



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 368 033**

51 Int. Cl.:  
**C07C 259/06** (2006.01) **C07C 317/14** (2006.01)  
**A61K 31/16** (2006.01) **A61K 31/165** (2006.01)  
**A61P 31/10** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00981535 .8**  
96 Fecha de presentación : **22.11.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1233958**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2002**

54 Título: **Inhibidores de histona desacetilasa.**

30 Prioridad: **23.11.1999 US 167035 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.11.2011**

73 Titular/es: **METHYLGENE Inc.**  
**7220, Rue Frederick-Banting**  
**Montreal, Quebec H4S 2A1, CA**

72 Inventor/es: **Delorme, Daniel;**  
**Ruel, Rejean;**  
**Lavoie, Rico;**  
**Thibault, Carl y**  
**Abou-Khalil, Elie**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 033 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de histona desacetilasa.

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a la inhibición de histona desacetilasa. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos y procedimientos para inhibir la actividad enzimática de la histona desacetilasa.

**Sumario de la técnica relacionada**

10 En células eucariotas, el ADN nuclear se asocia con histonas para formar un complejo compacto denominado cromatina. Las histonas constituyen una familia de proteínas básicas que generalmente están muy conservadas a través de las especies eucariotas. Las histonas centrales, denominadas H2A, H2B, H3, y H4, se asocian para formar un núcleo de proteína. El ADN se enrolla alrededor de este núcleo de proteína, interaccionando los aminoácidos básicos de las histonas con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN. Aproximadamente 146 pares de bases de ADN se enrollan alrededor de un núcleo de histona para constituir una partícula de nucleosoma, el motivo estructural de repetición de la cromatina.

15 Csordas, Biochem. J., 286: 23-38 (1990) enseña que las histonas están sometidas a acetilación post-traducciona de los grupos ε-amino de restos lisina N-terminales, una reacción que está catalizada por histona acetil transferasa (HAT1). La acetilación neutraliza la carga positiva de la cadena lateral de lisina, y se cree que afecta a la estructura de la cromatina. De hecho, Taunton et al., Science, 272: 408-411 (1996), enseñan que el acceso de los factores de transcripción a los moldes de cromatina se ve potenciado por la hiperacetilación de la histona. Taunton et al.  
20 enseñan adicionalmente que se ha encontrado un enriquecimiento en la histona H4 subacetilada en regiones transcripcionalmente mudas del genoma.

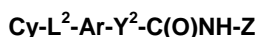
La acetilación de histona es una modificación reversible, estando la desacetilación catalizada por una familia de enzimas denominadas histona desacetilasas (HDAC). Grozinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 96: 4868-4873 (1999), enseña que las HDAC pueden dividirse en dos clases, la primera representada por proteínas similares a la levadura Rpd3, y la segunda representada por proteínas similares a la levadura Hda1. Grozinger et al. enseña también que las proteínas HDAC1, HDAC2, y HDAC3 humanas son miembros de la primera clase de HDAC, y desvela nuevas proteínas, denominadas HDAC4, HDAC5, y HDAC6, que son miembros de la segunda clase de HDAC. Kao et al., Genes & Dev., 14: 55-66 (2000), desvela HDAC7, un nuevo miembro de la segunda clase de HDAC. Van den Wyngaert, FEBS, 478: 77-83 (2000) desvela HDAC8, un nuevo miembro de la primera clase de HDAC.  
25  
30

Richon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95:3003-3007 (1998), desvela que la actividad de HDAC es inhibida por tricostatina A (TSA), un producto natural aislado de *Streptomyces hygroscopicus*, y mediante un compuesto sintético, ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA). Yoshida y Beppu, Exper. Cell Res., 177:122-131 (1988), enseña que TSA provoca la detención de los fibroblastos de rata en las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> del ciclo celular, lo que implica a HDAC en la regulación del ciclo celular. De hecho, Finnin et al., Nature, 401:188-193 (1999), enseña que TSA y SAHA inhiben el crecimiento celular, inducen la diferenciación terminal, y evitan la formación de tumores en ratones.  
35

Estos hallazgos sugieren que la inhibición de la actividad de HDAC representa un nuevo procedimiento para intervenir en la regulación del ciclo celular y que los inhibidores de HDAC tienen un gran potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades o afecciones proliferativas celulares. Hasta la fecha, solo se conocen unos pocos inhibidores de histona desacetilasa en la técnica. De esta manera, hay una necesidad de identificar inhibidores de HDAC adicionales y de identificar las características estructurales requeridas para una potente actividad inhibidora de HDAC. La técnica anterior pertinente incluye los documentos JP-11302173; J Med Chem 42(22), 199, 4669-79; Beilstein Database, BRN 3436503, 4265970, 2813528, 7299261, m2890108, 2793974; Beilstein Database BRN 5634742, 6816677, 2852507, 2855506, 3454395; Beilstein Database BRN 6864971, 4446205; Beilstein Database BRN 7655985, 3313150, 3313231; Beilstein Database BRN 3137042; Chem Abstr 91: 107818; Chem Abstr 131: 97120; WO 98/55449; Chem Abstr 131: 317417; EP 827742; WO 02/22577; WO 95/06554; WO 00/69819; WO 98/38859; WO 00/56704; JP 56051441; US 4013768; US 4173577; WO 93/12075; WO 02/30879; GB0023986D; y JP10182583.  
40  
45

**Breve sumario de la invención**

- 50 De acuerdo con la presente invención se proporciona un inhibidor de histona desacetilasa representado por la fórmula



en la que

Cy es cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterociclilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido

- con entre uno y cuatro sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, y en el que dicho arilo, heterociclilo y heteroarilo también pueden estar
- 5 opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre alquil ( $C_1-C_6$ ) amino, di-alquil ( $C_1-C_8$ ) amino, alcano ( $C_1-C_8$ ) acilamino y areno ( $C_6-C_{10}$ ) acilamino, y en la que dicho cicloalquilo y heterociclilo pueden estar también opcionalmente sustituidos con oxo, y en el que dicho heterociclilo estar también opcionalmente independientemente sustituido en el nitrógeno con un grupo seleccionado entre alquilsulfonilo, arilcarbonilo, arilsulfonilo y aralcoxi-carbonilo, con la condición de que Cy no sea un (espirocicloalquil)heterociclilo;
- 10  $L^2$  es alquilenilo  $C_1-C_8$  saturado o alquilenilo  $C_2-C_8$ , en la que el alquilenilo o alquilenilo puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, con la condición de que  $L^2$  no sea  $-C(O)-$ , y en la que uno de los átomos de
- 15 carbono del alquilenilo opcionalmente puede estar reemplazado por un resto heteroatómico seleccionado entre el grupo constituido por S; o S(O); o  $L^2$  es  $-S(O)_2-(CH_2)_{1-4}$ ;
- Ar es arileno, pudiendo estar dicho arileno opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo, o con un anillo de cicloalquilo o heterocíclico saturado o insaturado; y
- $Y^2$  es un alquilenilo saturado de cadena lineal o ramificada; y
- 20 Z se selecciona entre el grupo constituido por anilino, piridilo, tiadiazolilo, y -O-M, siendo M H o un catión farmacéuticamente aceptable, pudiendo estar dicho tiadiazolilo opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo constituido por tiol, trifluorometilo, amino y sulfonamido;
- con la condición de que cuando el átomo de carbono al que está fijado Cy está sustituido con oxo, entonces Cy y Z no sean ambos piridilo.
- 25 Preferentemente,  $L^2$  es alquilenilo  $C_1-C_8$  saturado o alquilenilo  $C_2-C_8$ , en los que el alquilenilo o alquilenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, con la condición de que  $L^2$  no sea  $-C(O)-$ , y en los que uno de los átomos de
- 30 carbono del alquilenilo opcionalmente pueden reemplazarse por un resto heteroatómico seleccionado entre el grupo constituido por S; o S(O).
- Preferentemente,  $Y^2$  es alquilenilo  $C_1-C_6$ . Preferentemente,  $Y^2$  es alquilenilo  $C_1-C_3$ . Preferentemente,  $Y^2$  es alquilenilo  $C_1-C_2$ .
- 35 Preferentemente, uno o dos carbonos saturados en  $L^2$  están sustituidos con un sustituyente seleccionado independientemente entre el grupo constituido por alquilo  $C_1-C_6$ , arilo  $C_6-C_{10}$ , amino, oxo, hidroxilo, alcoxi  $C_1-C_4$ , y ariloxi  $C_6-C_{10}$ .
- Preferentemente, ningún átomo de carbono del alquilenilo  $L^2$  está reemplazado por un resto heteroatómico. Como alternativa, preferentemente un átomo de carbono del alquilenilo  $L^2$  está reemplazado por un resto heteroatómico seleccionado entre el grupo constituido por S; o S(O).
- 40 Preferentemente,  $L^2$  se selecciona entre el grupo constituido por  $-S-(CH_2)_n$ ,  $-S(O)-(CH_2)_n$ , y  $-S(O)_2-(CH_2)_n$ , en los que n es 1, 2, 3 ó 4.
- Preferentemente,  $L^2$  es alquilenilo  $C_1-C_6$  saturado. Preferentemente,  $L^2$  es alquilenilo  $C_1-C_4$  saturado.
- 45 Preferentemente,  $L^2$  es alquilenilo  $C_1-C_6$  saturado, sustituido con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, con la condición de que  $L^2$  no sea  $-C(O)-$ .
- 50 Preferentemente,  $L^2$  es alquilenilo  $C_1-C_4$  saturado, sustituido con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, con la condición de que  $L^2$  no sea  $-C(O)-$ .
- Preferentemente, Z se selecciona entre el grupo constituido por 2-anilino, 2-piridilo, 1,3,4-tiadiazol-2-ilo, y -O-M, siendo M H o un catión farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, Z es -O-M, siendo M hidrógeno o cualquier

catión farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, Z es -O-M, siendo M hidrógeno.

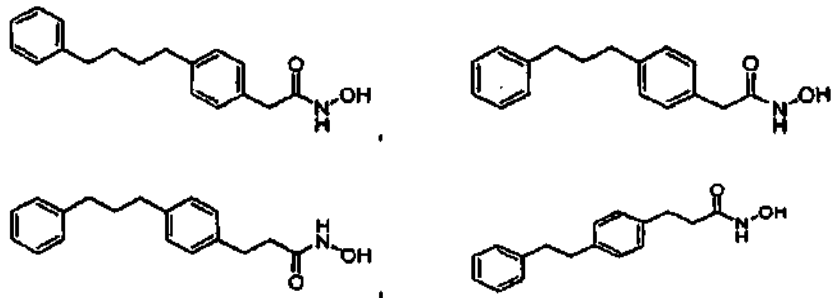
Preferentemente, Ar es fenileno no sustituido, que puede estar opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo, o con un anillo de cicloalquilo o heterocíclico saturado o parcialmente insaturado. Preferentemente, el fenileno es 4-fenileno.

- 5 Preferentemente, Cy se selecciona entre el grupo constituido por fenilo, naftilo, tienilo, benzotienilo, y quinolilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

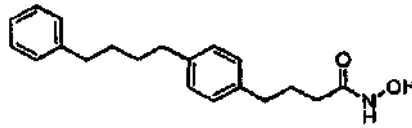
Preferentemente, el fenilo, naftilo, tienilo, benzotienilo, o quinolilo no está sustituido o está sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, ar (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), halo, nitro, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> carbonilo, carboxi, y amino.

- 10 Preferentemente, Cy es fenilo no sustituido.

Preferentemente, el inhibidor se selecciona entre el grupo constituido por

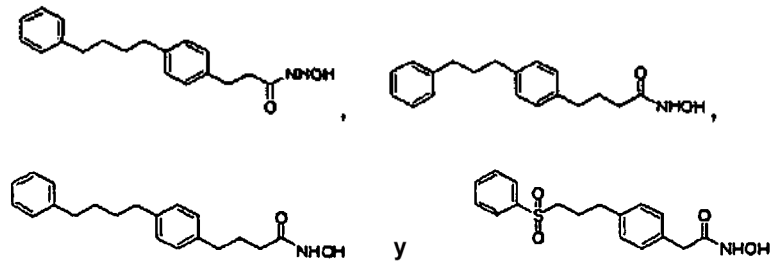


y

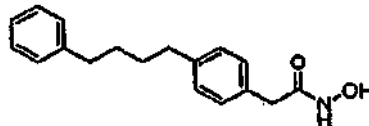


15

Preferentemente, el inhibidor se selecciona entre el grupo constituido por

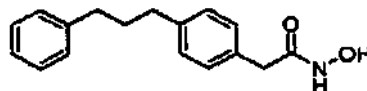


Preferentemente, el inhibidor tiene la estructura

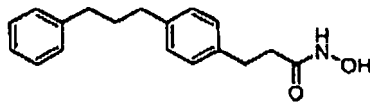


20

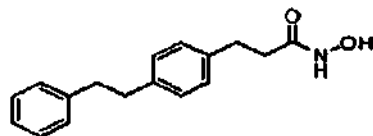
Preferentemente, el inhibidor tiene la estructura



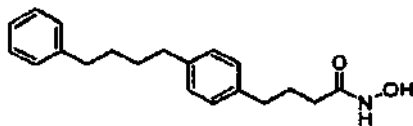
Preferentemente, el inhibidor tiene la estructura



Preferentemente, el inhibidor tiene la estructura



5 Preferentemente, el inhibidor tiene la estructura



También se proporciona de acuerdo con la presente invención una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de histona desacetilasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un vehículo, excipiente, o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 También se proporciona de acuerdo con la presente invención un inhibidor de histona desacetilasa de acuerdo con la presente invención para su uso en la inhibición de histona desacetilasa en una célula.

Preferentemente, la célula es una célula neoplásica. Preferentemente, la célula neoplásica está en un animal. Preferentemente, la célula neoplásica está en un crecimiento neoplásico.

15 Preferentemente, el inhibidor es para su uso con un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de una histona desacetilasa.

Preferentemente, el inhibidor es para su uso en la inhibición de la proliferación celular. Preferentemente, el inhibidor es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o infección fúngica.

También se proporciona de acuerdo con la presente invención el uso de un inhibidor de acuerdo con la presente invención en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación celular.

20 También se proporciona de acuerdo con la presente invención el uso de un inhibidor de acuerdo con la presente invención en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o infección fúngica.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

25 La invención proporciona compuestos y procedimientos para inhibir la actividad enzimática de histona desacetilasa. La invención proporciona también composiciones y procedimientos para tratar enfermedades y afecciones proliferativas celulares. La patente y la bibliografía científica mencionada en el presente documento establecen el conocimiento que está disponible para los especialistas en la técnica. En caso de inconsistencias, prevalecerá la presente divulgación.

Para los fines de la presente invención, se usarán las siguientes definiciones:

30 Como se usa en el presente documento, los términos "histona desacetilasa" y "HDAC" pretenden referirse a cualquiera de una familia de enzimas que retiran los grupos acetilo de los grupos ε-amino de los restos lisina en el extremo N de una histona. A menos que por el contexto se indique lo contrario, el término "histona" pretende referirse a cualquier proteína tipo histona, incluyendo H1, H2A, H2B, H3, H4, y H5, de cualquier especie. Las histona desacetilasas preferidas incluyen enzimas clase I y clase II. Preferentemente, la histona desacetilasa es una HDAC humana, incluyendo; aunque sin limitación, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC, HDAC-7, y

35 HDAC-8. En algunas otras realizaciones preferidas, la histona desacetilasa procede de una fuente protozoaria o fúngica.

La expresión "inhibidor de histona desacetilasa" se usa para identificar un compuesto que tiene una estructura como se define en el presente documento, que es capaz de interactuar con una histona desacetilasa e inhibir su actividad enzimática. Inhibir la actividad enzimática de la histona desacetilasa significa reducir la capacidad de una histona

desacetilasa para retirar un grupo acetilo de una histona. En algunas realizaciones preferidas, dicha reducción de la actividad de histona desacetilasa es al menos aproximadamente el 50%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, y aún más preferentemente al menos aproximadamente el 90%. En otras realizaciones preferidas, la actividad de la histona desacetilasa se reduce en al menos un 95% y, más preferentemente, en al menos un 99%.

Preferentemente, dicha inhibición es específica, es decir, el inhibidor de histona desacetilasa reduce la capacidad de una histona desacetilasa para retirar un grupo acetilo de una histona a una concentración que es menor que la concentración del inhibidor que se requiere para producir otro efecto biológico no relacionado. Preferentemente, la concentración del inhibidor requerida para inhibir la actividad de histona desacetilasa es al menos 2 veces menor, más preferentemente al menos 5 veces menor, aún más preferentemente al menos 10 veces menor, y lo más preferentemente al menos 20 veces menor que la concentración requerida para producir un efecto biológico no relacionado.

El término "alquilo", como se emplea en el presente documento, se refiere a grupos alifáticos de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 12 átomos de carbono, preferentemente 1-8 átomos de carbono, y más preferentemente, 1-6 átomos de carbono, que pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos o tres sustituyentes. A menos que a partir del contexto resulte evidente otra cosa, el término "alquilo" pretende incluir grupos alifáticos saturados y insaturados y parcialmente insaturados. Cuando se requieren particularmente grupos insaturados, se usarán los términos "alqueno" o "alquino". Cuando solo se requieren grupos saturados, se usará el término "alquilo saturado". Los grupos alquilo saturado preferidos incluyen, sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, y hexilo.

Un grupo "alqueno" es un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente en el presente documento, que está situado entre y que sirve para conectar otros dos grupos químicos. Los grupos alqueno preferidos incluyen, sin limitación, metileno, etileno, propileno, y butileno.

El término "cicloalquilo", como se emplea en el presente documento, incluye grupos hidrocarburo cíclicos, saturados y parcialmente insaturados, que tienen de 3 a 12 carbonos, preferentemente de 3 a 8 carbonos y, más preferentemente, de 3 a 6 carbonos, en el que el grupo cicloalquilo puede estar adicionalmente opcionalmente sustituido. Los grupos cicloalquilo preferidos incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexileno, ciclohexileno, cicloheptilo, y ciclooctilo.

Un grupo "arilo" es un resto aromático C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> que comprende de uno a tres anillos aromáticos, que puede estar opcionalmente sustituido. Preferentemente, el grupo arilo es un grupo arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>. Los grupos arilo preferidos incluyen, sin limitación, fenilo, naftilo, antraceno, y fluorenilo. Un grupo "aralquilo" o "arilalquilo" comprende un grupo arilo unido covalentemente a un grupo alquilo, que puede estar independientemente opcionalmente sustituido o no sustituido. Preferentemente, el grupo aralquilo es alq (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), incluyendo, sin limitación, bencilo, fenetilo, y naftilmetilo. Un grupo "alcarilo" o "alquilarilo" es un grupo arilo que tiene uno o más sustituyentes alquilo. Los ejemplos de grupos alcarilo incluyen, sin limitación, toliilo, xililo, mesitilo, etilfenilo, *terc*-butilfenilo, y metilnaftilo.

Un grupo "arileno" es un grupo arilo, como se ha definido anteriormente en el presente documento, que está situado entre, y que sirve para conectar otros dos grupos químicos. Los grupos arileno preferidos incluyen, sin limitación, fenileno y naftileno. El término "arileno" pretende incluir también grupos de enlace por puente de heteroarilo, incluyendo, aunque sin limitación, benzotienilo, benzofurilo, quinolilo, isoquinolilo, e indolilo.

Un grupo "heterociclico" o "heterocíclico" es una estructura de anillo que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 átomos, en la que uno o más átomos se seleccionan entre el grupo constituido por N, O, y S. El grupo heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido sobre carbono en una o más posiciones. El grupo heterocíclico puede estar también independientemente sustituido sobre nitrógeno con alquilo, arilo, aralquilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilo, arilcarbonilo, arilsulfonilo, alcoxicarbonilo, aralcoxicarbonilo, o sobre azufre con oxo o alquilo inferior. Los grupos heterocíclicos preferidos incluyen, sin limitación, epoxi, aziridinilo, tetrahidrofuranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tiazolidinilo, oxazolidinilo, oxazolidinonilo, y morfolino. En ciertas realizaciones preferidas, el grupo heterocíclico está condensado con un grupo arilo o heteroarilo. Los ejemplos de dichos heterociclos condensados incluyen, sin limitación, tetrahydroquinolina y dihydrobenzofurano.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a grupos que tienen de 5 a 14 átomos en el anillo, preferentemente 5, 6, 9, o 10 átomos en el anillo; que tienen 6, 10, o 14 electrones  $\pi$  compartidos en una disposición cíclica; y que tienen, además de átomos de carbono, entre uno y aproximadamente tres heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por N, O, y S. Los grupos heteroarilo preferidos incluyen, sin limitación, tienilo, benzotienilo, furilo, benzofurilo, dibenzofurilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, indolilo, quinolilo, isoquinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, oxazolilo, tiazolilo, e isoxazolilo.

Como se emplea en el presente documento, un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterocíclico "sustituido" es uno que tiene entre uno y aproximadamente cuatro, preferentemente entre uno y aproximadamente tres, más preferentemente uno o dos, sustituyentes distintos de hidrógeno. Los sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, grupos halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi; amino, acilamino,

alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcoxicarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfanantido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano, y ureido.

El término "halógeno" o "halo", como se emplea en el presente documento, se refiere a cloro, bromo, flúor, o yodo.

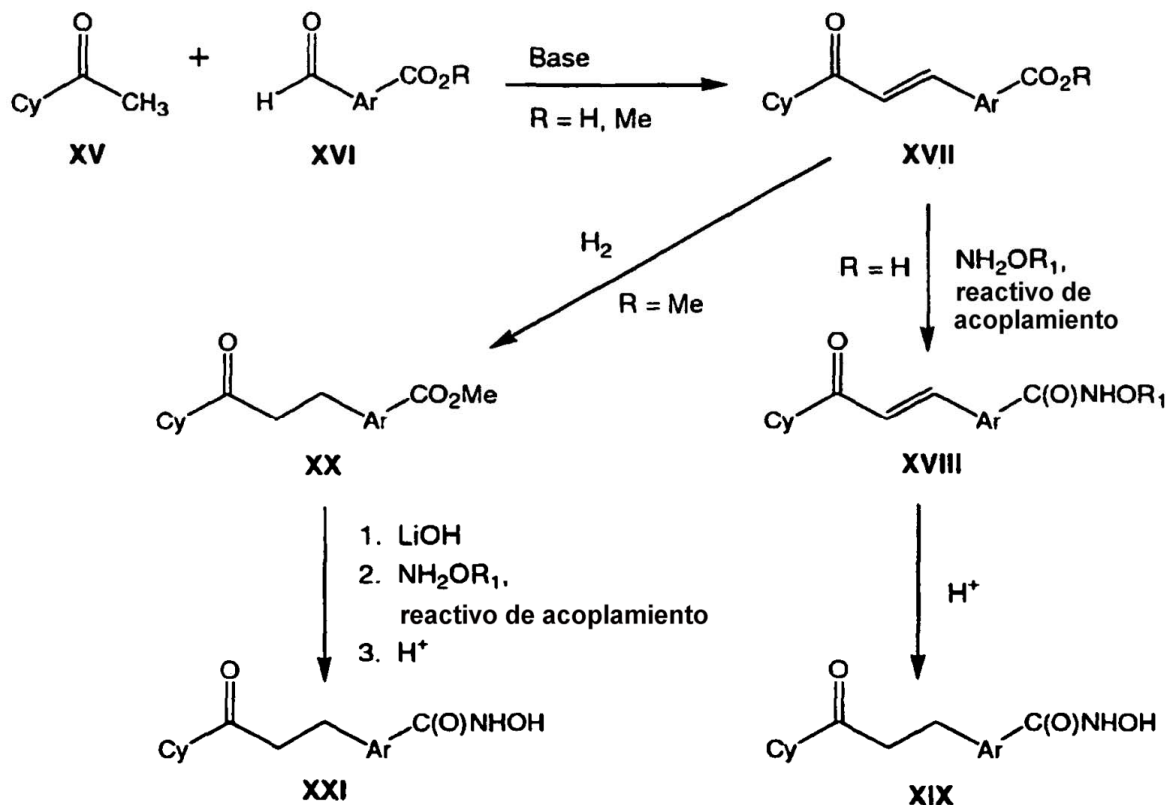
5 Como se emplea en el presente documento, el término "acilo" se refiere a un sustituyente alquilcarbonilo o arilcarbonilo.

El término "acilamino" se refiere a un grupo amida fijado al átomo de nitrógeno. El término "carbamoilo" se refiere a un grupo amida fijado al átomo de carbono del carbonilo. El átomo de nitrógeno de un sustituyente acilamino o carbamoilo puede estar adicionalmente sustituido. El término "sulfonamido" se refiere a un sustituyente sulfonamida fijado a través de cualquiera del átomo de azufre o nitrógeno. El término "amino" pretende incluir grupos NH<sub>2</sub>,  
10 alquilamino, arilamino, y amino cíclico. El término "ureido", como se emplea en el presente documento, se refiere a un resto urea, sustituido o no sustituido.

A continuación se dan ejemplos específicos de compuestos y rutas sintéticas. Sin embargo, los compuestos que no están incluidos dentro de la fórmula general detallada en la reivindicación 1 no forman parte de la presente invención.

## 15 Síntesis

### Esquema 3



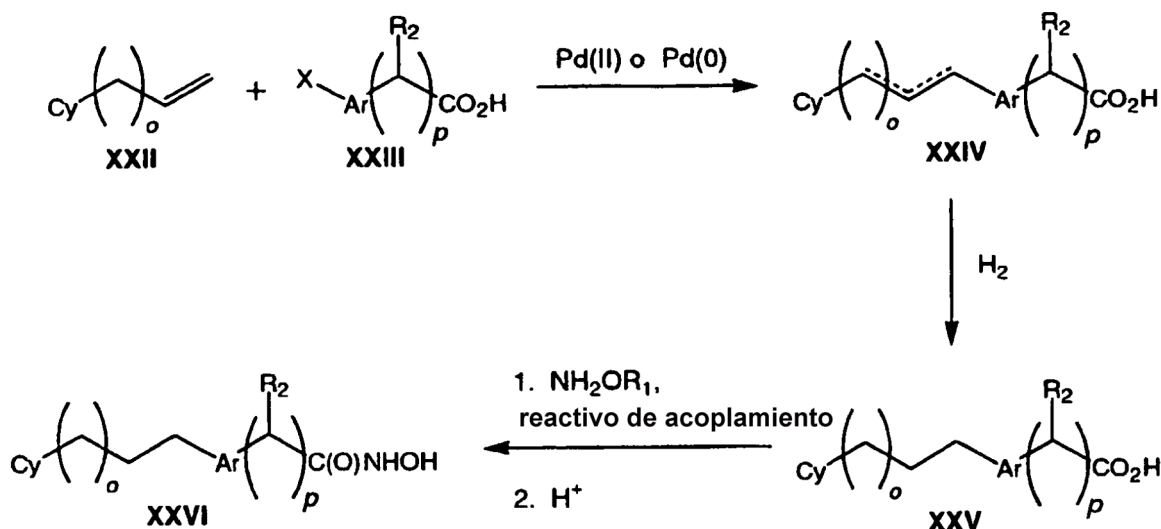
Los compuestos de la fórmula Cy-L<sup>2</sup>-Ar-Y<sup>2</sup>-(O)-NH-O-M se preparan, preferentemente, de acuerdo con las rutas sintéticas descrita en los Esquemas 3-5. Por consiguiente, en ciertas realizaciones preferidas, los compuestos de fórmulas XIX y XXI (L<sup>2</sup> = -C(O)-CH=CH- o -C(O)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) se preparan, preferentemente, de acuerdo con la ruta descrita en el Esquema 3. Por lo tanto, una aril acetofenona sustituida (XV) se trata con un aril aldehído (XVI) en un disolvente prótico, tal como metanol, en presencia de una base, tal como metóxido sódico, dando la enona XVII.

El sustituyente ácido de XVII (R = H) se acopla con una hidroxilamina O-protegida, tal como O-tetrahidropiranihidroxilamina (R<sub>1</sub> = tetrahidropirani) dando la N-hidroxibenzamida O-protegida XVIII. La reacción de acoplamiento se realiza, preferentemente, tratando el ácido y la hidroxilamina con dicitclohexilcarbodiimida en un disolvente, tal como cloruro de metileno o con 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida en presencia de N-hidroxibenzotriazol en un disolvente, tal como dimetilformamida. Otros reactivos de acoplamiento se conocen en la técnica, y pueden usarse también en esta reacción. La O-desprotección se consigue por tratamiento de XVIII con un

ácido, tal como ácido alcanforsulfónico, en un disolvente, tal como metanol, dando el ácido hidroxámico **XIX** ( $L^2 = -C(O)-CH=CH-$ ).

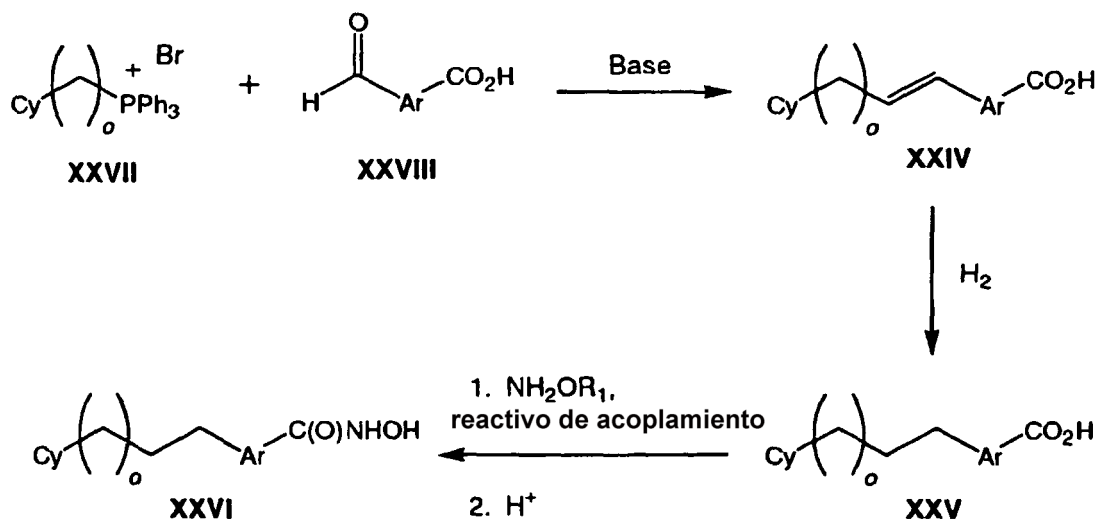
- 5 Los compuestos saturados de fórmula **XXI** ( $L^2 = -C(O)-CH_2CH_2-$ ) se preparan, preferentemente, por hidrogenación de **XVII** ( $R = Me$ ) sobre un catalizador de paladio, tal como Pd al 10%/C, en un disolvente, tal como metanol-tetrahidrofurano. La hidrólisis básica del producto resultante **XIX** con hidróxido de litio, seguida de formación de *N*-hidroxi amida e hidrólisis ácida, como se ha descrito anteriormente, da entonces el ácido hidroxámico **XXI**.

#### Esquema 4



- 10 Los compuestos de fórmula **XXVI** ( $L^2 = -(CH_2)_{o+2}-$ ) se preparan, preferentemente, por los procedimientos generales descritos en los Esquemas 4 y 5. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una olefina terminal (**XXII**) se acopla con un haluro de arilo (**XXIII**) en presencia de una cantidad catalítica de una fuente de paladio, tal como acetato de paladio o tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0), una fosfina, tal como trifenilfosfina, y una base, tal como trietilamina, en un disolvente, tal como acetonitrilo, dando el producto acoplado **XXIV**. La hidrogenación, seguida de formación de *N*-hidroxiamida e hidrólisis ácida, como se ha descrito anteriormente, da el ácido hidroxámico **XXVI**.

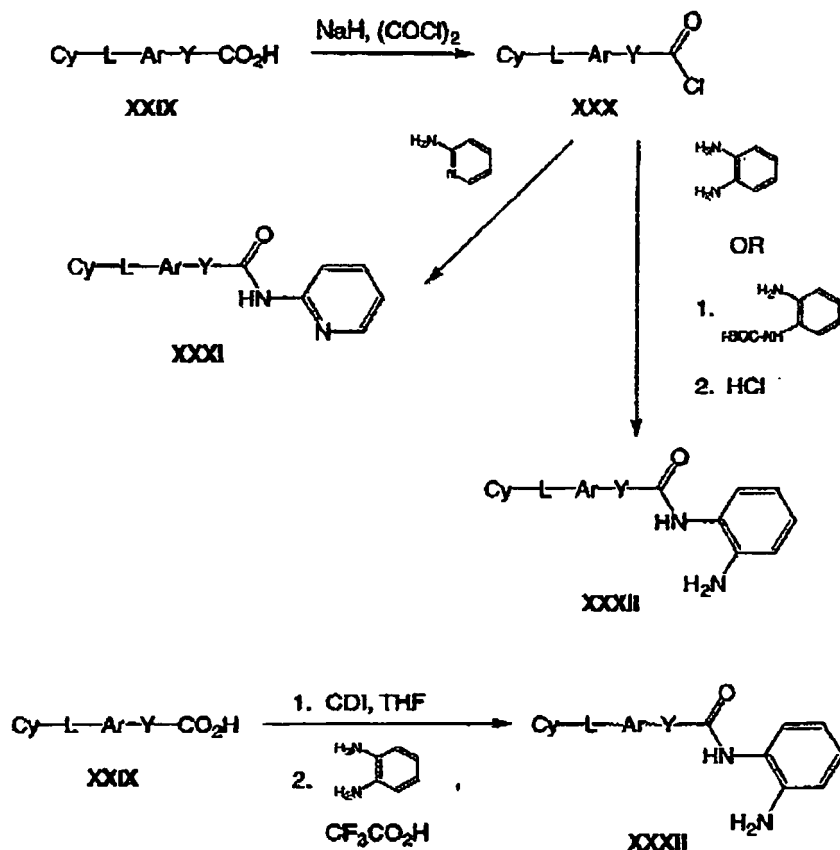
#### 15 Esquema 5



- 20 Como alternativa, en algunas otras realizaciones, una sal de fosfonio de fórmula **XXVII** se trata con un aril aldehído de fórmula **XXVIII**, en presencia de base, tal como hexametildisilazida de litio, en un disolvente, tal como tetrahidrofurano, para producir el compuesto **XXIV**. La hidrogenación, seguida de formación de *N*-hidroxiamida e hidrólisis ácida, da después los compuestos **XXVI**.



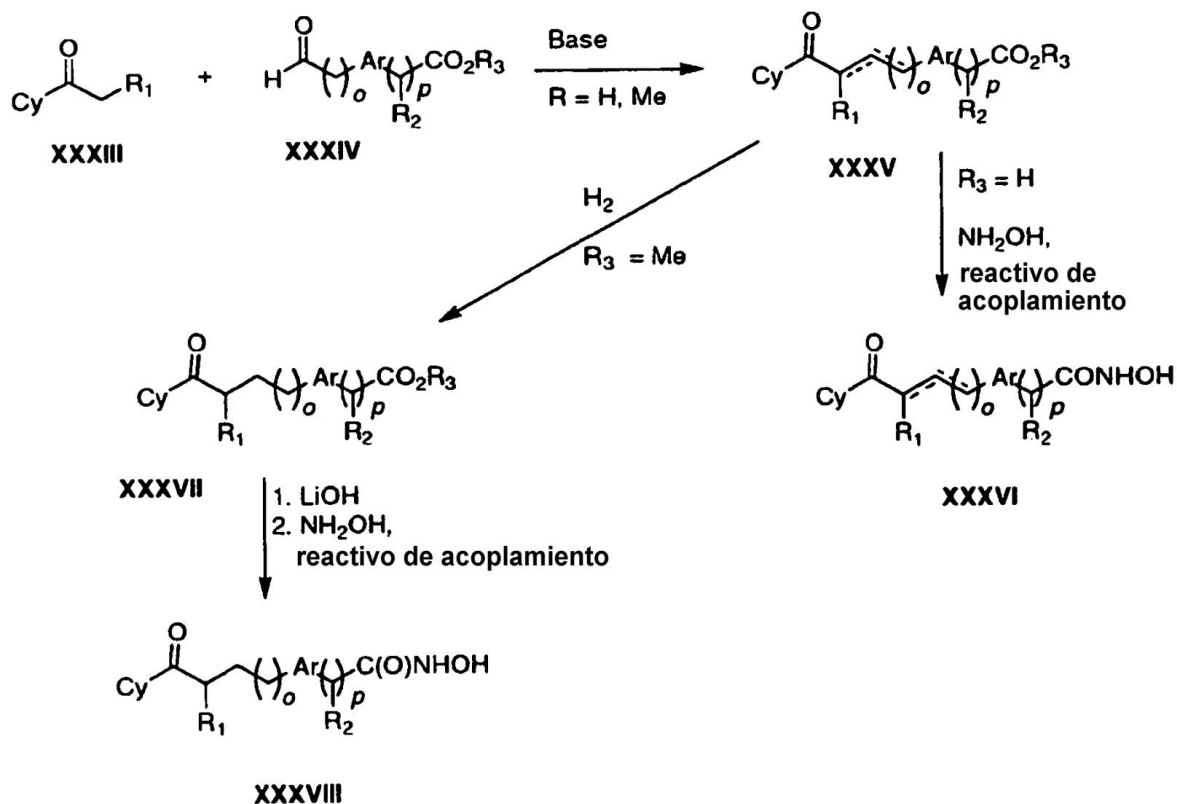
Esquema 6



Los compuestos de fórmula  $\text{Cy-L-Ar-Y-C(O)-NH-Z}$ , en la que L es  $\text{L}^2$ , Y es  $\text{Y}^2$ , y Z es anilino o piridilo, se preparan, preferentemente, de acuerdo con las rutas sintéticas descritas en el Esquema 6. Un ácido de fórmula  $\text{Cy-L-Ar-Y-C(O)-OH}$  (**XXIX**), preparado por uno de los procedimientos mostrados en los Esquemas 3-5, se convierte en el cloruro de ácido **XXX** correspondiente, de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo, por tratamiento con hidruro sódico y cloruro de oxalilo. El tratamiento de **XXX** con 2-aminopiridina y una base terciaria, tal como *N*-metilmorfolina, preferentemente en diclorometano a temperatura reducida, da entonces la piridil amida **XXXI**. De una manera similar, el cloruro de ácido **XXX** puede tratarse con 1,2-fenilenodiamina dando la anilil amida **XXXII**. Como alternativa, el cloruro de ácido **XXX** puede tratarse con una 1,2-fenilenodiamina mono-protegida, tal como 2-(*t*-BOC-amino)anilina, seguido de desprotección, dando **XXXII**.

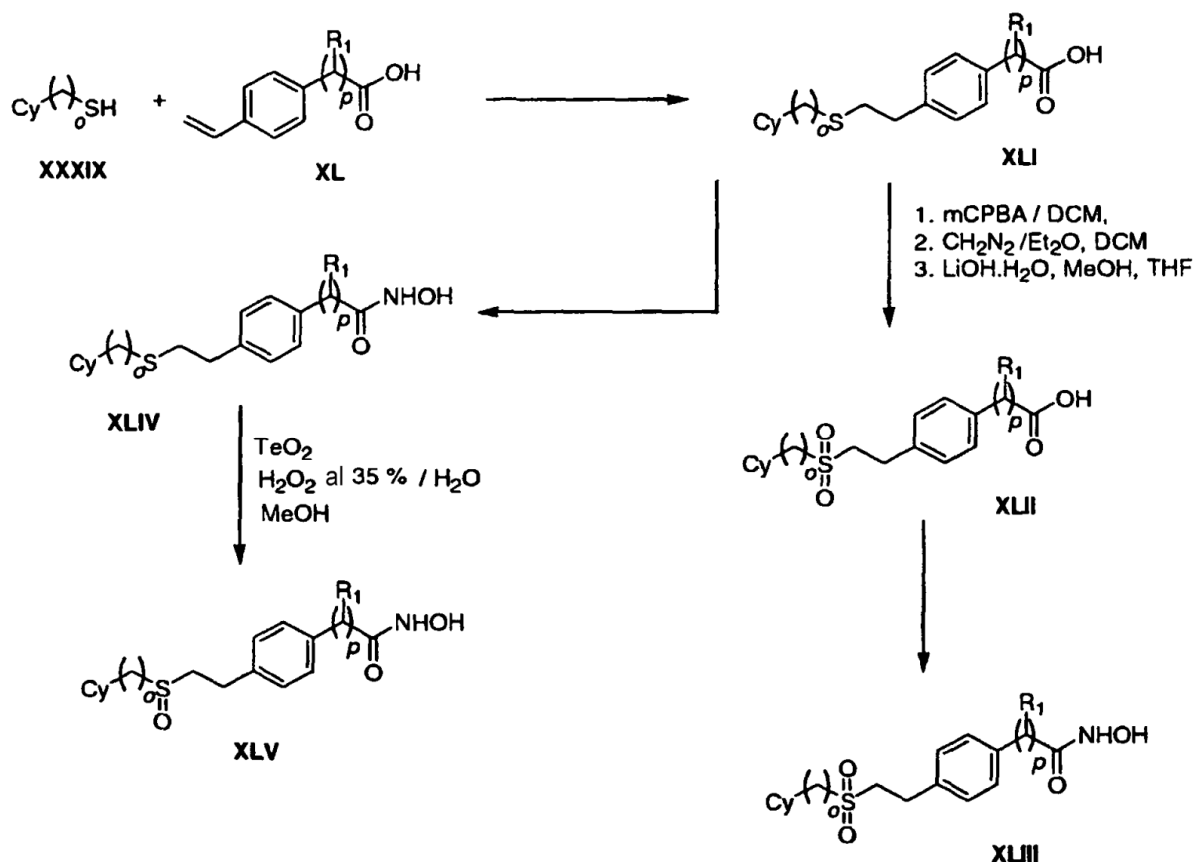
En otro procedimiento alternativo, el ácido **XXIX** puede activarse por tratamiento con carbonildiimidazol (CDI), seguido de tratamiento con 1,2-fenilenodiamina y ácido trifluoroacético, dando la anilil amida **XXXII**.

Esquema 7



Los compuestos de fórmula **XXXVIII** ( $L^2 = -C(O)\text{-alquileo-}$ ) se preparan, preferentemente, de acuerdo con el procedimiento general descrito en el Esquema 7. Por lo tanto, la condensación aldólica de la cetona **XXXIII** ( $R_1 = \text{H}$  o alquilo) con el aldehído **XXXIV** da el aducto **XXXV**. El aducto **XXXV** puede convertirse, directamente, en el ácido hidroxámico **XXXVI** correspondiente, o puede experimentar primero hidrogenación, dando el compuesto saturado **XXXVII** y convirtiéndose después en el ácido hidroxámico **XXXVIII**.

Esquema 8



Los compuestos de fórmula (2) en la que uno de los átomos de carbono en  $L^2$  está reemplazado con S, S(O), o S(O)<sub>2</sub> se preparan, preferentemente, de acuerdo con el procedimiento general descrito en el Esquema 8. Por lo tanto, el tiol **XXXIX** se añade a la olefina **XL** para producir **XLI**. La reacción se realiza, preferentemente, en presencia de un iniciador por radicales, tal como 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) o 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (VAZO™). La oxidación del sulfuro, preferentemente por tratamiento con ácido *m*-cloroperbenzoico (mCPBA), da la sulfona correspondiente, que se aísla convenientemente después de la conversión en el éster metílico por tratamiento con diazometano. La hidrólisis del éster da entonces el ácido **XLII**, que se convierte en el ácido hidroxámico **XLIII** de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. El sulfuro **XLI** puede convertirse también directamente en el ácido hidroxámico **XLIV** correspondiente, que después puede oxidarse selectivamente al sulfóxido **XLV**, por ejemplo, por tratamiento con peróxido de hidrógeno y dióxido de teluro.

### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un inhibidor de histona desacetilasa como se define en las reivindicaciones adjuntas, y un vehículo, excipiente, o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de la invención pueden formularse por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, y pueden prepararse para administración por cualquier vía, incluyendo, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, intratraqueal, o intrarectal. En ciertas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran por vía intravenosa en un marco hospitalario. En ciertas otras realizaciones preferidas, la administración puede ser, preferentemente, por la vía oral.

Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico, que es compatible con un sistema biológico, tal como una célula, un cultivo celular, tejido, u organismo, y que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Por lo tanto, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener, además del inhibidor, diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizadores, y otros materiales bien conocidos en la técnica. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, ed A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

### Inhibición de Histona Desacetilasa

La medición de la actividad enzimática de una histona desacetilasa puede conseguirse usando metodologías conocidas. Por ejemplo, Yoshida et al., J. Biol. Chem., 265: 17174-17179 (1990), describe la evaluación de la actividad enzimática de histona desacetilasa mediante la detección de histonas acetiladas en células tratadas con tricostatina A. Taunton et al., Science, 272: 408-411 (1996), describe análogamente procedimientos para medir la actividad enzimática de histona desacetilasa usando HDAC-1 endógeno y recombinante.

En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de histona desacetilasa interacciona con, y reduce la actividad de, todas las histona desacetilasas en la célula. En algunas otras realizaciones preferidas de acuerdo con este aspecto de la invención, el inhibidor de histona desacetilasa interacciona con, y reduce la actividad de, menos que todas las histona desacetilasas en la célula. En ciertas realizaciones preferidas, el inhibidor interacciona con, y reduce la actividad de, una histona desacetilasa (por ejemplo, HDAC-1), pero no interacciona con o reduce las actividades de otras histona desacetilasas (por ejemplo, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, y HDAC-8). Como se analiza más adelante, ciertos inhibidores de histona desacetilasa particularmente preferidos son aquellos que interaccionan con y reducen la actividad enzimática de una histona desacetilasa que está implicada en tumorigénesis. Ciertos otros inhibidores de histona desacetilasas preferidos interaccionan con y reducen la actividad enzimática de una histona desacetilasa fúngica.

Preferentemente, la inhibición de histona desacetilasa en una célula provoca una inhibición de la proliferación celular de las células en contacto. La expresión "inhibición de la proliferación celular" se usa para denotar una capacidad de un inhibidor de histona desacetilasa para retardar el crecimiento de células en contacto con el inhibidor, en comparación con las células con las que no ha habido contacto. Una evaluación de la proliferación celular puede hacerse contando las células con las que se ha contactado y con las que no, usando un contador de células Coulter (Coulter, Miami, FL) o un hema-citómetro. Cuando las células están en un crecimiento sólido (por ejemplo, un tumor sólido o un órgano), dicha evaluación de la proliferación celular puede hacerse midiendo el crecimiento con calibres y comparando el tamaño del crecimiento de las células con las que se ha hecho contacto con el de las células con las que no se ha hecho contacto.

Preferentemente, el crecimiento de las células que han entrado en contacto con el inhibidor se retarda al menos en un 50%, en comparación con el crecimiento de las células que no han entrado en contacto. Más preferentemente, la proliferación celular se inhibe en un 100% (es decir, las células con las que se ha hecho contacto no aumentan de número). Más preferentemente, la expresión "inhibición de la proliferación celular" incluye una reducción en el número o tamaño de células con las que se ha hecho contacto, en comparación con las células con las que no se ha hecho contacto. Por lo tanto, un inhibidor de histona desacetilasa de acuerdo con la invención que inhibe la proliferación celular en una célula con la que se ha hecho contacto puede inducir que la célula con la que se ha hecho contacto experimente retardo en el crecimiento, experimente una detención del crecimiento, experimente una muerte celular programada (es decir, apoptosis), o experimente una muerte celular necrótica.

La capacidad para inhibir la proliferación celular de los inhibidores de histona desacetilasas de acuerdo con la invención permite la sincronización de una población de células que crecen de forma no sincronizada. Por ejemplo, los inhibidores de histona desacetilasas de la invención pueden usarse para detener una población de células neoplásicas que crece *in vitro*, en la fase G1 o G2 del ciclo celular. Dicha sincronización permite, por ejemplo, la identificación del gen y/o los productos génicos expresados durante la fase G1 o G2 del ciclo celular. Dicha sincronización de células cultivadas podría ser útil también para ensayar la eficacia de un nuevo protocolo de transfección, en el que la eficacia de transfección varía y depende de la fase particular del ciclo celular de la célula a transfectar. El uso de los inhibidores de histona desacetilasas de la invención permite la sincronización de una población de células, ayudando de esta manera en la detección de una eficacia de transfección potenciada.

En algunas realizaciones preferidas, la célula con la que se pone en contacto es una célula neoplásica. El término "célula neoplásica" se usa para denotar una célula que muestra crecimiento celular aberrante. Preferentemente, el crecimiento celular aberrante de una célula neoplásica aumenta el crecimiento celular. Una célula neoplásica puede ser una célula hiperplásica, una célula que muestra una ausencia de inhibición de crecimiento por contacto, *in vitro*, una célula de un tumor benigno que es incapaz de metástasis *in vivo*, o una célula cancerosa que es capaz de metástasis *in vivo*, y que puede volver a aparecer después del intento de retirada. El término "tumorigénesis" se usa para denotar la inducción de la proliferación celular que conduce al desarrollo de un crecimiento neoplásico. En algunas realizaciones, el inhibidor de histona desacetilasa induce la diferenciación celular en la célula con la que ha entrado en contacto. Por lo tanto, una célula neoplásica, cuando entra en contacto con un inhibidor de histona desacetilasa, puede inducirse para que se diferencie, dando como resultado la producción de una célula hija que es filogenéticamente más avanzada que la célula con la que se ha puesto en contacto.

En algunas realizaciones preferidas, la célula con la que entra en contacto está en un animal. Por lo tanto, la invención proporciona el uso de un inhibidor de acuerdo con la presente invención en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación celular. Preferentemente, el animal es un mamífero, más preferentemente un mamífero domesticado. Más preferentemente, el animal es un ser humano.

La expresión "enfermedad o afección proliferativa celular" pretende hacer referencia a cualquier afección

caracterizada por crecimiento celular aberrante, preferentemente proliferación celular que aumenta anormalmente. Los ejemplos de dichas enfermedades o afecciones proliferativas celulares incluyen, aunque sin limitación, cáncer, reestenosis, y psoriasis. En realizaciones particularmente preferidas, la invención proporciona un procedimiento para inhibir la proliferación celular neoplásica en un animal que comprende administrar a un animal, que tiene al menos una célula neoplásica presente en su cuerpo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de histona desacetilasa de la invención.

De esta manera, la invención proporciona el uso de un inhibidor de acuerdo con la presente invención en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o infección fúngica. Preferentemente, el animal es un mamífero, más preferentemente un ser humano. Preferentemente, el inhibidor de histona desacetilasa usado de acuerdo con esta realización de la invención inhibe una histona desacetilasa fúngica en un mayor grado que inhibe histona desacetilasas de mamífero, particularmente histona desacetilasas humanas.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende denotar una dosificación suficiente para provocar la inhibición de la actividad de la histona desacetilasa en las células del sujeto, o una dosificación suficiente para inhibir la proliferación celular o inducir la diferenciación celular en el sujeto. La administración puede ser por cualquier vía, incluyendo, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, intratraqueal, o intrarectal. En ciertas realizaciones particularmente preferidas, los compuestos de la invención se administran por vía intravenosa en un marco hospitalario. En ciertas otras realizaciones preferidas, la administración puede ser, preferentemente, por la vía oral.

Cuando se administra por vía sistémica, el inhibidor de histona desacetilasa se administra, preferentemente, a una dosificación suficiente para conseguir un nivel en sangre del inhibidor de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 100 M, más preferentemente de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 50 M, aún más preferentemente de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 25 M, y lo más preferentemente de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 25 M. Para administración localizada, pueden ser eficaces concentraciones mucho menores que éstas, y pueden tolerarse concentraciones mucho mayores. Un especialista en la técnica apreciará que la dosificación de inhibidor de histona desacetilasa necesaria para producir un efecto terapéutico puede variar considerablemente dependiendo del tejido, órgano, o el animal o paciente particular a tratar.

En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el inhibidor es para su uso con un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de una histona desacetilasa. El uso combinado de un inhibidor del nivel de ácido nucleico (es decir, oligonucleótido antisentido) y un inhibidor del nivel de proteína (es decir, inhibidor de la actividad enzimática de histona desacetilasa) da como resultado un efecto inhibidor mejorado, reduciendo de esta manera las cantidades de los inhibidores requeridos, obteniendo un efecto inhibitorio dado, como comparación con las cantidades necesarias cuando se usa cualquiera de ellos individualmente. Los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con este aspecto de la invención son complementarios a las regiones de ARN o ADN de doble hebra que codifican HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, y/o HDAC-8.

Para los fines de la invención, el término "oligonucleótido" incluye polímeros de dos o más desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, o restos ribonucleósido 2'-O-sustituídos, o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, dichos oligo-nucleótidos tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 100 restos nucleósido, más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 restos nucleósido, y aún más preferentemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 restos nucleósido. Los restos nucleósido pueden estar acoplados entre sí por cualquiera de las numerosas uniones internucleósido conocidas. Dichas uniones internucleósido incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriester, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetilester, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato enlazado por puente, metileno fosfonato enlazado por puente, fosforotioato enlazado por puente y uniones internucleósido de sulfona. En ciertas realizaciones preferidas, estas uniones internucleósido pueden ser uniones fosfodiester, fosfotriester, fosforotioato, o fosforamidato, o combinaciones de las mismas. El término oligonucleótido también incluye polímeros tales que tienen bases o azúcares modificados químicamente y/o que tienen sustituyentes adicionales incluyendo, sin limitación, grupos lipófilos, agentes de intercalado, diaminas y adamantano. Para los fines de la invención el término "2'-O-sustituído" significa sustitución de la posición 2' del resto pentosa con un grupo -O-alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, o con un grupo -O-arilo o alilo que tiene 2-6 átomos de carbono, en el que dicho grupo alquilo, arilo o alilo puede estar no sustituido o puede estar sustituido, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxilo, o amino; o dicha sustitución en 2' puede ser con un grupo hidroxilo (para producir un ribonucleósido), un grupo amino o halo, pero no con un grupo 2'-H. El término "oligonucleótido" también incluye ácido nucleico unido y ácido nucleico peptídico.

Los oligonucleótidos antisentido particularmente preferidos utilizados en este aspecto de la invención incluyen oligonucleótidos quiméricos y oligonucleótidos híbridos.

Para los fines de la invención, un "oligonucleótido quimérico" se refiere a un oligonucleótido que tiene más de un tipo de unión internucleósido. Un ejemplo preferido de dicho oligonucleótido quimérico es un oligonucleótido quimérico que comprende una región de fosforotioato, fosfodiester o fosforoditioato, que preferentemente comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 nucleótidos, y una región alquilfosfonato o alquilfosfonotioato (véase, por ejemplo, Pederson et al. Patentes de Estados Unidos N° 5.635.377 y 5.366.878). Preferentemente, dichos

oligonucleótidos quiméricos contienen al menos tres uniones internucleósido consecutivas, seleccionadas entre uniones fosfodiéster y fosforotioato, o combinaciones de las mismas.

Para los fines de la invención, un "oligonucleótido híbrido" se refiere a un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo preferido de dicho oligonucleótido híbrido comprende un ribonucleótido o región de ribonucleótido 2'-O-sustituido, que preferentemente comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 nucleótidos 2'-O-sustituidos, y una región desoxirribonucleótido. Preferentemente, dicho oligonucleótido híbrido contendrá al menos tres desoxirribonucleósidos consecutivos y también contendrán ribonucleósidos, ribonucleósidos 2'-O-sustituidos, o combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Metelev y Agrawal, Patente de Estados Unidos N° 5.652.355).

- 10 La secuencia nucleotídica y estructura química exactas de un oligonucleótido antisentido utilizado en la invención pueden variar, siempre y cuando el oligonucleótido mantenga su capacidad de inhibir la expresión del gen de interés. Esto se determina fácilmente ensayando si el oligonucleótido antisentido particular es activo, cuantificando el ARNm que codifica un producto del gen, o en un ensayo de análisis por transferencia de Western para el producto del gen, o en un ensayo de actividad para un producto génico enzimáticamente activo, o en un ensayo de crecimiento de agar blando, o en un ensayo de construcción de gen informador, o un ensayo de crecimiento de tumor *in vivo*, todos los cuales se describen en detalle en la presente memoria descriptiva, o en Ramchandani et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94: 684-689.

- 20 Los oligonucleótidos antisentido utilizados en la invención pueden sintetizarse, convenientemente, sobre un soporte sólido adecuado, usando enfoques químicos bien conocidos, incluyendo química de H-fosfonato, química de fosforamidita, o una combinación de química de H-fosfonato y química de fosforamidita (es decir, química de H-fosfonato para algunos ciclos y química de fosforamidita para los otros ciclos). Los soportes sólidos adecuados incluyen cualquiera de los soportes sólidos convencionales usados para síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, tales como vidrio con tamaño de poro controlado (CPG) (véase, por ejemplo, Pon, R.T. (1993) Methods in Molec. Biol. 20: 465-496).

- 25 Particularmente, los oligonucleótidos preferidos tienen secuencias nucleotídicas de aproximadamente 13 a aproximadamente 35 nucleótidos, que incluyen las secuencias nucleotídicas mostradas en las Tablas 1-3. Otros oligonucleótidos adicionales particularmente preferidos tienen secuencias nucleotídicas de aproximadamente 15 a aproximadamente 26 nucleótidos de las secuencias nucleotídicas mostradas en las Tablas 1-3.

Tabla 1

SEC ID Nº	SECUENCIA	DIANA (**)
1	5'-GAG ACA GCA GCA CCA GCG GG -3'	17-36
2	5'-ATG ACC GAG TGG GAG ACA GC-3'	21-49
3	5'-GGA TGA CCG AGT GGG AGA CA-3'	31-50
4	5'-CAG GAT GAC CGA GTG GGA GA -3'	33-52
5	5'-TGT GTT CTC AGG ATG ACC GA-3'	41-60
6	5'-GAG TGA CAG AGA CGC TCA GG-3'	62-81
7	5'-TTC TGG CTT CTC CTC CTT GG-3'	1504-1523
8	5'-CTT GAC CTC CTC CTT GAC CC-3'	1531-1550
9	5'-GGA AGC CAG AGC TGG AGA GG-3'	1565-1584
10	5'-GAA ACG TGA GGG ACT CAG CA-3'	1585-1604
11	5'-CCG TCG TAG TAG TAA CAG ACT TT-3'	138-160
12	5'-TGT CCA TAA TAG TAA TTT CCA A-3'	166-187
13	5'-CAGCAAATTATGAGTCATGCGGATTC-3'	211-236
(**) el número de referencia de la diana está de acuerdo con HDAC-1, Número de Referencia GenBank U50079.		

Tabla 2

SEC ID Nº	SECUENCIA	DIANA (***)
14	5'-CTC CTT GAC TGT ACG CCA TG-3'	1-20
15	5'-TGC TGC TGC TGC TGC TGC CG-3'	121-141
16	5'-CCT CCT GCT GCT GCT GCT GC-3'	132-152
17	5'-CCG TCG TAG TAG TAG CAG ACT TT-3'	138-160
18	5'-TGT CCA TAA TAA TAA TTT CCA A-3'	166-187
19	5'-CAG CAA GTTATG GGT CAT GCG GAT TC-3'	211-236
20	5'-GGT TCC TTT GGT ATC TGT TT-3'	1605-1625

(\*\*\*) el número de referencia de la diana está de acuerdo con HDAC-2, Número de Referencia GenBank U31814.

Tabla 3

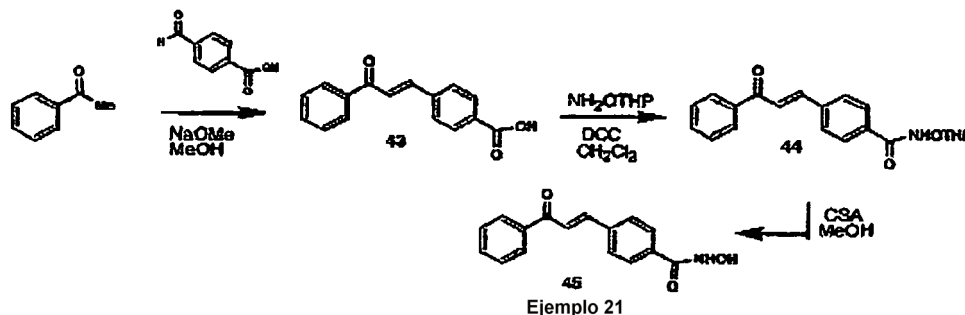
SEC ID Nº	SECUENCIA	DIANA (***)
21	5'-GCTGCCTGCCGTGCCACCC-3'	514-533

(\*\*\*) el número de referencia de la diana está de acuerdo con HDAC-4

- 5 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

#### Ejemplo 21:

*N*-Hidroxi-4-(3-oxo-3-fenilpropenil)-benzamida (45) (un compuesto no reivindicado)



#### 10 Etapa 1: 4-(3-oxo-3-fenilpropenil)-benzoico ácido (43)

Se añadió metóxido sódico (1,8 g, 33,3 mmol) a una suspensión agitada de 4-carboxibenzaldehído (2,5 g, 16,6 mmol) y acetofenona (20 g ul, 16,6 mmol) en metanol (50 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, y la mitad del volumen de metanol se retiró a presión reducida. La mezcla se vertió en HCl 1 M (50 ml) (hasta pH = 2) y se añadió acetato de etilo. La fase acuosa separada se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>, anh.), se filtró y se evaporó. El residuo se trituró con diclorometano-hexanos (1:1) dando 3 g de 43 (rendimiento del 72%).

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ 7,50-7,87 (m, 7 H), 8,04 (d, 2 H, J = 8 Hz), 8,16 (d, 2 H, J = 8 Hz)

#### Etapa 2: 4-(3-Oxo-3-fenilpropenil)-*N*-(O-tetrahidropiranil)-benzamida (44)

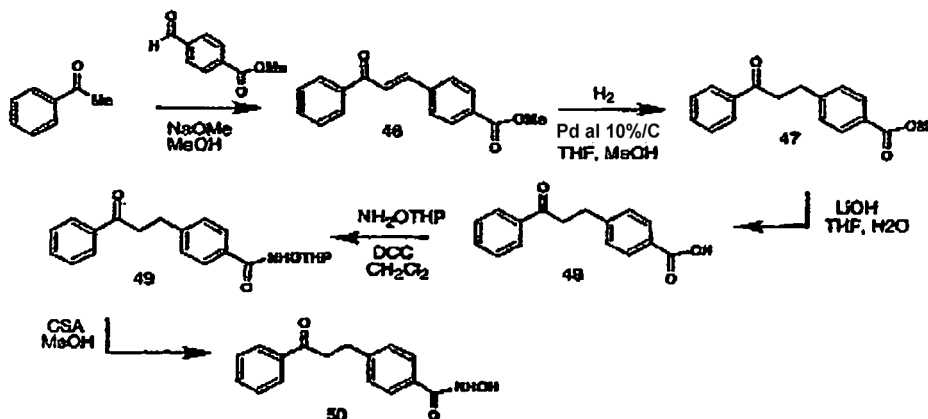
- 20 El ácido carboxílico 43 (260 mg, 1,0 mmol) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 ml) y se añadieron DCC (256 mg, 1,2 mmol) seguido de NH<sub>2</sub>OTHP (145 mg, 1,2 mmol). La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió NH<sub>4</sub>Cl sat, y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó al vacío. (La purificación por cromatografía en columna usando MeOH al 1%/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dio el compuesto del título, que se usó directamente en la siguiente etapa.

**Etapa 3: N-Hidroxi-4-(3-oxo-3-fenilpropenil)-benzamida (45)**

El ácido hidroxámico protegido **44** (234 mg, 0,67 mmol) se disolvió en MeOH (7 ml) y después se añadió CSA (31 mg, 0,13 mmol). La mezcla se dejó en agitación a reflujo durante 2 horas o hasta que la reacción se hubo completado por CCF. Se añadió HCl 1 N, se extrajo con EtOAc, la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. El disolvente se evaporó al vacío. La purificación por cromatografía en columna usando MeOH al 5%/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dio el compuesto del título. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ 7,53-8,20 (m, 11 H); 9,12 (s a, 1 H); 11,35 (s a, 1 H)

**Ejemplo 22:**

N-Hidroxi-4-(3-oxo-3-fenilpropil)-benzamida (**50**) (un compuesto no reivindicado)



Ejemplo 22

**Etapa 1: 4-(3-Oxo-fenilpropenil)-benzoato de metilo (46)**

A 4-carbometoxibenzaldehído (79 mg, 0,48 mmol) y acetofenona (56 ml, 0,48 mmol) en metanol anhidro (1,6 ml), se le añadió metóxido sódico puro (26 mg, 0,48 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche y después se calentó a reflujo durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente y se le añadió HCl 1 N y EtOAc. Las fases se separaron y la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. El disolvente se evaporó al vacío dando un sólido de color amarillo, que se recrystalizó en acetonitrilo/agua dando un sólido cristalino de color amarillo pálido.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ 3,95 (s, 3 H), 7,50-8,12 (m, 11 H)

**Etapa 2: 4-(3-Oxo-3-fenilpropil)-benzoato de metilo (47)**

La enona aromática **46** (321 mg, 1,20 mmol) se disolvió en THF anhidro (6 ml) y MeOH anhidro (6 ml). Se añadieron 2 cucharaditas de Pd al 10% sobre C activado, se puso en una atmósfera de hidrógeno y se dejó agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se purgó con nitrógeno, se filtró a través de Celite y el disolvente se retiró por evaporación al vacío. El alcohol bencílico se reoxida a la cetona mediante el siguiente procedimiento. El producto en bruto se captó de nuevo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 ml), con tamices moleculares 3 Å, se añadió TPAP (1 cucharadita) seguido de NMO (212 mg, 1,8 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se evaporó al vacío y se purificó por cromatografía en columna usando EtOAc al 10%/Hexano.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ 3,14 (t, 2 H), 3,34 (t, 2 H), 3,90 (s, 3 H), 7,30-7,60 (m, 6 H), 7,92-7,99 (m, 4 H).

**Etapa 3: Ácido 4-(3-oxo-3-fenilpropil)-benzoico (48)**

A una solución del éster metílico **47** (195 mg, 0,73 mmol) en agua/THF (1:1, 0,07 M) se añadió LiOH (46 mg, 1,1 mmol). La solución resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente o hasta que no se detectó material de partida por CCF. Se añadió HCl 1 N y la solución se extrajo con EtOAc y la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. La filtración y evaporación del disolvente al vacío seguido de purificación por cromatografía en columna usando MeOH al 10%/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dio el compuesto del título. RMN de <sup>1</sup>H (310 MHz, CDCl<sub>4</sub>); δ 3,16 (t, 2 H), 3,36 (t, 2 H), 7,33-7,60 (m, 5 H), 7,93-8,06 (m, 4 H).

**Etapa 4: N-hidroxil-4-(3-oxo-3-fenilpropil)-benzamida (50)**

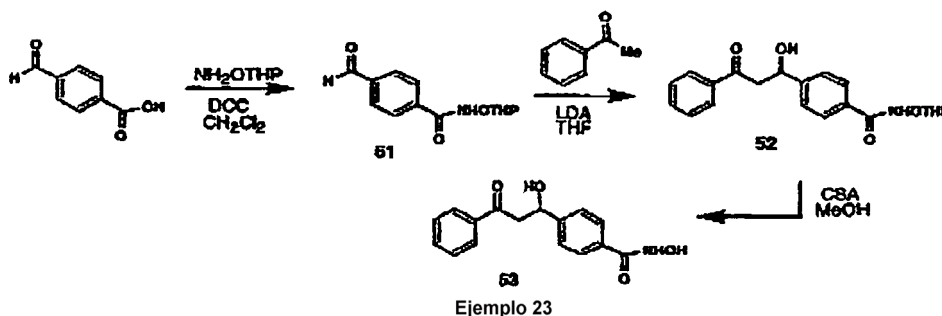
Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 21, Etapas 2-3, pero sustituyendo el ácido carboxílico **4** por el compuesto **48**, se obtuvo el compuesto del título.



RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ );  $\delta$  2,97 (t, 2 H), 3,38 (t, 2 H), 7,34 (d, 2 H,  $J = 8$  Hz), 7,45-7,70 (m, 5 H), 7,96 (dd, 2 H,  $J = 8$  Hz, 1 Hz), 11,14 (s a, 1 H)

### Ejemplo 23:

*N*-Hidroxi-4-(3-oxo-3-fenil-1-hidroxipropil)-benzamida (**53**) (un compuesto no reivindicado)



5

#### Etapa 1: 4-Carboxi-*N*-(*O*-tetrahidropiranyl)-benzamida (**51**)

Se añadió hidroxilamina-*O*-THP (3,9 g, 33,2 mmol) a una suspensión de ácido 4-formilbenzoico (4,2 g, 27,7 mmol) y DCC (6,8 g, 33,2 mmol) en diclorometano (200 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche y se inactivó con cloruro de amonio saturado. La fase acuosa separada se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ( $\text{MgSO}_4$  anh.), se filtraron y se evaporaron. La cromatografía ultrarrápida del residuo (metanol al 10% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), dio (**51**).

10

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_2$ );  $\delta$  ppm. 10,04 (s, 1 H), 8,95 (s, 1 H), 7,99 (d, 2 H,  $J = 7,0$  Hz), 7,93 (d, 2 H,  $J = 7,0$  Hz), 5,1 (s, 1 H), 3,60 (m, 2 H), 1,60 (m, 6 H)

#### Etapa 2: 4-(3-Oxo-3-fenil-1-hidroxipropil)-*N*-(*O*-tetrahidropiranyl)-benzamida (**52**)

Se añadió *n*-BuLi (1,4 M/hexano, 1,6 ml, 2,2 mmol) a una solución a 0 °C de diisopropilamina (337 ml, 2,4 mmol) en THF anhidro (15 ml). Se agitó a 0 °C 10 minutos, después se enfrió a -78 °C. Se le añadió acetofenona, después se agitó 30 minutos a -78 °C. Se canuló en una solución a -78 °C del aldehído **9** (50 mg, 2,0 mmol) en THF anhidro (10 ml). Se agitó 3 horas a -78 °C y después se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Se calentó a temperatura ambiente, se extrajo con EtOAc, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y el disolvente se evaporó al vacío. La purificación por HPLC  $\text{CH}_4\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$  0,1%; 10-95% dio el compuesto del título **52**.

20

#### Etapa 3: *N*-Hidroxi-4-(3-oxo-3-fenil-1-hidroxipropil)-benzamida (**53**)

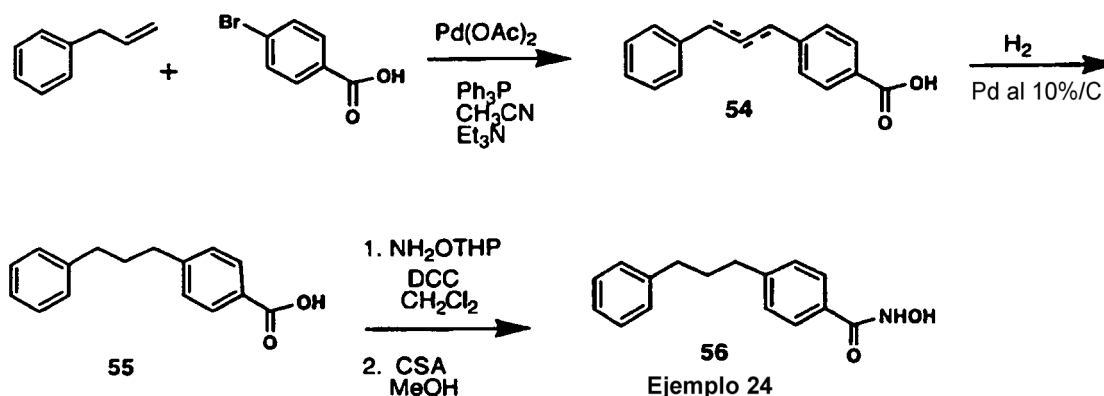
Siguiendo el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 21, Etapa 3, pero sustituyendo el compuesto **44** por el compuesto **52**, se obtuvo el compuesto del título.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ );  $\delta$  3,20 (dd, 1 H,  $J = 4$  Hz,  $J = 16$  Hz), 3,42 (dd, 1 H,  $J = 16$  Hz, 8 Hz), 5,20 (m, 1 H), 7,44-8,18 (m, 9 H), 11,15 (s a, 1 H), 11,32 (s a, 1 H)

25

### Ejemplo 24:

*N*-Hidroxi-4-(3-fenilpropil)-benzamida (**56**) (un compuesto no reivindicado)



Etapa 1: Ácido 4-(3-fenilpropenil)-benzoico / ácido 4-(3-fenil-2-propenil)-benzoico (54)

Alilbenceno (255 ml, 1,9 mmol), ácido 4-bromobenzoico (523 mg, 2,6 mmol), Et<sub>3</sub>N (0,91 ml, 6,5 mmol), acetato de paladio (II) (16 mg, 0,052 mmol), trifenilfosfina (60 mg, 0,21 mmol) y acetonitrilo (5 ml) se agitaron a reflujo durante una noche en un matraz de fondo redondo. Se añadió HCl 1 N, se extrajo con EtOAc, la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró, el disolvente se evaporó al vacío. Se purificó por cromatografía en columna usando MeOH al 10% / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> produjo 90 mg (14%) de una mezcla de dos regioisómeros **54**. La mezcla se sometió después a hidrogenación sin caracterización adicional.

Etapa 2: Ácido 4-(3-fenilpropil)-benzoico (55)

Una mezcla de olefinas regioisoméricas **54** (100 mg, 0,42 mmol) y Pd al 10% sobre C (10 mg) en metanol (4 ml) se agitó vigorosamente en atmósfera de H<sub>2</sub> (96,5 kPa). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, se filtró a través de Celite y se evaporó dando **55** en forma de un aceite. La cromatografía ultrarrápida del residuo dio **55** (88 mg, 88%).

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ ppm 8,10 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,35 (m, 7 H), 2,73 (m, 4 H), 2,00 (m, 2 H)

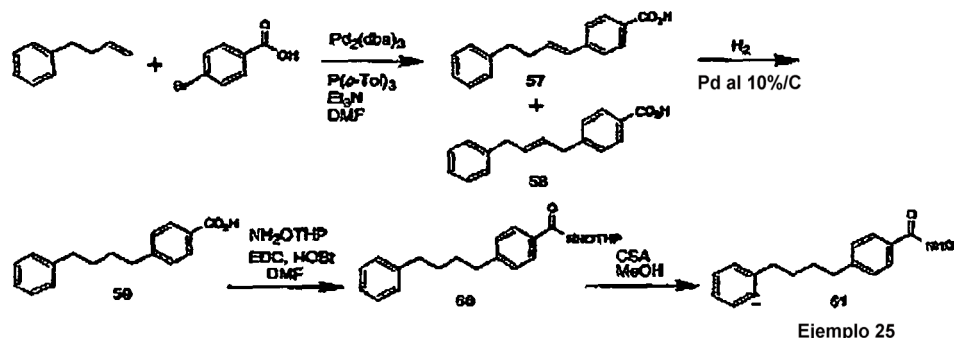
Etapa 3: N-Hidroxi-4-(3-fenilpropil)-benzamida (56)

15 Siguiendo el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 21, Etapas 2-3, pero sustituyendo el compuesto **43** por el compuesto **55**, se obtuvo el compuesto del título en forma de un sólido de color beige. (24 mg, rendimiento del 26%)

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD); δ (ppm) 7,63 (d, 2 H, J = 8,0 Hz); 7-38-7,05 (m, 7 H), 2,63 (m, 4 H), 1,91 (m, 2 H)

Ejemplo 25:

20 N-Hidroxi-4-(4-fenilbutil)-benzamida (**61**) (un compuesto no reivindicado)

Etapa 1: Ácido 4-(1-butenil-4-fenil)-benzoico / ácido 4-(2-butenil-4-fenil)-benzoico (57/58)

En atmósfera de nitrógeno, en un matraz de fondo redondo de 25 ml, se mezclaron: 4-fenil-1-buteno (568 ml, 3,8 mmol), ácido 4-bromobenzoico (634 mg, 3,2 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (87 mg, 0,1 mmol), tri-*o*-tolilfosfina (58 mg 0,2 mmol), trietilamina (1,1 ml, 7,9 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (7 ml, 0,5 M solución). La mezcla se agitó durante 22 horas a 100 °C. Después, la suspensión resultante se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de Celite y se enjuagó con acetato de etilo. El filtrado se acidificó con HCl 1 N, las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. El sólido resultante se trituró con hexano:diclorometano (9:1) dando 367 mg (46%) de un sólido beige **57/58**. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ (ppm) 2,50-2,60 (m, 2 H), 2,80 (t, 2 H, J = 9,0 Hz), 6,40-6,50 (m, 2 H), 7,12-7,35 (m, 5 H), 7,41 (d, 2 H, J = 9,0 Hz), 7,92 (d, 2 H, J = 9,0 Hz).

Etapa 2: 4-(4-fenilbutil)-benzoico ácido (59)

35 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 24, Etapa 2, pero sustituyendo el compuesto **54** por los compuestos **57/58**, se obtuvo el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 92%.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD); δ (ppm) 1,60-1,75 (m, 4 H), 2,65 (t, 2 H, J = 9,0 Hz), 2,72 (t, 2 H, J = 9,0 Hz), 7,12-7,30 (m, 5 H), 7,33 (d, 2 H, J = 9,0 Hz), 7,96 (d, 2 H, J = 9,0 Hz)

Etapa 3: 4-(4-Fenilbutil)-N-(O-tetrahidropiranyl)-benzamida (60)

40 En atmósfera de nitrógeno, en un matraz de fondo redondo de 25 ml, a ácido 4-(4-fenilbutil)benzoico **59** (341 mg, 1,3 mmol) en 5 ml de *N,N*-dimetilformamida (0,3 M solución) se le añadió el clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-

etilcarbodiimida (308 mg, 1,6 mmol) y el 1-hidroxibenzotriazol hidrato (272 mg, 2,0 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 30 minutos y después se añadió la 2-(tetrahidropiranyl) hidroxilamina (235 mg, 2,0 mmol) y la mezcla se agitó durante 4 días. La *N,N*-dimetilformamida se retiró al vacío, el aceite resultante se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró dando un rendimiento del 95% del compuesto del título 60 en bruto. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD); δ (ppm) 1,50-1,75 (m, 10 H), 2,65 (t, 2 H, J = 9,0 Hz), 2,72 (t, 2 H, J = 9,0 Hz), 3,51 (d, 1H, J = 15 Hz), 4,05 (t, 1H, J = 15 Hz), 5,05 (s, 1 H), 7,10-7,35 (m, 7 H), 7,75 (d, 2 H, J = 9,0 Hz), 10,60 (s, 1 H)

#### Etapa 4: *N*-Hidroxi-4-(4-fenilbutil)-benzamida (61)

En atmósfera de nitrógeno, al aceite en bruto en un matraz de fondo redondo de 25 ml, se le añadieron 5 ml de alcohol metílico (solución 0,3 M) y ácido alcanforsulfónico (333 mg, L4 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El alcohol metílico se retiró al vacío sin calentamiento y el aceite resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con alcohol metílico y diclorometano (1:19). El sólido se eluyó con hexano:dicloroametano (9:1) dando 212 mg (59%) de un sólido de color beige 61.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 1,66 (m, 4 H), 2,65 (t, 2 H, J = 7,2 Hz), 2,70 (t, 2 H, J = 7,1 Hz), 7,15-7,31 (m, 7 H), 7,75 (d, 2 H, J = 7,8 Hz), 8,18 (s ancho, 1 H), 10,68 (s ancho, 1 H).

RMN de <sup>13</sup>C (75,46 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 31,6 (t), 31,8 (t), 36,1 (t), 36,2 (t), 2 X 126,4 (d), 127,8 (d), 2 X 129,1 (d), 2 X 129,2 (d), 2 X 129,3 (d), 130,6 (s), 143,3 (s), 147,3 (s), 165,9 (s).

#### Ejemplo 26:

*N*-Hidroxi-3-(3-fenilpropil)-benzamida (64) (un compuesto no reivindicado)

#### Etapa 1: Ácido 3-(3-fenilpropenil)-benzoico (62)

Siguiendo el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 24, etapa 1, pero sustituyendo el ácido 3-bromobenzoico por ácido 4-bromobenzoico, se obtuvo el compuesto del título como una mezcla de olefinas. La mezcla se llevó a la siguiente etapa sin purificación.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>2</sub>); δ (ppm); 3,6 (dd, 2 H, CH<sub>2</sub>); 6,4 (dd, 2 H, vinílico); 7,0-7,5 (m, 8 H, CHAR); 8,0 (s, 1H, CHAR)

#### Etapa 2: Ácido 3-(3-fenilpropil)-benzoico (63)

Siguiendo el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 24, Etapa 2, pero sustituyendo el compuesto 54 por el compuesto 62, se obtuvo el compuesto con un rendimiento del 52% y se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ (ppm); 2,0 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>); 2,7 (m, 4 H, 2CH<sub>2</sub>); 7,0-7,4 (m, 8 H, CHAR); 8,0 (s, 1 H, CHAR)

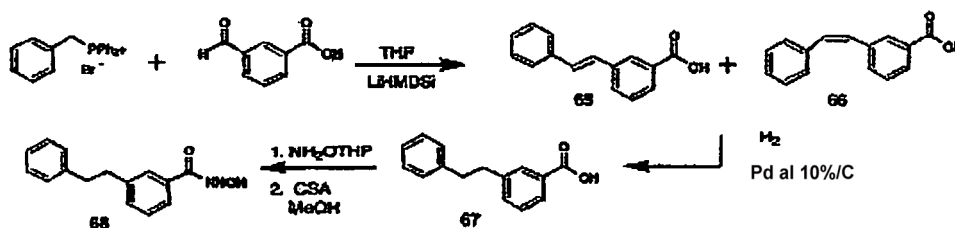
#### Etapa 3: *N*-Hidroxi-3-(3-fenilpropil)-benzamida (64)

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 25, Etapa 3-4, pero sustituyendo el compuesto 59 por el compuesto 63, se obtuvo el compuesto del título. La purificación por cromatografía ultrarrápida usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9,5:0,5) dio el compuesto 64 con un rendimiento del 20%.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ 1,8 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>); 2-8 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>); 7,0-7,4 (m, 7 H, CHAR); 7,6 (s, CHAR); 9,0 (s, NH); 11,2 (s, OH)

#### Ejemplo 27:

*N*-Hidroxi-3-(2-feniletil)-benzamida (68) (un compuesto no reivindicado)



Ejemplo 27

**Etapa 1: Ácido 3-(2-feniletetil)-benzoico (65/66)**

Una solución 1,0 M de bis(trimetilsilil)amiduro de litio (3,3 ml, 3,3 mmol) en THF se añadió a una suspensión agitada de bromuro de benciltrifenilfosfonio (1,44 g, 3,6 mmol) en THF (35 ml) a 0 °C. La solución de color naranja resultante se añadió mediante una cánula a una mezcla de 3-carboxibenzaldehído (500 mg, 3-3 mmol) y bis(trimetilsilil)amiduro de litio (3,3 ml, 3,3 mmol) en THF (10 ml). La mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se añadieron una solución 1 N de HCl (75 ml) y acetato de etilo (75 ml) y la fase acuosa separada se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>, anh.), se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por HPLC (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 10:95, TFA 0,1%) dando 130 mg del compuesto del título (17%)

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ (ppm) mezcla E:Z (1:1) 8,22 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H), 7,90-7,10 (m, 16 H), 6,70 (d, 1 H, J = 15,0 Hz), 6,62 (d, 1H, J = 15,0 Hz)

**Etapa 2: Ácido 3-(2-feniletetil)-benzoico (67)**

Siguiendo el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 24, Etapa 2, pero sustituyendo el compuesto 54 por los compuestos 65/66, se obtuvo el compuesto del título de forma cuantitativa.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ (ppm) 2,98 (m, 4 H); 7,30 (m, 7 H); 7,99 (m, 2 H)

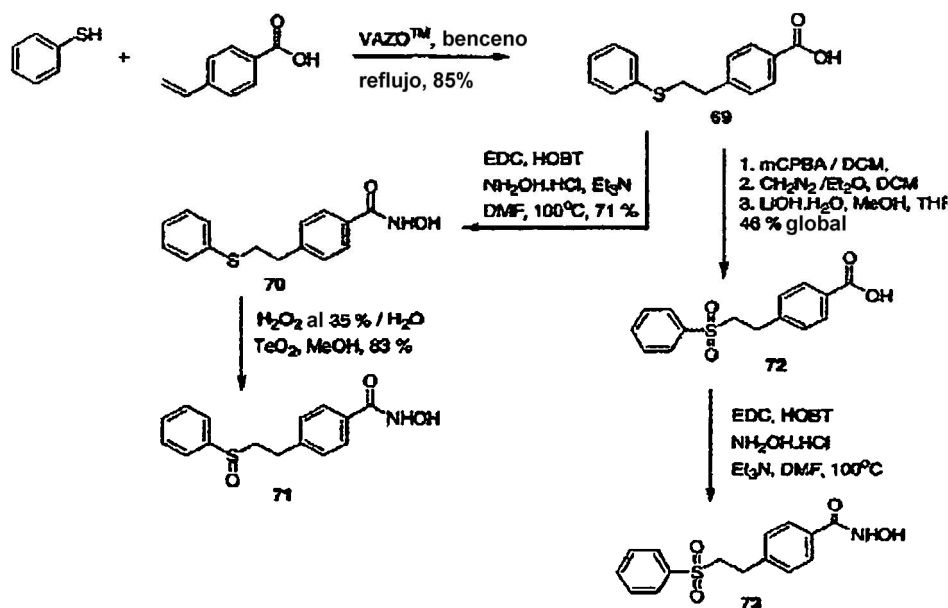
**Etapa 3: N-Hidroxi-3-(2-feniletetil)-benzamida (68)**

15 Siguiendo el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 25, Etapa 3 y 4, pero sustituyendo el compuesto 59 por el compuesto 67, se obtuvo el compuesto del título con un rendimiento del 22%.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); δ (ppm) 2,82 (s, 4 H); 7,03-7,08 (m, 8 H); 7,62 (s, 1 H); 8,98 (s a, 1 H); 11,15 (s a, 1 H)

**Ejemplo 28:**

20 N-Hidroxi-4-(2-tiofenil)-etil benzamida (70) (un compuesto no reivindicado)

**Etapa 1: Ácido 4-(2-tiofenil)-etil benzoico (69)**

De acuerdo con el procedimiento publicado (Gareau et al., Tet. Lett., 1994, 1837), en atmósfera de nitrógeno en un matraz de fondo redondo de 50 ml, que contenía ácido 4-vinil-benzoico (1,0 g, 6,75 mmoles), en 10 ml de benceno (0,7 M) se añadió bencenotiol (797 ml, 7,76 mmoles) seguido de VAZO™ (Aldrich Chemical Company, 495 mg, 2,02 mmoles). La mezcla se agitó durante 12 horas a reflujo. La solución resultante se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó al vacío. El sólido se purificó por trituración usando hexano y diclorometano dando 1,94 g (85%) de sólido blanco.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ 3,01 (t, 2 H, J = 8,4 Hz), 3,28 (dd, 2 H, J = 7,2, 7,8 Hz), 7,21 (tt, 1 H, J = 1,2, 7,2 Hz), 7,34 (t, 2 H, J = 8,1 Hz), 7,38-7,43 (m, 1 H), 7,41 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,97 (d, 2 H, J = 8,1 Hz).

**Etapa 2: *N*-Hidroxi-4-(2-tiofenil)-etil benzamida (70)**

En atmósfera de nitrógeno, en un matraz de fondo redondo de 50 ml que contenía ácido 4-(2-tiofenil)-etil benzoico (600 mg, 2,32 mmoles) en 12 ml de *N,N*-dimetilformamida (0,2 M) se le añadió clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil) 3-etilcarbodiimida (579 mg, 3,02 mmoles) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (377 mg, 2,79 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó 30 minutos, después se añadieron clorhidrato de hidroxilamina (242 mg, 3,48 mmoles) y tri-etilamina (971 ml, 6,97 mmoles) y la mezcla se agitó durante 12 horas a 50 °C. La *N,N*-dimetilformamida se retiró al vacío y el aceite resultante se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, solución saturada de hidrogenocarbonato sódico, agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El sólido en bruto se purificó por trituración usando hexano y diclorometano dando 450 mg (71%) de un sólido de color beige. RP-HPLC (Hewlett-Packard 1100, columna C18 HP 4,6 x 250 mm, flujo 1 ml/min, CH<sub>3</sub>CN al 10-95% / H<sub>2</sub>O en 42 min con TFA al 0,1%); Pureza: 95,8% (220 nm), 93,2% (254 nm).

RMN de <sup>1</sup>H (300,072 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 2,98 (t, 2 H, J = 7,2 Hz), 3,26 (dd, 2 H, J = 6,6, 8,4 Hz), 7,21 (tt, 1 H, J = 1,5, 6,9 Hz), 7,31-7,42 (m, 6 H), 7,77 (d, 2 H, J = 9,3 Hz), 8,08 (s ancho, 1 H), 10,69 (s ancho, 1 H).

RMN de <sup>13</sup>C (75,46 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 34,8 (t), 35,9 (t), 126,7 (d), 127,9 (d), 2 X 129,6 (d), 2 X 129,7 (d), 2 X 129,9 (d), 131,3 (s), 137,3 (s), 145,0 (s).

Análisis Elemental; Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>NS x 0,1 H<sub>2</sub>O: % C = 75,31, % H = 7,14, % N = 5,17. Encontrado: % C = 75,2 ± 0,1, % H = 7,41 ± 0,07, % N = 5,17 ± 0,01.

***N*-Hidroxi-4-(2-bencenosulfonil)-etil benzamida (73)****Etapa 1: Ácido 4-(2-bencenosulfonil)-etil benzoico (72)**

En atmósfera de nitrógeno en un matraz de fondo redondo de 100 ml que contenía ácido 4-(2-tiofenil)-etil benzoico (69) (600 mg, 2,32 mmoles) en 20 ml de diclorometano (0,1 M) a 0 °C se le añadió en porciones ácido 3-cloroperbenzoico (Aldrich Chemical Co., sólido puro al 57-86%, 2 g, 6,97 mmoles), como se describe por Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., 114: 8897 (1992). Se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Se añadió sulfuro de dimetilo (5 ml), la mezcla se diluyó en diclorometano y se lavó 3 veces con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó al vacío dando 3 g de sólido blanco. Esta mezcla de ácido 3-clorobenzoico y el ácido 4-(2-bencenosulfonil)-etil benzoico deseado se puso en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, disuelto en 30 ml de diclorometano y se trató con un exceso de solución recién preparada de diazometano en éter dietílico (0,35 M). Se burbujeó nitrógeno para retirar el exceso de diazometano y los disolventes se evaporaron al vacío. El sólido resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con 20% acetato de etilo : 80% hexano dando 341,6 mg (48%) del éster correspondiente. La saponificación de este éster se realizó usando el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 1, etapa 2, dando 312,4 mg (96%) de ácido 4-(2-bencenosulfonil)-etil benzoico (72) RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3,06-3,11 (m, 2 H), 3,56-3,61 (m, 2 H), 7,37 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,67 (tt, 2 H, J = 1,5, 7,2 Hz), 7,76 (tt, 1H, J = 1,2, 7,5 Hz), 7,93 (d, 2 H, J = 8,7 Hz), 7,97 (dd, 2 H, J = 1,8, 6,9 Hz).

**Etapa 2: *N*-Hidroxi-4-(2-bencenosulfonil)-etil benzamida (73)**

Siguiendo el procedimiento descrito para *N*-hidroxi-4-(2-tiofenil)-etil benzamida, pero sustituyendo el ácido 4-(2-bencenosulfonil)-etil benzoico por ácido 4-(2-tiofenil)-etil benzoico, se obtuvo el compuesto del título en forma de un sólido de color beige. RP-HPLC (Hewlett-Packard 1100, columna C18 HP 4,6 x 250 mm, flujo 1 ml/min, CH<sub>3</sub>CN al 10-95% / H<sub>2</sub>O en 42 min con TFA al 0,1%); Pureza: 98,8% (220 nm), 97,6% (254 nm).

RMN de <sup>1</sup>H (300,072 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 2,98 (t, 2 H, J = 7,2 Hz), 3,26 (dd, 2 H, J = 6,6, 8,4 Hz), 7,21 (tt, 1 H, J = 1,5, 6,9 Hz), 7,31-7,42 (m, 6 H), 7,77 (d, 2 H, J = 9,3 Hz), 8,08 (s ancho, 1 H), 10,69 (s ancho, 1 H).

RMN de <sup>13</sup>C (75,46 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 25,2 (t), 34,3 (t), 55,6 (t), 128,0 (d), 2 X 128,8 (d), 129,4 (d), 2 X 130,2 (d), 131,1 (s), 134,5 (d), 140,7 (s), 145,5 (s), 165,8 (s).

***N*-Hidroxi-4-(2-bencenosulfóxido)-etil benzamida (71)**

De acuerdo con el procedimiento descrito por Van Der Borgh et al., J. Org. Chem., 65: 288 (2000), en una atmósfera de nitrógeno en un matraz de fondo redondo de 10 ml que contenía *N*-hidroxi-4-(2-tiofenil)-etil benzamida (70) (50 mg, 0,18 mmol) en 2 ml de metanol (0,1 M) se añadió dióxido de teluro (3 mg, 0,018 mmol) seguido de una solución al 35% en agua de peróxido de hidrógeno (32 ml, 0,36 mmol). La mezcla se agitó durante cinco días y después se añadió salmuera. La fase acuosa se extrajo 3 veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se evaporó al vacío. El sólido resultante (43,3 mg) se purificó por trituración usando acetonitrilo, dando 10 mg (20%) de un sólido de color beige.

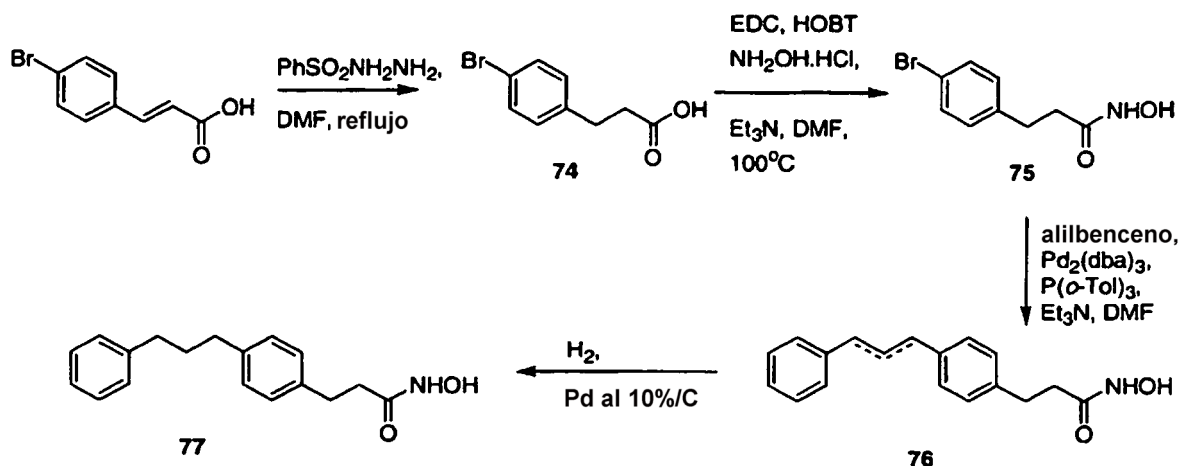
RP-HPLC (Hewlett-Packard 1100, columna C18 HP 4,6 x 250 mm, flujo 1 ml/min, CH<sub>3</sub>CN al 10-95% / H<sub>2</sub>O en 42 min con TFA al 0,1%); Pureza: 98,8% (220 nm), 97,9% (254 nm).

RMN de  $^1\text{H}$  (300,072 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  2,76-2,91 (m, 1 H), 3,00-3,29 (m, 3 H), 7,34 (d, 2 H,  $J = 8,4$  Hz), 7,55-7,62 (m, 3 H), 7,70 (dd, 2 H,  $J = 1,5, 8,1$  Hz), 7,76 (d, 2 H,  $J = 8,1$  Hz), 8,08 (s ancho, 1 H), 10,70 (s ancho, 1 H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  28,3 (t), 57,8 (t), 2 X 124,8 (d), 128,0 (d), 2 X 129,6 (d), 2 X 130,0 (d), 131,5 (d), 144,1 (s), 145,7 (s).

## 5 Ejemplo 29

### ***N*-Hidroxi-3-[4-(3-fenilpropil)-fenil]-propanamida (77)**



#### Etapa 1: Ácido 3-(4-bromofenil)-propanoico (74)

10 En atmósfera de nitrógeno, en un matraz de fondo redondo de 250 ml, que contenía ácido 4-bromocinnámico (5,0 g, 22 mmoles) en 45 ml de *N,N*-dimetilformamida (0,5 M) se añadió bencenosulfonilhidrazida (7,6 g, 44 mmoles). La mezcla se agitó a reflujo durante 12 horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se añadió solución acuosa saturada cloruro de amonio y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo 3 veces. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El sólido resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con 5% metanol : 95% diclorometano dando 3,66 g (73%) de un sólido de color beige.

15 RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,66 (t, 2 H,  $J = 7,5$  Hz), 2,91 (d, 2 H,  $J = 7,5$  Hz), 7,08 (d, 2 H,  $J = 8,4$  Hz), 7,41 (d, 2 H,  $J = 8,4$  Hz).

#### Etapa 2: *N*-Hidroxi-3-(4-bromofenil)-propanamida (75)

20 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito para la preparación de 70, se obtuvieron 1,54 g (39%) del compuesto del título.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,39 (t, 2 H,  $J = 7,8$  Hz), 2,89 (d, 2 H,  $J = 7,2$  Hz), 7,18 (d, 2 H,  $J = 8,1$  Hz), 7,42 (d, 2 H,  $J = 8,7$  Hz), 8,18 (s ancho, 1 H), 9,98 (s ancho, 1 H).

#### Etapa 3: *N*-Hidroxi-3-[4-(3-fenil-1-propenil)-fenil]-propanamida y *N*-Hidroxi-3-[4-(3-fenil-2-propenil)-fenil]-propanamida (76)

25 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 25, etapa 1, pero sustituyendo ácido 4-bromobenzoico por *N*-hidroxi-3-(4-bromofenil)-propanamida (75) (250 mg, 1,02 mmol) y 4-fenil-1-buteno (163 ml, 1,2 mmol) por alil benceno, produciendo 155,4 mg (54%) de los compuestos del título mezclados.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,39 (m, 2 H), 2,88 (t, 2 H,  $J = 8,4$  Hz), 3,51 (t, 2 H,  $J = 8,1$  Hz), 6,32-6,53 (m, 2 H), 7,14-7,44 (m, 9 H), 8,60 (s ancho, 1 H), 10,04 (s ancho, 1 H).

#### Etapa 4: *N*-Hidroxi-3[4-(3-fenilpropil)-fenil]-propanamida (77)

30 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 24, etapa 2, pero sustituyendo las olefinas 54 (155 mg, 0,55 mmol) por la mezcla de *N*-hidroxi-3-[4-(3-fenil-1-propenil)-fenil]-propanamida y *N*-hidroxi-3-[4-(3-fenil-2-propenil)-fenil]-propanamida, se obtuvieron 155,4 mg (99%) del compuesto del título.

35 RP-HPLC: (Hewlett-Packard 1100, columna C18 HP 4,6 x 250 mm, flujo 1 ml/min,  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 10-95% /  $\text{H}_2\text{O}$  en 42 min con TFA al 0,1%); Pureza: 99,9% (220 nm) (2 picos pero el mismo compuesto, probado por CLEM, 99,9% (254 nm).

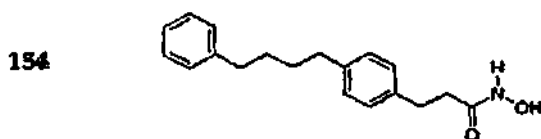
RMN de  $^1\text{H}$  (300,072 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  1,91 (quintuplete, 2 H,  $J = 8,1$  Hz), 2,38 (t, 2 H,  $J = 7,8$  Hz), 2,61 (c, 4 H,  $J = 9,6$  Hz), 2,87 (t, 2 H,  $J = 7,2$  Hz), 7,12-7,29 (m, 9 H), 8,42 (s ancho, 1 H), 10,01 (s ancho, 1 H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  26,3 (t), 28,7 (t), 29,8 (t), 30,3 (t), 30,7 (t), 121,1 (d), 3 X 123,7 (d), 3 X 123,8 (d), 133,9 (s), 133,4 (s), 137,8 (s), 164,9 (s).

- 5 Análisis Elemental; Calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N} \times 0,1 \text{ H}_2\text{O}$ : % C = 75,81, % H = 7,49, % N = 4,91. Encontrado: % C = 75,7  $\pm$  0,3, % H = 7,54  $\pm$  0,02, % N = 4,85  $\pm$  0,03.

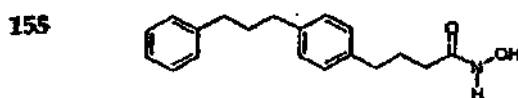
### Ejemplo 36:

Los siguientes compuestos adicionales se prepararon por procedimientos análogos a aquellos descritos en los Ejemplos anteriores:

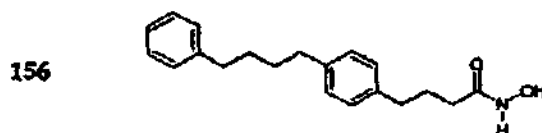


RMN de  $^1\text{H}$  (300,072 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  1,63 (m, 4 H,  $J = 45$  Hz), 2,37 (t, 2 H,  $J = 7,8$  Hz), 2,57-2,66 (m, 4 H), 2,86 (t, 2 H,  $J = 7,5$  Hz), 7,10-7,28 (m, 9 H), 8,01 (s ancho, 1 H), 9,98 (s ancho, 1 H).

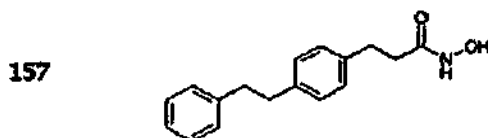
RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  31,0 (t), 2 X 3L9 (t), 35,1 (t), 35,8 (t), 36,2 (t), 126-4 (d), 2 X 129,0 (d), 2 X 129,1 (d), 2 X 129,1 (d), 129,2 (d), 138,8 (s), 141,2 (s), 143,4 (s), 164,1 (s).



RMN de  $^1\text{H}$  (300,072 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  1,83-1,98 (m, 4 H), 2,08-2,14 (m, 2 H), 2,56-2,67 (m, 6 H), 7,12-7,30 (m, 9 H), 9,98 (s ancho, 1 H).

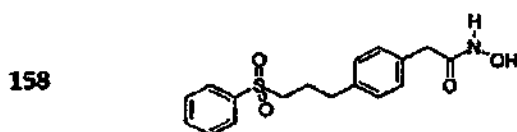


RMN de  $^1\text{H}$  (300,072 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  1,60-1,68 (m, 4 H), 1,87 (quintuplete, 2 H,  $J = 7,5$  Hz), 2,03-2,14 (m, 2 H), 2,55-2,67 (m, 6 H), 7,09-7,28 (m, 9 H).



RMN de  $^1\text{H}$  (300,072 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  2,37 (t, 2M,  $J = 7,2$  Hz), 2,78-2,89 (m, 6 H), 7,13-7,29 (m, 9 H), 7,84 (s ancho, 1 H), 9,90 (s ancho, 1 H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  31,6 (t), 35,1(t), 38,2 (t), 38,6 (t), 2 X 126,6 (d), 2 X 129,1 (d), 2 X 129,2 (d), 2 X 129,3 (d), 139,4 (s), 140,4 (s), 142,8 (s), 170,1 (s).



RMN de  $^1\text{H}$  (300,072 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  1,96 (quintuplete, 2 H,  $J = 6,0$  Hz), 2,69 (t, 2 H,  $J = 8,0$  Hz), 3,19 (dd, 2 H,  $J = 6,0, 9,0$  Hz), 3,38 (s, 2 H), 7,09 (d, 2 H,  $J = 7,5$  Hz), 7,21 (d, 2 H,  $J = 7,5$  Hz), 7,66 (t, 2 H,  $J = 8,1$  Hz), 7,747 (t, 1 H,

J = 6,9 Hz), 7,90 (d, 2 H, J 6,6 Hz), 10,08 (s ancho, 1 H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  25,5 (t), 34,1 (t), 39,9 (t), 55,7 (t), 2 X 128,8 (d), 130,0 (d), 2 X 130,2 (d), 134,4 (s), 139,9 (s), 140,7 (s), 168,5 (s).

#### Ejemplo 40:

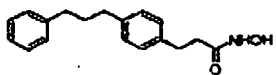
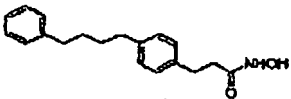

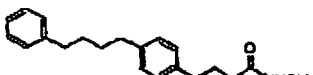
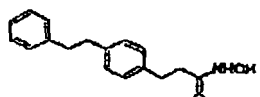
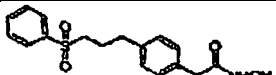
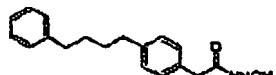
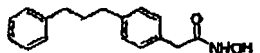
#### 5 Inhibición de la actividad enzimática de histona desacetilasa

Los inhibidores de HDAC se seleccionaron frente a la enzima histona desacetilasa en extractos nucleares preparados a partir de la línea cancerosa de células microcíticas pulmonares humanas H446 (ATTC HTB-171) y frente a una enzima HDAC-1 humana recombinante clonada, expresada y purificada a partir de un sistema de expresión de células de insecto de Baculovirus.

10 Para ensayos de desacetilasa, se incubaron 20.000 cpm del sustrato de histona acetilada marcada metabólicamente con  $^3\text{H}$  (M. Yoshida et al., J. Biol. Chem. 265(28):17174-17179 (1990)) con 30 mg de extracto nuclear H446 o una cantidad equivalente del HDAC-1 recombinante clonado durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético (0,04 M, concentración final) y HCl (250 mM, concentración final). La mezcla se extrajo con acetato de etilo y el ácido [ $^3\text{H}$ ]-acético liberado se cuantificó mediante recuento por centelleo. Para estudios de  
15 inhibición, la enzima se pre-incubó con compuestos a 4 °C durante 30 minutos antes de iniciar el ensayo enzimático. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  para los inhibidores de enzima HDAC se determinaron realizando curvas de dosis a respuesta con compuestos individuales, y determinando la concentración de inhibidor que produce un cincuenta por ciento de la inhibición máxima.

20 Los datos representativos se presentan en la Tabla 4. En la primera columna se muestran los valores de  $\text{CI}_{50}$  determinados frente a histona desacetilasa en extractos nucleares de células H446 (HDAC combinada). En la segunda columna se presentan los valores de  $\text{CI}_{50}$  determinados frente a la enzima HDAC-1 humana recombinante (HDAC-1r). Para compuestos menos activos, los datos se expresan como el porcentaje de inhibición a la concentración especificada.

Tabla 4: Inhibición de Histona Desacetilasa

Ejemplo	Compuesto	Estructura	$\text{CI}_{50}$ de HDAC combinada ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CI}_{50}$ de HDAC-1r ( $\mu\text{M}$ )
Ej. 29	77		3	0,65
Ej. 36	154		2	0,9
Ej. 36	155		39% a 20 $\mu\text{M}$	
Ej. 36	156		5	0,73
Ej. 36	157		6	2-4
Ej. 36	158		>209	
	174		>20	
	175		>20	



**Ejemplo 41:****Inhibición de Histona Desacetilasa en Células Completas****1. Acetilación de histona H4 en células completas por inmunotransferencias**

5 Se incubaron células cancerosas de vejiga humana T24, que crecían en un cultivo, con inhibidores de HDAC durante 16 horas. Las histonas se extrajeron de las células después del periodo de cultivo, como se describe por M. Yoshida et al. (J. Biol. Chem. 265(28): 17174-17179 (1990)). Se cargaron 20 mg de proteína histona total en SDS/PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se sondaron con anticuerpos policlonales específicos para acetilada histona H-4 (Bitotech Inc. anterior), seguido de anticuerpos secundarios conjugados de peroxidasa de rábano rusticano (Sigma). La detección de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham) se realizó usando películas Kodak (Eastman Kodak). La señal de H-4 acetilada se cuantificó por densitometría.

**2. Análisis con gel de Ácido Urea Triton (AUT) de acetilación de histona.**

15 Se incubaron células cancerosas humanas (T24, 293T o células Jurkat), que crecían en un cultivo, con inhibidores de HDAC durante 24 h. Las histonas se extraen de las células como se describe por M. Yoshida et al. (J. Biol. Chem. 265(28): 17174-17179 (1990)). Se usa electroforesis con gel de ácido urea triton (AUT) para la detección de moléculas de histona acetiladas. Las histonas (150 mg de proteína total) se someten a electroforesis a 80 V durante 16 h, a temperatura ambiente, como se describe por M. Yoshida et al., *supra*. Los geles se tiñen con azul brillante de Coomassie para visualizar las histonas, se secan y se exploran por densitometría para cuantificar la acetilación de las histonas.

**Ejemplo 42:****20 Efecto Antineoplásico de los Inhibidores de Histona Desacetilasa sobre Células Tumorales *In Vivo***

A ratones BALB/c hembra, atímicos, de ocho a diez semanas de edad (Taconic Labs, Great Barrington, NY) se les inyecta por vía subcutánea en el área del costado con  $2 \times 10^6$  células de carcinoma pulmonar humano A549 preacondicionadas. El preacondicionamiento de estas células se realiza con un mínimo de tres trasplantes de tumor consecutivos en la misma cepa de los ratones sin pelo. Posteriormente, se escinden fragmentos de tumor de aproximadamente 30 mg y se implantan por vía subcutánea en ratones, en el área del costado izquierdo, bajo anestesia Forene (Abbott Labs, Geneve, Suiza). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se trataron por vía intravenosa, por vía subcutánea, o por vía intraperitoneal mediante inyección diaria, con una solución del inhibidor de histona desacetilasa en un vehículo apropiado, tal como PBS, DMSO/agua, o Tween 80/agua, a una dosis inicial de 10 mg/kg. La dosis óptima del inhibidor de HDAC se establece mediante experimentos de respuesta a dosis, de acuerdo con protocolos convencionales. El volumen del tumor se calcula cada segundo día después de la infusión, de acuerdo con procedimientos convencionales (por ejemplo, Meyer et al., Int. J. Cancer 43: 851-856 (1989)). El tratamiento con los inhibidores de HDAC de acuerdo con la invención provoca una reducción significativa en el peso y volumen del tumor respecto a los controles tratados solo con solución salina (es decir, sin inhibidor de HDAC). Además, se espera que la actividad de histona desacetilasa, cuando se mide, se reduzca significativamente respecto a los controles tratados con solución salina.

**Ejemplo 43:****Efecto Antineoplásico Sinérgico de los Inhibidores de Histona Desacetilasa y Oligonucleótidos Antisentido de Histona Desacetilasa sobre las Células Tumorales *In Vivo***

40 El fin de este ejemplo es ilustrar la capacidad del inhibidor de histona desacetilasa de la invención y un oligonucleótido antisentido de histona desacetilasa para inhibir sinérgicamente el crecimiento tumoral en un mamífero. Preferentemente, el oligonucleótido antisentido y el inhibidor de HDAC inhiben la expresión y la actividad de la propia histona desacetilasa.

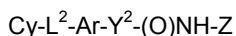
45 Como se ha descrito en el Ejemplo 10, los ratones que llevaban tumores A549 implantados (volumen medio  $100 \text{ mm}^3$ ) se tratan diariamente con preparaciones salinas que contienen de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal de oligonucleótido antisentido de histona desacetilasa. Un segundo grupo de ratones se trata diariamente con preparaciones farmacéuticamente aceptables que contienen de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 mg por kg peso corporal de inhibidor de HDAC.

50 Algunos ratones recibieron tanto el oligonucleótido antisentido como el inhibidor de HDAC. De estos ratones, un grupo puede recibir el oligonucleótido antisentido y el inhibidor de HDAC simultáneamente por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Otro grupo puede recibir el oligonucleótido antisentido a través de la vena de la cola, y el inhibidor de HDAC por vía subcutánea. Otro grupo más puede recibir tanto el oligonucleótido antisentido como el inhibidor de HDAC por vía subcutánea. Se establecen análogamente grupos de ratones de control, que no reciben tratamiento (por ejemplo, solo solución salina), un oligonucleótido antisentido desapareado únicamente, un compuesto de control que no inhibe la actividad de la histona desacetilasa, y un oligonucleótido antisentido desapareado con un compuesto de control.

El volumen del tumor se mide con calibres. El tratamiento con el oligonucleótido antisentido más el inhibidor de la proteína histona desacetilasa de acuerdo con la invención causa una reducción significativa en el peso y el volumen del tumor respecto a los controles.

## REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de histona desacetilasa representado por la fórmula



en la que

5 Cy es cicloalquilo, arilo, heteroarilo, o heterociclilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con entre uno y cuatro sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcoxicarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, y en el que dicho arilo, heterociclilo y heteroarilo también puede estar  
10 opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_8$ ) amino, di-alquil ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) amino, alcano ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) acilamino y areno ( $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ ) acilamino, y en el que dicho cicloalquilo y heterociclilo pueden estar también opcionalmente sustituidos con oxo, y en el que dicho heterociclilo puede estar también opcionalmente independientemente sustituido en el nitrógeno con un grupo seleccionado entre alquilsulfonilo, arilcarbonilo, arilsulfonilo y aralcoxicarbonilo, con la condición de que Cy no sea un (espirocicloalquil)heterociclilo;

15  $\text{L}^2$  es alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$  saturado o alquenileno  $\text{C}_2\text{-C}_8$ , pudiendo estar el alquilenilo o alquenileno opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcoxicarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido con la condición de que  $\text{L}^2$  no sea  $\text{-C(O)-}$ , y en el que uno de los átomos de carbono del alquilenilo puede estar reemplazado opcionalmente por un resto heteroatómico seleccionado entre el  
20 grupo constituido por S; o S(O): o  $\text{L}^2$  es  $\text{S(O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{1-4}$ :

Ar es arileno, pudiendo estar dicho arileno opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo, o con un anillo de cicloalquilo o heterocíclico saturado o insaturado; y

$\text{Y}^2$  es un alquilenilo saturado de cadena lineal o ramificada; y

25 Z se selecciona entre el grupo constituido por anilino, piridilo, tiadiazolilo, y  $\text{-O-M}$ , siendo M H o un catión farmacéuticamente aceptable, pudiendo estar tiadiazolilo opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo constituido por tiol, trifluorometilo, amino y sulfonamido;

con la condición de que cuando el átomo de carbono al que está fijado Cy está sustituido con oxo, entonces Cy y Z no sean ambos piridilo.

30 2. El inhibidor de la reivindicación 1, en el que  $\text{L}^2$  es alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_8$  saturado o alquenileno  $\text{C}_2\text{-C}_8$ , en el que el alquilenilo o alquenileno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcoxicarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido con la condición de que  $\text{L}^2$  no sea  $\text{-C(O)-}$ , y en el que uno de los átomos de carbono del alquilenilo puede estar opcionalmente reemplazado por un resto heteroatómico seleccionado entre el grupo constituido por S; o S(O).  
35

3. El inhibidor de la reivindicación 1 ó 2, en el que  $\text{Y}^2$  es alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ .

4. El inhibidor de la reivindicación 1 ó 2, en el que  $\text{Y}^2$  es alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ .

5. El inhibidor de la reivindicación 1 ó 2, en el que  $\text{Y}^2$  es alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_2$ .

40 6. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que uno o dos carbonos saturados en  $\text{L}^2$  están sustituidos con un sustituyente seleccionado independientemente entre el grupo constituido por alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ , amino, oxo, hidroxilo, alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_4$ , y ariloxi  $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ .

7. Los inhibidores de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en los que ningún átomo de carbono del alquilenilo  $\text{L}^2$  está reemplazado por un resto heteroatómico.

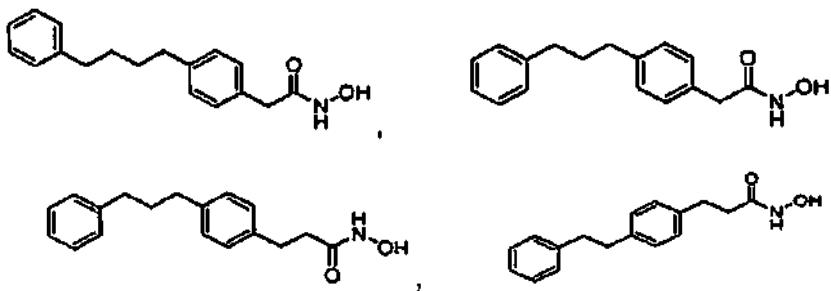
45 8. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un átomo de carbono del alquilenilo  $\text{L}^2$  está reemplazado por un resto heteroatómico seleccionado entre el grupo constituido por S; o S(O).

9. El inhibidor de la reivindicación 1, en el que  $\text{L}^2$  se selecciona entre el grupo constituido por  $\text{-S-(CH}_2\text{)-}$ ,  $\text{-S(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ , y  $\text{-S(O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ , en los que n es 1, 2, 3 ó 4.

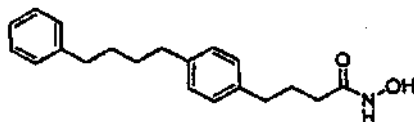
10. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que  $\text{L}^2$  es alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  saturado.

11. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que  $\text{L}^2$  es alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$  saturado.

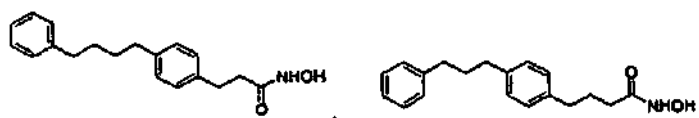
- 5 12. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que  $L^2$  es alquileo  $C_1-C_6$  saturado sustituido con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, con la condición de que  $L^2$  no sea  $-C(O)-$ .
- 10 13. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que  $L^2$  es alquileo  $C_1-C_4$  saturado sustituido con un grupo seleccionado entre oxo, halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido, con la condición de que  $L^2$  no sea  $-C(O)-$ .
14. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que Z se selecciona entre el grupo constituido por 2-anilino, 2-piridilo, 1,3,4-tiadiazol-2-ilo, y  $-O-M$ , siendo M H o un catión farmacéuticamente aceptable.
15. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que Z es  $-O-M$ , siendo M hidrógeno o cualquier catión farmacéuticamente aceptable.
- 15 16. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que Z es  $-O-M$ , siendo M hidrógeno.
17. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que Ar es fenileno no sustituido, que puede estar opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo, o con un anillo de cicloalquilo o heterocíclico saturado o parcialmente insaturado.
18. El inhibidor de la reivindicación 17, en el que el fenileno es 4-fenileno.
- 20 19. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que Cy se selecciona entre el grupo constituido por fenilo, naftilo, tienilo, benzotienilo, y quinolilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
20. El inhibidor de la reivindicación 19, en el que el fenilo, naftilo, tienilo, benzotienilo, o quinolilo no está sustituido o está sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo constituido por alquilo  $C_1-C_4$ , haloalquilo  $C_1-C_4$ , arilo  $C_6-C_{10}$ , ar( $C_6-C_{10}$ )alquilo ( $C_1-C_6$ ), halo, nitro, hidroxilo, alcoxi  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$  carbonilo, carboxi, y amino.
- 25 21. El inhibidor de la reivindicación 19, en el que Cy es fenilo no sustituido.
22. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 seleccionado entre el grupo constituido por

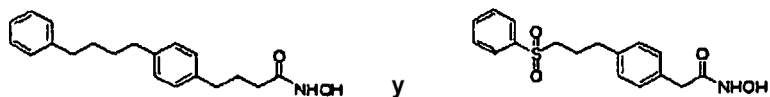


30 y

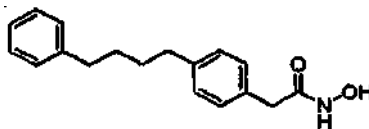


23. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo constituido por

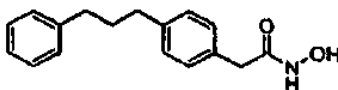




24. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 22 que tiene la estructura

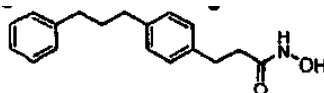


25. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 22 que tiene la estructura

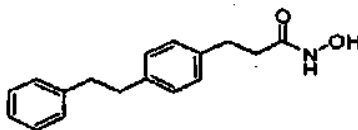


5

26. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 22 que tiene la estructura

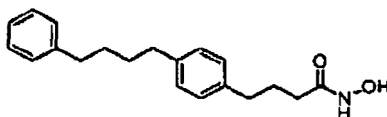


27. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 22 que tiene la estructura



10

28. El inhibidor de acuerdo con la reivindicación 22 que tiene la estructura



29. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de histona desacetilasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un vehículo, excipiente, o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 30. Un inhibidor de histona desacetilasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para su uso en la inhibición de histona desacetilasa en una célula.

31. El inhibidor de la reivindicación 30, en el que la célula es una célula neoplásica.

32. El inhibidor de la reivindicación 31, en el que la célula neoplásica está en un animal.

33. El inhibidor de la reivindicación 32, en el que la célula neoplásica está en un crecimiento neoplásico.

20 34. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, para su uso con un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de una histona desacetilasa.

35. El inhibidor de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, para su uso en la inhibición de la proliferación celular.

36. El inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o infección fúngica.

25 37. Uso de un inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación celular.

38. Uso de un inhibidor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o infección fúngica.