

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 277**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/165** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/192** (2006.01)  
**A61K 31/216** (2006.01)  
**A61K 31/445** (2006.01)  
**A61K 31/4453** (2006.01)  
**A61K 31/495** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61K 31/5375** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07826053 .6**  
96 Fecha de presentación: **20.08.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2061452**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54 Título: **USO DEL ÁCIDO CAFEICO Y DERIVADOS COMO AGENTES ANTICANCEROSOS.**

30 Prioridad:  
**01.09.2006 US 842060 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.03.2012**

73 Titular/es:  
**PIRAMAL LIFE SCIENCES LIMITED  
PIRAMAL TOWER GANPATRAO KADAM MARG  
LOWER PAREL  
MUMBAI 400 013, MAHARASHTRA, IN**

72 Inventor/es:  
**JOSHI, Kalpana, Sanjay;  
SIVAKUMAR, Meenakshi;  
AWARE, Valmik, Sopan;  
WAGH, Vilas, Sampatrao;  
DESHPANDE, Amit;  
SARDE, Ankush, Gangaram y  
SHARMA, Somesh**

74 Agente/Representante:  
**Ruo, Alessandro**

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

ES 2 376 277 T3

## DESCRIPCIÓN

Uso del ácido cafeico y derivados como agentes anticancerosos

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al uso de un derivado del ácido cafeico o una sal del mismo representado por la fórmula general (I) como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) como que es resistente al tratamiento con Gleevec (Glivec, mesilato de imatinib o STI571). La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas (para la preparación del medicamento) que incluyen un derivado del ácido cafeico o una sal del mismo representado por la fórmula general (1) como se define en la reivindicación 1 para el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec.

15 **Antecedentes de la invención**

[0002] La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por la proliferación clonal de células progenitoras mieloides malignas que dan como resultado una cantidad excesiva de células mieloides en todas las etapas de maduración. El desarrollo de la LMC está asociado con una translocación cromosómica específica conocida como cromosoma Filadelfia (Ph). La mutación somática del cromosoma Ph se origina a partir de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22. Una consecuencia molecular de esa translocación es la generación de una proteína de fusión Bcr-Abl, una tirosina quinasa activada de manera constitutiva que es detectable durante el transcurso de la enfermedad. El cromosoma Ph produce una enzima que desempeña una función principal en el crecimiento y división celular aberrante. La enzima, una proteína de fusión (Bcr-Abl) que potencia la actividad tirosina quinasa, cambia las instrucciones genéticas normales de las células. Esta enzima aberrante envía señales a través de múltiples rutas dentro de la célula, dando como resultado la hiperproducción de leucocitos en el cuerpo. El resultado es que, mientras que un milímetro cúbico de sangre sana contiene de 4.000 a 10.000 leucocitos, la sangre de un paciente con LMC contiene de 10 a 25 veces esta cantidad. El aumento masivo en el número de leucocitos caracteriza la LMC. Además de la LMC, un subconjunto de casos, la leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA), son leucemias Ph positivas. Gleevec (Glivec, mesilato de Imatinib o STI571), un inhibidor de Abl quinasa es actualmente el tratamiento de primera línea para pacientes con LMC. Gleevec está indicado para el tratamiento de pacientes con LMC positiva al cromosoma Filadelfia en la fase crónica, fase acelerada o en crisis blástica. En algunos casos Gleevec se usa después de fracaso de terapia con interferón alfa. Del mismo modo, en algunos casos, el tratamiento terapéutico con interferón=alfa se proporciona después de fracaso de terapia con Gleevec. La eficacia de Gleevec en la LMC se basa en índices de respuestas hematológicas y citogenéticas globales. Gleevec es una nueva terapia que ofrece una nueva opción de tratamiento a pacientes que padecen LMC, una enfermedad que previamente tuvo opciones de tratamiento limitadas. También ha proporcionado investigaciones con los nuevos conocimientos en los mecanismos biológicos del cáncer.

[0003] La mayoría de los pacientes tratados con Gleevec padecen acontecimientos adversos en algún momento. La mayoría de los eventos son de grado leve a moderado, pero en ensayos clínicos en Fase II para la LMC, el fármaco se suspendió por eventos adversos en el 2% de pacientes en fase crónica, en el 3% en fase acelerada y en el 5% en crisis blástica. Los efectos secundarios más comunes incluyen náuseas, retención de líquidos, vómitos, diarrea, hemorragia, calambres musculares, erupción cutánea, cansancio, cefalea, dispepsia y disnea, así como neutropenia y trombocitopenia. En algunos pacientes también se han descrito efectos secundarios graves e intensos, tales como hepatotoxicidad (del 1% al 4%), síndrome de retención de líquidos (del 3% al 12%), neutropenia (del 8% al 48%) y trombocitopenia (menos del 1% al 33%). Hasta ahora, no existen datos de seguridad a largo plazo sobre el tratamiento con Gleevec disponibles. Aunque la mayoría de pacientes con LMC tratados con Gleevec muestran respuestas hematológicas y citogenéticas significativas, la resistencia al tratamiento con Gleevec es aún un problema, principalmente en pacientes en las fases acelerada o crisis blástica de la enfermedad.

[0004] Un artículo de revisión en Leukemia (2004,1 -11), una publicación de Nature, describe las posibles razones para el desarrollo de resistencia al tratamiento con Gleevec. La resistencia al tratamiento con Gleevec en pacientes se ha asociado con una disposición heterogénea de mecanismos que varía desde una resistencia múltiple a fármacos no específica a alteraciones genéticas intrínsecas de Bcr-Abl. El mecanismo de resistencia adquirida a Gleevec, más frecuentemente identificado, es por mutaciones puntuales del dominio Bcr-Abl quinasa que deterioran la unión a Gleevec interfiriendo con un sitio de unión a Gleevec o estabilizando una conformación Bcr-Abl con afinidad reducida a Gleevec. El documento US20060057157A1 también describe la posible razón para el desarrollo de resistencia a tratamiento con Gleevec. De acuerdo con la referencia, la inducción de apoptosis es el principal mecanismo por el cual la mayoría de los agentes quimioterapéuticos ejercen su función. Por consiguiente, no experimentar apoptosis es probablemente el mecanismo que media la resistencia a fármacos en tumores.

[0005] La T315I humana es la forma mutada más normalmente observada de Bcr-Abl, que es resistente a Gleevec. La T315I es el resultado de una mutación puntual del resto de treonina en la posición 315 a isoleucina en el dominio quinasa de la proteína Bcr-Abl.

[0006] Blood, 2003,101, 690-698, describe la línea celular resistente K-562-R. La K-562 es una de las líneas

celulares leucémicas humanas que contiene una proteína Bcr-Abl de tipo silvestre, mientras que la K-562-R es una línea celular K-562 que se hace resistente a Gleevec por exposición continua a Gleevec (2 µg/ml) durante varios pases.

5 **[0007]** En Hematology, 2005, 183-187, se describen dos inhibidores de ABL quinasa de pequeña molécula de uso en investigación, Dasatinib (BMS-354825) y AMN107, que han mostrado eficacia en ensayos clínicos en fase I para el tratamiento de LMC resistente a mesilato de imatinib (Gleevec) y que además se están evaluando clínicamente. La eficacia prolongada de estos nuevos inhibidores queda por determinar.

10 **[0008]** En Cancer Res., 2006, 66(2), 1007-1014, y Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 2005, 102(6), 1992-1997 se describen dos compuestos, VX-680 y ON-012380, activos contra la LMC resistente a Gleevec (T315I).

15 **[0009]** En Cancer Res., 2005, 65 (11), 4500-4505 se describe la actividad *in-vitro* de inhibidores de Bcr-Abl, AMN107 y BMS-354825, contra mutantes clínicamente relevantes del dominio Abl quinasa resistentes a mesilato de imatinib. El artículo describe diversas líneas celulares resistentes a mesilato de imatinib- Ba/F3 Bcr-Abl/T315I, Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3 Bcr-Abl/F359V, Ba/F3 Bcr-Abl/E255V, Ba/F3 Bcr-Abl/F317L, Ba/F3 Bcr-Abl/H396R, Ba/F3 Bcr-Abl/M244V, Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H, Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F y Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H.

20 **[0010]** El ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxi cinámico), un compuesto fitoquímico, es un constituyente del café, frutas, hortalizas, granos y propolis de abeja melífera. Se sabe que el ácido cafeico posee diversas actividades farmacológicas tales como efectos antioxidantes y antivirales. El ácido cafeico o sus derivados, tales como ésteres, se describen por tener actividad anticancerosa. Trabajos posteriores describen las propiedades anticancerosas específicas del ácido cafeico o sus derivados.

25 **[0011]** En Breast Cancer Res., 2004, 6, R63-R74, se describen los efectos antiproliferativos y apoptóticos del ácido cafeico en células cancerosas de mama humano T47D.

30 **[0012]** En Bull. Korean Chem., 2001, 22(10), 1131-1135, se describe el efecto inhibidor del éster metílico del ácido cafeico sobre la formación del complejo Fos-Jun-ADN y la supresión de crecimiento de células cancerosas. La publicación describe el efecto citotóxico contra líneas celulares cancerosas humanas (A549 y K-562).

35 **[0013]** En Biol. Pharm. Bull., 2005, 28(12), 2338-2341, se describe la inhibición del crecimiento por el octilcafeato, de células U937 de linfoma histiolítico humano mediante apoptosis.

**[0014]** En Cancer Letters, 1996, 108, 211-214, se describe el efecto inhibidor del éster fenético del ácido cafeico sobre células HL-60 de Leucemia humana.

40 **[0015]** En J. Nutritional Biochemistry, 2006,17(5), 356-362, se describen los efectos inhibidores del éster fenético del ácido cafeico sobre metástasis de células cancerosas mediados por la regulación negativa de la expresión de metaloproteinasas de la matriz en células de fibrosarcoma HT1080 humanas.

45 **[0016]** Las siguientes solicitudes de patente describen composiciones que contienen ácido cafeico o sus derivados.

**[0017]** El documento WO9105543 describe composiciones farmacéuticas o cosméticas que contienen ácido cafeico o uno de sus ésteres o amidas como ingrediente activo.

50 **[0018]** El documento JP60013712 describe fármacos que contienen éster metílico del ácido cafeico como un ingrediente activo, para la inhibición de la actividad 5-lipooxigenasa.

**[0019]** Los documentos US 2004/0006138 y US 2005/0282892 describen composiciones farmacéuticas que comprenden análogos del ácido clorogénico y/o sus sales para su uso en el tratamiento de leucemia mieloide crónica en la que la Bcr-Abl quinasa se expresa constitutivamente en animales y en seres humanos.

**[0020]** Existe una urgente necesidad de medicamentos para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec debido, por ejemplo, a la mutación Bcr-Abl.

60 **Sumario de la invención**

**[0021]** La presente invención se refiere a un derivado del ácido cafeico o una sal del mismo representado por la fórmula general (I) como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente a tratamiento con Gleevec.

65 **[0022]** Los compuestos de la presente invención pueden emplearse en la inhibición del crecimiento de líneas

celulares resistentes a Gleevec que incluyen K-562-R y 32Dcl Bcr-Abl T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3 Bcr-Abl/F359V, Ba/F3 Bcr-Abl/E255V, Ba/F3 Bcr-Abl/F317L, Ba/F3 Bcr-Abl/H396R, Ba/F3 Bcr-Abl/M244V, Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H, Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F, y Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H.

5 **[0023]** También se describe una composición farmacéutica para el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec, que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido cafeico o un derivado de fórmula (I), o una sal del mismo.

10 **[0024]** También se describe el uso del ácido cafeico o un derivado o una sal del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec.

### Breve descripción de los dibujos

15 **[0025]** **La Figura 1:** ilustra la actividad antiproliferativa de los compuestos de la presente invención en líneas celulares sensibles a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/WT) y resistentes a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/T3151).

20 **La Figura 2:** ilustra la actividad antiproliferativa de los compuestos de la presente invención, expresada como valores de  $CI_{50}$  medios en  $\mu M$ , en células con mutaciones de baja frecuencia resistentes a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/E255V, Ba/F3 Bcr-Abl/M244V y Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H) como se observa en el entorno clínico.

25 **La Figura 3:** ilustra la actividad antiproliferativa de los compuestos de la presente invención, expresada como valores de  $CI_{50}$  medios en  $\mu M$ , en células con mutaciones de alta frecuencia resistentes a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3 Bcr-Abl/F359V, Ba/F3 Bcr-Abl/F317L, Ba/F3 Bcr-Abl/H396R, Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F y Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H) como se observa en el entorno clínico.

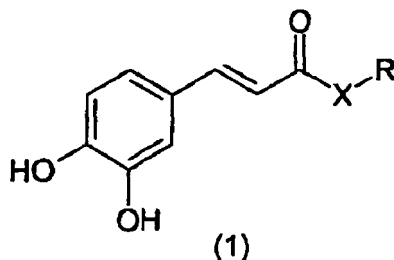
**La Figura 4:** ilustra la inducción de apoptosis después de 48 horas, por los compuestos de la presente invención (a 5  $\mu M$ ) en líneas celulares sensibles y resistentes a mesilato de imatinib.

30 **La Figura 5A:** ilustra la eficacia *in-vivo* de los compuestos de la presente invención en ratones SCID en el modelo de xenoinjerto resistente a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/T3151)

**La Figura 5B:** ilustra la eficacia *in-vivo* de los compuestos de la presente invención en ratones SCID en el modelo de xenoinjerto sensible a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/WT).

### Descripción detallada de la Invención

35 **[0026]** La presente invención proporciona derivados del ácido cafeico representados por la siguiente fórmula general (1)



en la que

40 X es O, NH o heterociclilo;

R es un alquilo de cadena lineal o ramificado que está opcionalmente sustituido, arilo que está opcionalmente sustituido, heterociclilo que está opcionalmente sustituido o está ausente;

45 en todas sus formas estereoisoméricas o tautoméricas, y mezclas de las mismas en todas las proporciones, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec (mesilato de Imatinib).

### Definiciones

50 **[0027]** Los que se enumera a continuación son definiciones que se aplican a los términos como que se usan a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas.

**[0028]** Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo alifático, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal o ramificada. Además, a menos que se indique lo contrario, el término "alquilo" incluye grupos sin sustituir, así como grupos alquilo que están sustituidos con uno o más sustituyentes diferentes.

55 **[0029]** En una realización, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene 20 o menos átomos de carbono en su estructura principal (por ejemplo,  $C_1$ - $C_{20}$  para cadena lineal,  $C_3$ - $C_{20}$  para cadena ramificada), por

ejemplo, 15 o menos átomos de carbono. Son ejemplos de residuos alquilo que contienen de 1 a 20 átomos de carbono: metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo y eicosilo, los n-isómeros de todos estos residuo, isopropilo, isobutilo, 1-metilbutilo, isopentilo, neopentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, isohexilo, 2,3,4-trimetilhexilo, isodecilo, sec-butilo o terc-butilo. Los residuos alquilo adecuados contienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, de 1 a 4 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-propilo, t-butilo, n-butilo, sec-butilo o iso-butilo.

**[0030]** Los grupos alquilo pueden estar sustituidos o sin sustituir. A menos que se indique lo contrario, los grupos alquilo pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 ó 5) sustituyentes idénticos o diferentes. Cualquier sustituyente presente en residuos de alquilo sustituidos pueden estar presentes en cualquier posición deseada, con la condición de que la sustitución no conduzca a una molécula inestable. Un alquilo sustituido se refiere a un residuo alquilo en el que uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 átomos de hidrógeno están reemplazados por sustituyentes, por ejemplo, alquilo, halógeno, hidroxilo, carbonilo, carboxilo, alcoxilo, cicloalquilo, éster, éter, ciano, amino, mono- o di-alquilamino, amido, imino, nitro, aralquilo, aciloxi, heterociclilo, arilo o heteroarilo.

**[0031]** Como se usa en el presente documento el término "arilo" se refiere a un grupo hidrocarburo monocíclico o policíclico que tiene hasta 14 átomos de carbono en el anillo, por ejemplo, hasta 10 átomos de carbono en el anillo, en el que al menos un anillo carbocíclico que está presente tiene un sistema de electrones  $\pi$  conjugados. Los ejemplos adecuados de residuos arilo-(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) incluyen fenilo, naftilo, bifenilo, fluorenilo o antraceniilo, especialmente fenilo y naftilo. A menos que se indique otra cosa, los residuos arilo, por ejemplo fenilo, naftilo o fluorenilo, pueden estar en general sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes, por ejemplo, hasta cinco sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno, alquilo, fluoroalquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxi, amino, ciano, nitro, tiol, imina, amida, carbonilo, arilo y heterociclilo.

**[0032]** El término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillos monocíclico o policíclico, saturado, parcialmente insaturado o aromático que contiene hasta 14 átomos en el anillo de los que 1, 2 ó 3 son heteroátomos idénticos o diferentes seleccionados entre: nitrógeno, oxígeno o azufre. El grupo heterociclilo puede tener, por ejemplo, 1 ó 2 átomos de oxígeno, 1 ó 2 átomos de azufre y/o de 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo. Los heteroátomos en el anillo pueden estar presentes en cualquier número deseado y en cualquier posición con respecto a los otros, con la condición de que el sistema heterocíclico resultante se conozca en la técnica y sea estable y adecuado como un subgrupo en una sustancia de fármaco. Los ejemplos adecuados de grupos heterociclilo incluyen piperazinilo, piperidinilo, imidazolilo, pirrolidinilo, morfolinilo, benzoxazolilo, quinolilo, isoquinolilo, carbazolilo, indolilo, isoindolilo, fenoxazinilo, benzotiazolilo, benzoimidazolilo, benzoxadiazolilo o benzofurazanilo.

**[0033]** Los grupos heterociclilo pueden estar sustituidos o sin sustituir. A menos que se indique otra cosa, y a parte de cualquiera de los sustituyentes enlazados a grupos heteroarilo en la definición de los compuestos de fórmula 1, el grupo heterociclilo puede estar sin sustituir o sustituido en átomos de carbono en el anillo, con uno o más sustituyentes, hasta cinco sustituyentes idénticos o diferentes. Los ejemplos adecuados de sustituyentes para el carbono del anillo y átomos del anillo de nitrógeno incluyen: alquilo, aralquilo, alcoxilo, halógeno, hidroxilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, ariloxilo, amino, ciano, nitro, tiol, imina, amida, carbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, arilo o heterociclilo. Los sustituyentes pueden estar presentes en una o más posiciones, con la condición de que los mismos den como resultado una molécula estable.

**[0034]** Como se usa en el presente documento el término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo o heteroarilo, en el que los términos alquilo, arilo y heteroarilo son como se han definido anteriormente. Los grupos aralquilo ejemplares incluyen -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-fenilo o -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-piridilo, en los que p es un número entero de 1 a 3. El grupo aralquilo puede estar adicionalmente sustituido con alquilo, hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, amino, arilo, heteroarilo o similar.

**[0035]** El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

**[0036]** Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", "terapia" y similares, se refieren a aliviar, disminuir el avance, profilaxis, atenuación o cura de la enfermedad existente (por ejemplo, leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec). "Prevenir", como se usa en el presente documento, se refiere a retrasar, atenuar, inhibir, reducir o mejorar el inicio de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec.

**[0037]** Como se usa en el presente documento, la expresión "aceptable farmacéuticamente" significa que el vehículo, diluyente, excipientes y/o sal debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

**[0038]** La expresión, "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento, significa una cantidad del compuesto o composición (por ejemplo, ácido cafeico o derivado de fórmula (1)) suficiente para inducir significativamente una modificación positiva en la afección que se quiere regular o tratar, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios si los hubiera (en una proporción beneficio/riesgo razonable), dentro del alcance

del buen criterio médico. La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o composición variará con la afección particular que se esté tratando, la edad y condición física del usuario final, la gravedad de la afección que se esté tratando/previendo, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea, el compuesto o composición específica empleados, el vehículo aceptable farmacéuticamente en utilizado en particular y factores similares.

5

### Compuestos de ácido cafeico y procedimientos que los emplean

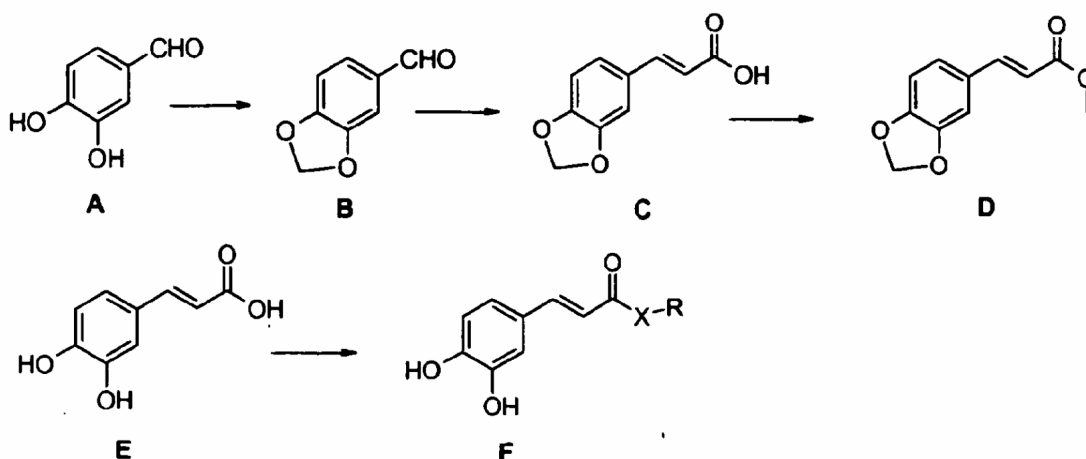
**[0039]** El ácido cafeico o derivados de fórmula general (1) se conocen en la bibliografía, pueden sintetizarse mediante el esquema I proporcionado más adelante y pueden convertirse opcionalmente en sus sales farmacéuticamente aceptables.

10

**[0040]** Puede convertirse 3,4-dihidroxibenzaldehído (**A**) en piperonal (**B**) por tratamiento con dibromometano en presencia de carbonato de cesio en N,N-dimetilformamida seca por el procedimiento descrito en Tetrahedron 2003, 59, 4383 – 4387. El piperonal (**B**), obtenido de esta forma, puede someterse a condensación de Knoevenagel con ácido malónico para producir ácido 3,4-(metilendioxi)cinámico (**C**), por el procedimiento descrito en Eur. J. Med. Chem. 2002, 37, 979 – 984. EL ácido (**C**) puede convertirse en su éster metílico (**D**) por reacción con cloruro de tionilo y metanol. La desprotección del grupo metilendioxi del éster metílico (**D**) usando tribromuro de boro puede realizarse por el procedimiento descrito en J. Org. Chem. 1974, 39, 1427 -1429. El tratamiento de la mezcla de reacción daría como resultado la hidrólisis del éster para producir ácido cafeico (**E**). El ácido cafeico (**E**) puede convertirse en un éster (**F**) (X = O y R = alquilo, arilo o heterociclilo) por tratamiento con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, en presencia de un alcohol adecuado a 0 °C, seguido de dejar que la mezcla se caliente a temperatura ambiente o calentando a reflujo, según las necesidades de la reacción. El ácido cafeico (**E**) puede convertirse en una amida (**F**) (X = NH y R = H, alquilo, arilo o heterociclilo) mediante el acoplamiento con una amina adecuada, utilizando clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y

15

20



X = O, NH o heterociclilo  
R = H, alquilo, arilo, heterociclilo o ausente

### ESQUEMA I

25

triethylamina en cloruro de metileno a temperatura ambiente por el procedimiento descrito en Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 4677 – 4681. En un procedimiento alternativo, el ácido cafeico puede convertirse en su cloruro de ácido por tratamiento con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo, que después puede convertirse en una amida (**F**) (X = NH y R = H, alquilo, arilo o heterociclilo) por tratamiento con la amina de elección.

30

**[0041]** El ácido cafeico o derivados de fórmula general (1) también pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, tales como extractos de plantas.

35

**[0042]** Los derivados de ácido cafeico de fórmula (1) de la presente invención son útiles para tratar leucemia mielocítica crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec.

40

**[0043]** La actividad antiproliferativa de los compuestos de fórmula (1) puede evaluarse frente a líneas celulares mutadas resistentes a Gleevec, tales como K-562-R y 32Dcl<sup>Bcr-AblT3151</sup>. Muchas otras líneas celulares hematopoyéticas también pueden usarse para estudiar los compuestos para actividad antiproliferativa. Las líneas celulares incluyen Ba/F3 Bcr-Abl/T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3

Bcr-Abi/F359V, Ba/F3 Bcr-Abi/E255V, Ba/F3 Bcr-Abi/F317L, Ba/F3 Bcr-Abi/H396R, Ba/F3 Bcr-Abi/M244V, Ba/F3 Bcr-Abi/Q252H, Ba/F3 Bcr-Abi/Y253F o Ba/F3 Bcr-Abi/Y253H. Un aspecto de la presente invención es el tratamiento de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec, mediante la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula general (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.

**[0044]** También se describe en la prevención, reducción o minimización del daño resultante de la leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec, mediante la administración a un mamífero afectado (por ejemplo, un ser humano hombre o mujer) de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula general (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.

**[0045]** Los compuestos representativos de fórmula (1) útiles en el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec de acuerdo con la presente invención incluyen:

Éster metílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 Éster etílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 2-Nitro-etil éster del ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-acrílico;  
 n-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 i-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 Butil éster del ácido 3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 (E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-1-piperidin-1-il-propenona;  
 3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-(4-etil-piperazin-1-il)-propenona;  
 1-(4-Bencil-piperazin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona;  
 (E)-3-{4-[3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acriloil]-piperazin-1-il}propionitrilo;  
 (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-[4-(1-metil-piperidin-4-il)piperazin-1-il]-propenona;  
 (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-(4-fenilpiperazin-1-il)-propenona;  
 (E)-1-(4-acetil-piperazin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona;  
 (E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-1-(4-fenetil-piperazin-1-il)-propenona;  
 (E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-1-morfolin-4-il-propenona;  
 3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-N-(3-dimetilamino-propil)-acrilamida;  
 (E)-3-(3,4-Dihidroxifenil)-N-isopropil-acrilamida; o  
 1-(4-Bencil-piperidin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona.

**[0046]** Los compuestos adecuados para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec de acuerdo con la presente invención incluyen:

Éster metílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 Éster etílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 n-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 i-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;  
 1-(4-Bencil-piperazin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona;  
 (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-N-isopropil-acrilamida; o  
 1-(4-Bencil-piperidin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona.

**[0047]** También se describen composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz de al menos un compuesto de fórmula general (1) o su sal fisiológicamente tolerable junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable habitual y un proceso para la producción de un compuesto farmacéutico, que incluye poner en contacto al menos un compuesto de fórmula (1), en una forma de administración adecuada usando un excipiente farmacéuticamente adecuado y fisiológicamente tolerable y, si fuera apropiado, otros compuestos, aditivos o auxiliares activos adecuados.

**[0048]** Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento del cáncer, particularmente para la leucemia mieloide crónica (LMC) que no responde a tratamiento con Gleevec. La presente invención, por consiguiente, se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (1) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que no responde a tratamiento con Gleevec.

**[0049]** La presente invención también contempla el uso de un compuesto de fórmula general (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos. Por ejemplo, una composición farmacéutica, que incluye un compuesto de fórmula general (1) o una sal farmacéuticamente aceptable, puede administrarse a un mamífero, en particular a un ser humano, con cualquier otro compuesto activo contra células o tumores resistentes a Gleevec, o cualquier otro compuesto farmacéuticamente activo que se sabe que es útil en el tratamiento de uno de los trastornos mencionados anteriormente, mezclado con cualquier otro o en forma de preparaciones farmacéuticas.

**[0050]** Los compuestos de la presente invención pueden usarse en un método para reducir *in vitro* la población de células de leucemia mieloide crónica (LMC) sensibles a Gleevec (por ejemplo K-562 o Ba/F3 Bcr-Abi/WT) y

resistentes a Gleevec (K-562-R y 32Dcl Bcr-Abl T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3 Bcr-Abl/F359V, Ba/F3 Bcr-Abl/E255V, Ba/F3 Bcr-Abl/F317L, Ba/F3 Bcr-Abl/H396R, Ba/F3 Bcr-Abl/M244V, Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H, Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F, o Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H).

- 5 **[0051]** La eficacia *in vivo* de los compuestos de la presente invención en modelos tumorales sensibles a Gleevec y resistentes a Gleevec puede evaluarse usando líneas celulares tales como transfectantes Ba/F3 que expresan Bcr-Abl de tipo silvestre de longitud completa (Ba/F3 Bcr-Abl/WT) o Bcr-Abl mutada (Ba/F3 Bcr-Abl/T3151) en modelos de xenoinjerto de ratones SCID (con Inmunodeficiencia Combinada Grave).
- 10 **[0052]** Por consiguiente la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (1) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) que no responde al tratamiento con Gleevec.
- 15 **[0053]** En un aspecto de la invención, los tratamientos descritos en el presente documento, que utilizan las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, pueden administrarse mediante las siguientes vías, modos, etc. de administración.

### **Composiciones y Métodos Farmacéuticos**

- 20 **[0054]** Los productos farmacéuticos pueden administrarse por vía oral, por ejemplo en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, gránulos o elixires. Sin embargo, la administración también puede realizarse por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios, o por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía subcutánea, en forma de soluciones o suspensiones estériles inyectables o por vía tópica, por ejemplo, en forma de soluciones o parches transdérmicos o de otros modos, por ejemplo en forma de aerosoles o pulverizadores nasales.
- 25

- [0055]** Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se preparan de una manera conocida y común para un experto en la materia. Además del compuesto (o compuestos) de fórmula general (1) y/o su sal (o sales) fisiológicamente tolerables, pueden usarse vehículos y/o aditivos inorgánicos y/u orgánicos inertes farmacéuticamente aceptables. Para la producción de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas de gelatina dura es posible usar, por ejemplo, lactosa, almidón de maíz y o derivados de los mismos, goma arábiga, magnesio o glucosa, etc. Los vehículos para las cápsulas de gelatina blanda y para los supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, aceites naturales o endurecidos, etc. Los vehículos adecuados para la producción de soluciones, por ejemplo, soluciones para inyección, o de emulsiones o jarabes son, por ejemplo, agua, solución fisiológica de cloruro de sodio o alcoholes, por ejemplo, etanol, propanol o glicerol, soluciones azucaradas, tales como soluciones con glucosa o soluciones con manitol o una mezcla de los diversos disolventes que se han mencionado.
- 30
- 35

- [0056]** Las preparaciones farmacéuticas normalmente contienen aproximadamente del 1 al 99%, por ejemplo, aproximadamente del 5 al 70%, o de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 30% en peso del compuesto de fórmula (1) o su sal fisiológicamente tolerable. En las preparaciones farmacéuticas, la cantidad del ingrediente activo de fórmula (1) o su sal fisiológicamente tolerable, normalmente es de aproximadamente 5 a 500 mg. La dosis de los compuestos de la presente invención, que debe administrarse, puede incluir un amplio intervalo. La dosis para administrar diariamente se selecciona para ser apropiada con el efecto deseado. Una dosificación adecuada es de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg/día del compuesto de fórmula (1) o su sal fisiológicamente tolerable, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a 50 mg/kg al día de un compuesto de fórmula (1) o una sal del compuesto farmacéuticamente aceptable. Si se necesitase, también pueden administrarse dosis diarias superiores o inferiores. En las composiciones farmacéuticas de la presente invención los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particular sin ser tóxico para el paciente.
- 40
- 45
- 50

- [0057]** El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular a emplear, la duración del tratamiento, de otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con los compuestos particulares empleados, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico anterior del paciente a tratar y factores similares bien conocidos en la técnica médica.
- 55

- [0058]** Además del ingrediente activo, el compuesto de fórmula general (1) o su sal y sustancias vehículo fisiológicamente aceptables, las separaciones farmacéuticas pueden contener aditivos tales como, por ejemplo, cargas, antioxidantes, dispersantes, emulsionantes, antiespumantes, aromatizantes, conservantes, solubilizantes o colorantes. También pueden contener dos o más compuestos de fórmula general (1) o sus sales fisiológicamente tolerables. Además de esto, junto con al menos un compuesto de fórmula general (1) o su sal fisiológicamente tolerable, las preparaciones farmacéuticas también pueden contener uno o más ingredientes terapéutica o profilácticamente activos.
- 60
- 65



**[0059]** Se entiende que, las modificaciones que no influyen sustancialmente en la actividad de las diversas realizaciones de la presente invención, se incluyen dentro de la invención descrita en el presente documento. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1 (referencia)

Ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico [ácido cafeico] (Compuesto 1)

**[0060]** El Compuesto del Ejemplo 1c (6,0 g, 0,029 mol) se disolvió en cloroformo (20 ml), al mismo se le añadió una solución al 25% p/v de tribromuro de boro en cloroformo (90 ml) y se agitó a 25 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición gota a gota de una solución acuosa al 10% de bicarbonato sódico, a 25 °C y con agitación, para conseguir un pH final 7. La fase orgánica se separó, se lavó con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 2,0 g (38,3%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}_d6$ ):  $\delta$  6,83 (d, 1H, J = 15,6 Hz), 6,41 (d, 1 H), 6,25 (dd, 1 H), 6,18 (d, 1 H), 6,52 (d, 1 H, J = 15,6 Hz).

### Ejemplo 1a

Benzo[1,3]dioxole-5-carbaldehído [piperonal]

**[0061]** Se disolvieron 3,4-dihidroxi benzaldehído (25 g, 0,181 mol), carbonato de cesio (88,29 g, 0,271 mol) y dibromometano (19,0 ml, 0,271 mol) en N,N-dimetilformamida (400 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 1,5 h. Se evaporó N,N-dimetilformamida a presión reducida y la mezcla de reacción se diluyó usando acetato de etilo (500 ml), se lavó con agua (2 x 250 ml) y salmuera (2 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 23,0 g (84,6%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9,8 (s, 1 H), 7,42 (d, 1 H), 7,34 (d, 1 H), 6,94 (d, 1 H), 6,09 (s, 2H).

### Ejemplo 1b

Ácido 3-benzo[1,3]dioxol-5-il-acrílico

**[0062]** Una mezcla del compuesto del Ejemplo 1a (23 g, 0,153 mol) y ácido malónico (31,77 g, 0,305 mol) se disolvió en piridina (69 ml) con agitación y se añadió piperidina (0,92 ml). La mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante 1 h, después de lo cual la temperatura se aumentó adicionalmente a 105 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con agua (50 ml) y se hizo básica (a pH 9) usando una solución acuosa al 10% de hidróxido sódico. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 250 ml). La fase acuosa se hizo ácida (a pH 2) usando ácido clorhídrico acuoso al 50% y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 20,0 g (68%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7,42 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,31 (s, 1 H), 7,10 (d, 1 H), 6,92 (d, 1 H), 6,37 (d, 1H, J = 15,9 Hz), 6,04 (s, 2H); EM (EN-): 191 (M-1).

### Ejemplo 1c

Éster metílico del ácido 3-benzo[1,3]dioxol-5-il-acrílico

**[0063]** El Compuesto del Ejemplo 1b (25 g, 0,13 mol) se disolvió en metanol (200 ml) y se enfrió a 0-5 °C. Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (14,2 ml, 0,195 mol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 16 h. Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con bicarbonato sódico al 10% para alcanzar pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 250 ml). La fase orgánica se lavó con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 20,0 g (74,6%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_d6$ ):  $\delta$  7,55 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,38 (d, 1 H), 7,17 (dd, 1 H), 6,93 (d, 1 H), 6,48 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 6,05 (s, 2H), 3,68 (s, 3H).

### Ejemplo 2

Éster metílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico (Compuesto 2)

**[0064]** El Compuesto 1 (8,0 g, 0,044 mol) se disolvió en metanol (70 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (4,84 ml, 0,066 mol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con bicarbonato sódico al 10% para conseguir pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). La fase orgánica se lavó con agua (50 ml) y salmuera (50 ml), se secó

sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco.

Rendimiento: 7,5 g (87,8%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  7,45 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,02 (s, 1 H), 6,98 (d, 1 H), 6,73 (d, 1 H), 6,24 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 3,7 (s, 3H); EM (EN-): 193 (M-1).

5

### Ejemplo 3

Éster etílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico (Compuesto 3)

10 **[0065]** El Compuesto 1 (0,2 g, 1,11 mmol) se disolvió en etanol (15 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,1 ml, 1,41 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C), se calentó a 50 °C y se mantuvo a esa temperatura durante una noche (16 h). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con bicarbonato sódico al 10% para conseguir pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 ml). Las fase orgánica se lavó con agua (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo al 5% en éter de pet.) para obtener el compuesto del título.

15

Rendimiento: 0,11 g (47,5%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  9,31 (s a, 2H), 7,44 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,00 (s, 1 H), 6,97 (d, 1 H), 6,73 (d, 1 H), 6,24 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 4,12 (c, 2H), 1,24 (t, 3H); EM (EN-): 207 (M-1).

20

### Ejemplo 4

2-Nitro-etil éster del ácido (E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico (Compuesto 4)

25 **[0066]** El Compuesto 1 (0,400 g, 2,22 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,49 ml, 6,88 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (5 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota 2-nitroetanol (1,59 ml, 22,20 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con una solución acuosa al 10% de bicarbonato sódico a pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 15 ml). Las fase orgánica se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.

30

35 Rendimiento: 0,170 g (30,35%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,55 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,03 (d, 1 H), 6,94 (dd, 1 H), 6,76 (d, 1 H), 6,24 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 4,79 (m, 2H), 4,66 (m, 2H).

### Ejemplo 5

40 n-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico (Compuesto 5)

**[0067]** El Compuesto 1 (0,25 g, 1,38 mmol) se disolvió en propan-1-ol (20 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,12 ml, 1,65 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C), se calentó a 50 °C y se mantuvo a esa temperatura durante una noche (16 h). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con bicarbonato sódico al 10% a pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo al 5% en éter de pet.) para obtener el compuesto del título.

45

50 Rendimiento: 0,2 g (65,2%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  9,5 (s a, 2H), 7,40 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,02 (s, 1 H), 6,98 (d, 1 H), 6,73 (d, 1 H), 6,21 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 4,04 (t, 2H), 1,61 (m, 2H), 0,89 (t, 3H); EM (EN-): 221 (M-1).

### Ejemplo 6

55 i-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico (Compuesto 6)

**[0068]** El Compuesto del Ejemplo 1 (0,3 g, 1,66 mmol) se disolvió en propan-2-ol (20 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,18 ml, 2,5 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y después se calentó a 70 °C y se mantuvo a esa temperatura durante una noche (16 h). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con bicarbonato sódico al 10% a pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, propan-2-ol al 3% en cloroformo) para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 0,2 g (54,2%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  9,33 (s a, 2H), 7,42 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,00 (s, 1 H), 6,97 (d, 1 H), 6,73 (d, 1 H), 6,20 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 4,96 (m, 1 H), 1,21 (d, 6H); EM (EN-): 221 (M-1).

65

**Ejemplo 7**

Éster butílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico (Compuesto 7)

- 5 **[0069]** El Compuesto 1 (0,1 g, 5,5 mmol) se disolvió en n-butanol (10 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,04 ml, 8,3 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con una solución acuosa al 10% de bicarbonato sódico para conseguir pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). La fase orgánica se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo al 5% en éter de pet.) para obtener el compuesto del título.
- 10 Rendimiento: 50,0 mg (38,4%). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,56 (d, 1H, J = 15,9 Hz), 7,08 (s, 1 H), 7,01 (d, 1 H), 6,87 (d, 1 H), 6,25 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 5,86 (s a, 1 H), 5,80 (s a, 1 H), 4,19 (t, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,44 (m, 2H), 0,95 (t, 3H); EM (EN-) 235 (M-1).
- 15

**Ejemplo 8**

(E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-1-piperidin-1-il-propenona (Compuesto 8)

- 20 **[0070]** El Compuesto 1 (0,500 g, 2,77 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (1 ml, 13,85 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota piperidina (1,1 ml, 11,08 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con una solución acuosa al 10% de bicarbonato sódico a pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). La fase orgánica se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 2% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.
- 25 Rendimiento: 0,350 g (51,02%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7,27 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 7,04 (d, 1 H), 6,95 (dd, 1H, J = 15,3 Hz), 6,89 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,71 (d, 1H, J = 15,3 Hz), 3,53 (m, 4H), 1,57 (m, 6H); EM (EN-): 246,11.
- 30

**Ejemplo 9**

3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-(4-etil-piperazin-1-il)-propenona (Compuesto 9)

- 35 El Compuesto 1 (0,3 g, 1,66 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (5 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,36 ml, 5,1 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (5 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota 1-etil-piperazina (1,1 ml, 8,62 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con una solución acuosa al 10% de bicarbonato sódico a pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). La fase orgánica se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, metanol al 5% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.
- 40 Rendimiento: 180 mg (39,2%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9,43 (s, 1 H), 8,97 (s, 1 H), 7,45 (d, 1 H, J = 15,9 Hz), 7,05 (d, 1 H), 6,96 (dd, 1 H), 6,89 (d, 1H, J = 15,9 Hz), 6,71 (d, 1 H), 3,56 (m, 4H), 2,32 (m, 6H), 0,99 (t, 3H); EM (EN+): 277 (M+1).
- 45

Preparación de sal clorhidrato:

Cloruro de 4-[3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acriloil]-1-etil-piperazin-1-ilo

- 55 **[0072]** El Compuesto 9 (2,0 g, 7,29 mmol) se disolvió en 10 ml de metanol. La solución se enfrió a 0-5 °C, se añadió una solución etérea al 5% de ácido clorhídrico (25 ml) y se agitó durante 10 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el sólido resultante se secó por completo para obtener el producto deseado. Rendimiento: 2,1 g (93,3%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,88 (s, 1 H), 7,35 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 7,10 (d, 1 H, J = 1,5 Hz), 6,99 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 6,97 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,74 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 4,48 (m, 2H), 3,46 (m, 2H), 3,11 (m, 4H), 2,91 (m, 2H), 1,23 (t, 3H).
- 60

**Ejemplo 10**

- 65 1-(4-Bencil-piperazin-1-il)3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona (Compuesto 10)

**[0073]** El Compuesto 1 (0,3 g, 1,66 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (5 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,6 ml, 8,5 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (5 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota 1-bencil-piperazina (0,9 ml, 5,2 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con una solución acuosa al 10% de bicarbonato sódico a pH 7 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). La fase orgánica se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, metanol al 5% en cloroformo) para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 160 mg (28,4%). RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 7,44 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 7,32 (m, 5H), 7,03 (d, 1H), 6,96 (dd, 1 H), 6,85 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,75 (d, 1H), 3,71 (s a, 4H), 3,56 (s, 2H), 2,49 (s a, 4H); EM (EN+): 339 (M+1).

Preparación de del clorhidrato:

Cloruro de 4-[3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acriloil]-1-bencil-piperazin-1-io

**[0074]** El Compuesto 10 (0,5 g, 1,49 mmol) se disolvió en 15 ml de metanol. La solución se enfrió a 0 - 5 °C, se añadió una solución etérea al 5% de ácido clorhídrico (25 ml) y se agitó durante 10 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el sólido resultante se secó por completo para obtener el producto deseado.

Rendimiento: 0,52 g (94,54%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9,56 (s, 1 H), 7,56 (m, 2H), 7,32 (d, 1 H J = 15,3 Hz), 9,06 (d, 1 H), 6,95 (m, 1 H), 6,89 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,72 (d, 1 H), 4,43 (m, 2H), 4,27 (m, 2H), 3,26 (m, 3H), 2,89 (m, 3H).

### Ejemplo 11

(E)-3-[4-[3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acriloil]-piperazin-1-il]propionitrilo (Compuesto 11)

**[0075]** El Compuesto 1 (0,400 g, 2,22 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (0,57 ml, 6,66 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (15 ml) y se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Éste se añadió gota a gota a una solución de 3-piperazin-1-il-propionitrilo (0,37 g, 2,66 mmol) y trietilamina (0,67 ml, 48,8 mmol) en tetrahidrofurano mantenida a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.

Rendimiento: 0,130 g (19,43%). RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 7,45 (d, 1 H, J = 15 Hz), 7,04 (d, 1 H), 6,97 (dd, 1 H), 6,86 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,76 (d, 1 H), 3,75 (m, 4H), 2,71 (m, 4H), 2,66 (m, 4H); EM (EN+): 302,14.

### Ejemplo 12

(E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-1-[4-(1-metil-piperidin-4-il)piperazin-1-il]-propenona (Compuesto 12)

**[0076]** El Compuesto 1 (0,500 g, 2,77 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (0,52 ml, 6,09 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Éste se añadió gota a gota a una solución de 1-(1-metilpiperidin-4-il)piperazina (0,45 g, 2,49 mmol) y trietilamina (0,84 ml, 6,09 mmol) en tetrahidrofurano, mantenida a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.

Rendimiento: 0,170 g, (17,74%). RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 7,47 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 7,06 (d, 1 H), 6,98 (dd, 1 H), 6,87 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,79 (d, 1 H), 3,76 (s a, 4H), 3,18 (m, 2H), 2,63 (s a, 4H), 2,51 (s, 3H), 2,45 (m, 3H), 1,96 (m, 2H), 1,69 (m, 2H); EM (EN+): 346,21.

### Ejemplo 13

(E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-1-(4-fenilpiperazin-1-il)-propenona (Compuesto 13)

El Compuesto 1 (0,500 g, 2,77 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (0,71 ml, 8,31 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Éste se añadió gota a gota a una solución de N-fenil-piperazina (0,54 ml, 3,60

mmol) y trietilamina (0,84 ml, 6,09 mmol) en tetrahidrofurano, mantenida a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 0,100 mg (11,11%). RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 7,47 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 7,23 (t, 2H), 7,05 (d, 1 H), 6,98(d, 2H), 6,91 (1H, J = 15,3 Hz), 6,84 (m, 1 H), 6,77 (d, 1 H), 3,85 (s a, 4H), 3,19 (s a, 4H); EM (EN-): 323,12.

#### Ejemplo 14

10 **[0078]** (E)-1-(4-acetil-piperazin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona (Compuesto 14)  
El Compuesto 1 (0,500 g, 2,77 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (0,52 ml, 6,09 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 3 h. La mezcla de  
15 reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Éste se añadió gota a gota a una solución de N-acetil-piperazina (0,35 g, 2,77 mmol) y trietilamina (0,84 ml, 6,09 mmol) en tetrahidrofurano, mantenida a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.  
20 Rendimiento: 0,3 g (37,26%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,93 (s a, 1 H), 7,34 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,99 (dd, 1 H), 7,09 (d, 1H, J = 15 Hz), 6,75 (d, 1 H), 3,85 (m, 8H), 2,03 (s, 3H); EM (EN+): 291,15 (M+1).

#### Ejemplo 15

25 (E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-(4-fenetil-piperazin-1-il)-propenona (Compuesto 15)  
**[0079]** El Compuesto 1 (0,500 g, 2,77 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (0,35 ml, 4,15 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 3 h. La mezcla de  
30 reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Éste se añadió gota a gota a una solución de 1-feniletil-piperazina (0,52 g, 2,77 mmol) y trietilamina (0,84 ml, 6,09 mmol) en tetrahidrofurano, mantenida a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al  
35 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.  
Rendimiento: 0,150 g (15,33%). EM (EN+): 353,24.

#### Ejemplo 16

40 (E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-1-morfolin-4-il-propenona (Compuesto 16)  
**[0080]** El Compuesto del Ejemplo 1 (0,4 g, 2,22 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,51 ml, 7,10 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 2 h. La  
45 mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota morfolina (0,77 ml, 8,88 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.  
50 Rendimiento: 0,200 g (28,94%). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7,31 (d, 1 H, J = 15 Hz), 7,06 (s a, 1 H), 6,96 (d, 1 H), 6,89 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,71 (d, 1 H), 3,60 (m, 8H).

#### Ejemplo 17

55 3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-N-(3-dimetilamino-propil)-acrilamida (Compuesto 17)  
**[0081]** Una mezcla del compuesto 1 (0,2 g, 1,11 mmol), N,N-dimetil-propano-1,3-diamina (0,13 ml, 1,11 mmol) y HOBt (0,2 g, 1,32 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (5 ml). Se añadió trietilamina (0,4 ml, 3,3 mmol) a esta solución a 0 °C. Después de 10 min, se añadió EDC (0,25 g, 1,3 mmol) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a  
60 temperatura ambiente (25 °C) durante 24 h. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con acetato de etilo (25 ml). La fase orgánica se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El producto en bruto obtenido se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, metanol al 0,3% en cloroformo) para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 190 mg (64,7%). EM (EN-): 263 (M-1).

**Ejemplo 18**

(E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-N-isopropil-acrilamida (Compuesto 18)

- 5 **[0082]** El Compuesto 1 (0,500 g, 2,77 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (30 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (0,71 ml, 8,31 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C, durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Éste se añadió gota a gota a una solución de isopropilamina (0,30 ml, 3,60 mmol) y trietilamina (0,84 ml, 6,09 mmol) en tetrahidrofurano, mantenida a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). Al final de la reacción, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título.
- 10 Rendimiento: 0,150 g (24,42%). RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 7,36 (d, 1 H, J =15,6 Hz), 6,98 (d, 1 H), 6,88(dd, 1 H), 6,74 (d, 1 H), 6,32 (d, 1 H, J = 15,6 Hz), 4,06 (m, 1 H), 1,17 (d, 6H).
- 15

**Ejemplo 19**

1-(4-Bencilpiperidin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona

- 20 **[0083]** El Compuesto 1 (5 g, 27,7 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (60 ml) y se enfrió a 0 °C. A éste, se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (5,26 ml, 61,0 mmol), manteniendo la temperatura a 0 °C durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (20 ml) y se enfrió a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Éste se añadió gota a gota a una solución de 4-bencilpiperidina (5,35 g, 30,5 mmol) y trietilamina (5,52 ml, 41,6 mmol) en tetrahidrofurano mantenida a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (25 °C) y se agitó durante una noche (16 h). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, metanol al 1% en cloroformo) para obtener el compuesto del título. Rendimiento: 2,2 g (23,50%). RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ 7,41 (d, 1H, J = 15,3 Hz), 7,25 (m, 2H), 7,15 (m, 3H), 7,02 (d, 1 H), 6,95 (dd, 1 H), 6,85 (d, 1 H, J = 15,3 Hz), 6,76 (d, 1 H), 4,57 (m, 1 H), 4,20 (m, 1 H), 3,08 (m, 1 H), 2,67 (m, 1 H), 2,56 (d, 2H), 1,85 (m, 1 H), 1,73 (m, 2H), 1,18(m, 2H); EM (EN-): 336,1 (M-1).
- 25
- 30

- [0084]** La eficacia de los compuestos de la presente invención en la inhibición de la línea celular sensible a Gleevec K-562, Ba/F3 Bcr-Abl/WT y en las líneas celulares resistentes a Gleevec K-562-R y 32Dcl Bcr-Abl T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3 Bcr-Abl/F359V, Ba/F3 Bcr-Abl/E255V, Ba/F3 Bcr-Abl/F317L, Ba/F3 Bcr-Abl/H396R, Ba/F3 Bcr-Abl/M244V, Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H, Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F y Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H puede determinarse POR diversos ensayos farmacológicos descritos a continuación. Los ensayos farmacológicos ilustrados, que se indican a continuación, se han realizado con mesilato de imatinib y compuestos de la presente invención o sus sales (denominados en el presente documento compuestos de ensayo).
- 35
- 40

**[0085]** En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas:

- 45 ATCC : Colección Americana de Cultivos Tipo
- OHSU : Universidad de Ciencias y Salud de Oregón, Oregón, Estados Unidos
- NPRC : Centro de Investigación Nicholas Piramal, Mumbai, India
- 50 FBS : Suero Bovino Fetal
- IMDM : Medio de Dulbecco Modificado de Iscove
- RPMI: Instituto Memorial Park Roswell
- 55 SDS-PAGE : Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
- PBS : Solución salina tamponada con fosfato
- 60 EDTA : ácido etilen diamino tetra acético
- NP-40 : Nonidet P-40
- HEPES : (ácido N-[2-Hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico])
- 65 DTT: Ditiotreitól

EGTA : Ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N'- tetraacético

IL3 : Interleucina 3

## 5 Ejemplo 20

### Ensayo de proliferación celular

10 [0086] Ensayo de captación de  $^3\text{H}$ -Timidina: La incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina es directamente proporcional al número de células en división en el cultivo.

#### Protocolo:

15 [0087] Se adquirieron líneas celulares de diferentes fuentes (Tabla 1) y se mantuvieron en condiciones óptimas de cultivo como sugiere el proveedor. Los cultivos de crecimiento exponencial se sometieron a diferentes concentraciones de compuestos de ensayo y convencionales como se proporciona a continuación.

**Tabla 1: Descripción de diversas líneas celulares hematopoyéticas**

Fuente N°	Línea celular	Descripción de la línea celular	Fuente	Estado de Ph	Medio de propagación (FBS%)
1	K-562	Línea celular de leucemia Bcr-Abl humana	ATCC	+vo	IMDM (10%)
2	K-562-R	Línea celular de leucemia Bcr-Abl humana resistente a Gleevec	NPRC	+vo	RPMI-1640 (10%)
3	32DCI3 Bcr-Abl	Fibroblastos de ratón con Bcr-Abl mutada a T3151	-	+vo	IMDM (10%)

#### 20 Método:

25 [0088] Las células se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  por pocillo (en 0,180 ml) en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos transparente (NUNC, Estados Unidos) y se dejaron incubar a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con dióxido de carbono al 5% durante 2-6 h. Los compuestos de ensayo se diluyeron en medio (RPMI1640 con FBS al 10%) a diversas concentraciones y se añadieron 0,02 ml de reserva 10x a cada pocillo por triplicado. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con dióxido de carbono al 5% durante 72 h con observación microscópica intermitente cada 24 h.

30 [0089] Después de 72 h de incubación, las placas centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos en una centrifugadora de placa. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente y se añadió  $^3\text{H}$ -Timidina a los pocillos a una concentración de  $0,5 \mu\text{Ci/pocillo}$  en medio completo 0,1 ml. Después las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con dióxido de carbono durante 6-14 h.

35 [0090] Al final del periodo de incubación, las células de las placas de 96 pocillos se recogieron usando un colector celular (Packard, Estados Unidos) sobre una placa de filtro de vidrio de 96 pocillos (Cat N° 6005177, Unifilter-96, GF/B, Packard, Estados Unidos). La placa de filtro se secó completamente a  $60^\circ\text{C}$  durante 1 h o durante una noche (16 h) a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Después de secarse, la parte superior de la placa se bloqueó con sellador y se añadieron 0,05 ml/pocillo de líquido de centelleo (Microscint-O, Packard). La placa se selló desde la parte superior, se leyó y sobre un contador de centelleo (TopCount, Packard) y se calculó el porcentaje de inhibición y la  $\text{CI}_{50}$  en comparación con los valores de control.

**Tabla 2: Actividad antiproliferativa del compuesto 2 con distintas líneas celulares**

N°	Compuesto	$\text{CI}_{50} \mu\text{M}$		
		K-562	K-562-R	32Dcl Bcr-Abl T3151
1	Mesilato de imatinib	$0,21 \pm 0,05$	1,0	$>3,0$
2	Compuesto 2	$13,6 \pm 2,3$	23,0	35,0

45 [0091] Conclusión: El compuesto 2 de la presente invención inhibió la proliferación de las células K-562, K-562-R y 32Dcl Bcr-Abl T3151, resistentes a Gleevec.

**Ejemplo 21**

**[0092]** Determinación de especificidad de los compuestos de ensayo para líneas celulares resistentes a mesilato de imatinib usando actividad antiproliferativa *in vitro*.

**[0093]** Se adquirieron diversas líneas celulares resistentes a mesilato de imatinib procedentes del laboratorio del Doctor Brian Druker del Instituto Médico Howard Hughes, Instituto del Cáncer de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregón (OHSU), Portland, Oregon, Estados Unidos, cuyos detalles se proporcionan en la Tabla 3. Estas líneas celulares se mantuvieron en condiciones óptimas de crecimiento como sugiere el proveedor.

**Tabla 3: Descripción de diversas líneas celulares sensibles a mesilato de imatinib y resistentes a mesilato de imatinib**

Fuente N°	Línea celular	Fuente	Estado de Ph	Medio de propagación (FBS%)
1	Ba/F3 Bcr-Abl/ WT	OHSU	+ vo de tipo silvestre	RPML-1640 (10%)
2	Ba/F3Bcr-Abl/T315I	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
3	Ba/F3 Bcr-Abl/E255K	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
4	Ba/F3 Bcr-Abl/H396P	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
5	Ba/F3Bcr-Abl/M351T	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
6	Ba/F3 Bcr-Abl/F359V	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
7	Ba/F3 Bcr-Abl/E255V	OHSU	+ vo de tipo silvestre	RPML-1640 (10%)
8	Ba/F3Bcr-Abl/F317L	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
9	Ba/F3 Bcr-Abl/H396R	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
10	Ba/F3 Bcr-Abl/M244V	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
11	Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
12	Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
13	Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H	OHSU	+ vo mutado	RPML-1640 (10%)
14	Ba/F3*	OHSU	- vo de tipo silvestre	IMDM (10%)+IL3**

\* células Ba/F3 que solo contienen vector (Ba/F3-pSR  $\alpha$ )  
 \*\* IL3 como factor de crecimiento

**[0094]** Las líneas celulares descritas en la Tabla 3 se usaron para ensayar la actividad antiproliferativa de los compuestos de ensayo. La actividad de los compuestos de ensayo, como agente antiproliferativo, se comparó con mesilato de imatinib en líneas celulares resistentes a mesilato de imatinib usando el ensayo CCK-8.

**Ensayo de proliferación celular y citotoxicidad con CCK-8:**

**[0095]** El Kit-8 de Recuento Celular (CCK-8) permite un ensayo muy conveniente utilizando sal de tetrazolio altamente soluble en agua de Dojindo, que no es radioactiva y que permite realizar un ensayo colorimétrico sensible para la determinación de diversas células viables en ensayos de proliferación celular y citotoxicidad. La cantidad de tinción de formazán generada por las deshidrogenasas en las células es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Por tanto, el ensayo con CCK-8 también puede sustituirse por el ensayo de incorporación de H<sup>3</sup>-Timidina.

**Preparación del compuesto**

**[0096]** El mesilato de imatinib se obtuvo procedente de Natco Pharma, India. Para los compuestos de ensayo y mesilato de imatinib convencional, se preparó una reserva de 10 mM en DMSO.

**Método**

**[0097]** Las células se sembraron a una densidad de  $\sim 5 \times 10^3$  por pocillo (0,09 ml) en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos transparente (NUNC, Estados Unidos) y se dejó incubar a 37 °C, en una incubadora con CO<sub>2</sub> al



5% durante 2-6 h. A cada pocillo se añadieron, por triplicado, diferentes concentraciones de compuestos de ensayo y mesilato de imatinib convencional. Después, las placas se incubaron a 37 °C, en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% durante 72 horas. A cada pocillo se añadieron 10 µl de solución CCK-8 y la placa se incubó durante 1-4 h en la incubadora. La absorbencia se midió a 450 nm usando un lector de microplaca.

5 **[0098] A.** El porcentaje de inhibición y la CI<sub>50</sub> se calcularon en comparación con los valores de control. Los resultados se proporcionan en las siguientes Tablas 4 y 5.

10 **[0099] B.** Como se muestra en la Figura 1, la actividad antiproliferativa de los compuestos de ensayo, expresada como valores CI<sub>50</sub> en µM, en la línea celular (Ba/F3 Bcr-Abl/WT) sensible a mesilato de imatinib y en la línea celular (Ba/F3 Bcr-Abl/T3151) resistente a mesilato de imatinib, como se observa en el entorno clínico, se representa mediante un gráfico. Como se muestra en la Figura 2, la actividad antiproliferativa de los compuestos, expresada como valores medios de CI<sub>50</sub> en µM para cinco líneas celulares, en mutaciones de baja frecuencia resistentes a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/E255V, Ba/F3 Bcr-Abl/M244V y  
15 Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H), como se observa en el entorno clínico, se representa mediante un gráfico.

20 **[0100]** Como se muestra en la Figura 3, la actividad antiproliferativa de los compuestos, expresada como valores medios de CI<sub>50</sub> en µM para siete líneas celulares en mutaciones de alta frecuencia resistentes a mesilato de imatinib (Ba/F3 Bcr-Abl/T315I, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3 Bcr-Abl/F359V, Ba/F3 Bcr-Abl/F317L, Ba/F3 Bcr-Abl/H396R, Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F y Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H), como se observa en el entorno clínico, se representa mediante un gráfico..

**Tabla 4: Concentraciones inhibitoras (CI<sub>50</sub>) para los compuestos de la presente invención en líneas celulares sensibles y resistentes a mesilato de imatinib.**

Fuente N°	Compuestos	Líneas celulares (CI <sub>50</sub> ) µM		
		Sensible a mesilato de imatinib		Resistente a mesilato de imatinib
		K562	Ba/F3 Bcr-Abl/WT	Ba/F3 Bcr-Abl/T315I
1	Compuesto 1 (referencia)	>100	>100	>100
2	Compuesto 2	13,3 ± 2,1	7,9 ± 2,1	3,8 ± 1,9
3	Compuesto 3	11,8 ± 8,8	3,3 ± 0,9	2,3 ± 0,9
4	Compuesto 5	13,5 ± 2,1	2,4 ± 0,8	0,7 ± 0,1
5	Compuesto 6	16,5 ± 2,1	2,3 ± 1,1	1,7 ± 1,1
6	Compuesto 9	59,5	40,6 ± 16,4	43,1 ± 27,9
7	Compuesto 10	18,0	2,8 ± 0,4	2,5 ± 1,5
8	Compuesto 12	>30	>30	>30
9	Compuesto 13	33,5	27,0 ± 8,5	26,6 ± 6,5
10	Compuesto 18	32,1	19,4 ± 8,8	9,5 ± 4,1
11	Compuesto 19	5,7	4,2 ± 1,3	2,7 ± 0,5
12	Mesilato de Imatinib	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	20,8 ± 6,1

**Tabla 5: Actividad inhibidora citotóxica de los compuestos de la presente invención en líneas celulares resistentes a mesilato de imatinib**

Fuente N°	Líneas celulares	Actividad Inhibidora Citotóxica (CI <sub>50</sub> ) µM							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	Ba/F3 Bcr-Abl/E255 K	>100	15,0	6,7	2,9	5,1	2,4	1,5	8,7
2	Ba/F3 Bcr-Abl/E255 V	>100	18,9	10,2	3,4	9,9	2,1	0,8	8,4
3	Ba/F3 Bcr-Abl/F317L	>100	23,5	12,3	1,6	11,3	1,2	1,1	2,0
4	Ba/F3 Bcr-Abl/F359 V	>100	18,4	13,4	2,5	14,6	2,6	2,4	2,1
5	Ba/F3 Bcr-Abl/H396 P	>100	26,2	16,6	5,6	10,8	3,7	2,8	4,3
6	Ba/F3 Bcr-Abl/H396 R	>100	18,8	8,6	1,1	7,0	1,0	1,4	2,1
7	Ba/F3 Bcr-Abl/M244 V	>100	30,1	15,2	3,0	9,8	1,3	1,0	1,8
8	Ba/F3 Bcr-Abl/M351 T	>100	16,1	8,7	2,2	5,1	2,2	2,1	2,1
9	Ba/F3 Bcr-Abl/Q252 H	>100	15,4	8,4	1,7	5,9	1,5	1,1	2,0
10	Ba/F3 Bcr-Abl/Y253 F	>100	17,0	6,4	1,7	5,2	1,1	1,0	3,9
11	Ba/F3 Bcr-Abl/Y253 H	>100	14,5	13,2	3,3	13,3	2,5	1,0	9,2
12	Ba/F3 Bcr-Abl/T315I	>100	6,3	1,1	0,6	2,0	3,1	2,1	27,0

I- compuesto 1, II- compuesto 2, III- compuesto 3, IV- compuesto 5, V- compuesto 6, VI- compuesto 10, VII- compuesto 19, VIII- mesilato de Imatinib

5 **[0101] Conclusión:** A partir de los resultados es evidente que los compuestos de la presente invención presentan actividad inhibidora significativa contra células mutadas a Bcr-Abl resistentes a mesilato de imatinib.

#### Ejemplo 22

#### Ensayo Bcr-Abl quinasa

10

#### Objetivo:

15 **[0102]** Para estudiar la inhibición de la autofosforilación de Bcr-abl, se realizó un estudio por inmunoprecipitación de la p210<sup>bcr-abl</sup> tirosina quinasa de lisado de células K-562, seguido de ensayo de enzima quinasa. La mezcla de reacción se sometió a SDS-PAGE seguido de autorradiografía.

**Introducción:**

5 [0103] La inmunoprecipitación es una técnica que permite la purificación de proteínas específicas usando anticuerpos específicos, a partir del lisado celular bruto. Este anticuerpo primario está ya unido a agarosa o puede estar unido a perlas de Sefarosa- proteína A durante el procedimiento para separar físicamente el complejo anticuerpo-antígeno del resto de la muestra.

**Método:**

10 [0104] Para comprobar la inhibición de autofosforilación de la p210<sup>bcr-abl</sup> tirosina quinasa por los compuestos de la presente invención, se usaron células K-562 que expresaban la Bcr-abl de tipo silvestre. Se trataron 2 x 10<sup>6</sup> células K-562 con los compuestos concentraciones Cl<sub>50</sub> y 3 x Cl<sub>50</sub> (basándose en datos de actividad antiproliferativa con K-562, como se describe en el Ejemplo 20) y se incubó durante 24 horas en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se lavaron con solución PBS y se sometieron a lisis usando tampón de lisis (reactivo de Lisis CelLytic M Cell, Sigma Aldrich, Estados Unidos) durante 2-3 h en condiciones frías. La proteína se calculó mediante el procedimiento de Bradford (reactivo Bradford, Sigma Aldrich, Estados Unidos). Para la inmunoprecipitación se tomó la misma cantidad de proteína de todas las muestras. Una proteína p210<sup>bcr-abl</sup> se inmunoprecipitó usando anticuerpo policlonal anti-c-abl (Santa Cruz Biotechnologies, Estados Unidos) seguido por incubación a 4 °C durante una noche con Proteína A- Sefarosa. El complejo inmune se aisló y se lavó tres veces en tampón NET-N (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y N P40 al 0,5%) seguido de resuspensión en solución de tampón quinasa (HEPES 50 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EGTA 2,5, β-glicerolfosfato 10 mM, NaF 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM).

25 [0105] La reacción quinasa se realizó usando (γ<sup>32</sup>P)-adenosin trifosfato 0,5 μCi por reacción y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). La reacción quinasa se detuvo por adición de tampón de muestra SDS y después calentando a 95 °C durante 5 minutos. Los productos de la reacción de autofosforilación se resolvieron sobre SDS-PAGE y se detectaron por autorradiografía.

30 [0106] **Resultados:** La inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE y autorradiografía indicó reducción en la autofosforilación de Bcr-abl como se observa por disminución de la densidad de banda. Se descubrió que el compuesto 2 era un fuerte inhibidor de Bcr-abl tirosina quinasa.

**Ejemplo 23.**

35 [0107] Efecto de los compuestos de la presente invención en líneas celulares mutadas a Bcr-Abl resistentes a mesilato de imatinib en el ciclo celular y apoptosis usando citometría de flujo.

40 [0108] Se sembraron células para citometría de flujo a una densidad de 10 X 10<sup>4</sup> células/ml y se incubaron con los compuestos de ensayo/mesilato de imatinib (5 μM) durante 24 h a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Al final de la incubación, las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos, seguido de 2 lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS). El sedimento celular del último lavado se resuspendió gradualmente en etanol enfriado con hielo al 70% lo que facilita la permeabilización de los tintes. La suspensión celular se conservó durante un periodo mínimo de 4 h antes de la tinción con yoduro de propidio (PI). Las células fijadas se tiñeron con PI (80 μg/ml) en presencia de RNasa A (50 μg/ml) y se leyeron en un calibrador FACS BD para el análisis de ciclo celular. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 4.

45 [0109] **Conclusión:** La inducción de la apoptosis inducida por los compuestos de la presente invención en líneas celulares resistentes a mesilato de imatinib es significativa.

**Ejemplo 24**

50 [0110] El ensayo de la eficacia *in vivo* de los compuestos de la presente invención en modelos tumorales resistentes a mesilato de imatinib y sensibles a mesilato de imatinib se estudió usando líneas celulares, tales como, transfectantes Ba/F3 que expresaban Bcr-Abl de tipo silvestre de longitud completa (Ba/F3 Bcr-Abl/WT) o Bcr-Abl mutada (Ba/F3 Bcr-Abl/T315I).

**Objetivo**

60 [0111] Ensayar la eficacia *in vivo* de derivados del ácido cafeico en modelos tumorales resistentes a mesilato de imatinib y sensibles a mesilato de imatinib.

**Líneas celulares**

65 [0112] En este estudio se usaron líneas celulares transfectantes Ba/F3 que expresaban (Ba/F3 Bcr-Abl/WT) sensibles a mesilato de imatinib de tipo silvestre de longitud completa o (Ba/F3 Bcr-Abl/T315I) resistentes a mesilato de imatinib mutadas. El laboratorio del Doctor Brian Druker, Instituto Médico Howard Hughes, Instituto del Cáncer de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregón (OHSU), Portland, Oregón, Estados Unidos (Cancer Research, 2002,

62, 7149-7153) autorizó estas líneas celulares recombinantes.

**Conservación del compuesto**

5 **[0113]** Todos los compuestos, incluyendo los convencionales, se conservaron a 4-8 °C es en un frasco de color ámbar. Los compuestos en las soluciones también se mantuvieron a 4-8 °C en un refrigerador. La muestra para inyección animal se preparó reciente cada día, el volumen residual se agrupó y se desechó según el procedimiento operativo convencional (SOP) para la eliminación de productos químicos.

10 **Preparación de la dosis**

**[0114]** El compuesto necesario se pesó y se mezcló con carboximetilcelulosa (MCM) al 0,5% (p/v) y se trituroó con Tween-20 (de acuerdo con la técnica) con adición gradual de agua para constituir la concentración final.

15 **Estudio de eficacia en ratones SCID**

**[0115]** Se usó un grupo de 110 ratones macho con Inmunodeficiencia Combinada Grave (cepa SCID-CBySmn.CB17-Prldc<sup>scid</sup>/J, *The Jackson Laboratory, Reserva N° 001803*), de 6-9 semanas de vida, con un peso ~20 g.

20 **[0116]** En una incubadora con CO<sub>2</sub> al 0,5% a 37 °C, se cultivaron células Ba/F3 Bcr-Abl/WT y Ba/F3 Bcr-Abl/T3151 en medio RPMI1640 que contenía suero fetal de ternero al 10%. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en solución salina para conseguir un recuento de 80-100 X 10<sup>6</sup> células por ml, 0,2 ml de esta suspensión celular se inyectó por vía subcutánea (s.c.) a ratones SCID. Se observó a los ratones durante días alternos por palpación de masa tumoral. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó un tamaño de 5-7 mm de diámetro, los animales se asignaron al azar en grupos de tratamiento respectivos. Cada día se administró la dosis del compuesto de ensayo o de control. El tamaño del tumor se registró a intervalos de 2-5 días. El peso del tumor (mg) se calculó de acuerdo con la fórmula para un elipsoide alargado: {Longitud (mm) x [anchura (mm)<sup>2</sup>] x 0,5} suponiendo que la gravedad específica era de uno y π de tres. El crecimiento tumoral en los animales tratados con compuesto se calculó como T/C (Tratado/Control) x 100% y el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (GI%) fue [100-T/C%]. Los grupos de tratamiento respectivos se presentan en la Tabla 6.

**[0117]** Los resultados se presentan gráficamente en la Figura 5A y Figura 5B.

35 **Tabla 6: Grupos de tratamiento en los modelos de xenoinjerto (grupo I y grupo II)**  
**Denominación (grupo I): Ba/F3 Bcr-Abl/T3151**

Grupos	Muestra	Dosis	Vía	Número de tratamientos	n=
I	Control (no tratado)	Vehículo	p.o.	q1d X 12	8
II	Compuesto. 2	200 mg/kg	p.o.	q1d X 12	8
III	Compuesto 3	200 mg/kg	p.o.	q1d X 12	8
IV	Compuesto 5	200 mg/kg	p.o.	q1d X 12	8
V	Compuesto 6	200 mg/kg	p.o.	q1d X 12	8
VI	Compuesto 10	200 mg/kg	p.o.	q1d X 12	7
VII	Mesilato de Imatinib	200 mg/kg	p.o.	q1d X 12	7

p.o. = por vía oral; n = número de animales  
q1dx12 = administración única durante 12 días

**Denominación (grupo II): Ba/F3 Bcr-Abl/WT**

Grupos	Muestra	Dosis	Vía	Número de tratamientos	n=
I	Control (no tratado)	Vehículo	p.o.	q1dx14	8
II	Compuesto 2	200 mg/kg	p.o.	q1dx14	8
III	Compuesto 3	200 mg/kg	p.o.	q1dx14	8
IV	Compuesto 5	200 mg/kg	p.o.	q1dx14	8
V	Compuesto 6	200 mg/kg	p.o.	q1dx14	8
VI	Compuesto 10	200 mg/kg	p.o.	q1dx14	8
VII	Mesilato de Imatinib	200 mg/kg	p.o.	q1dx14	7
p.o. = por vía oral; n = número de animales q1dx14 = administración única durante 14 días					

5 **[0118]** Conclusión: Los datos presentados en la Figura 5A y Figura 5B demuestran que los compuestos de la presente invención presentan eficacia *in vivo* significativamente mayor que la del mesilato de imatinib inhibiendo la forma mutada más predominante de Bcr-Abl es decir Ba/F3 Bcr-Abl/T3151 cuando se ensaya a la misma dosis que la Bcr-Abl de tipo silvestre que expresa xenoinjerto es decir Ba/F3 Bcr-Abl/WT.

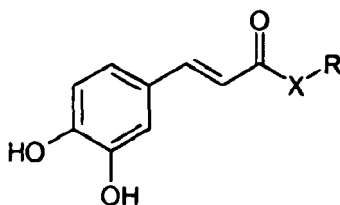
10 **[0119]** Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene un “compuesto” incluye una mezcla de dos o más compuestos. También debe observarse que el término “o” se emplea generalmente en su sentido de incluir “y/o” salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

15 **[0120]** En esta memoria descriptiva, todas las publicaciones y solicitudes de patente son indicativas del nivel de experiencia habitual en la materia a la cual pertenece la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un derivado de ácido cafeico representado por la fórmula general (1)

(1)



5

en la que

X es O, NH o heterociclilo;

10 R es un alquilo de cadena lineal o ramificado que está opcionalmente sustituido, arilo que está opcionalmente sustituido, heterociclilo que está opcionalmente sustituido o está ausente;

en todas sus formas tautoméricas y estereoisoméricas, y mezclas de las mismas en todas las proporciones o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para uso en el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) que es resistente al tratamiento con Gleevec (mesilato de Imatinib).

15 2. El derivado de ácido cafeico para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que se selecciona entre:

Éster metílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

Éster etílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

20 2-Nitro-etil éster del ácido (E)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

n-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

i-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

Butil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

(E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-piperidin-1-il-propenona;

25 3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-(4-etil-piperazin-1-il)-propenona;

1-(4-Bencil-piperazin-1-il)3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona;

(E)-3-{4-[3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-acrilóil]-piperazin-1-il}propionitrilo;

(E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-[4-(1-metil-piperidin-4-il) piperazin-1-il]-propenona;

(E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-(4-fenilpiperazin-1-il)-propenona;

30 (E)-1-(4-Acetil-piperazin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona;

(E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-(4-fenil-piperazin-1-il)-propenona;

(E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-1-morfolin-4-il-propenona;

3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-N-(3-dimetil-amino-propil)-acrilamida;

(E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-N-isopropil-acrilamida; o

1-(4-Bencil-piperidin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona.

35

3. El derivado de ácido cafeico para uso de acuerdo con la reivindicación 2 que se selecciona entre:

Éster metílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

Éster etílico del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

40 n-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

i-Propil éster del ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-acrílico;

1-(4-Bencil-piperazin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona;

(E)-3-(3,4-Dihidroxi-fenil)-N-isopropil-acrilamida; o

1-(4-Bencil-piperidin-1-il)-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propenona.

45

4. El derivado del ácido cafeico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resistencia al tratamiento con Gleevec (mesilato de Imatinib) está producida por una mutación Bcr-Abl.

50 5. El derivado del ácido cafeico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la resistencia a tratamiento con Gleevec (mesilato de Imatinib) se produce debido a una mutación encontrada en una célula seleccionada entre las líneas celulares K-562-R, 32Dcl Bcr-Abl T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/T3151, Ba/F3 Bcr-Abl/E255K, Ba/F3 Bcr-Abl/H396P, Ba/F3 Bcr-Abl/M351T, Ba/F3 Bcr-Abl/F359V, Ba/F3 Bcr-Abl/E255V, Ba/F3 Bcr-Abl/F317L, Ba/F3 Bcr-Abl/H396R, Ba/F3 Bcr-Abl/M244V, Ba/F3 Bcr-Abl/Q252H, Ba/F3 Bcr-Abl/Y253F, o Ba/F3 Bcr-Abl/Y253H.

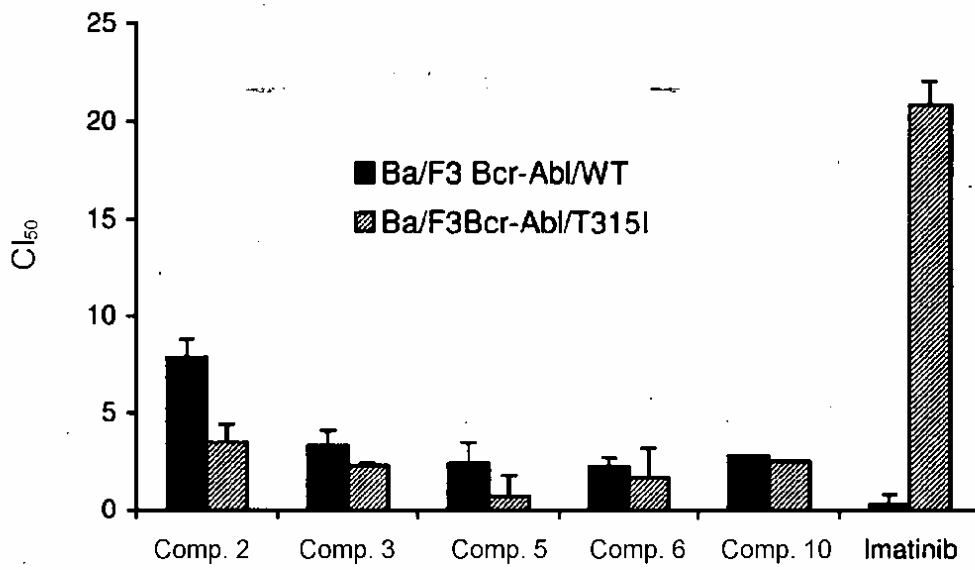


Figura 1

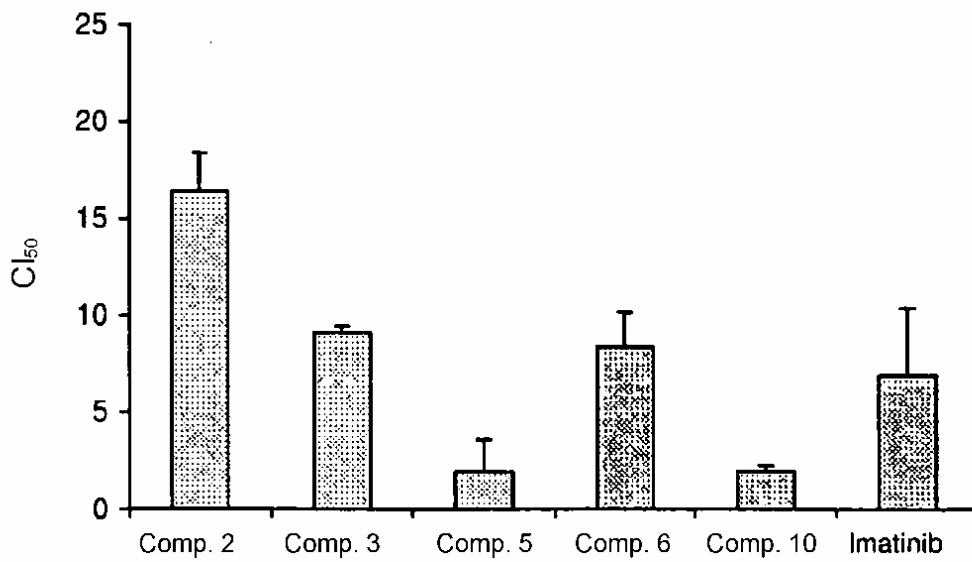


Figura 2

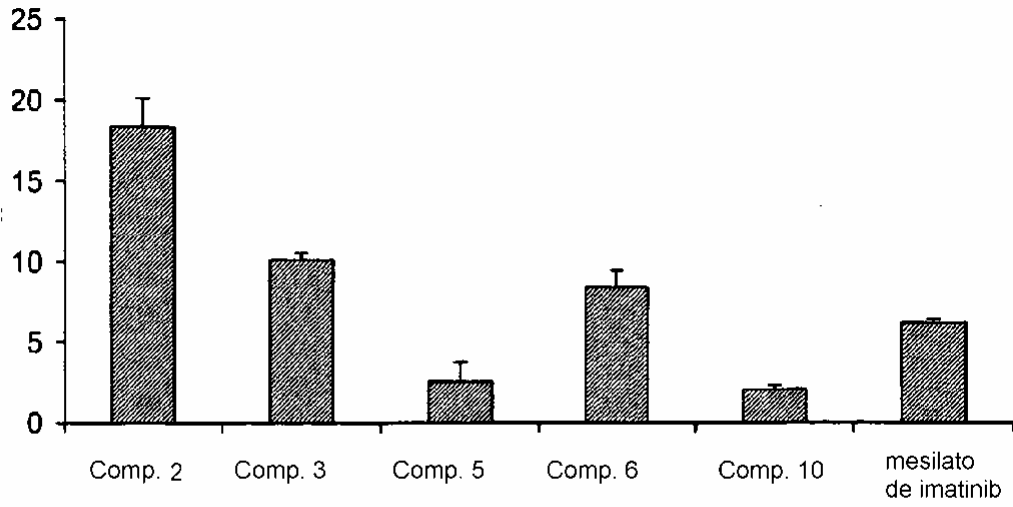


Figura 3

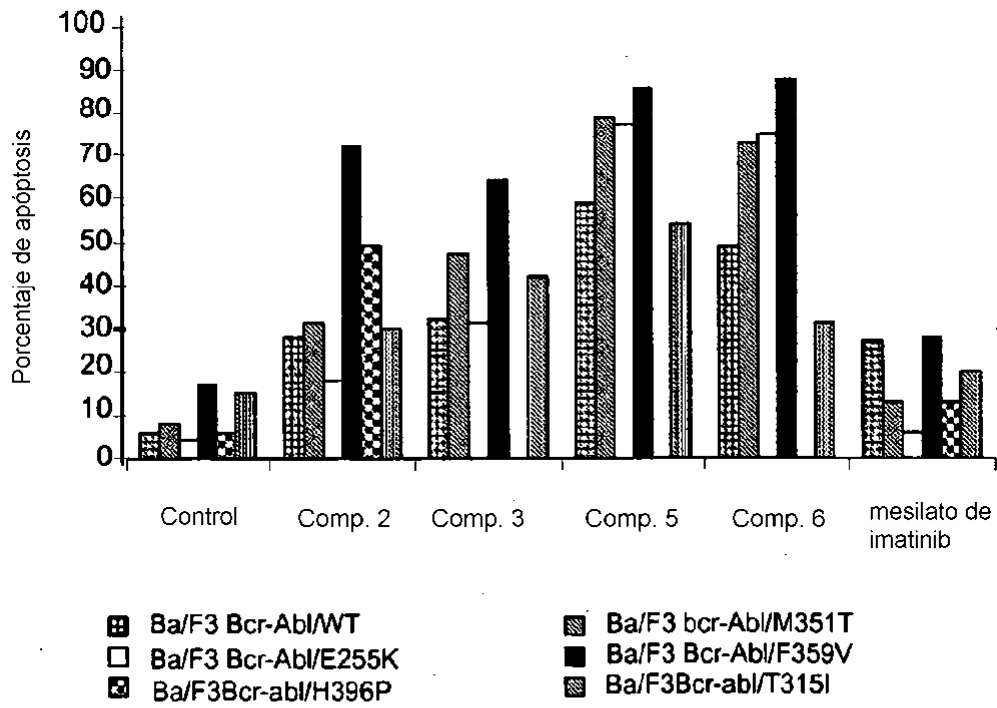


Figura 4



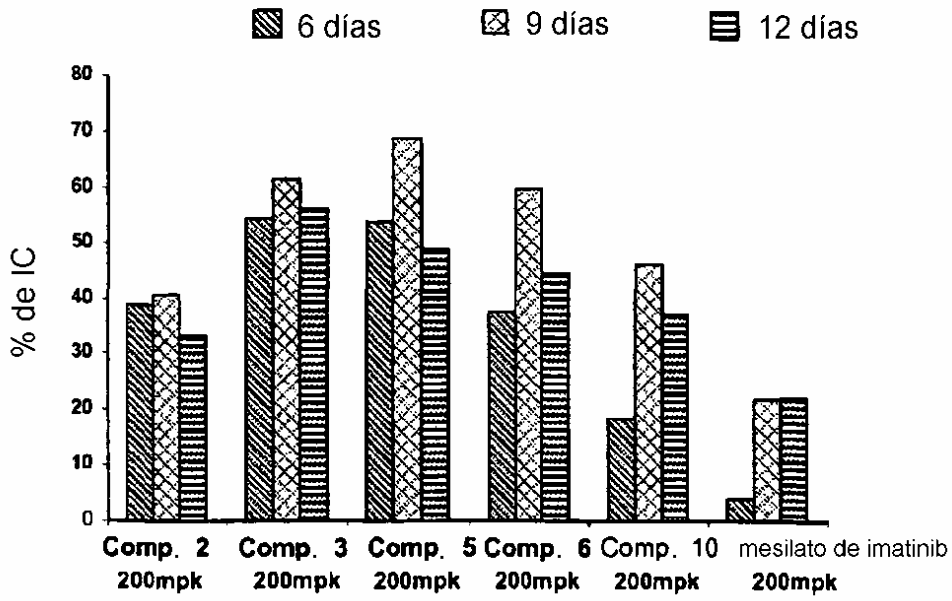


Figura 5A

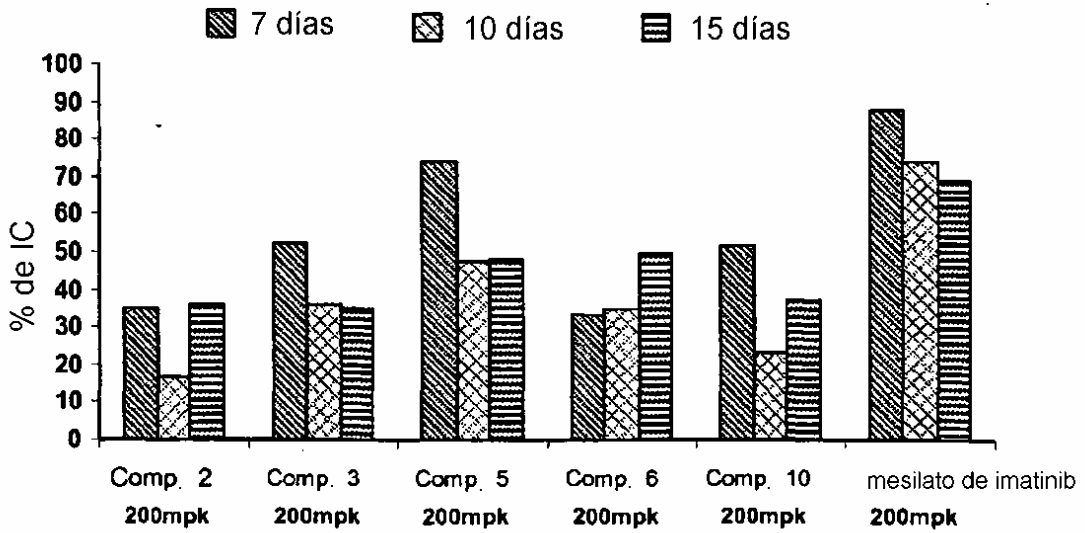


Figura 5B