

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 705**

51 Int. Cl.:
C07D 207/34 (2006.01)
C07D 207/42 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05850516 .5**
96 Fecha de presentación: **27.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1975158**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **NUEVOS DERIVADOS PIRRÓLICOS CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE DESACETILASAS DE HISTONAS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO-EUSKAL
HERRIKO UNIBERSITATEA
BARRIO SARRIENA, S/N
48940 LEIOA (VIZCAYA), ES y
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
ONCOLOGICAS (CNIO)**

72 Inventor/es:
**COSSIO MORA, Fernando, Pedro;
ESTELLER BADOSA, Manel;
ZUBIA OLASCOAGA, Aizpea y
OTAEGUI ANSA, Dorleta**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 369 705 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

Nuevos derivados pirrólicos con actividad inhibitoria de desacetilasas de histonas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a nuevos compuestos derivados de pirroles, con procedimientos para su preparación y con el uso de los mismos como fármacos para el tratamiento del cáncer en composiciones farmacéuticas gracias a la actividad inhibitoria de los mismos sobre ciertas desacetilasas de histonas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La síntesis química de anillos de pirrol tri y tetrasustituidos puede llevarse a cabo de diversos modos utilizando metodologías de síntesis lineal o convergente (Sundberg, en *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Katrizki, A. y Rees, C. W. Eds.; Pergamon: Oxford, 1984; Vol. 4, p. 313). Una vía preparativa suficientemente general consiste en la aromatización de pirrolidinas sustituidas (Fejes y colab. *Tetrahedron* 2000, 56, 8545. Gupta y colab. *Synth. Commun.* 1998, 28, 3151). Estos últimos heterociclos pueden a su vez ser preparados en forma convergente mediante la cicloadición entre alquenos e iluros de azometino (Ayerbe y colab. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 1795. Vivanco y colab. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 6078). También son conocidas las reacciones de acoplamiento de derivados de ácidos carboxílicos con hidroxilamina para dar lugar a la formación de ácidos hidroxámicos (Reddy y colab. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 6285) y las reacciones entre aminas sustituidas y derivados de fosgeno y tiofosgeno para dar lugar, a través de la formación de isocianatos y tioisocianatos intermedios, a las N-hidroxiureas, N-hidroxitioureas, N-(alquil)aminoureas y N-(alquil)aminotioureas correspondientes (Jain y colab. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 4223).

Por otro lado, es sabido que los inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACs) constituyen una prometedora vía para el tratamiento del cáncer, mediante el bloqueo de ciertos mecanismos del crecimiento tumoral (McLaughlin y colab. *Biochem. Pharm.* 2004, 68, 1139. Krämer y colab. *Trends Endocrin. Met.* 2001, 12, 294. Archer y colab. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999, 9, 171). Aunque los mecanismos detallados de la acción terapéutica de los citados inhibidores no son bien conocidos, existe un consenso general en que la inhibición de los centros activos de la HDACs facilita el acceso de ciertos genes a factores transcripcionales mediante la acetilación de histonas localizadas en ciertas regiones del ADN que codifican proteínas de control del ciclo celular tales como la quinasa dependiente de ciclina p21 (Archer y colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 6791). Otra ventaja de esta diana terapéutica es que se estima que tan sólo alrededor del 2 % de la transcripción de ADN a ARNm está modulada por inhibidores de HDACs (McLaughlin y colab. *Biochem. Pharm.* 2004, 68, 1139), lo que debe repercutir en la baja toxicidad de estos inhibidores, que ha sido observada en ensayos clínicos (Van Lint y colab. *Gen. Express* 1996, 5, 245. Glaser y colab. *Mol. Cancer Ther.* 2003, 2, 151). Asimismo, se estima que la utilidad clínica de los inhibidores de HDACs puede aumentar al combinarse de forma sinérgica con otros tratamientos al mejorar el perfil transcripcional de genes que dificultan el desarrollo de resistencias (Keen y colab. *Cancer Res. Treat.* 2003, 81, 177. Egger y colab. *Nature* 2004, 429, 457).

Se conocen diversas familias de inhibidores de HDACs, cuyas características generales pueden encontrarse en diversas revisiones (Villar-Garea y Esteller *Int. J. Cancer* 2004, 112, 171 y *Curr. Drug Metab.* 2003, 4, 11. Grozinger y colab. *Chem. Biol.* 2002, 9, 3. McLaughlin y colab. *Drug Discov. Today* 2003, 8, 793. Monneret *Eur. J. Med. Chem.* 2005, 40, 1, Biel y colab. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3186). En líneas generales, las estructuras de los inhibidores más activos se caracterizan por constar de una parte cíclica o policíclica de naturaleza predominantemente hidrofóbica unida mediante una cadena carbonada espaciadora a una unidad capaz de coordinarse al ión metálico del centro activo de la HDAC. En particular, se ha descrito la síntesis de 3-(4-aroil-1-metil-1H-2-pirrolil)-N-hidroxi-2-propenamidas como inhibidores de HDAC (cf. Mai y colab. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1098). En este caso, la cadena espaciadora es insaturada y las posiciones 3 y 5 del anillo pirrólico no están sustituidas, resultando en una geometría molecular de carácter lineal.

Pese a la cantidad de inhibidores obtenidos sintéticamente, la utilidad terapéutica de los mismos no está exenta de problemas, entre los que cabe destacar la selectividad de inhibición de diferentes HDACs, algunas de las cuales no constituyen dianas terapéuticas útiles en oncología, la toxicidad, y la inestabilidad química. En este contexto, la presente invención describe un método general de síntesis de nuevos inhibidores de HDACs que incorpora la posibilidad de generar una amplia variedad de grupos funcionales, que resulta en moléculas químicamente estables y con diversos sistemas policíclicos, tamaños de espaciadores y unidades coordinantes al átomo metálico de los enzimas a inhibir.

El problema que plantea por tanto la presente invención es proporcionar compuestos y composiciones con una alta selectividad en la inhibición de diferentes HDACs relacionadas con la aparición y desarrollo de procesos neoplásicos, con alta estabilidad química y baja toxicidad. La solución propuesta comprende el uso de derivados pirrólicos de fórmula general I. Estos compuestos poseen sustituyentes de tipo arilo o heteroarilo en las posiciones 3 y 5, así como grupos electrón-atrayentes como el grupo nitro en la posición 4 y grupos heterogéneos en la posición 2 que comprenden espaciadores de diferente naturaleza y la utilización de grupos N-hidroxiurea, N-alquilamino(arilo)urea, N-hidroxitiourea y N-alquilamino(arilo)tiourea como coordinantes al átomo metálico de las

HDACs. Estos derivados pirrólicos demuestran una gran capacidad para inhibir la proliferación celular y el crecimiento tumoral.

5 En definitiva, la presente invención viene a solucionar la necesidad que existía de disponer de inhibidores de desacetilasas de histonas que presentaran ventajas como pueden ser las buenas propiedades farmacológicas, la estabilidad química en fase sólida y en disolución, la facilidad y eficiencia de la síntesis química de los mismos y la accesibilidad y variabilidad de los compuestos químicos de partida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La Figura 1 muestra el efecto determinado *in vitro* de algunos de los compuestos objeto de la presente invención sobre la actividad desacetilasa de histonas de la línea celular HCT116 (carcinoma de colon humano), comparado con los compuestos TSA (acrónimo de *tricostatin A*) y SAHA (acrónimo de *suberoylanilide hydroxamic acid*) utilizados como control positivo.

15 La Figura 2 muestra el efecto *in vitro* de ejemplos representativos de los compuestos objeto de la presente invención sobre la actividad desacetilasa de histonas de la línea celular MOLT4 (leucemia fibroblástica humana), comparado con los compuestos TSA y SAHA utilizados como control positivo.

20 La Figura 3 muestra la cuantificación del nivel de acetilación mediante HPCE (electroforesis capilar de alta eficacia) de las histonas H3 y H4 de la línea celular Jurkat de leucemia promielocítica humana tratadas con algunos de los compuestos objeto de la invención en una concentración 10µM.

25 La Figura 4 muestra la medida del porcentaje de células apoptóticas y necróticas en presencia de diversas concentraciones de SAHA y de dos de los inhibidores objeto de la presente invención. Se incluyen también los datos obtenidos en la muestra de control y en una muestra tratada con DMSO. Los datos expuestos corresponden al modelo de carcinoma de colon humano HCT116.

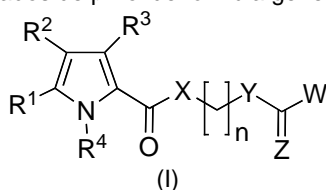
30 La Figura 5 muestra la medida del porcentaje de células apoptóticas y necróticas en presencia de diversas concentraciones de SAHA y de dos de los inhibidores objeto de la presente invención. Se incluyen también los datos obtenidos en la muestra de control y en una muestra tratada con DMSO. Los datos expuestos corresponden al modelo de leucemia mieloide aguda humana HL60.

35 La Figura 6 muestra la inhibición de crecimiento tumoral de carcinoma de colon humano HCT116 en ratones desnudos atímicos, provocada por la administración intraperitoneal de algunos de los compuestos objeto de la invención. Los xenoinjertos fueron efectuados por vía intraesplénica y los inhibidores fueron inyectados por vía intraperitoneal, según el procedimiento detallado en el ejemplo nº 18.

40 La Figura 7 muestra la actividad antitumoral *in vivo* en ratones desnudos atímicos de algunos de los compuestos objeto de la invención en el modelo de leucemia fibroblástica humana MOLT4. Los xenoinjertos fueron efectuados por vía intraesplénica según el procedimiento detallado en el ejemplo nº 17.

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención tiene por objeto los derivados de pirrol de fórmula general I:



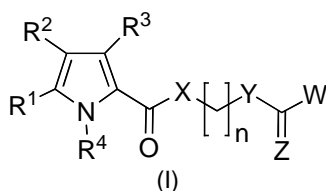
45 Asimismo, otro objeto de la presente invención son los procedimientos de preparación de dichos compuestos de fórmula general I.

50 Otro objeto adicional de la invención es el uso de estos derivados para el tratamiento de diversas formas de cáncer mediante la restricción del crecimiento tumoral a través de la inhibición de la acción de ciertas desacetilasas de histonas.

55 Por último, esta invención tiene por objeto la elaboración de una composición farmacéutica que pueda incluir algún derivado de pirrol de fórmula general I y al menos algún excipiente farmacéuticamente aceptable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En primer lugar, la presente invención proporciona unos compuestos derivados de pirrol que presentan la siguiente fórmula I:

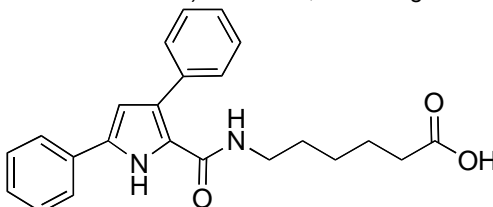


donde:

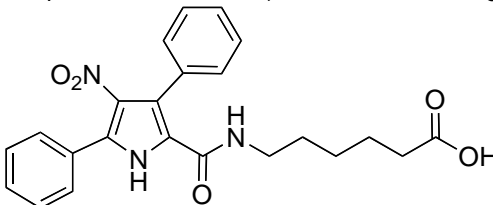
- 5 R^1 y R^3 representan independientemente entre si un radical fenilo; fenilo mono o polisustituido en las diferentes posiciones del anillo, en el que el sustituyente es un grupo metoxi; o un grupo heteroarilo C5-C10 que contiene al menos un heteroátomo de O, N o S;
- R^2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo electronatrayente como el grupo nitro; o un grupo amino o amido;
- 10 R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo C1-C6 alquilo lineal, ramificado o cíclico;
- (n) representa un número de grupos metileno comprendido entre 1 y 8, ambos inclusive;
- (X) representa indistintamente un grupo amino secundario, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;
- (Y) representa un grupo seleccionado entre metileno y amino secundario;
- (Z) representa indistintamente un átomo de oxígeno o de azufre; y
- 15 (W) representa un grupo seleccionado entre el hidroxilo, el hidroxiamino, el hidrazino y el alquil, aril o heteroaril-hidrazino.

En una realización preferida dichos compuestos de fórmula general I son:

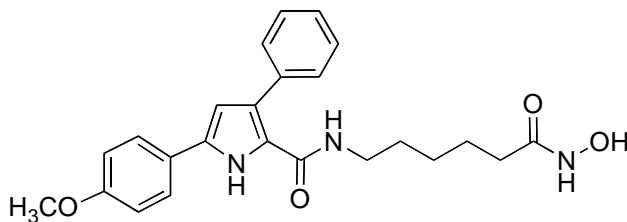
- Ácido 6-(3,5-difenil-1*H*-pirrol-2-carboxamido)hexanoico, con la siguiente fórmula estructural:



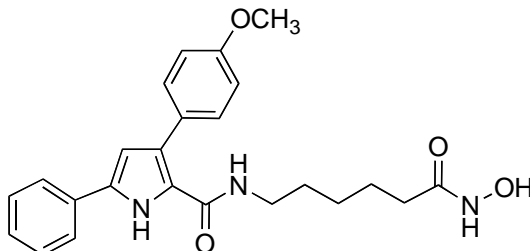
- 20 • Ácido 6-(4-nitro-3,5-difenil-1*H*-pirrol-2-carboxamido)hexanoico, con la siguiente fórmula estructural:



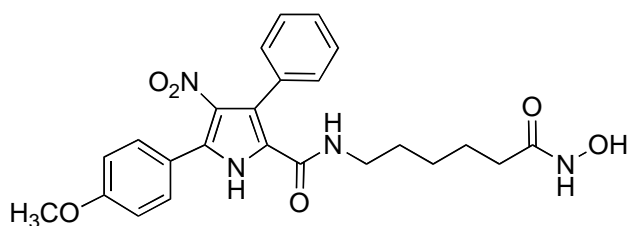
- *N*-(5-(Hidroxicarbamoil)pentil)-3-fenil-5-(4-metoxifenil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:



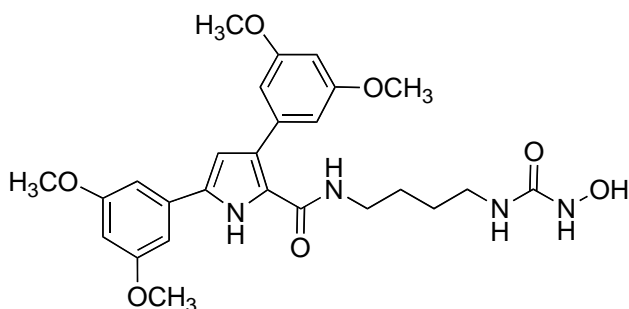
- 25 • *N*-(5-(Hidroxicarbamoil)pentil)-5-fenil-3-(4-metoxifenil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:



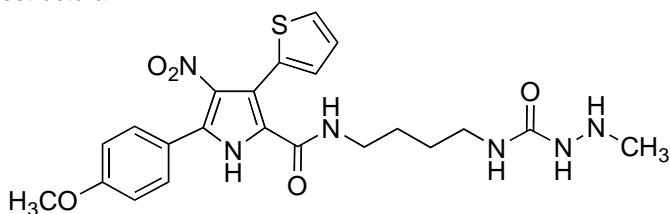
- 30 • *N*-(5-(Hidroxicarbamoil)pentil)-3-fenil-5-(4-metoxifenil)-4-nitro-1*H*-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:



- 1-(4-(3,5-bis(3,5-Dimetoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-hydroxiurea, con la siguiente fórmula estructural:



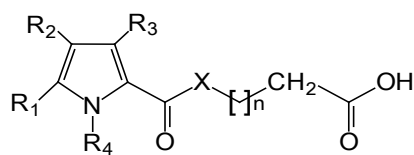
- 5 • 1-(4-(5-(4-Metoxifenil)-4-nitro-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-(2-metilamino)urea, con la siguiente fórmula estructural:



- 10 Otro aspecto de la invención hace referencia a diferentes procedimientos para obtener los compuestos de formula general I. Los siguientes métodos A a E describen los procedimientos para obtener compuestos de formula general (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) como veremos más adelante. Dichos compuestos (Ia) a (Id) son compuestos cuya formula general cae dentro de la formula general I.

Método A

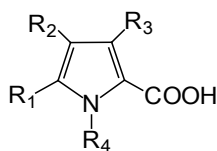
- 15 El método A representa un procedimiento para la preparación de compuestos de formula general (Ia):



(Ia)

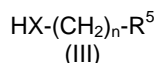
- 20 donde R₁, R₂, R₃, R₄, X y n tienen la significación dada anteriormente, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

- a) Un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



(II)

- b) Un compuesto de fórmula III,



(III)

donde R⁵ es un alcóxicarbonilo,

- c) Un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

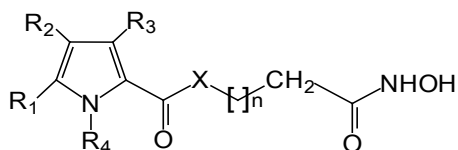
- d) Una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C₃-C₁₀ carbonos y las alcanoaromáticas con C₉-C₁₅ carbonos,

y hacer reaccionar el producto obtenido con una mezcla de hidróxido de litio o sodio, dimetoxietano y agua.

5 Para los fines de la invención, la mezcla de reacción formada por los cuatro compuestos de las fases a) a d) se puede realizar adicionando uno de los componentes a la mezcla previa de los otros tres en el disolvente orgánico y a la temperatura de $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente a temperaturas próximas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se deja un tiempo para completar la reacción, pudiendo alcanzar la temperatura ambiente. Una vez completada la reacción de acoplamiento, el éster obtenido tras seguir el procedimiento general se hace reaccionar con la mezcla de hidróxido de litio o sodio, dimetoxietano y agua rindiendo así, tras el tratamiento correspondiente, los compuestos de fórmula general (Ia).

10 **Método B**

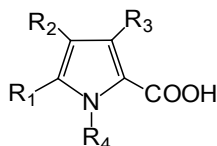
El método B representa un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Ib):



(Ib)

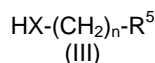
15 donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X y n tienen la significación dada anteriormente, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

a) Un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



(II)

20 b) Un compuesto de fórmula III,



(III)

donde R^5 es un alcóxicarbonilo,

c) Un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

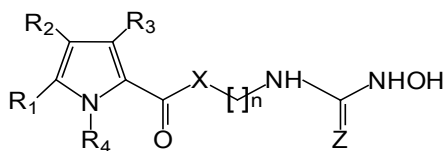
25 d) Una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos,

y adicionar el producto resultante sobre una mezcla de clorhidrato de hidroxilamina y fenoltaleína en presencia de un exceso de metóxido sódico en metanol.

30 Para los fines de la invención, la mezcla de reacción formada por los cuatro compuestos de las fases a) a d) se puede realizar adicionando uno de los componentes a la mezcla previa de los otros tres en el disolvente orgánico y a la temperatura de $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente a temperaturas próximas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se deja un tiempo para completar la reacción, pudiendo alcanzar la temperatura ambiente. Una vez completada la reacción de acoplamiento, el éster obtenido se adiciona sobre una mezcla de clorhidrato de hidroxilamina y fenoltaleína en presencia de un exceso de metóxido sódico en metanol. Una vez completada la reacción se obtienen, tras el tratamiento correspondiente, los compuestos de fórmula general (Ic).

Método C

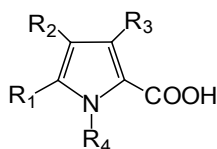
40 El método de C representa un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Ic):



(Ic)

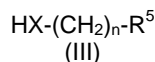
donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X , Z y n tienen la significación dada anteriormente, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

45 a) Un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



(II)

b) Un compuesto de fórmula III,



(III)

donde R⁵ es el terc-butoxicarbamoilo (NHBoc) o benciloxicarbamoilo (NHCBz),

c) Un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

d) Una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos,

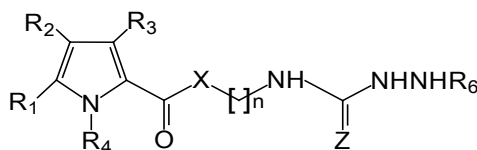
desproteger el producto obtenido mediante tratamiento ácido o hidrólisis y hacerlo reaccionar con fosgeno o sus análogos como el difosgeno, trifosgeno o tiosfosgeno, obteniéndose un isocianato o tioisocianato que es tratado con hidroxilamina.

Para los fines de la invención, la mezcla de reacción formada por los cuatro compuestos de las fases a) a d) se puede realizar adicionando uno de los componentes a la mezcla previa de los otros tres en un disolvente orgánico y a la temperatura de -85 °C a +25 °C, preferentemente a temperaturas próximas a 0 °C. Luego se deja un tiempo para completar la reacción, pudiendo alcanzar la temperatura ambiente. Dependiendo del significado de R₅ en el compuesto III, es decir, dependiendo de si R₅ representa terc-butoxicarbamoilo (NHBoc) o benciloxicarbamoilo (NHCBz), los tratamientos subsiguientes serán diferentes. En caso de que R₅ sea NHBoc el producto resultante debe ser sometido a un tratamiento ácido que consiste preferiblemente en la reacción a temperatura ambiente con ácido trifluoroacético en un disolvente halogenado. Cuando R₅ representa NHCBz el producto resultante es sometido a hidrogenolisis, preferiblemente mediante reacción con hidrógeno gaseoso o formiato amónico en el seno de un alcohol de cadena corta como disolvente y en presencia de un catalizador heterogéneo de paladio. En ambos casos, tras la desprotección se obtiene una amina primaria que es tratada con fosgeno o alguno de sus derivados como el difosgeno o el trifosgeno o también el tiosfosgeno. Cuando la reacción es con fosgeno, difosgeno o trifosgeno, el compuesto final (Ic) tendrá como significado de Z un átomo de oxígeno. Si por el contrario el tratamiento es con tiosfosgeno Z será un átomo de azufre.

Tras la reacción bien con el fosgeno (difosgeno, trifosgeno) o el tiosfosgeno se obtienen los correspondientes isocianatos o tioisocianatos que son tratados *in situ* con hidroxilamina obteniéndose los compuestos de fórmula (Ic).

Método D

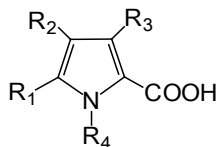
El método D representa un procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Id):



(Id)

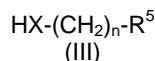
donde R₁, R₂, R₃, R₄, X, Z y n tienen la significación dada anteriormente y R₆ es un H, C1-C6 alquilo, arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros con 1 o más heteroátomos seleccionados entre O, N o S, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

a) Un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



(II)

b) Un compuesto de fórmula III,



(III)

donde R⁵ es terc-butoxicarbamoilo (NHBoc) o benciloxicarbamoilo (NHCBz),

c) Un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

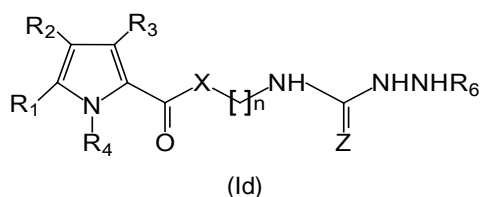
d) Una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos,

desproteger el producto obtenido mediante tratamiento ácido o hidrólisis y hacerlo reaccionar con fosgeno o sus análogos como el difosgeno, trifosgeno o tiofosgeno, obteniéndose un isocianato o tioisocianato que es tratado con hidracina o alquil, aril o heteroaril-hidrazinas.

- 5 Para los fines de la invención, la mezcla de reacción formada por los cuatro compuestos de las fases a) a d) se puede realizar adicionando uno de los componentes a la mezcla previa de los otros tres en un disolvente orgánico y a la temperatura de $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferentemente a temperaturas próximas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se deja un tiempo para completar la reacción, pudiendo alcanzar la temperatura ambiente. Dependiendo del significado de R_5 en el compuesto III, es decir, dependiendo de si R_5 representa terc-butoxicarbamoilo (NHBOc) o benciloxicarbamoilo (NHCBz), los tratamientos subsiguientes serán diferentes. En caso de que R_5 sea NHBOc el producto resultante debe ser sometido a un tratamiento ácido que consiste preferiblemente en la reacción a temperatura ambiente con ácido trifluoroacético en un disolvente halogenado. Cuando R_5 representa NHCBz el producto resultante es sometido a hidrogenolisis preferiblemente mediante reacción con hidrógeno gaseoso o formiato amónico en el seno de un alcohol de cadena corta como disolvente y en presencia de un catalizador heterogéneo de paladio. En ambos casos, tras la desprotección se obtiene una amina primaria que es tratada con fosgeno o alguno de sus derivados como el difosgeno o el trifosgeno o también el tiofosgeno. Cuando la reacción es con fosgeno, difosgeno o trifosgeno, el compuesto final (Ic) tendrá como significado de Z un átomo de oxígeno. Si por el contrario el tratamiento es con tiofosgeno Z será un átomo de azufre.
- 10
- 15
- 20 Tras la reacción bien con el fosgeno (difosgeno, trifosgeno) o el tiofosgeno se obtiene los correspondiente isocianatos o tioisocianatos que son tratados in situ con hidracinas o alquilhidracinas para dar lo compuestos de formula (Id).

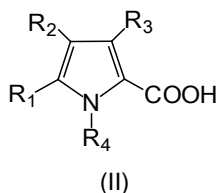
Método E

- 25 El método E representa un procedimiento adicional para la preparación de compuestos de formula general (Id):

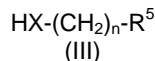


- 30 donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X, Z y n tienen la significación dada anteriormente y R_6 es un H, C1-C6 alquilo, arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros con 1 o más heteroátomos seleccionados entre O, N o S, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

- a) Un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



- 35 b) Un compuesto de fórmula III,



donde R^5 es 3-benciloxiureilo o 3-alquil, aril o heteroaril ureilo,

- 40 c) Un reactivo de activación del grupo carboxilo; y
d) Una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos,

- 45 Si la reacción de acoplamiento detallada anteriormente se lleva a cabo con N-benciloxiureas o tioureas, sólo es necesario liberar las N-hidroxiureas o tioureas correspondientes mediante hidrogenolisis en presencia de un catalizador metálico adecuado. En el caso de las N-alquil(aril,heteroaril)aminoureas o tioureas, si dichos radicales ya están introducidos en los precursores (III) correspondientes, la reacción de acoplamiento rinde directamente las moléculas finales esperadas.

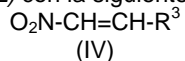
- 50 Como elemento común a los métodos A-E el reactivo de activación del grupo carboxilo es preferiblemente diclorofosfato de fenilo, el fosforocamidato de dietilo (DEPC) o el sistema formado por el 1-hidroxibenzotriazol y la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida.

- 55 A su vez es un reactivo común a los métodos A y B una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos. Preferiblemente esta amina terciaria se selecciona entre N-metil pirrolidina o la N-metilmorfolina.

Además es preferible llevar a cabo la reacción entre los elementos a) a d) de cada uno de los métodos A a E mediante irradiación con microondas.

5 La preparación de los compuestos de fórmula II mencionados anteriormente se efectúa en un disolvente orgánico o bien en ausencia del mismo y bajo irradiación con microondas, haciendo reaccionar, en primer lugar, una mezcla que comprende:

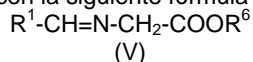
a) Un nitroalqueno de configuración (*E*) o (*Z*) con la siguiente fórmula IV,



donde:

R^3 tiene la significación dada anteriormente;

b) Una imina de configuración (*E*) o (*Z*) con la siguiente fórmula V,



donde:

R^1 tiene la significación dada anteriormente, y

R^6 representa un grupo C1-C6 alquilo o arilo;

c) Una sal metálica, preferentemente seleccionada entre el perclorato de litio, el perclorato de plata o el acetato de plata, y

d) Una base orgánica terciaria, seleccionada entre las alifáticas con C3-C10 carbonos o alcanoarómicas con C9-C15 carbonos.

25 Para los fines de la invención, la mezcla de reacción formada por los cuatro componentes arriba indicados se puede realizar mediante irradiación con microondas o bien adicionando uno de los componentes sobre los otros tres, en el disolvente orgánico y a la temperatura de $-25\text{ }^\circ\text{C}$ a $+25\text{ }^\circ\text{C}$, preferentemente a temperaturas próximas a $+25\text{ }^\circ\text{C}$. Una vez completada la reacción de cicloadición se obtiene una mezcla de 2-alcoxycarbonil pirrolidinas correspondiente a los sustituyentes seleccionados para cada reacción particular. Dicha mezcla se disuelve en un éter cíclico como el tetrahidrofurano o acíclico de alto punto de ebullición como el éter bis(2-metoxietílico), también conocido como "diglyme" y se añade un agente oxidante como el dióxido de manganeso, el peróxido de hidrógeno o la 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona. Tras un cierto tiempo a temperaturas comprendidas entre los $+60\text{ }^\circ\text{C}$ y los $+250\text{ }^\circ\text{C}$, se obtiene una mezcla formada por el 2-alcoxycarbonil-NH-pirrol y el 2-alcoxycarbonil-4-nitro-NH-pirrol correspondiente, cuyos componentes pueden separarse mediante cristalización fraccionada o cromatografía. Los ácidos de fórmula general II se obtienen mediante hidrólisis alcalina de los ésteres anteriores, preferentemente mediante tratamiento de los mismos con hidróxido de litio o de sodio en una mezcla de agua y dimetoxietano.

40 Un aspecto adicional de esta invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula general I para el tratamiento del cáncer. El mecanismo de acción de dichos compuestos se explica por sus propiedades antagonistas con las desacetilasas de histonas implicadas en el bloqueo de la síntesis de proteínas encargadas de la regulación de procesos tales como la apoptosis o el crecimiento y proliferación celular. Dichas propiedades impiden o bloquean la unión de las desacetilasas y los complejos enzimáticos relacionados a sus sustratos naturales, como son los residuos de lisina N-acetilados en la posición ϵ de los residuos terminales de lisina de las histonas, por lo que éstas permanecen en el estado mono- o poliacetilado.

45 Un último aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula general I y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de fórmula I de la presente invención pueden ser administrados tanto como sustancia pura como en forma de formulaciones farmacéuticas, aunque es preferible la administración del compuesto de forma combinada. La combinación del medicamento es preferiblemente en forma de una formulación la cual:

- 50 i) Contenga el compuesto de fórmula general I solo;
 ii) Contenga uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras; y
 iii) Pueda contener alguna sustancia adicional terapéuticamente activa.

55 Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares deben ser farmacéuticamente y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinadas con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado.

60 Las formulaciones incluyen aquéllas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración dependerá del estado del paciente.

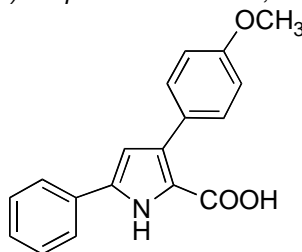
65 Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas y se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas a administrar pueden variar en función de las particularidades de la terapia aunque generalmente varíaran entre 1 y 500 mg al día en una o varias tomas.

Para facilitar la comprensión de las ideas precedentes, se describen seguidamente unos ejemplos de realización de la presente invención. Dichos ejemplos son de carácter meramente ilustrativo.

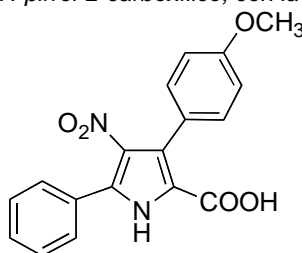
Ejemplo 1

5

Preparación del ácido 5-fenil-3-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxílico, con la siguiente fórmula estructural:



y del ácido 5-fenil-3-(4-metoxifenil)-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxílico, con la siguiente fórmula estructural:



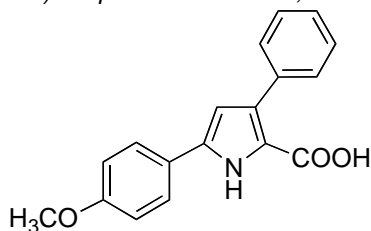
- 10 A una mezcla de *N*-fenilmetilidenglicinato de metilo (14.17 g, 80.0 mmol) en acetonitrilo (800 ml) se le adicionaron sucesivamente trietilamina (12 ml, 80.0 mmol), acetato de plata (1.98 g, 11.9 mmol) y (*E*)-2-(4-metoxifenil)-1-nitroeteno (14.33 g, 80.0 mmol). El progreso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa fina. Una vez completada la reacción, la mezcla fue filtrada a través de un lecho de Celita y lavada con una disolución saturada de NH₄Cl (2 x 150 ml) y con agua (2 x 150 ml). Una vez secada sobre MgSO₄, la disolución fue evaporada bajo presión
- 15 reducida, obteniéndose 26.5 g de una mezcla de diastereómeros de 5-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-metoxicarbonil-4-nitropirrolidina. 12.22 g (34.27 mmol) de esta mezcla fue disuelta en éter bis(2-metoxietílico) (343 ml) bajo atmósfera inerte y se le añadió dióxido de manganeso (29.8 g, 343 mmol). La mezcla de reacción fue agitada a reflujo durante 48 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla fue llevada a temperatura ambiente y filtrada a través de un lecho de Celita. La disolución obtenida fue concentrada a presión reducida, obteniéndose 7.93 g de una mezcla formada por
- 20 5-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-metoxicarbonil-4-nitro-1H-pirrol y 5-fenil-3-(4-metoxifenil)-2-metoxicarbonil-1H-pirrol. Los productos fueron separados mediante cromatografía de columna flash, y la hidrólisis de cada uno de ellos fue realizada por separado como se indica a continuación. A una solución del éster correspondiente (4.0 mmol) en etanol (100 ml) se le adicionó gota a gota NaOH 10% (40 ml, solución acuosa), y la mezcla fue agitada a reflujo. El progreso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa fina. Una vez completada la reacción, la mezcla fue
- 25 enfriada a 0°C, neutralizada con HCl 1N y extraída con cloruro de metileno (3x 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas fueron secadas sobre MgSO₄ y evaporadas bajo presión reducida, obteniéndose el ácido carboxílico correspondiente.

- 30 Ácido 5-fenil-3-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxílico: Rdto. 41%; p.f. 198°C (dec.); IR 3467, 1643 cm⁻¹; ¹H-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 11.72 (s, 1H), 7.88 (d, 2H, J=7.7 Hz), 7.51 (d, 2H, J=8.4 Hz), 7.38 (t, 2H, J= 7.6 Hz), 7.26 (t, 1H, J=7.2 Hz), 6.91 (d, 2H, J= 8.4 Hz), 6.69 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.34 (s, 1H); ¹³C-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 162.5, 157.9, 134.4, 131.3, 131.2, 130.3, 128.6, 127.9, 127.0, 125.1, 119.8, 113.0, 112.9, 109.3, 55.0, 54.9; Anal. Calc. para C₁₈H₁₅NO₃: C, 73.71; H, 5.15; N, 4.78. Encontrado: C, 73.56; H, 5.08; N, 4.81 %.

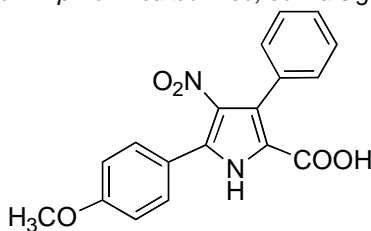
- 35 Ácido 5-fenil-3-(4-metoxifenil)-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxílico: Rdto. 28%; p.f. 190°C; IR 3437,1663,1493 cm⁻¹; ¹H-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 7.57-7.52 (m, 2H), 7.48-7.43 (m, 3H), 7.24 (d, 2H, J=8.4 Hz), 6.90 (d, 2H, J=8.4 Hz), 3.79 (s, 3H); ¹³C-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 161.6, 158.3, 133.5, 132.5, 131.1, 129.3, 129.0, 128.0, 124.5, 124.2, 121.1, 112.7, 54.9; Anal. Calc. para C₁₈H₁₄N₂O₅: C, 63.90; H, 4.17; N, 8.28. Encontrado: C, 63.85; H, 4.20; N, 8.27 %.

Ejemplo 2

Preparación del ácido 3-fenil-5-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxílico, con la siguiente fórmula estructural:



5 y del ácido 3-fenil-5-(4-metoxifenil)-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxílico, con la siguiente fórmula estructural:



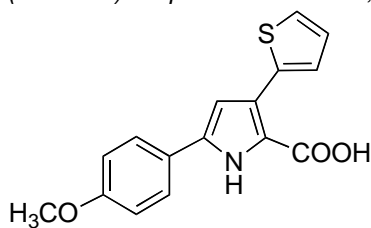
Estos materiales fueron preparados mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 1, obteniéndose los compuestos del título como sólidos amarillos.

10 Ácido 3-fenil-5-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxílico: Rdto. 52%; p.f. 251°C; IR 3457, 3316, 1618 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, DMSO-d_6) 10.67 (s_a, 1H), 7.88 (d, 2H, J=7.5 Hz), 7.70 (d, 2H, J=8.5 Hz), 7.23 (t, 2H, J=7.5 Hz), 7.11 (t, 1H, J=7.3 Hz), 6.87 (d, 2H, J=8.5 Hz), 6.52 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.38 (s_a, 1H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, DMSO-d_6) 166.1, 157.5, 137.1, 129.7, 128.9, 127.9, 126.9, 125.3, 125.2, 124.7, 113.9, 106.4, 54.9; Anal. Calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3$: C, 73.71; H, 5.15; N, 4.78. Encontrado: C, 73.48; H, 5.11; N, 4.79 %.

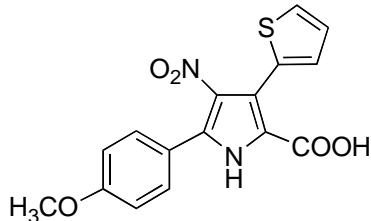
15 Ácido 3-fenil-5-(4-metoxifenil)-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxílico: Rdto. 35%; p.f. 106-107°C; IR 3407, 1668, 1507, 1351 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, CDCl_3) 9.32 (s, 1H), 7.54 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 7.42-7.38 (m, 5H), 7.01 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 3.88 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, CDCl_3) 163.4, 161.1, 135.2, 133.2, 130.8, 130.3, 129.7, 128.7, 128.2, 127.8, 127.6, 120.6, 114.3, 114.2, 55.4; Anal. Calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 63.90; H, 4.17; N, 8.28. Encontrado: C, 63.77; H, 4.19; N, 8.30 %.

Ejemplo 3

Preparación del ácido 5-(4-metoxifenil)-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxílico, con la siguiente fórmula estructural:



25 y del ácido 5-(4-metoxifenil)-4-nitro-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxílico, con la siguiente fórmula estructural:



Estos materiales fueron preparados mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 1, obteniéndose los compuestos del título como sólidos amarillos.

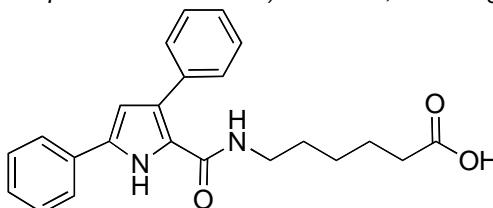
30 Ácido 5-(4-metoxifenil)-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxílico: Rdto. 54%; p.f. 153-154°C; IR 3424, 3112, 2964, 1610 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, CDCl_3) 8.29 (s_a, 1H), 7.41 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 7.10 (d, 1H, J= 5.0 Hz), 7.07 (d, 1H, J= 3.1 Hz), 7.02-6.98 (m, 2H), 6.92 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 6.58 (s, 1H), 3.82 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, CDCl_3) 158.6, 139.2, 133.0, 127.4, 125.3, 121.8, 121.2, 120.4, 114.9, 114.4, 103.5, 71.9, 70.5, 59.0, 55.3; Anal. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$: C, 64.20; H, 4.38; N, 4.68. Encontrado: C, 64.11; H, 4.35; N, 4.70 %.

35

Ácido 5-(4-metoxifenil)-4-nitro-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxílico: Rdto. 28%; p.f. 180-181°C; IR 3408, 3120, 1610, 1511 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 7.54 (da, 1H, J= 3.4 Hz), 7.49 (d, 2H, J= 8.3 Hz), 7.03 (sa, 2H), 7.00 (d, 2H, J= 8.2 Hz), 3.81 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 161.1, 135.1, 133.7, 130.1, 129.3, 127.3, 126.8, 120.1, 114.3, 65.9, 55.4, 15.2; Anal. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 55.81; H, 3.51; N, 8.14. Encontrado: C, 56.09; H, 3.49; N, 8.14 %.

Ejemplo 4

10 Preparación del ácido 6-(3,5-difenil-1H-pirrol-2-carboxamido)hexanoico, con la siguiente fórmula estructural:



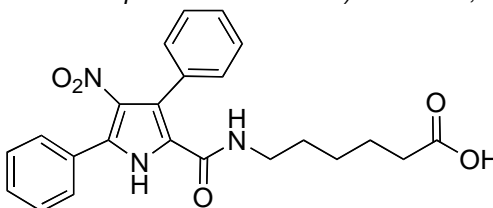
Una solución de ácido 3,5-difenil-1H-pirrol-2-carboxílico (0.39 g, 1.5 mmol) y de clorhidrato del éster metílico del ácido 6-aminohexanoico (0.25 g, 1.5 mmol) en DMF (7.5 ml) fue enfriada a 0°C. Trietilamina (1.15 ml, 8.25 mol), 1-hidroxibenzotriazol (0.22 g, 1.65 mmol), clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (0.32 g, 1.65 mmol) y *N*-metilmorfolina (0.165 ml, 1.5 mmol) fueron añadidos sucesivamente, y la mezcla fue agitada a 0°C durante 2 h, y durante 96 horas más a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió acetato de etilo (300 ml), y la solución obtenida fue lavada con agua (90 ml), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1N (90 ml, solución acuosa), agua (90 ml), NaHCO_3 (90 ml, solución acuosa saturada), y NaCl (90 ml, solución acuosa saturada), secada sobre MgSO_4 y evaporada bajo presión reducida, obteniéndose 0.47 g (1.2 mmol) de éster.

El éster metílico obtenido fue disuelto en etilenglicol dimetil éter (6 ml) y la disolución fue enfriada a 0°C. A continuación, se adicionó gota a gota una disolución acuosa de LiOH 1N (3.6 ml) y la mezcla resultante fue agitada a 0°C. El progreso de la reacción fue monitorizado por cromatografía en capa fina. Una vez completada la reacción, fue adicionado (pH \approx 6) ácido cítrico 10% (3.6 ml, solución acuosa). La solución fue extraída con cloruro de metileno (3 x 5 ml), y las fracciones orgánicas combinadas fueron secadas sobre MgSO_4 y evaporadas bajo presión reducida. El crudo de reacción fue triturado en dietil éter para dar 0.42 g de un sólido blanco.

Rdto. 74%; p.f. 228-229 °C; IR 3427, 3246, 1608 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 13.05 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.99 (d, 2H, J= 7.7 Hz), 7.52 (d, 2H, J=7.5 Hz), 7.36-7.29 (m, 4H), 7.21 (dd, 2H, J=12.5 Hz, J'= 7.0 Hz), 6.65 (s, 1H), 3.21 (dd, 2H, J=11.3 Hz, J'=5.6 Hz), 2.05 (t, 2H, J=6.6 Hz), 1.54-1.44 (m, 4H), 1.36-1.30 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 177.5, 160.8, 136.1, 132.7, 131.8, 129.0, 128.5, 128.3, 127.6, 126.5, 125.9, 124.6, 123.3, 108.3, 37.3, 28.8, 26.6, 25.5; Anal. Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 73.38; H, 6.43; N, 7.44. Encontrado: C, 73.45; H, 6.41; N, 7.44 %.

Ejemplo 5

35 Preparación del ácido 6-(4-nitro-3,5-difenil-1H-pirrol-2-carboxamido)hexanoico, con la siguiente fórmula estructural:

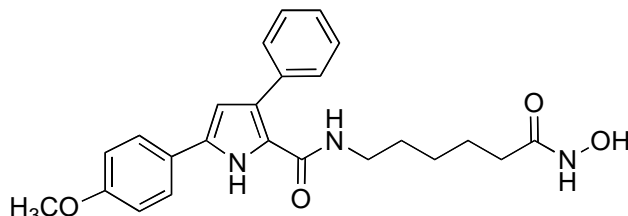


Este material fue preparado mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 4, obteniéndose el compuesto del título como un sólido de color amarillo.

Rdto. 71%; p.f. 153-154 °C; IR 3417, 3155, 1638, 1492 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 7.58 (d, 2H, J=7.2 Hz), 7.36 (t, 2H, J=7.2 Hz), 7.32-7.23 (m, 7H), 4.87 (sa, 2H), 3.07 (dd, 2H, J=12.9 Hz, J'=6.6 Hz), 2.09 (t, 2H, J=7.3 Hz), 1.46-1.40 (m, 2H), 1.35-1.29 (m, 2H), 1.18-1.12 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 176.0, 161.9, 136.8, 134.4, 133.4, 131.8, 130.1, 129.0, 127.5, 127.4, 127.3, 126.3, 122.8, 71.0, 64.8, 57.9, 38.2, 35.0, 28.8, 26.0, 24.7, 15.1; Anal. Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$: C, 65.55; H, 5.50; N, 9.97. Encontrado: C, 65.37; H, 5.44; N, 10.01 %.

Ejemplo 6

Preparación de la *N*-(5-(hidroxicarbamoil)pentil-3-fenil-5-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:

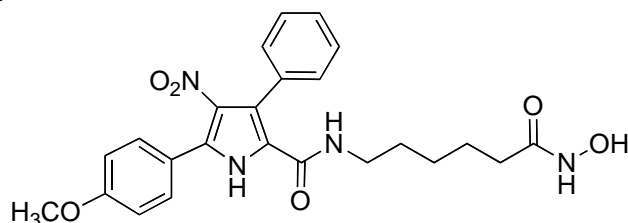


5 A una solución de clorhidrato de hidroxilamina (0.26 g, 3.75 mmol) y feniltaleína (1 mg) en metanol (1.25 ml) bajo atmósfera inerte se le añadió gota a gota una alícuota de metóxido sódico en metanol (tomada de una solución de 0.65 g, 12.0 mmol de metóxido sódico en 3.3 ml de metanol bajo atmósfera inerte) hasta observar en la solución un color rosa permanente. 6-(3-fenil-5-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamido)hexanoato de metilo (0.53 g, 1.25 mmol),
 10 preparado a partir de ácido 3-fenil-5-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxílico y clorhidrato del éster metílico del ácido 6-aminohexanoico según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, y metóxido sódico en metanol (5.0 mmol, 1.4 ml de una disolución preparada previamente) fueron añadidos sucesivamente. La mezcla fue agitada durante 26h, observándose la formación de un precipitado denso. Transcurrido este tiempo, se añadió agua (3 ml) al medio de reacción. Esta solución fue acidificada con ácido acético glacial y extraída con cloruro de metileno (3 x 10 ml). Las fracciones orgánicas combinadas fueron secadas sobre MgSO₄ y evaporadas bajo presión reducida, obteniéndose
 15 0.46 g del producto del título como un sólido blanco.

Rdto. 87%; p.f. 157-158 °C; IR 3407, 3226, 1663, 1608 cm⁻¹; ¹H-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 11.44 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, J=7.8 Hz), 7.49 (d, 2H, J=7.7 Hz), 7.36 (t, 2H, J=7.3 Hz), 7.30 (t_a, 1H, J=5.1 Hz), 7.26 (t, 2H, J=7.3 Hz), 6.97 (d, 2H, J=7.9 Hz), 6.56 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.16 (dd, 2H, J=12.0 Hz, J'=5.9 Hz), 1.93 (t, 2H, J=7.2 Hz), 1.51-1.45 (m, 2H), 1.43-1.38 (m, 2H), 1.24-1.17 (m, 2H); ¹³C-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 168.9, 160.9, 158.2, 135.7, 132.8, 128.7, 127.9, 127.3, 126.2, 125.9, 124.3, 122.7, 114.0, 107.1, 55.1, 32.1, 28.7, 26.0, 24.8; Anal. Calc. para C₂₄H₂₇N₃O₄: C, 68.39; H, 6.46; N, 9.97. Encontrado: C, 68.25; H, 6.42; N, 9.98 %.

25 Ejemplo 7

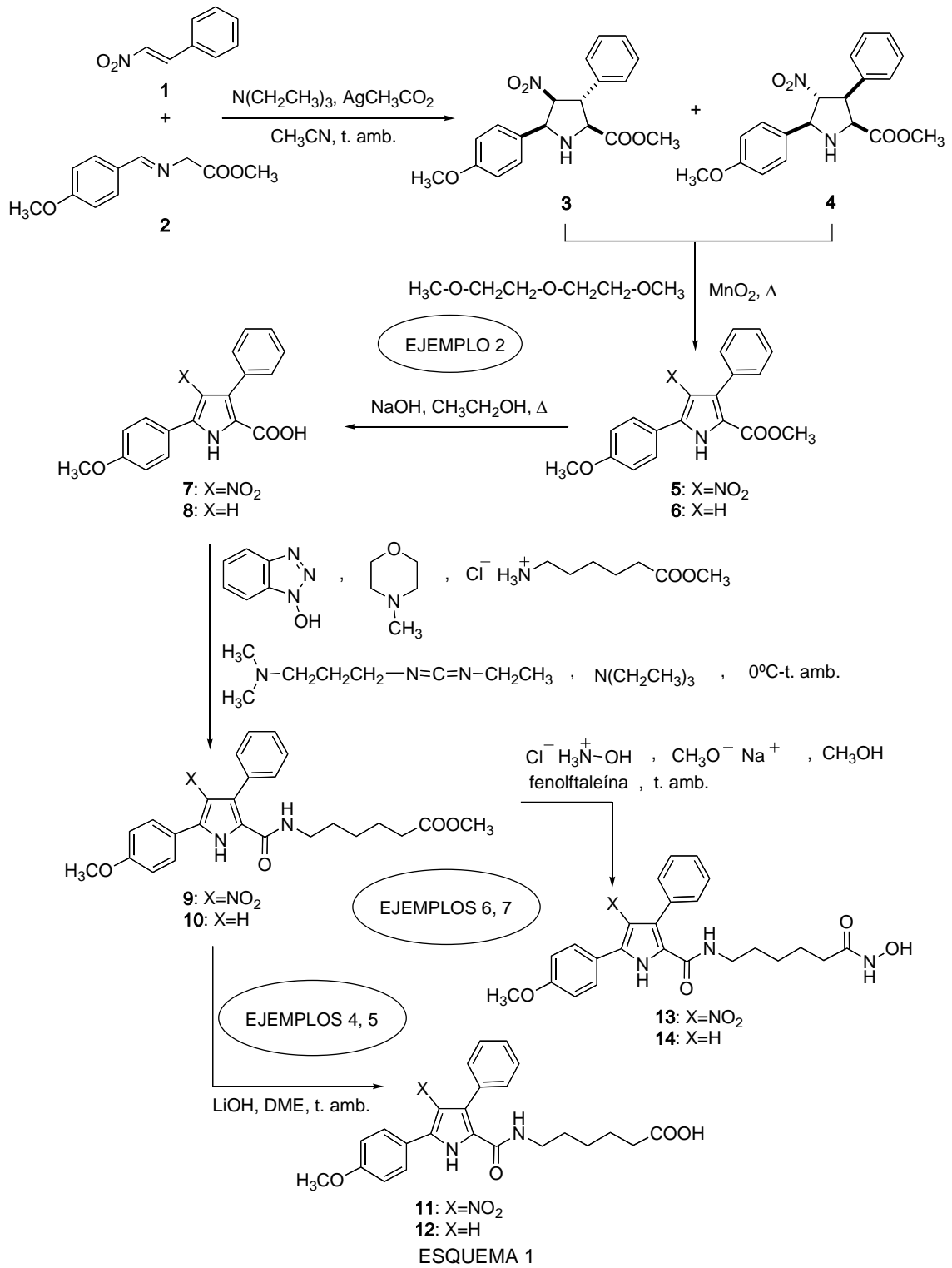
Preparación de la *N*-(5-(hidroxicarbamoil)pentil-3-fenil-5-(4-metoxifenil)-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:



30 Este material fue preparado mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 6, obteniéndose el compuesto del título como un sólido de color amarillo.

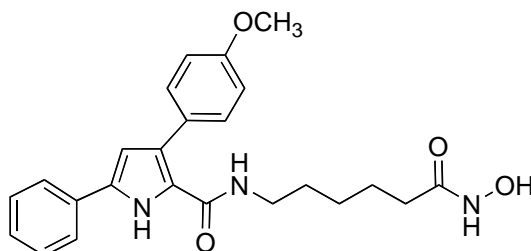
Rdto. 84%; p.f. 126-127 °C; IR 3397, 3185, 1668, 1628, 1507, 1356 cm⁻¹; ¹H-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 12.59 (s_a, 1H), 10.33 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.53 (d, 2H, J=8.5 Hz), 7.44-7.39 (m, 3H), 7.35 (d, 2H, J=7.0 Hz), 7.03 (d, 2H, J=8.5 Hz), 6.71 (t_a, 1H, J=4.4 Hz), 3.82 (s, 3H), 3.03 (dd, 2H, J=11.9 Hz, J'=6.0 Hz), 1.88 (t, 2H, J=7.3 Hz), 1.40-1.34 (m, 2H), 1.24-1.18 (m, 2H), 1.03-0.96 (m, 2H); ¹³C-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 168.9, 159.9, 159.4, 133.3, 132.0, 131.1, 130.9, 129.9, 128.0, 127.6, 123.3, 121.4, 121.1, 113.5, 55.2, 32.0, 28.4, 25.7, 24.7; Anal. Calc. para C₂₄H₂₆N₄O₆: C, 61.79; H, 5.62; N, 12.01. Encontrado: C, 61.71; H, 5.59; N, 12.04 %.

40 Con el fin de facilitar la comprensión de las ideas expuestas en estos últimos ejemplos, en el Esquema 1, que se incluye a continuación, se exponen las diferentes etapas sintéticas conducentes a los compuestos de los anteriores ejemplos.



Ejemplo 8

Preparación de la *N*-(5-(hidroxicarbamoil)pentil-3-(4-metoxifenil)-5-fenil 1*H*-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:



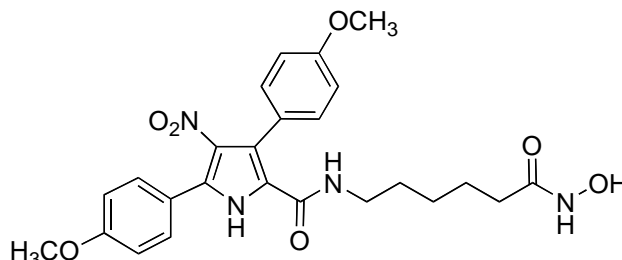
5 Este material fue preparado mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 6, obteniéndose el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido.

10 Rdto. 80 %; p.f. 142°C; IR 3417, 3256, 1663, 1613, 1547, 1306 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 12.59 (s_a , 1H), 10.33 (s , 1H), 8.66 (s , 1H), 7.53 (d , 2H, $J=8.5$ Hz), 7.44-7.39 (m , 3H), 7.35 (d , 2H, $J=7.0$ Hz), 7.03 (d , 2H, $J=8.5$ Hz), 6.71 (t_a , 1H, $J=4.4$ Hz), 3.82 (s , 3H), 3.03 (dd , 2H, $J=12.43$ Hz, $J'=6.35$ Hz), 1.94 (t , 2H, $J=7.3$ Hz), 1.54-1.45 (m , 2H), 1.45-1.37 (m , 2H), 1.28-1.16 (m , 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 169.0, 161.0, 158.0, 132.6, 131.6, 129.9, 128.6, 127.8, 127.2, 126.6, 124.5, 123.1, 113.4, 108.1, 55.0, 32.2, 28.8, 26.1, 24.9. Anal. Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$: C, 68.39; H, 6.46; N, 9.97. Encontrado: C, 68.27; H, 6.43; N, 9.99 %.

15

Ejemplo 9

Preparación de la *N*-(5-(hidroxicarbamoil)pentil-3-(4-metoxifenil) -5- (fenil)-4-nitro-1*H*-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural.



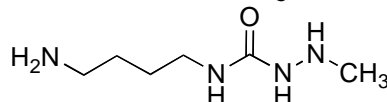
20 Este material fue preparado mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 6, obteniéndose el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido. Rdto. 94 %; p.f. 155°C; IR 3397, 3155, 1638, 1497, 1356 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6) 11.59 (s , 1H), 10.34 (s , 1H), 8.68 (s , 1H), 7.63-7.53 (m , 2H), 7.52-7.41 (m , 3H), 7.29 (d , 2H, $J=8.5$ Hz), 6.99(d , 2H, $J=8.5$ Hz), 6.72 (t_a , 1H, $J=4.4$ Hz), 3.80 (s , 3H), 3.05 (dd , 2H, $J=12.02$ Hz, $J'=6.24$ Hz), 1.89 (t , 2H, $J=7.3$ Hz), 1.50-1.33 (m , 2H), 1.33-1.16 (m , 2H), 1.14-0.98 (m , 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, DMSO- d_6). 168.9, 159.4, 158.8, 133.0, 131.6, 131.2, 129.3, 129.1, 129.0, 128.0, 123.5, 121.0, 113.5, 55.0, 32.0, 28.3, 25.7, 24.6 Anal. Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6$: C, 61.79; H, 5.62; N, 12.01. Encontrado: C, 61.40; H, 5.77; N, 11.80 %.

25

Ejemplo 10

30

Preparación de la 4-(4-aminobutil)-1-metilsemicarbazida, con la siguiente fórmula estructural:



35 Una mezcla de dicarbonato de diterc-butilo (10.9 g, 51 mmol) en metanol (30 ml) fue adicionada gota a gota sobre una disolución de 1,4-diaminobutano (11.12 g, 150 mmol) en trietilamina (30 ml, 215 mmol) y metanol (300 ml). La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido este tiempo, la trietilamina y el metanol fueron evaporados bajo presión reducida. El aceite resultante fue disuelto en cloruro de metileno (100 ml) y lavado con carbonato sódico 10% (2 x 50 ml, solución acuosa). La fase orgánica fue secada sobre MgSO_4 y evaporada bajo presión reducida. Se obtuvo de este modo la amina monoprotégida (7.8 g, 41.42 mmol)

40 A una disolución de la amina monoprotégida (6g, 31.86 mmol y trifosgeno (3.48g, 11.72 mmol) en cloruro de metileno (438 ml) se le añadió gota a gota una solución de bicarbonato sódico (18.23 g, 63.72 mmol) en agua (438 ml) a temperatura ambiente. El sistema bifásico resultante fue agitado vigorosamente durante 1.5 h. Transcurrido este tiempo la fase orgánica fue decantada, secada sobre MgSO_4 y evaporada bajo presión reducida. El aceite resultante (4.3g, 20 mmol) fue disuelto en metanol (6.8ml) y se adicionó gota a gota a 0° C lentamente sobre otra disolución previamente preparada de metilhidrazina (1.1 ml, 20.8 mmol) y agua (4.05 ml) La mezcla fue agitada durante 45 minutos a 0° C. Transcurrido este tiempo el precipitado fue filtrado y se obtuvieron 3.492 g de un sólido

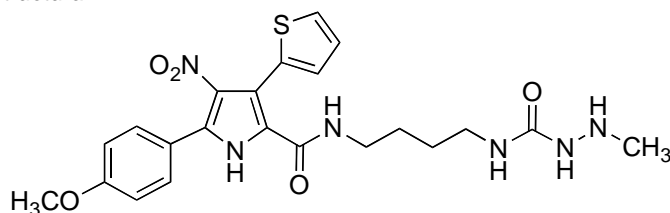
45

de color blanco cuyas propiedades espectroscópicas fueron juzgadas compatibles con la 4-(4-terc-butoxicarbonilaminobutil)-1-metilsemicarbazida.

- 5 A una disolución del precipitado anteriormente obtenido (0.500 g, 1.92 mmol) en cloruro de metileno (27.5 ml) a 0° C fue añadida otra disolución de ácido trifluoroacético (4.96 ml, 44 mmol) en cloruro de metileno (22 ml) lentamente durante 30 minutos. La mezcla fue agitada durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se le añadió tolueno (50 ml) y se evaporó a presión reducida hasta la mitad del volumen repitiendo el proceso varias veces. Se obtuvo así el trifluoroacetato de la sal de amonio del compuesto del título (0.720 g, 2.63 mmol). Rdto. 68 %; IR 3387, 3115, 1673 cm⁻¹; ¹H-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 7.88 (s, 3H), 7.42-7.15 (m, 2H), 3.78-3.64 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.16-2.97 (m, 2H), 2.95-2.73 (m, 2H), 1.80-1.38 (m, 4H); ¹³C-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 159.0, 158.6, 158.1, 157.7, 156.7, 51.1, 26.3, 24.3.

Ejemplo 11

- 15 *Preparación de la 1-(4-(5-(4-metoxifenil)-4-nitro-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-(2-metilamino)urea, con la siguiente fórmula estructural:*

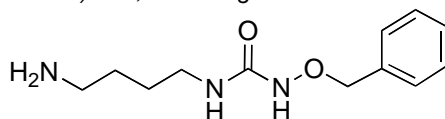


- 20 Una solución de ácido 5-(4-metoxifenil)-4-nitro-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxílico (0.434 g, 1.25 mmol) y de trifluoroacetato de la sal de amonio de la 4-(4-aminobutil)-1-metilsemicarbazida (0.345 g, 1.25 mmol) en DMF (6.25 ml) fue enfriada a 0°C. A continuación, se añadió sucesivamente trietilamina (0.98 ml, 7.04 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (0.210 g, 1.37 mmol), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (0.263 g, 1.37 mmol) y N-metilmorfolina (0.14 ml, 1.25 mmol). La mezcla resultante fue agitada a 0°C durante 2 h, y durante 96 horas más a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió acetato de etilo (250 ml), y la solución obtenida fue lavada con agua (80 ml), Na₂S₂O₃ 1N (80 ml, solución acuosa), agua (80 ml), NaHCO₃ (80 ml, solución acuosa saturada), y NaCl (80 ml, solución acuosa saturada), secada sobre MgSO₄ y evaporada bajo presión reducida, obteniéndose 0.400 g (0.82mmol) del compuesto del título.

- 30 Rdto. 65.6% ; p.f. 185-187°C; IR 3408, 3161, 1639, 1511 cm⁻¹; ¹H-RMN (δ ppm, CDCl₃): 10.4 (s, 1H), 7.56 (dd, 1H, J =5.5 Hz, J' =0.8), 7.54 (d, 2H, J=8.7 Hz), 7.20-7.15 (m, 3H), 6.98 (d, 2H, J=8.7 Hz), 5.74 (t, 1H, J=5.2 Hz), 4.66 (s, 1H), 3.86 (s, 4H), 3.67 (s, 3H), 3.13-3.04 (m, 4H), 1.31-1.24 (m, 4H); ¹³C-RMN (δ ppm, CDCl₃): 160.7, 159.6, 157.0, 134.6, 132.9, 131.5, 130.9, 129.5, 128.7, 127.6, 123.2, 121.1, 113.9, 113.7, 55.4, 52.1, 40.5, 38.7, 27.0, 26.2. Ion molecular calculado para C₂₂H₂₆N₆O₅S: m/z 486.14. Encontrado: 471.1 (M⁺-Me).

Ejemplo 12

- 35 *Preparación de 1-(4-aminometil)-3-(benciloxi)urea, con la siguiente fórmula estructural:*

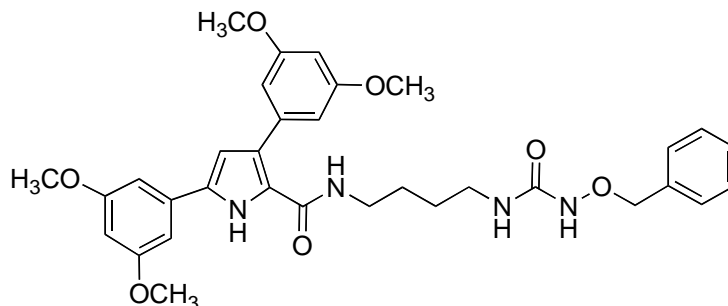


- 40 Este material fue preparado mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 10, empleando benciloxiamina en lugar de metilhidrazina. Tras la secuencia de adición-desprotección previamente especificada, se obtuvo el compuesto del título como el trifluoroacetato de la sal de amonio correspondiente.

Rdto. 68%; IR 3759, 3356, 1648 cm⁻¹; ¹H-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 7.82 (s, 3H), 7.52-7.28 (m, 7H), 5.00 (s, 2H), 3.09-2.92 (m, 2H), 2.90-2.68 (m, 2H), 1.68-1.32 (m, 4H); ¹³C-RMN (δ ppm, DMSO-d₆) 159.6, 158.2, 157.7, 136.4, 128.5, 128.1, 127.8, 77.2, 38.0, 26.6, 24.3, 24.0. Ion molecular calculado para C₁₃H₂₀N₃O₂: m/z 237.32. Encontrado 238.0.

Ejemplo 13

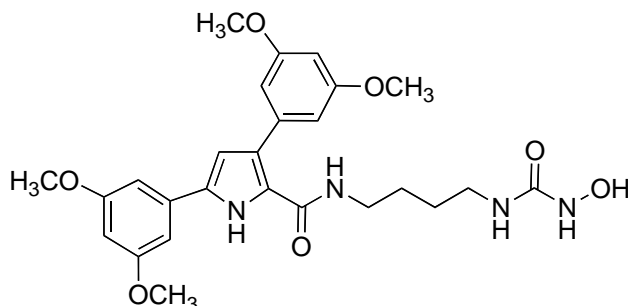
Preparación de 1-(4-(3,5-bis(3,5-Dimetoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-(benciloxi)urea, con la siguiente fórmula estructural:



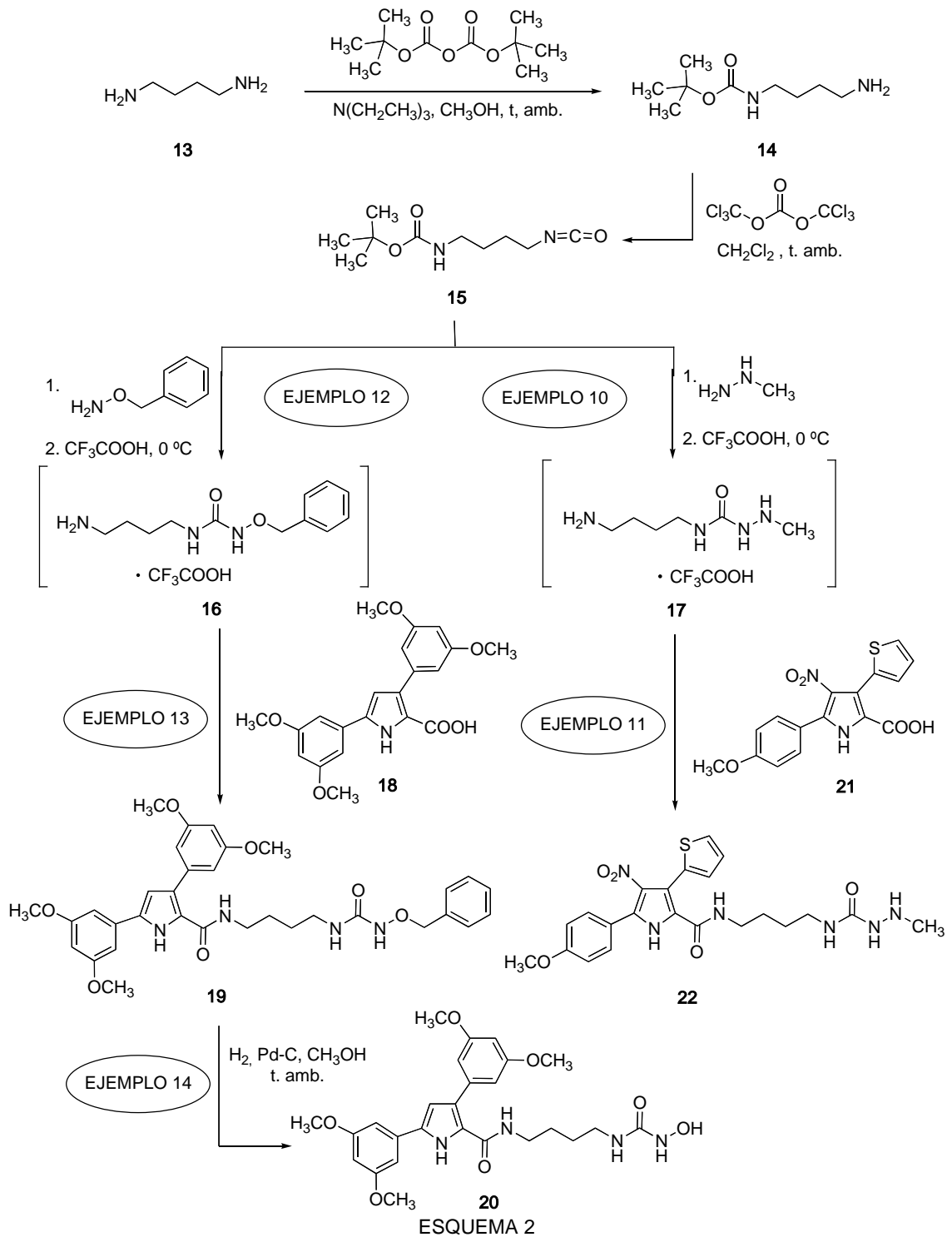
5 Este material fue preparado mediante un procedimiento sustancialmente similar al del Ejemplo 11, a partir del ácido 3,5-bis(3,5-dimetoxifenil)-1H-pirrol carboxílico y del trifluoroacetato de la sal de amonio de la 1-(4-aminometil)-3-(benciloxi)urea. Rdto. 81% ; IR 3407, 3216, 1688, 1597 cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm, CDCl_3) 9.87 (s, 1H), 7.44-7.32 (m, 5H), 7.13 (s, 1H), 6.77 (d, 2H, $J=2.0$ Hz), 6.62 (d, 2H, $J=2.2$ Hz), 6.50 (d, 2H, $J=2.6$ Hz), 6.43 (t, 1H, $J=2.0$ Hz), 6.03 (t, 1H, $J=5.5$ Hz), 5.62 (t, 1H, $J = 5.3$ Hz), 4.80 (s, 2H), 3.85 (s, 6H), 3.82 (s, 6H), 3.28 (dd, 2H, $J=11.9$ Hz, $J'=5.9$ Hz), 3.15 (dd, 2H, $J=12.7$ Hz, $J'=6.5$ Hz), 1.41-1.29 (m, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, CDCl_3) 161.2, 160.0, 137.6, 135.4, 134.1, 133.2, 130.8, 129.2, 128.8, 128.7, 127.7, 122.2, 110.0, 107.4, 103.0, 100.0, 99.8, 78.6, 72.3, 10.1, 68.1, 55.4, 39.1, 38.8, 27.1, 26.6. Ion molecular calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7$; m/z 602.68. Encontrado: 603.2.

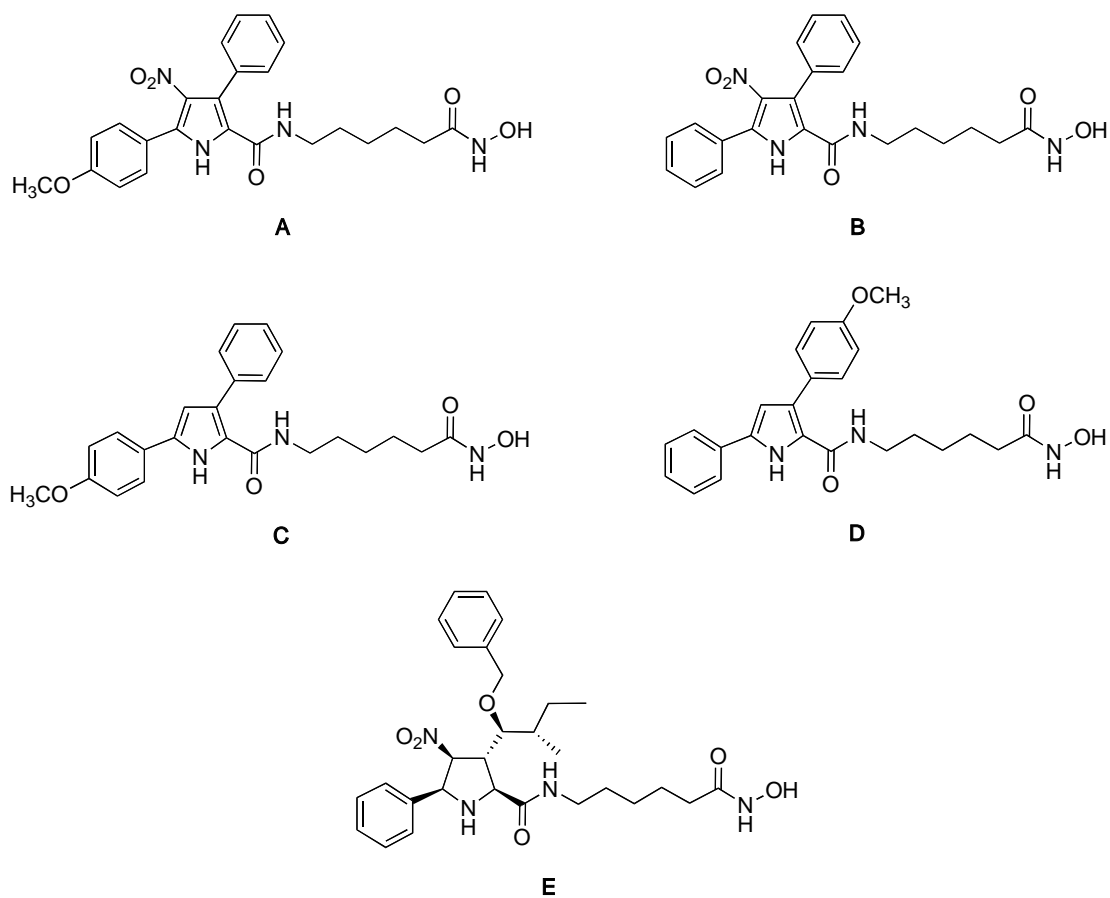
15 Ejemplo 14

Preparación de la 1-(4-(3,5-bis(3,5-Dimetoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-hidroxiurea, con la siguiente fórmula estructural:



20 Se preparó una disolución de 1-(4-(3,5-bis(3,5-dimetoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-(benciloxi)urea (0.200g, 0.33 mmol) en acetato de etilo (66ml) y etanol (16.5ml) a la que se le añadió el catalizador de Pd-C al 10% (0.116g, 0.11 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente con corriente de hidrogeno durante 5 horas. Transcurrido dicho tiempo la suspensión resultante fue filtrada sobre celita y el filtrado fue evaporado bajo presión reducida. Se obtuvo así el producto del título como un aceite incoloro. Rdto. 71% ; IR 3416, 3244, 2948, 1598 cm^{-1} ;
 25 $^1\text{H-RMN}$ (δ ppm CDCl_3) 10.3 (s, 1H), 6.78 (s, 2H), 6.60 (d, 2H, $J=1.7$ Hz), 6.53-6.44 (m, 2H), 6.39 (s, 1H), 6.17-6.02 (m, 1H), 4.81 (s, 1H), 3.86-3.78 (m, 13H), 3.34-3.16 (m, 4H), 1.48-1.33 (m, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (δ ppm, CDCl_3) 161.2, 137.6, 134.6, 134.5, 133.3, 128.3, 128.2, 122.1, 122.0, 109.7, 107.5, 103.3, 99.9, 99.6, 55.6, 55.5, 39.0, 38.9, 38.7, 27.2, 27.0, 26.8. Ion molecular calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_7$; m/z 512.55. Encontrados: 513.2 (M^+), 497.1 (M^+-OH).
 30 Con el fin de facilitar la comprensión de las ideas expuestas en estos últimos ejemplos, en el Esquema 2 que se incluye a continuación se exponen las diferentes etapas sintéticas conducentes a los compuestos recogidos en los ejemplos 10, 11, 12, 13 y 14.





ESQUEMA 3. Fórmulas desarrolladas de los compuestos cuya actividad inhibitoria se recoge en las Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

Ejemplo 15Medida in vitro de la capacidad inhibitoria de la actividad desacetilasa de histona.

5 Con el fin de ilustrar mejor los procedimientos seguidos, en el presente ejemplo y en el siguiente se incluyen, a título ilustrativo, los resultados obtenidos con los compuestos indicados en el Esquema 3, en el que se ha incluido un derivado de pirrolidina quiral, a fin de comparar la actividad de este sistema cíclico con los pirroles objeto de la presente invención.

10 Para determinar la capacidad inhibitoria de la actividad desacetilasa de histona de los compuestos sintetizados, se realizó un ensayo *in vitro* de incubación de extracto nuclear de las líneas celulares HCT116 y MOLT4 e histonas acetiladas marcadas con tritio, en presencia de distintas concentraciones de los compuestos sintetizados, tras la cual se midió la concentración de grupos acetilo liberados mediante centelleo.

Preparación de extracto nuclear

15 Las células en suspensión (8×10^6) se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 2 ml de tampón A (10 mM Tris pH 7.5, 15 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoetanol, 1 pastilla de inhibidor de proteasa libre de EDTA por cada 50 ml de tampón). Se le añadieron 135 μ l de tampón B (50 mM Tris, 1M KCl, 30 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoetanol), se centrifugaron a $2,7 \times 10^3$ rpm a 4°C durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se suspendió de nuevo en 2 ml de tampón A y se agitó 5 veces en un homogeneizador de 2 ml. Se volvió a centrifugar a 7.8×10^3 rcf a 4°C durante 8 minutos, el pellet se resuspendió en 2 ml de tampón A, y se agitó 5 veces en el homogeneizador. Se le añadieron 200 μ l de sulfato amónico y se agitó durante 30 minutos en una noria a 4°C. Se centrifugó a 12×10^3 rpm a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se dializó en una membrana de tamaño MWCO=3500 durante 2 h a 4°C en 200 ml de tampón C (20 mM Tris pH 7.5, 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 pastilla de inhibidor de proteasa libre de EDTA por cada 50 ml de tampón). Transcurrido este tiempo, se recuperó el contenido de la membrana y se utilizó para el ensayo que se describe a continuación.

Medida in vitro de la actividad inhibidora de los compuestos.

30 A 30 μ l de extracto nuclear obtenido empleando el procedimiento indicado, se le añadieron 55 μ l de tampón C (*vide supra*), 5 μ l de la disolución de inhibidor correspondiente y 10 μ l de histonas hiperacetiladas marcadas con tritio, y la mezcla resultante fue incubada a 37°C durante 1h.

35 La incubación se detuvo mediante la adición de 37.5 μ l de una disolución de ácido clorhídrico (concentración final de 1M) y ácido acético (concentración final de 0.4 M). A la mezcla resultante se le añadieron 700 μ l de acetato de etilo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos y, finalmente, la fase superior (que contenía el ácido acético tritiado liberado) se llevó al contador de centelleo. Las muestras para el lector de centelleo se prepararon mezclando 500 μ l de la fase superior y 5 ml de líquido de centelleo.

40 Los datos más representativos obtenidos tras seguir el procedimiento anterior se muestran en las Figuras 1 y 2: Los resultados de la Figura 1 corresponden a la línea celular HCT116 y los resultados de la Figura 2 corresponden a la línea celular MOLT4.

Ejemplo 16Medida de la acetilación global de las histonas

45 La cuantificación del grado de acetilación de las histonas H3 y H4 se llevó a cabo mediante el procedimiento que se explica a continuación.

50 Las células de las líneas humana Jurkat (leucemia promielocítica) se trataron durante 24h con distintas concentraciones de los compuestos inhibidores de HDAC objeto de la presente invención. Transcurrido este tiempo, se aislaron los núcleos añadiendo a las células tampón RSB (Tris 10 mM de pH 7.5, cloruro sódico 10 mM y cloruro magnésico 3 mM) con Nonidet-P40 al 1% e inhibidor de proteasa. Para extraer las histonas, se añadió HCl 0.25M a los núcleos, y la mezcla se agitó a 4°C durante 16 h. A continuación, se precipitaron las histonas añadiendo 8 volúmenes de acetona. La mezcla de histonas obtenida se separó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase reversa, utilizando una columna C18 con un gradiente de acetonitrilo (20–60%) en 0.3% de ácido trifluoroacético.

55 La separación de las especies no acetiladas, mono-, di-, tri-, y tetra- acetiladas de cada fracción de las histonas H3 y H4 se llevó a cabo mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE), utilizando un capilar de sílica (60.2 cm x 75 μ m, longitud efectiva de 50 cm). Las condiciones de elución usadas fueron: 25° C, voltaje de 12 kV, detector de absorbancia a 214 nm, y tampón de elución de fosfato 110 mM (pH 2.0) y celulosa-HPM (0.03% peso/vol).

60 Antes de cada inyección, el sistema se lavó durante 3 minutos con NaOH 0.1M, seguido de otro lavado de 2 minutos con H_2SO_4 0.5M, y se equilibró con el tampón de elución durante 3 minutos. Los tampones y disoluciones de lavado se prepararon con agua Milli-Q filtrada a través de un filtro de poro 0.45 μ m. Las muestras se inyectaron bajo presión de 0.3 psi durante 3 segundos. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Algunos datos representativos obtenidos con varias moléculas objeto de la presente invención se muestran en la Figura 3.

5

Ejemplo 17

Medida de la inducción de apoptosis.

La cuantificación de la cantidad de células apoptóticas se realizó estudiando el cambio de permeabilidad de la membrana citoplasmática mediante análisis por citometría de flujo, utilizando como agente de tinción el kit comercial YoPro®. El procedimiento seguido se explica a continuación. Las células de las líneas humanas HCT116 y HL60 (10⁶ células por tratamiento) se trataron durante 24h con distintas concentraciones de los compuestos inhibidores de HDAC objeto de la invención. Transcurrido este periodo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X frío, se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X y se añadieron 1µl de YoPro® y 1µl de ioduro de propidio. La mezcla se incubó protegida de la luz durante 30 minutos en hielo. La cantidad de células apoptóticas se midió mediante citometría de flujo.

10

15

Los datos más representativos se muestran en las Figuras 4 y 5. En la Figura 4 se presentan los datos relativos al modelo de carcinoma de colon humano HCT116. En la Figura 5 se presentan los datos relativos al modelo de leucemia mieloide aguda humana HL60.

20

Ejemplo 18

Medida de la actividad biológica in vivo.

Con el fin de observar el efecto de algunos de los compuestos descritos sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, se realizaron ensayos utilizando ratones hembra atímicos desnudos de 6 semanas de edad (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA). Para el estudio se inocularon subcutáneamente 2x10⁶ células de la línea HCT116 (carcinoma de colon humano) y 10⁷ células de MOLT4 (Leucemia linfoblástica aguda de células T humana) en un volumen final de inoculación de 200 µl/animal resuspendidas en PBS. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100 mm³, se administró a cada ratón una dosis diaria de 200 µl de una disolución 20 µM de la molécula correspondiente mediante inyección intraperitoneal (10 mg/kg peso). A los ratones del grupo de control se les administraron 200 µl de PBS para mimetizar el estrés de la inoculación. Cada 24h se pesaron los ratones, y el volumen del tumor se estimó mediante calibrado milimétrico, asumiendo una geometría esférica para los tumores (volumen= d³x π/6). Cuando los tumores llegaron a un volumen de 1-1.5 cm³ (Human End Point: Final ético-humanitario), los ratones se sacrificaron y los tumores fueron extraídos y pesados.

25

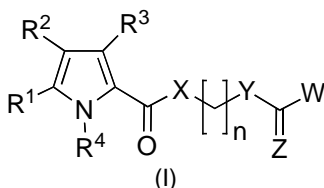
30

35

Los datos más representativos se muestran en las Figuras 7 y 8. En la Figura 7 se presentan los datos relativos al modelo de carcinoma de colon humano HCT116. En la Figura 8 se presentan los datos relativos al modelo de leucemia fibroblástica humana MOLT4.

REIVINDICACIONES

1. Derivado pirrólico de fórmula general I,



5

donde:

R^1 y R^3 representan independientemente entre sí un radical fenilo; fenilo mono o polisustituido en las diferentes posiciones del anillo, en el que el sustituyente es un grupo metoxi; o un grupo heteroarilo C5-C10 que contiene al menos un heteroátomo de O, N o S;

10 R^2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo electrónatractor como el grupo nitro; o un grupo amino o amido;

R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo C1-C6 alquilo lineal, ramificado o cíclico;

(n) representa un número de grupos metileno comprendido entre 1 y 8, ambos inclusive;

(X) representa indistintamente un grupo amino secundario, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

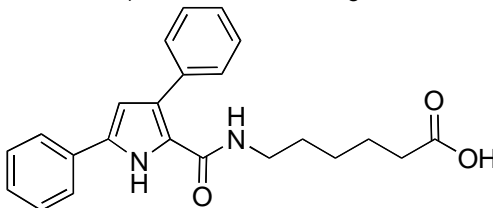
15 (Y) representa un grupo seleccionado entre metileno, metileno sustituido y amino secundario;

(Z) representa indistintamente un átomo de oxígeno o de azufre; y

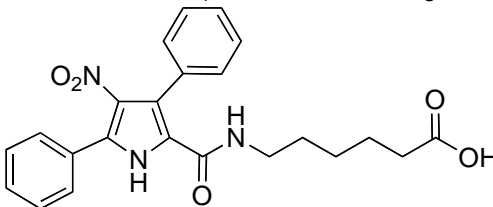
(W) representa un grupo seleccionado entre el hidroxilo, el hidroxiamino, el hidrazino y el alquil, aril o heteroaril-hidrazino.

20 2. Derivado pirrólico de fórmula general I de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre:

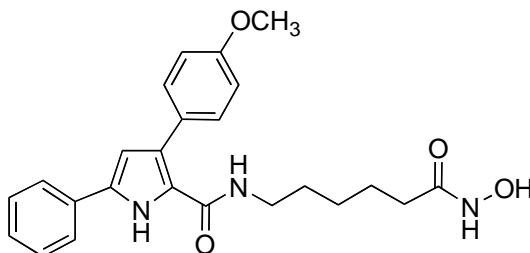
[1] Ácido 6-(3,5-difenil-1H-pirrol-2-carboxamido)hexanoico, con la siguiente fórmula estructural:



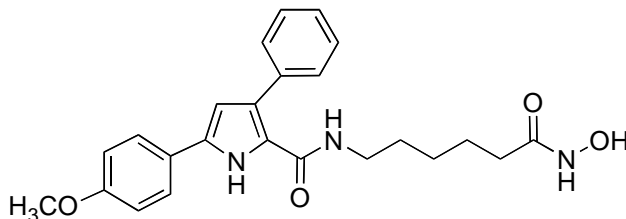
[2] Ácido 6-(4-nitro-3,5-difenil-1H-pirrol-2-carboxamido)hexanoico, con la siguiente fórmula estructural:



25 [3] N-(5-(Hidroxicarbamoil)pentil)-5-fenil-3-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:

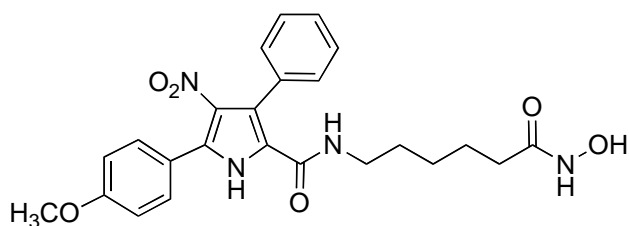


[4] N-(5-(Hidroxicarbamoil)pentil)-3-fenil-5-(4-metoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:

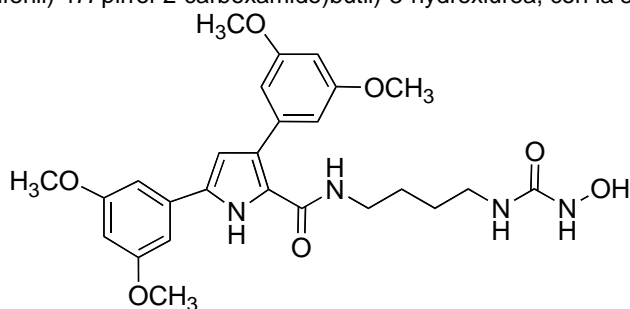


30

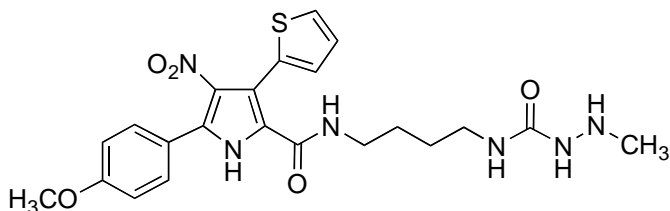
[5] N-(5-(Hidroxicarbamoil)pentil)-3-fenil-5-(4-metoxifenil)-4-nitro-1H-pirrol-2-carboxamida, con la siguiente fórmula estructural:



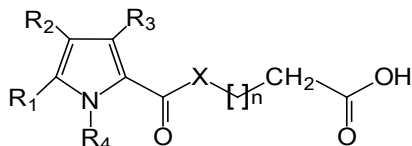
[6] 1-(4-(3,5-bis(3,5-Dimetoxifenil)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-hydroxiurea, con la siguiente fórmula estructural:



5 [7]1-(4-(5-(4-Metoxifenil)-4-nitro-3-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-2-carboxamido)butil)-3-(2-metilamino)urea, con la siguiente fórmula estructural:



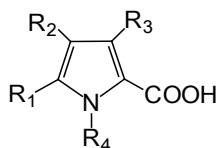
3. Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Ia):



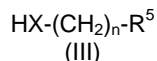
(Ia)

10 donde R₁, R₂, R₃, R₄, X y n tienen la significación dada anteriormente, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

a) un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



15 b) un compuesto de fórmula III,



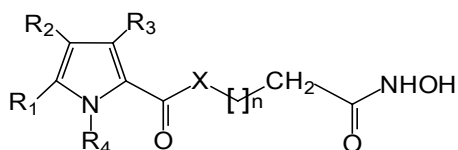
donde R⁵ es un alcóxicarbonilo,

c) un reactivo de activación del grupo carboxílico; y

20 d) una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos,

y hacer reaccionar el producto obtenido con una mezcla de hidróxido de litio o sodio, dimetoxietano y agua.

4. Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Ib):

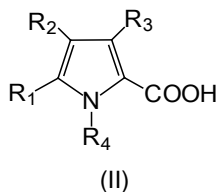


(Ib)

25

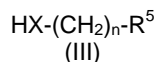
donde R₁, R₂, R₃, R₄, X y n tienen la significación dada anteriormente, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

- a) un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



5

- b) un compuesto de fórmula III,



donde R⁵ es un alcoxycarbonilo,

10

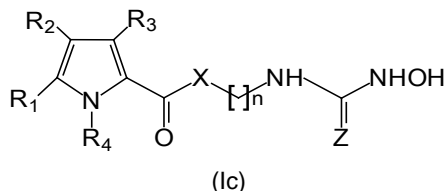
c) un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

d) una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoarómicas con C9-C15 carbonos,

y adicionar el producto resultante sobre una mezcla de clorhidrato de hidroxilamina y fenoftaleína en presencia de un exceso de metóxido sódico en metanol.

15

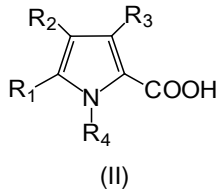
5. Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Ic):



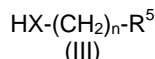
donde R₁, R₂, R₃, R₄, X, Z y n tienen la significación dada anteriormente, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

20

- a) un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



- b) un compuesto de fórmula III,



25

donde R⁵ es el terc-butoxicarbamoilo (NHBOc) o benciloxicarbamoilo (NHCBz),

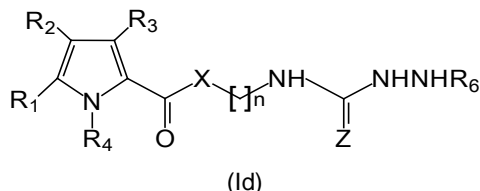
c) Un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

d) Una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoarómicas con C9-C15 carbonos,

30

desproteger el producto obtenido mediante tratamiento ácido o hidrólisis y hacerlo reaccionar con fosgeno o sus análogos como el difosgeno, trifosgeno o tiofosgeno, obteniéndose un isocianato o tioisocianato que es tratado con hidroxilamina.

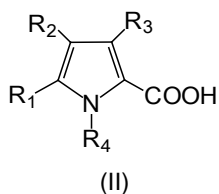
6. Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Id):



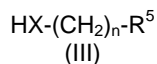
35

donde R₁, R₂, R₃, R₄, X, Z y n tienen la significación dada anteriormente y R₆ es un H, C1-C6 alquilo, arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros con 1 o más heteroátomos seleccionados entre O, N o S, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

- a) un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



b) un compuesto de fórmula III,



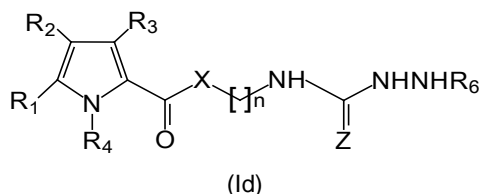
donde R⁵ es terc-butoxicarbamoilo (NHBoc) o beciloxicarbamoilo (NHCBz),

c) un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

d) una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos,

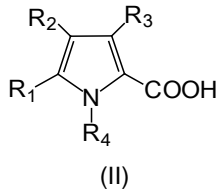
desproteger el producto obtenido mediante tratamiento ácido o hidrogenolisis y hacerlo reaccionar con fosgeno o sus análogos como el difosgeno, trifosgeno o tiofosgeno, obteniéndose un isocianato o tioisocianato que es tratado con hidracina o alquil, aril o heteroaril-hidrazinas.

7. Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (Id):

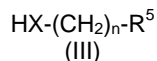


donde R₁, R₂, R₃, R₄, X, Z y n tienen la significación dada anteriormente y R₆ es un H, C1-C6 alquilo, arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros con 1 o más heteroátomos seleccionados entre O, N o S, que comprende hacer reaccionar una mezcla constituida por:

a) un ácido 1H-pirrol-2-carboxílico de fórmula II,



b) un compuesto de fórmula III,



donde R⁵ es 3-benciloxiureilo o 3-alquil, aril o heteroaril ureilo,

c) Un reactivo de activación del grupo carboxilo; y

d) Una amina terciaria, seleccionada entre las alifáticas cíclicas o acíclicas con C3-C10 carbonos y las alcanoaromáticas con C9-C15 carbonos.

8. Derivado pirrólico de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer.

9. Uso de los derivados pirrólicos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

10. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

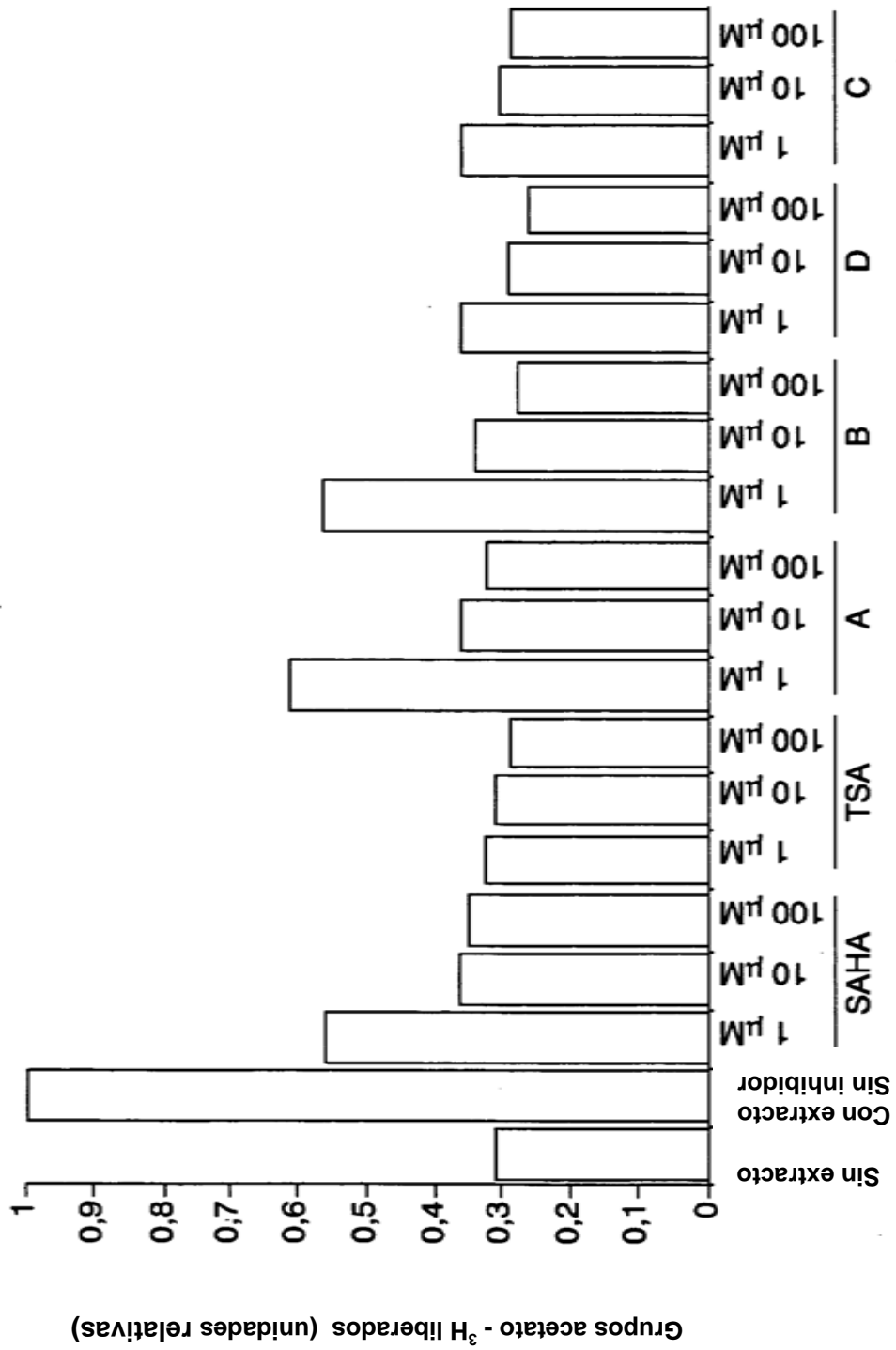


FIG. 1

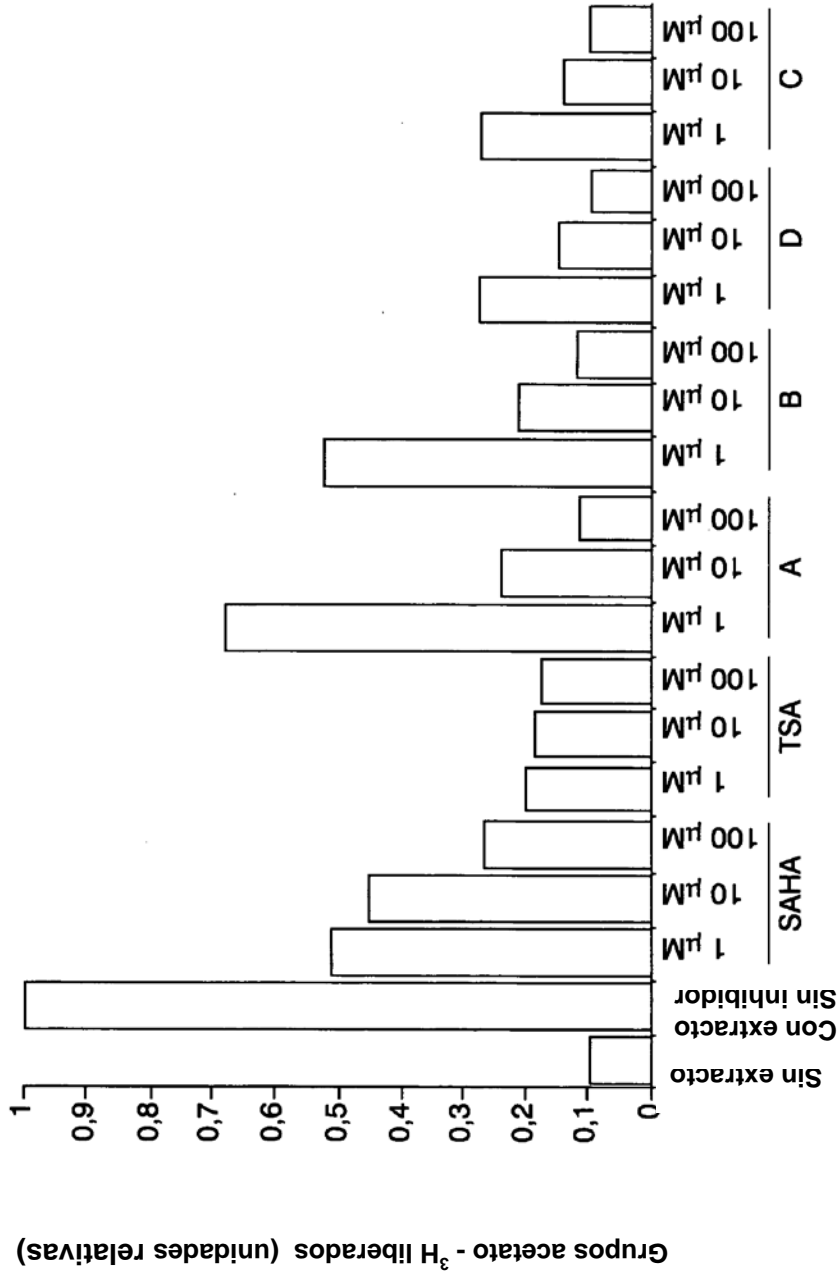


FIG. 2

Histonas H3 y H4 en diferentes
grados de (poli)acetilación

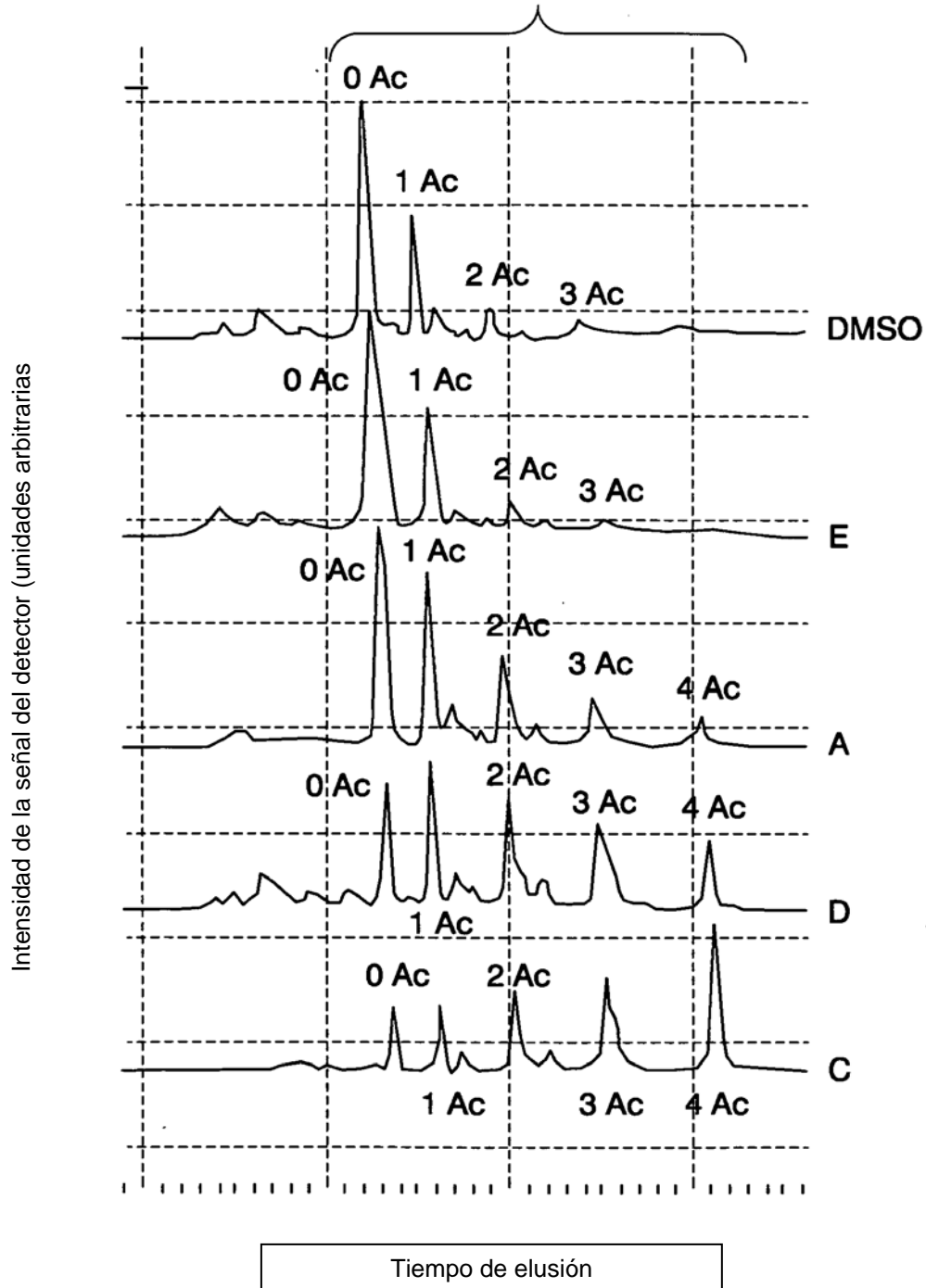


FIG. 3

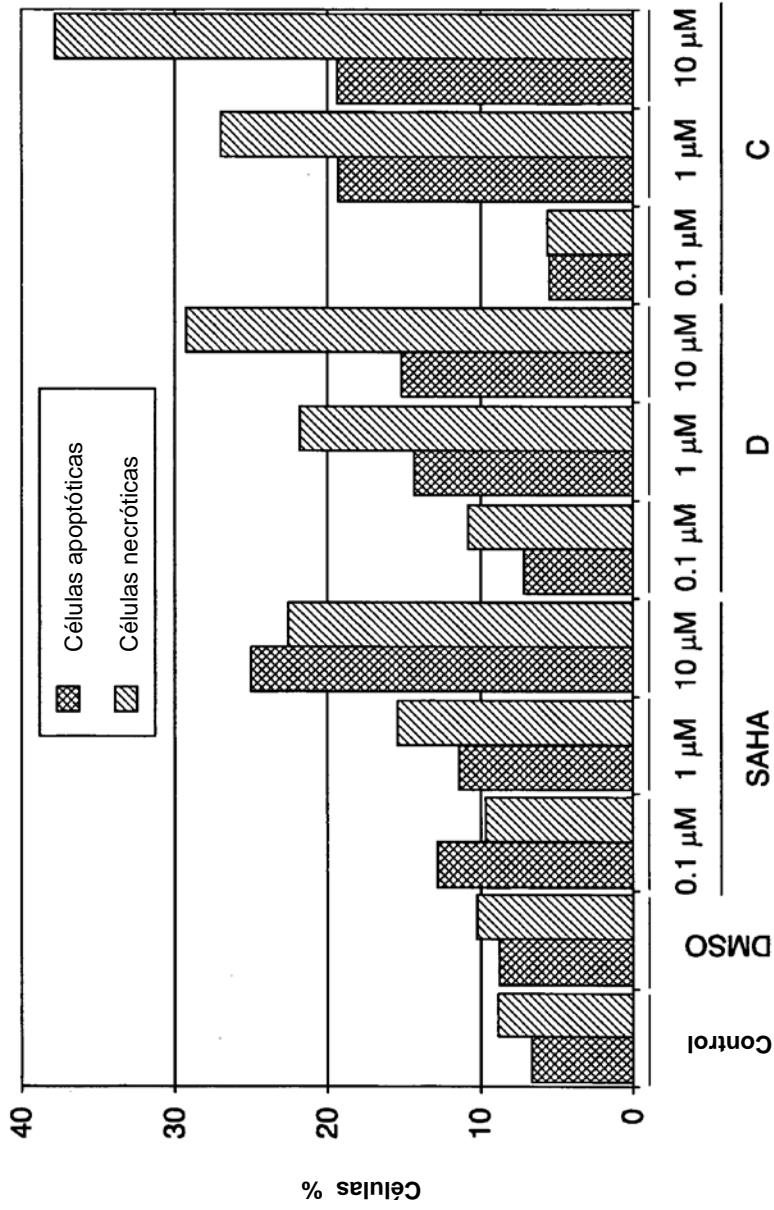


FIG. 4

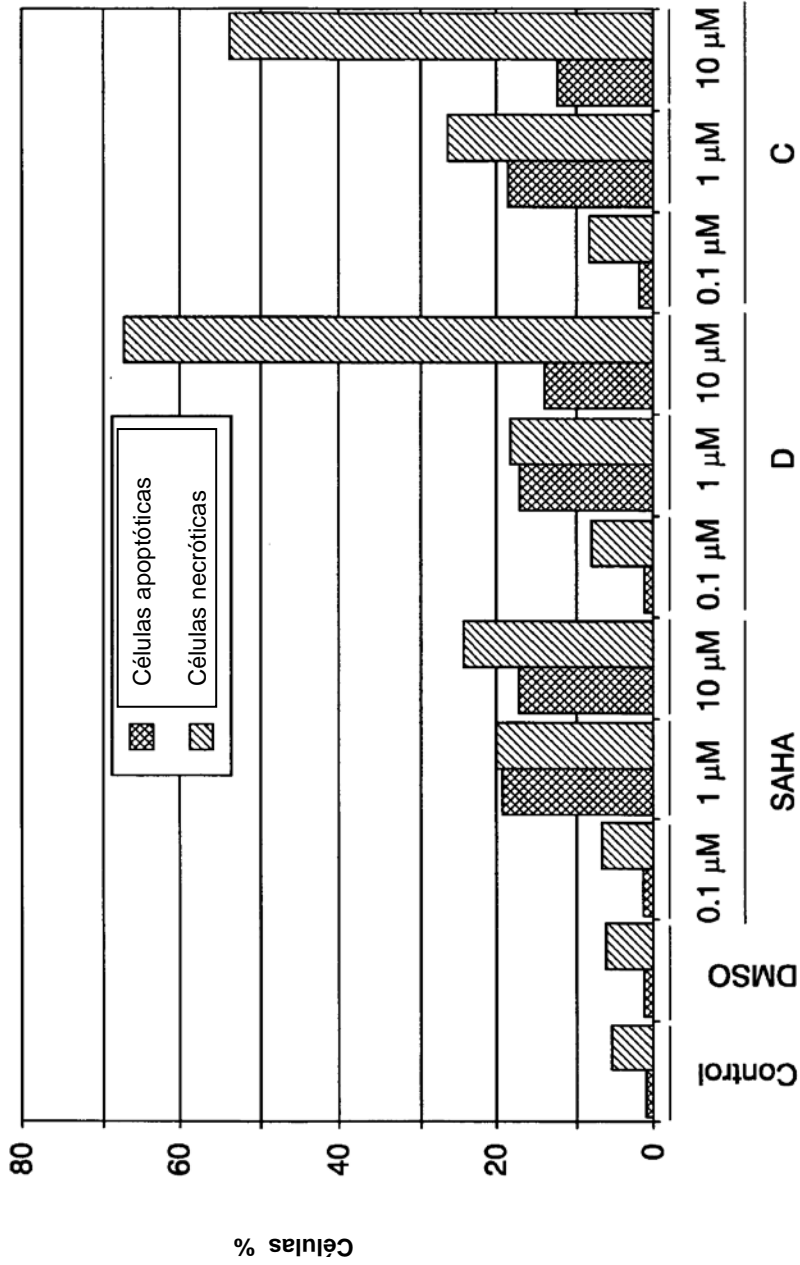
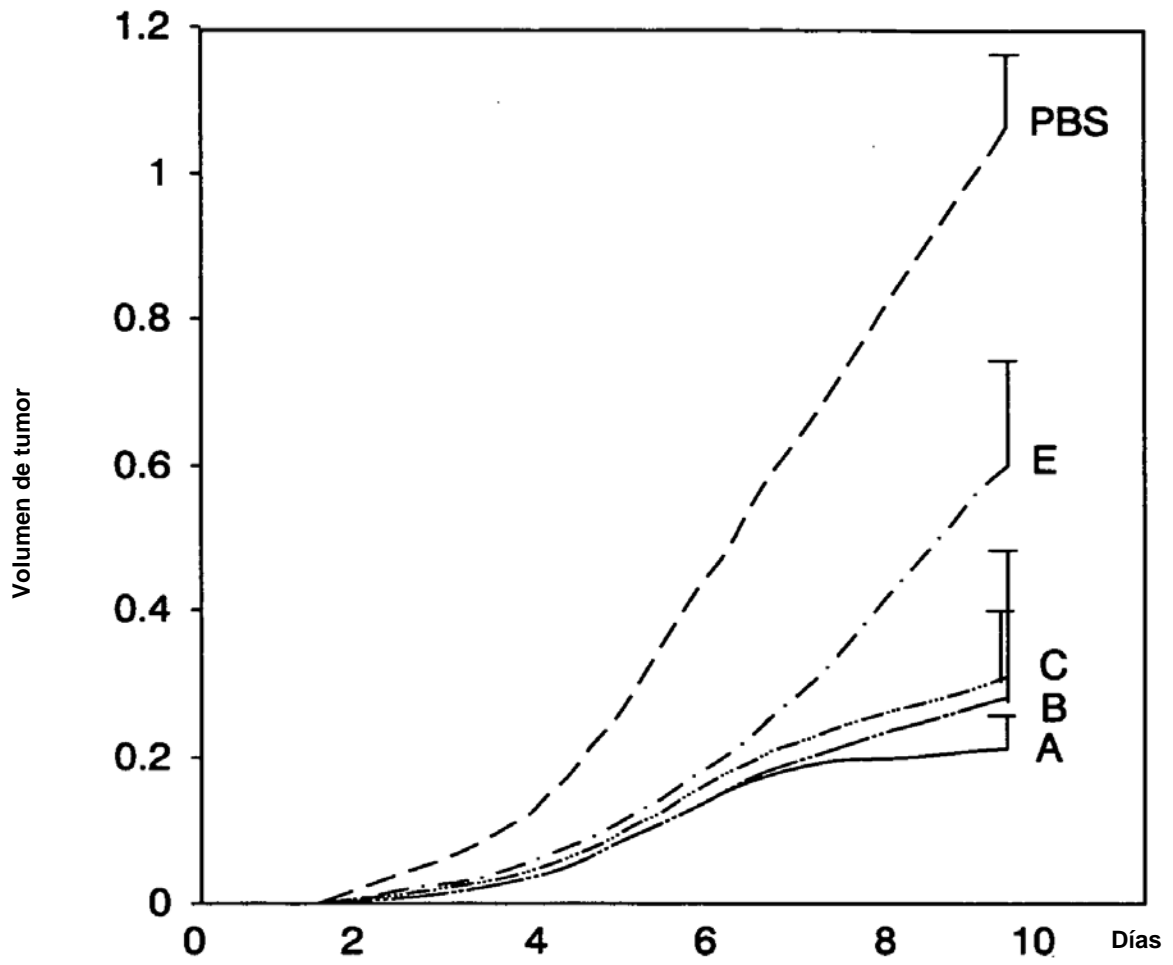


FIG. 5



PBS

A

B

C

E

FIG. 6

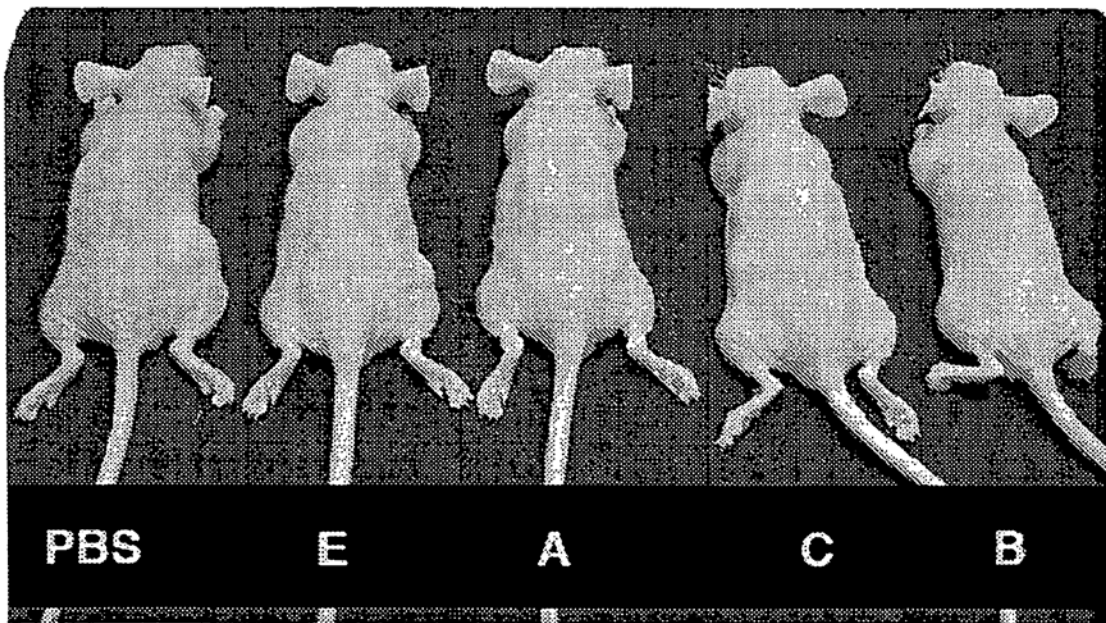
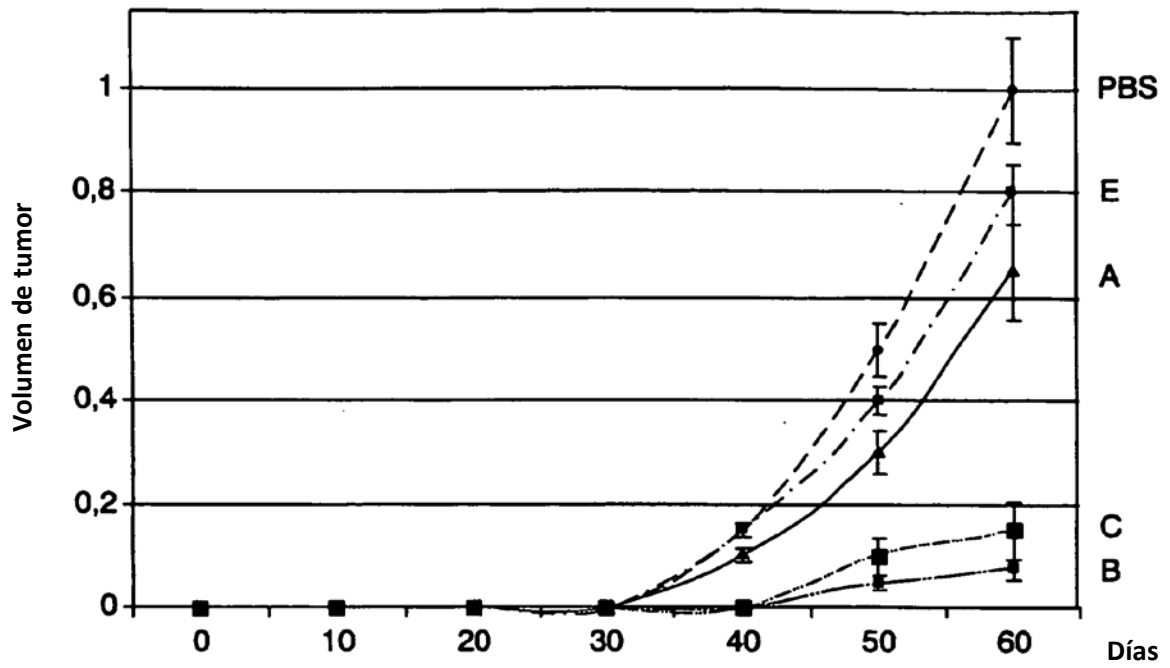


FIG. 7