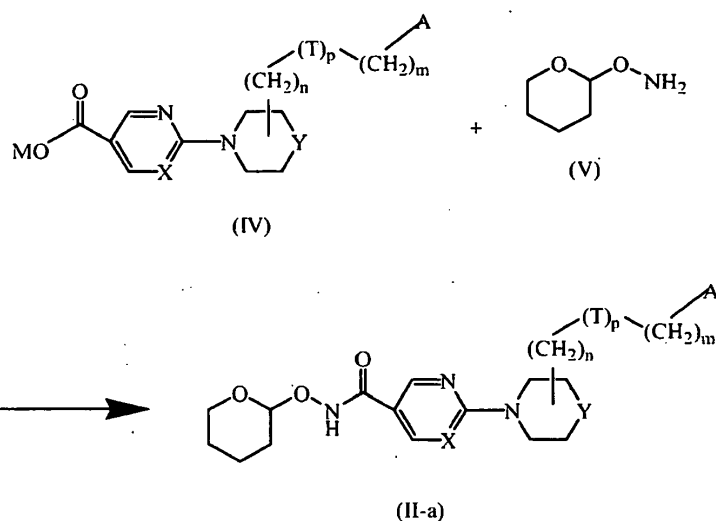
15



12. Un proceso de preparación de un compuesto tal como se ha reivindicado en la reivindicación 11, caracterizado porque:

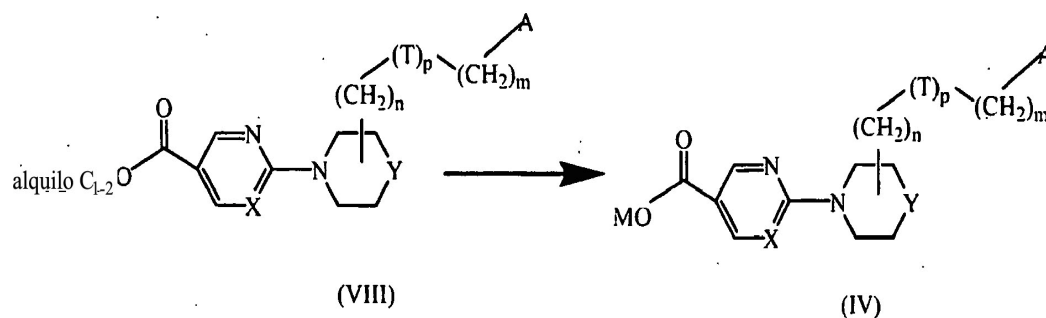
20

a) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (IV) en la que M representa hidrógeno o un metal alcalino, con un intermedio de fórmula (V) para formar un compuesto de fórmula (B) en la que Q es tetrahidropiraniloxiaminocarbonilo, representado por la fórmula (II-a):



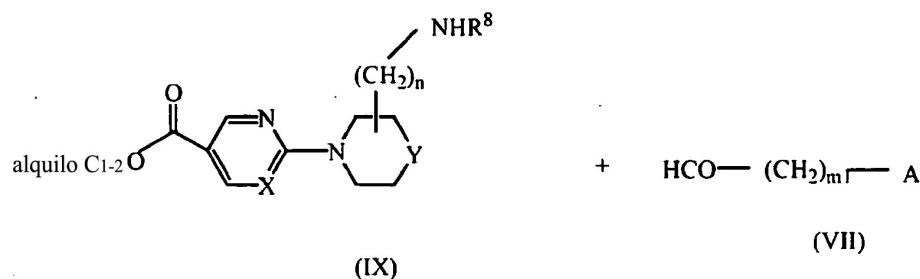
5

b) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (VIII) con una base MOH apropiada para formar un compuesto de fórmula (B) en la que Q es MO_2C , representado por la fórmula (IV):

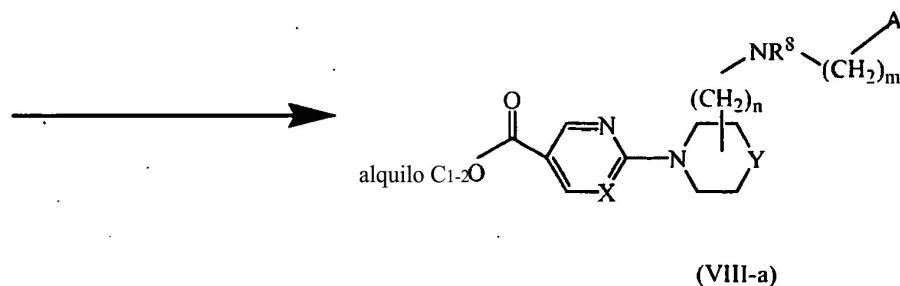


10

c) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (IX) con un intermedio de fórmula (VII) para formar un compuesto de fórmula (B) en la que Q es alquil C_{1-2} -oxicarbonilo, p es 1 y T es NR^8 , n, m, X e Y son tal como se han definido para la fórmula (I), representado por la fórmula (VIII-a):

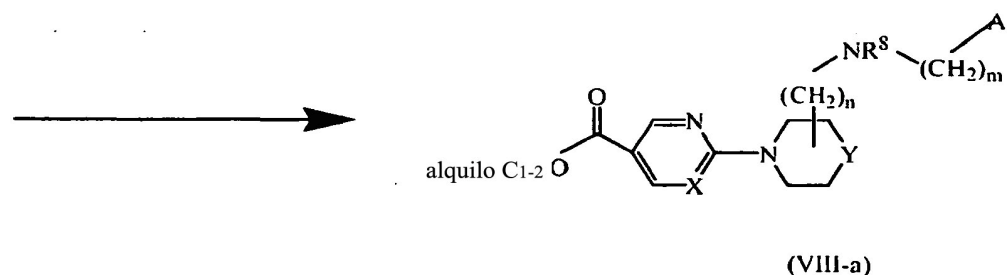
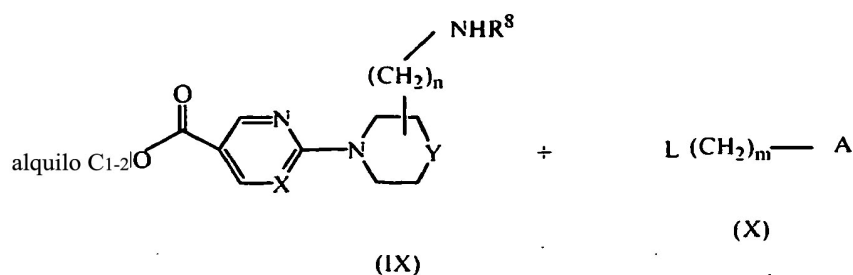


15



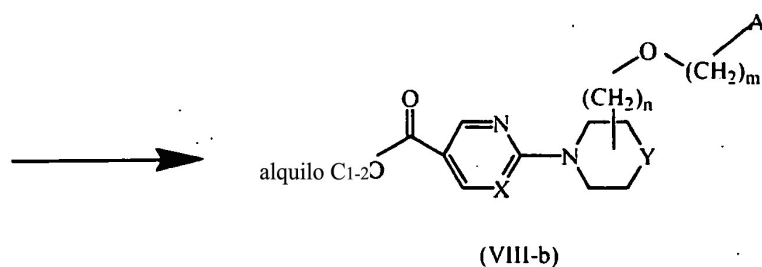
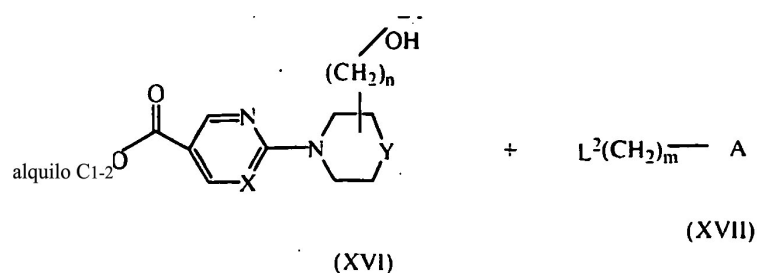
d) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (IX) con un intermedio de fórmula (X) en la que L representa un grupo saliente para formar un compuesto de fórmula (VIII-a):

5



e) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (XVI) con un intermedio de fórmula (XVII) en la que L² es un grupo saliente para formar un compuesto de fórmula (B) en la que Q es alquil C₁₋₂-oxicarbonilo, p es 1 y T es O y n, m, X e Y son tal como se han definido para la fórmula (I), representado por la fórmula (VIII-b):

10



f) se hace reaccionar un intermedio de fórmula (XX) con un intermedio de fórmula (XXI) en la que m_1 es 0 ó 1 para formar un compuesto de fórmula (B) en la que Q es alquil C_{1-2} -oxicarbonilo, Y es N, p es 0 y m, X y A son tal como se han definido para la fórmula (I), representado por la fórmula (VIII-c):

