

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 446**

51 Int. Cl.:  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 413/14** (2006.01)  
**A61K 31/4166** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06763797 .5**  
96 Fecha de presentación: **20.06.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1899325**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Derivados de imidazolinona e hidantoína como nuevos inhibidores de histona desacetilasa**

30 Prioridad:  
**23.06.2005 EP 05105592**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.03.2012**

73 Titular/es:  
**JANSSEN PHARMACEUTICA NV  
TURNHOUTSEWEG 30  
2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:  
**TEN HOLTE, Peter;  
VAN EMELLEN, Kristof;  
ANGIBAUD, Patrick René;  
MARCONNET-DECRANE, Laurence y  
MEERPOEL, Lieven**

74 Agente/Representante:  
**Linage González, Rafael**

ES 2 377 446 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

Derivados de imidazolinona e hidantoína como nuevos inhibidores de histona desacetilasa

Esta invención se refiere a compuestos que tienen actividad enzimática de inhibición de histona desacetilasa (HDAC). Se refiere adicionalmente a procedimientos para su preparación, a composiciones que los comprende, así como su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, para inhibir HDAC y como una medicina, por ejemplo, para inhibir estados proliferativos como cáncer y soriasis.

Las histonas nucleares son conocidas como componentes integrales y dinámicos de la maquinaria responsables de regular la transcripción génica y otros procedimientos mediante plantillas de ADN como la replicación, reparación, recombinación y segregación de cromosomas. Son el objeto de modificaciones post-transcripcionales que incluyen acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación.

La(s) histona(s) desacetilasa(s), también denominadas en la presente memoria descriptiva "HDAC", son enzimas que catalizan la supresión de la modificación de acetilo en residuos de lisina de proteínas, que incluyen histonas nucleosomales nucleares H2A, H2B, H3 y H4. Junto con la(s) histona(s) acetiltransferasa(s), denominadas en la presente memoria descriptiva "HAT", las HDAC regulan el nivel de acetilación de las histonas. El equilibrio de acetilación de las histonas nucleosomales desempeña una función importante en la transcripción de muchos genes. La hipoacetilación de histonas está asociada con la estructura de cromatina condensada que da lugar a la represión de la transcripción génica, mientras que las histonas acetiladas se asocian con una estructura de cromatina más abierta y la activación de la transcripción.

Se han descrito once HDAC estructuralmente relacionadas y se clasifican en dos clases. Las HDAC de clase I consisten en las HDAC 1, 2, 3, 8 y 11, mientras que las HDAC de clase II consisten en las HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10. Los miembros de una tercera clase de HDAC no están estructuralmente relacionados con la clase I y clase II de HDAC. Las HDAC de clase I/II funcionan mediante mecanismos dependientes de zinc, mientras que las HDAC de clase II son dependientes de NAD.

Además de las histonas, otras proteínas han sido también el sustrato para la acetilación, en particular factores de transcripción como p53, GATA-1 y E2F; receptores nucleares como el receptor de glucocorticoides, los receptores de tiroides, los receptores de estrógenos; y las proteínas reguladoras del ciclo celular como pRb. La acetilación de proteínas ha estado asociada con la estabilización de proteínas como la estabilización de p53, la captación de cofactores y una unión aumentada de ADN. El p53 es un supresor de tumores que puede inducir la detención del ciclo celular o apoptosis en respuesta a una diversidad de señales de tensión, como el deterioro de ADN. El objetivo principal de la detención del ciclo celular inducido por p53 parece ser el gen p21. A continuación de su activación por p53, el p21 ha sido identificado debido a su asociación con complejos de quinasa de ciclina/dependiente de ciclina que dan lugar a la detención del ciclo celular en fases G1 y G2, su sobre-regulación durante la senescencia y su interacción con el antígeno nuclear de células proliferantes.

El estudio de inhibidores de HDAC indica que desempeñan una función importante en la detención del ciclo celular, la diferenciación celular, apoptosis e inversión de fenotipos transformados.

El inhibidor tricostatina A (TSA), por ejemplo, provoca la detención del ciclo celular en fases G1 y G2, invierte el fenotipo transformado de diferentes líneas celulares e induce la diferenciación de células de leucemia Friend y otras. La TSA (y el ácido suberohilánilido-hidroxámico SAHA) se ha informado que inhiben el crecimiento celular, inducen la diferenciación terminal y evitan la formación de tumores en ratones (Finnin et al., Nature, 401: 188-193,1999).

También se ha informado de que la tricostatina A es útil en el tratamiento de fibrosis, por ejemplo, fibrosis hepática y cirrosis hepática. (Geerts et al., solicitud de patente europea EP 0 827 742, publicada el 11 de marzo de 1998).

El fármaco para inhibidores de HDAC consiste en un dominio de unión a metal, que interacciona con el sitio activo que contiene zinc de las HDAC, un dominio conector y un dominio de reconocimiento superficial o región de remate, que interacciona con residuos del borde del sitio activo.

También se ha informado de que los inhibidores de HDAC producen la expresión génica de p21. La activación transcripcional del gen p21 mediante estos inhibidores está favorecido por la remodelación de cromatina, seguida de la acetilación de las histonas H3 y H4 en la región promotora de p21. Esta activación de p21 se produce de una forma independiente de p53 y, por tanto, los inhibidores de HDAC son operativos en células con genes p53 mutados, una característica distintiva de numerosos tumores.

Además, los inhibidores de HDAC pueden tener actividades indirectas como un aumento de las respuestas inmunes del hospedante y la inhibición de la angiogénesis tumoral y, por tanto, pueden suprimir el crecimiento de tumores primarios e impedir metástasis (Mai et al., Medicinal Research Reviews, 25: 261-309,2005).

Teniendo en consideración lo que antecede, los inhibidores de HDAC pueden tener una gran capacidad potencial en el tratamiento de enfermedades o estados de proliferación celular que incluyen tumores con genes p53 mutados.

La solicitud de patente EP 1472216 publicada el 14 de agosto de 2003 describe hidroxamatos bicíclicos como inhibidores de histona desacetilasa.

5 Las solicitudes de patentes EP 1485099, EP 1485348, EP 1485353, EP1485354, EP1485364, EP1485365, EP1485370, EP1485378 publicadas el 18 de septiembre de 2003, entre otras, describen ácidos piperazinil-pirimidinilhidroxámicos sustituidos como inhibidores de histona desacetilasa, adicionalmente, el documento EP 1485365 describe R306465.

10 La solicitud de patente EP 1492534 publicada el 9 de octubre de 2003 describe compuestos de ácidos carbámicos que comprenden un enlace piperazino como inhibidores de HDAC.

La solicitud de patente EP 1495002 publicada el 23 de octubre de 2003 describe compuestos de piperazinil-fenil-benzamidas sustituidos como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente WO 03/092686 publicada el 13 de noviembre de 2003 describe benzamidas como inhibidores de histona desacetilasa.

15 La solicitud de patente WO 04/009536 publicada el 29 de enero de 2004 describe derivados que contienen un conector alquílico entre el grupo arilo y el hidroxamato, como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente EP 1525199 publicada el 12 de febrero de 2004 describe hidroxamatos (hetero) arilalquenil-sustituidos bicíclicos como inhibidores de histona desacetilasa.

20 La solicitud de patente EP 1572626 publicada el 24 de junio de 2004 describe derivados de (2-amino-fenil)-amidas de ácidos arileno-carboxílicos como agentes farmacológicos.

La solicitud de patente EP 1581484 publicada el 29 de julio de 2004 describe derivados de N-hidroxi-benzamida con actividad antiinflamatoria y antitumoral.

La solicitud de patente EP 1585735 publicada el 29 de julio de 2004 describe derivados de hidroxamato de arilo sustituido como inhibidores de histonas desacetilasa.

25 La solicitud de patente EP 1592667 publicada el 19 de agosto de 2004, describe derivados de O-fenilendiaminas mono-aciladas como agentes farmacológicos.

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

30 La solicitud de patente EP 1592665 publicada el 26 de agosto de 2004, describe derivados de benzamida como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente WO 04/072047 publicada el 26 de agosto de 2004, describe índoles, bencimidazoles y naftimidazoles como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente EP 1608628 publicada el 30 de septiembre de 2004, describe hidroxamatos unidos a sistemas de anillos heterocíclicos no aromáticos como inhibidores de histona desacetilasa.

35 La solicitud de patente EP 1613622 publicada el 14 de octubre de 2004, describe derivados de oximas como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente EP 1611088 publicada el 28 de octubre de 2004, describe derivados de hidroxamatos como inhibidores de histona desacetilasa.

40 La solicitud de patente WO 05/028447 publicada el 31 de marzo de 2005, describe benzamidazoles como inhibidores de histona desacetilasa.

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

La solicitud de patente WO 05/040101 publicada el 06 de mayo de 2005, describe hidroxamatos conectados a acilurea y conectados a sulfonilurea como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente WO 05/040161 también publicada el 06 de mayo de 2005, describe hidroxamatos unidos a diarilo como inhibidores de histona desacetilasa.

La solicitud de patente WO 05/075469 publicada el 18 de agosto de 2005, describe ácidos tiazolil-hidroxiámicos y ácidos tiadiazolil-hidroxiámicos como inhibidores de histona desacetilasa.

5 La solicitud de patente WO 05/086898 publicada el 22 de septiembre de 2005, describe ácidos hidroxiámicos heteropentacíclicos como inhibidores de histona desacetilasa.

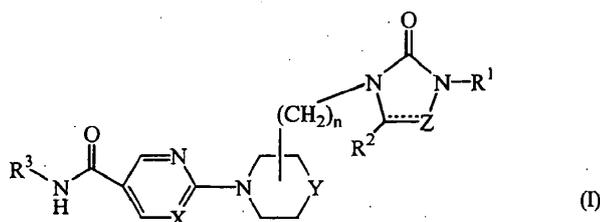
La solicitud de patente WO 05/092899 publicada el 06 de octubre de 2005, describe alqueniilbenzamidas como inhibidores de histona desacetilasa.

10 Los compuestos de la presente invención difieren de la técnica anterior en la estructura y su actividad farmacológica y/o potencia farmacológica.

El problema que va a ser resuelto es proporcionar inhibidores de histona desacetilasa con elevada actividad enzimática y celular que tienen una biodisponibilidad aumentada.

15 Los nuevos compuestos de la presente invención resuelven el problema anteriormente descrito. Los compuestos de la presente invención muestran una excelente actividad enzimática y celular de inhibición de histona desacetilasa. Tienen una elevada capacidad para activar el gen p21. Pueden tener un perfil farmacocinético deseable y pueden tener una baja afinidad por las enzimas p450 que reducen el riesgo de interacciones adversas entre fármacos permitiendo también un margen de seguridad más amplio.

Esta invención se refiere a compuestos de fórmula (I)



20 las formas de N-óxido, las sales por adición farmacéuticamente aceptables y sus formas isómeras estereoquímicas, en la cual

cada X es independientemente N o CH;

cada I es independientemente O, CH o CH<sub>2</sub> y cuando Y es CH, entonces el sustituyente está unido al átomo Y de la estructura anular;

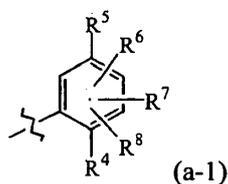
25 cada Z es independientemente C=O, CH<sub>2</sub> o CH y cuando z es CH entonces la línea de puntos es un enlace;

n es 0 ó 1 y cuando n es 0 entonces está previsto un enlace directo;

30 R<sup>1</sup> es fenilo, naftalenilo, heterociclilo, fenil-alquilo C<sub>1-6</sub>, naftalenil-alquilo C<sub>1-6</sub>, heterociclil-alquilo C<sub>1-6</sub>; en que cada uno de dichos fenilo, naftalenilo o heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, polihalo-alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo, feniloxi, ciano, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino o dos sustituyentes tomados conjuntamente pueden formar el radical bivalente -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-;

R<sup>2</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o fenilo en que cada fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, feniloxi o ciano;

R<sup>3</sup> es hidroxi o un radical de fórmula (a-1)



35

en la cual

R<sup>4</sup> es hidroxilo o -NH<sub>2</sub>;

5 R<sup>5</sup> es hidrógeno, tienilo, furanilo o fenilo y cada tienilo, furanilo o fenilo puede estar opcionalmente sustituido con halo, amino, nitro, ciano, hidroxilo, fenilo, alquilo C<sub>1-6</sub> (di-alquil C<sub>1-6</sub>)amino, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, fenil-alquiloxi C<sub>1-6</sub>, hidroxialquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>-carbonilo, hidroxycarbonilo, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilo, poli-halo-alquiloxi C<sub>1-6</sub>, poli-halo-alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilsulfonilo C<sub>1-6</sub>, hidroxycarbonil-alquilo C<sub>1-6</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino, aminosulfonilo, aminosulfonil-alquilo C<sub>1-6</sub>, isoxazolilo, aminocarbonilo, fenil-alqueno C<sub>2-6</sub>, fenil-alquinilo C<sub>3-6</sub> o piridinil-alquinilo C<sub>3-6</sub>;

R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, -NH<sub>2</sub>, nitro, furanilo, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, trifluorometilo, tienilo, fenilo, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino, aminocarbonil-alquilo C<sub>1-6</sub> o -C≡C-CH<sub>2</sub>-R<sup>9</sup>;

10 en que R<sup>9</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxilo, amino o alquiloxi C<sub>1-6</sub>; y

15 heterociclilo en lo que antecede es furanilo, tienilo, pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, dioxolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tiranilo, piridinilo, piperidinilo, dioxanilo, morfolinilo, ditianilo, tiomorfolinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piperazinilo, triazinilo, tritrianilo, indolizínilo, indolilo, indolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, quinolizínilo, quinolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo o naftiridinilo.

Las líneas trazadas en los sistemas de anillos desde los sustituyentes indican que el anillo puede estar unido a cualquiera de los átomos del anillo adecuados del sistema de anillos.

20 La expresión "inhibidor de histona desacetilasa" se usa para identificar un compuesto que es capaz de interactuar con histona desacetilasa e inhibir su actividad, más particularmente su actividad enzimática. La inhibición de la actividad enzimática de histona desacetilasa significa reducir la capacidad de una histona desacetilasa para suprimir un grupo acetilo de una histona. Preferentemente, esta inhibición es específica, es decir, el inhibidor de histona desacetilasa reduce la capacidad de una histona desacetilasa para suprimir un grupo acetilo de una histona a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que es necesaria para producir otro efecto biológico no relacionado.

30 Como se usa en las definiciones que anteceden y en lo sucesivo, halo es una denominación genérica para flúor, cloro, bromo y yodo; alquilo C<sub>1-4</sub> define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, 1-metiletilo, 2-metilpropilo y similares; alquilo C<sub>1-6</sub> incluye alquilo C<sub>1-4</sub> y sus homólogos superiores que tienen 5 a 6 átomos de carbono como, por ejemplo, pentilo, 2-metilbutilo, exilo, 2-metilpentiletilo y similares; alqueno C<sub>2-6</sub> define radicales hidrocarbonados de cadena lineal o ramificada que contienen un enlace doble y que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, como, por ejemplo, etenilo, 2-propenilo, 2-butenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 3-metil-2-butenilo y similares; alquino C<sub>3-6</sub> define radicales hidrocarbonados de cadena lineal y ramificada que contienen un enlace triple y que tienen de 3 a 6 átomos de carbono como, por ejemplo, 2-propinilo, 3-butinilo, 2-butinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 3-exinilo y similares; poli-halo-alquilo C<sub>1-6</sub> define alquilo C<sub>1-6</sub> que contiene tres sustituyentes halo iguales o diferentes, por ejemplo, trifluorometilo; y cicloalquilo C<sub>3-6</sub> incluye brumos hidrocarbonados cíclicos que tienen de 3 a 6 átomos de carbono como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo y similares.

40 Las sales por adición farmacéuticamente aceptables abarcan sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y sales por adición de bases farmacéuticamente aceptables. Está previsto que las sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, como las mencionadas anteriormente, comprendan las formas no tóxicas y terapéuticamente activas de sales por adición de ácidos, que son capaces de formar los compuestos de fórmula (I). Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades básicas pueden ser convertidos en sus sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables tratando dicha forma de base con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos como ácidos halohídricos, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico; 45 ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácidos acético, trifluoroacético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-amino-salicílico, pamoico y similares.

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

La expresión, “sales por adición de ácidos o bases” comprende también los hidratos y las formas de adición de disolventes que son capaces de formar los compuestos de fórmula (I). Ejemplos de estas formas, son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

5 La expresión “formas estereoquímicamente isómeras de compuestos de fórmula (I)” como se usa en la presente memoria descriptiva, define todos los compuestos posibles preparados a partir de los mismos átomos unidos mediante la misma secuencia de enlaces, pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que nos son intercambiables, que pueden poseer los compuestos de fórmula (I). Salvo que se mencione o indique otra cosa, la denominación química de un compuesto abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isómeras posibles que puede poseer dicho compuesto. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o  
10 enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Está previsto que todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos de fórmula (I), tanto en forma pura como en una mezcla con cada una de las otras estén abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

15 Está previsto que las formas de N-óxido de los compuestos de fórmula (I) comprendan los compuestos de fórmula (I) en la que uno o varios átomos de nitrógeno son oxidados al denominado N-óxido, particularmente los N-óxidos en los que uno o más átomos de nitrógeno de piperidina, piperazina o piridizino están N-oxidados.

Algunos de los compuestos de fórmula (I) pueden existir también en sus formas tautómeras. Está previsto que estas formas, aunque no están explícitamente indicadas en la fórmula anterior, estén incluidas dentro del alcance de la presente invención.

20 Está previsto que la expresión “compuestos de fórmula (I)”, siempre que se use en lo sucesivo, incluya también las sales por adición farmacéuticamente aceptables de todas las formas estereoisómeras.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, está previsto que los términos “histona desacetilasa” y “HDAC” se refieran a una cualquiera de las familias de enzimas que separan grupos acetilo de los grupos ε-amino de residuos de lisina en el N-terminal de una histona. Salvo que se indique otra cosa por el contexto, está previsto que el término “histona se refiera a cualquier proteína de histona, que incluye H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5 de cualquier especie. Las  
25 proteínas de HDAC humanas o productos génicos incluyen, pero sin limitación HDAC -1, HDAC -2, HDAC -3, HDAC -4, HDAC -5, HDAC -6, HDAC -7, HDAC -8, HDAC -9, HDAC -10 y HDAC -11. La histona desacetilasa puede ser derivada también de una fuente de protozoos o fúngica.

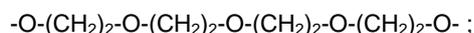
Un primer grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que se cumplen una o más de las siguientes restricciones:

30 a) cada X es N;

b) cada Y es independiente O o CH;

c) n es 1;

35 d) R<sup>1</sup> es fenilo, naftalenilo o heterociclil-alquilo C<sub>1-6</sub> en que dicho fenilo, naftanelino o heterociclil-alquilo C<sub>1-6</sub> está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub>, poli-halo-alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo, fenilo o ciano, o dos sustituyentes tomados conjuntamente pueden formar el radical bivalente



e) R<sup>2</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o fenilo; y

f) R<sup>3</sup> es hidroxilo.

40 Un segundo grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que se cumplen uno o más de las siguientes restricciones:

a) cada X es N;

b) cada Y es CH;

c) cada Z es CH;

45 c) R<sup>1</sup> es fenilo, o heterociclil-alquilo C<sub>1-6</sub> en que cada uno de dicho fenilo, o heterociclil-alquilo C<sub>1-6</sub> está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre

hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo, feniloxi;

d) R<sup>2</sup> es hidrógeno; y

e) R<sup>3</sup> es hidroxilo.

5 Un tercer grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que se cumplen una o más de las siguientes restricciones:

a) R<sup>3</sup> es un radical de fórmula (a-1);

b) R<sup>4</sup> es -NH<sub>2</sub>;

c) R<sup>5</sup> es hidrógeno o dienilo; y

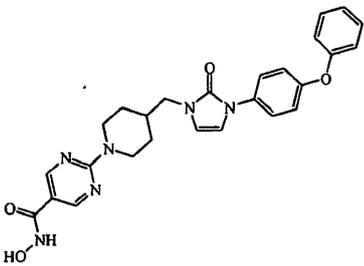
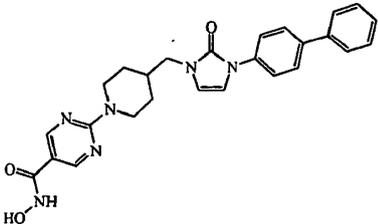
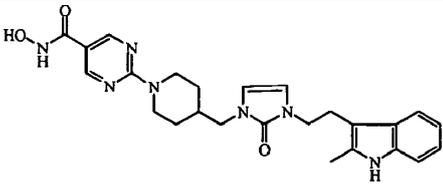
d) R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son cada uno independientemente hidrógeno.

10 Un grupo de compuestos preferidos consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que cada X es N; cada y es independientemente O o CH; n es 1; R<sub>1</sub> es fenilo, naftalenilo o heterocicliil-alquilo C<sub>1-6</sub> en que cada uno de dicho fenilo, naftalenilo o heterocicliil-alquilo- C<sub>1-6</sub> está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, poli-halo alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo, feniloxi ciano o dos sustituyentes tomados conjuntamente pueden formar el radical bivalente

15 -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-; R<sup>2</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o fenilo y R<sup>3</sup> es hidroxilo.

Un grupo de compuestos más preferidos consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que cada X es N; cada Y es CH; cada Z es CH; R<sup>1</sup> es fenilo o heterocicliil-alquilo C<sub>1-6</sub> en que cada uno de dicho fenilo o heterocicliil-alquilo C<sub>1-6</sub> está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo o feniloxi; R<sup>2</sup> es hidrógeno y R<sup>3</sup> es hidroxilo.

20 Los compuestos más preferidos son el compuesto nº 3, compuestos nº 2 y compuesto nº 35.

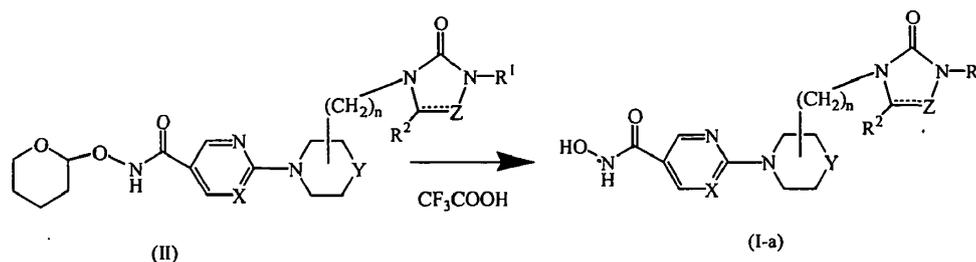
	
<p>Comp. Nº 2</p>	<p>Comp. Nº 3</p>
	
<p>Comp. Nº 35</p>	

25 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales y N-óxidos farmacéuticamente aceptables y sus formas estereoquímicamente isómeras pueden ser preparados de una manera convencional. Los materiales de partida y algunos de los ingredientes son compuestos conocidos y están disponibles comercialmente o pueden ser reparados mediante procedimientos de reacciones convencionales generalmente conocidos en la técnica.

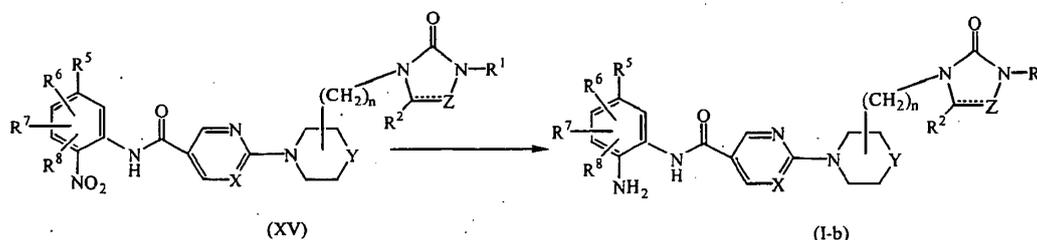
Se describirán más en detalle con posterioridad algunos métodos de preparación. Otros métodos para obtener los compuestos finales de fórmula (I) se describen en los ejemplos.

30 Los compuestos de fórmula (I) en la que R<sup>3</sup> es hidroxilo, denominados en la presente memoria descriptiva compuestos de fórmula (Ia) pueden ser preparados haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un ácido apropiado como, por ejemplo, ácido trifluoroacético. Dicha reacción se realiza en un disolvente apropiado como, por ejemplo,

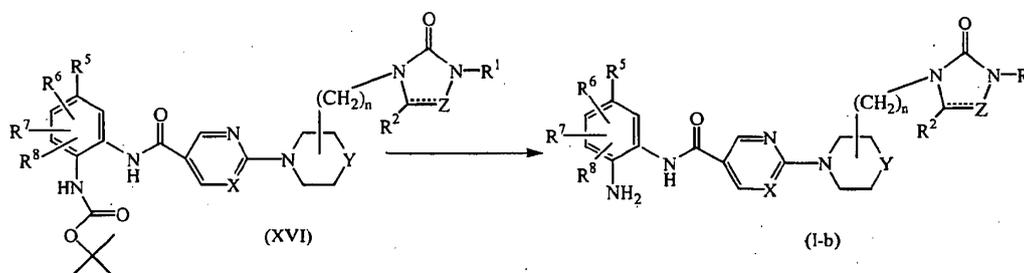
metanol o diclorometano.



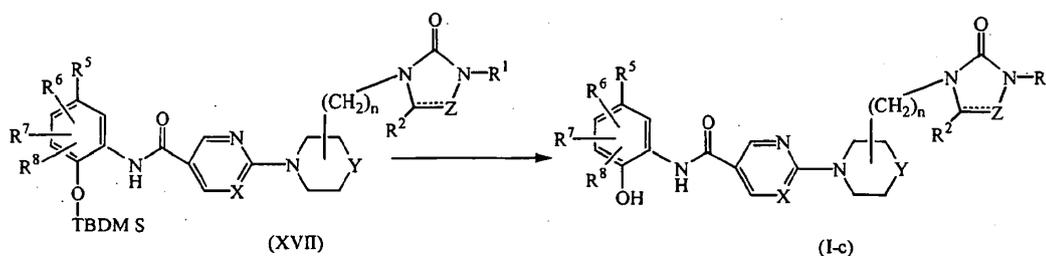
- 5 Los compuestos de fórmula (I) en la que R<sup>3</sup> es un radical de fórmula (a-1) y R<sup>4</sup> es -NCH<sub>2</sub>, denominados en la presente memoria descriptiva compuestos de fórmula (I-b) pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XV) con hidrato de cloruro de estaño (II). Dicha reacción se puede realizar en un disolvente apropiado como, por ejemplo, una mezcla de tetrahidrofurano, metanol y agua. Alternativamente, los compuestos de fórmula (I-b) pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XV) con hidrógeno en presencia de 10% de paladio sobre carbón en un disolvente adecuado como, por ejemplo, metanol.



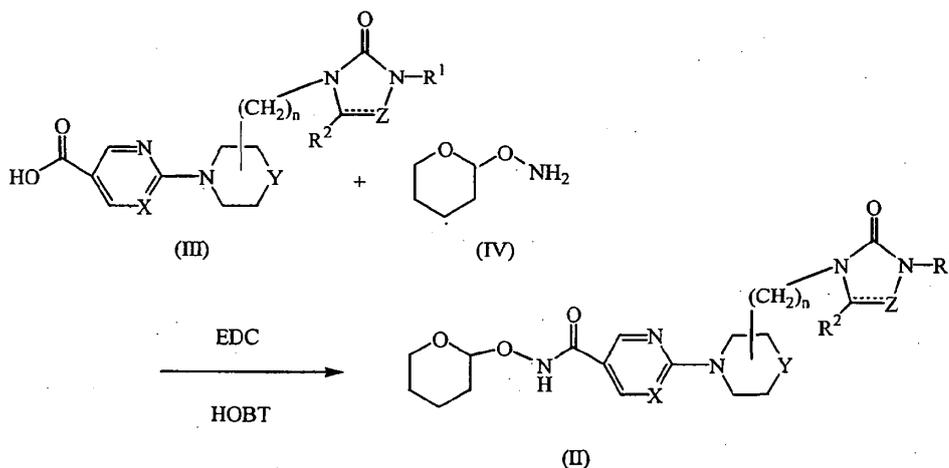
- 10 Los compuestos de fórmula (I-b) pueden ser preparados también haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XVI) con un ácido apropiado como, por ejemplo, ácido trifluoroacético. Dicha relación se realiza en un disolvente apropiado como, por ejemplo, metanol o diclorometano.



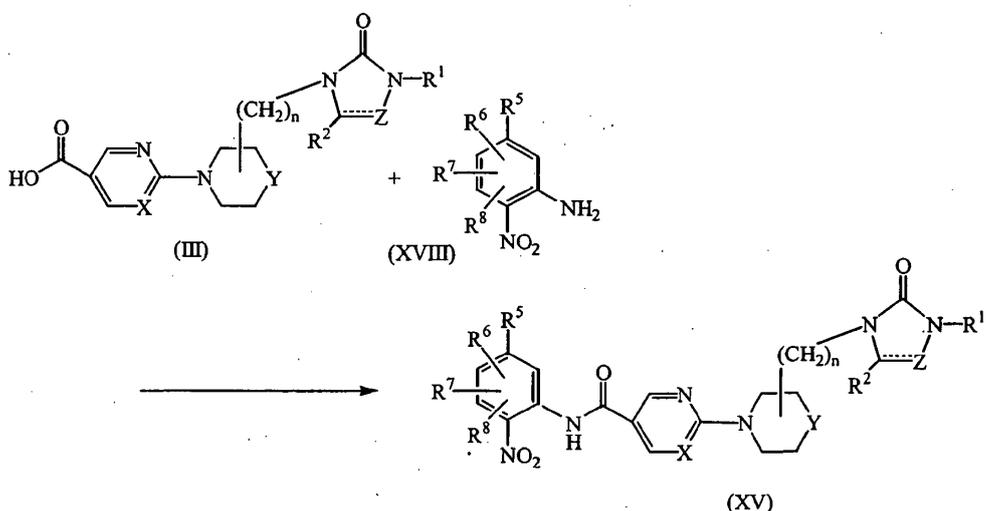
- 15 Los compuestos de fórmula (I) en la que R<sup>3</sup> es un radical de fórmula (a-1) y R<sup>4</sup> es hidroxilo, denominados en la presente memoria descriptiva compuestos de fórmula (I-c) pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XVII) con fluoruro de tetrabutilamonio en un disolvente apropiado como, por ejemplo, tetrahidrofurano. TBDMS en el intermedio de fórmula (XVII) significa terc-butil(dimetil)silanilo.



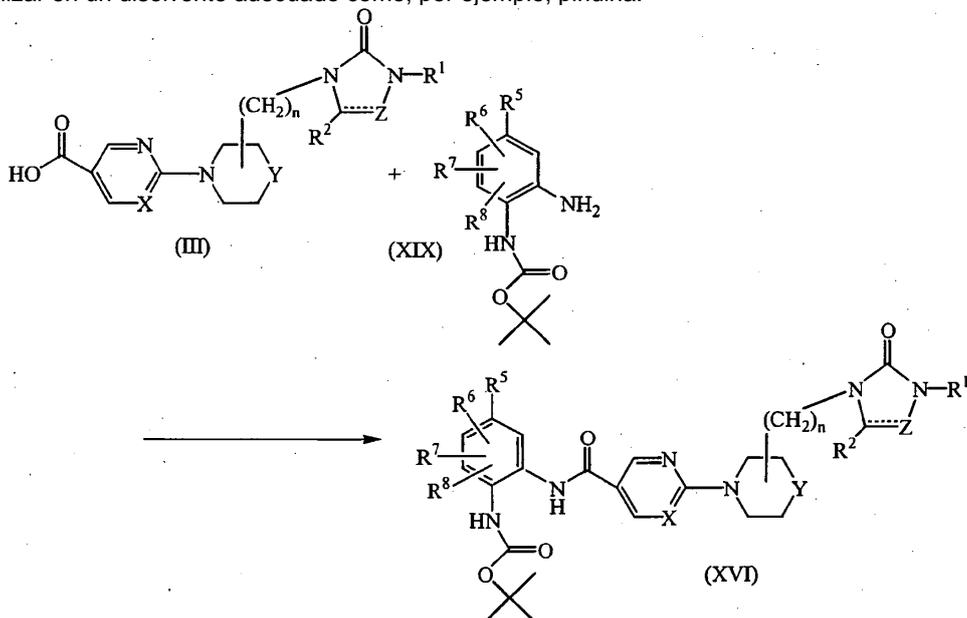
- 20 Los intermedios de fórmula (II) pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (III) con un intermedio de fórmula (IV) en presencia de reactivos apropiados como hidrocloreto de (3-dimetilamino-propil)-1-etilcarbodiimida (EDC) y 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBT). La reacción se puede realizar en presencia de una base como trietilamina, en un disolvente adecuado, como una mezcla de diclorometano, N,N-dimetilformamida y tetrahidrofurano o una mezcla de diclorometano y tetrahidrofurano.



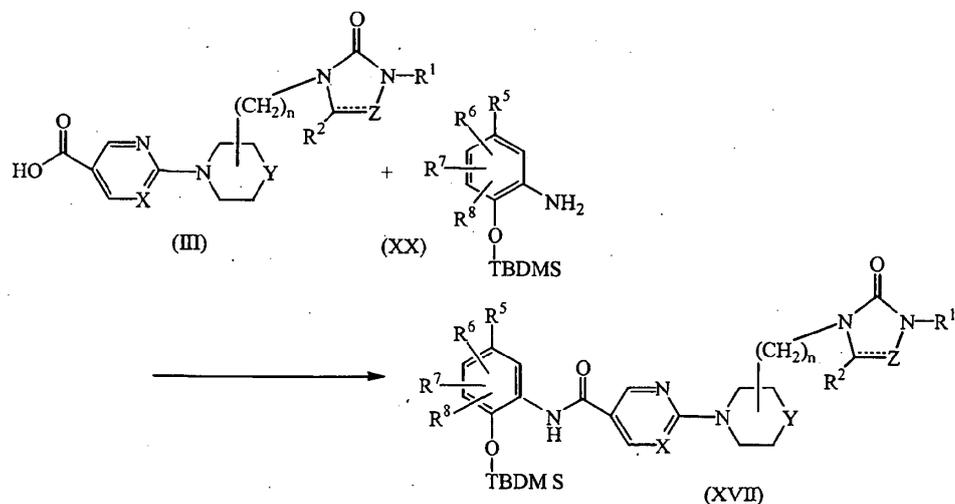
5 Los intermedios de fórmula (XV) pueden ser preparados mediante la reacción de un intermedio de fórmula (III) con una nitrofenilamina apropiada de fórmula (XVIII) en presencia de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamino) fosfonio (BOP) e hidruro de sodio. Dicha reacción se puede realizar en un disolvente adecuado como, por ejemplo, piridina.



10 También, los intermedios de fórmula (XVI) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (III) con una fenilamina protegida con terc-butiloxicarbonilo (Boc) apropiada de fórmula (XIX) en presencia de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamino) fosfonio BOP) y de hidruro de sodio. Dicha reacción se puede realizar en un disolvente adecuado como, por ejemplo, piridina.

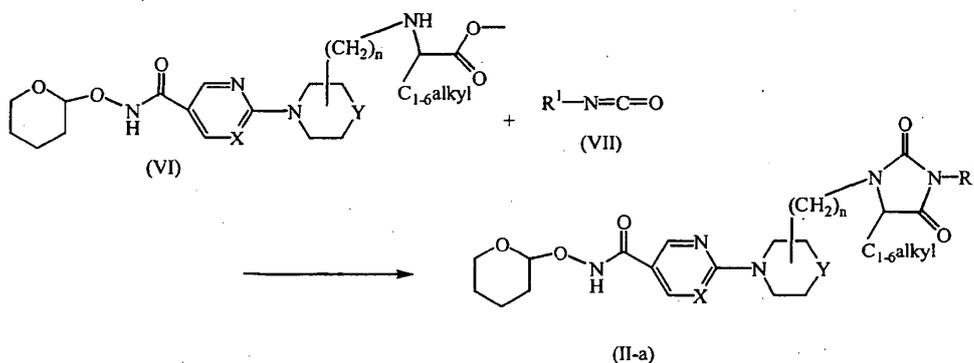


Los intermedios de fórmula (XVII) pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (III) con una fenilamina apropiada protegida con terc-butil (dimetilsilanino) (TBDMS) de fórmula (XX) en presencia de hexafluorofosfato de benzotrazol-1-hiloxitris (dimetilamino) fosfonio (BOP) y trietilamina. Dicha reacción se realiza en un disolvente adecuado como, por ejemplo, N,N-dimetilformamida.



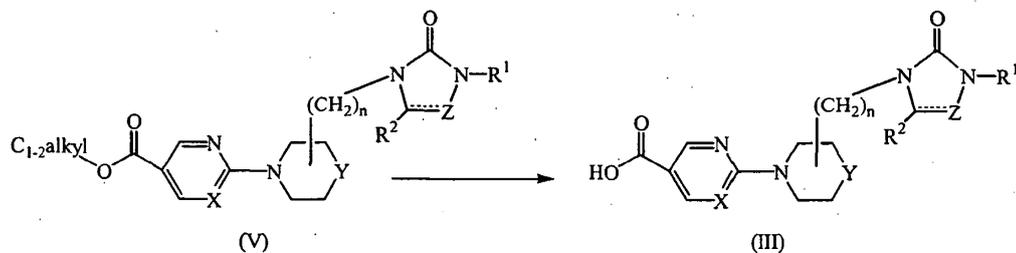
5

Los intermedios de fórmula (II) en la que Z es C=O y R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> (véase el dibujo) o fenilo, denominados en la presente memoria descriptiva intermedios de fórmula (II-a) pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (VI) en la que R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> (véase el dibujo) o fenilo con un intermedio de fórmula de (VII) en presencia de un disolvente adecuado, como tetrahidrofurano



10

Los intermedios de fórmula (III) pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (V) con una solución ácida apropiada, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una solución básica, por ejemplo, hidróxido de litio o hidróxido de sodio, en un disolvente adecuado como dioxano o una mezcla de disolventes adecuados como alcoholes, acetonitrilo y agua.

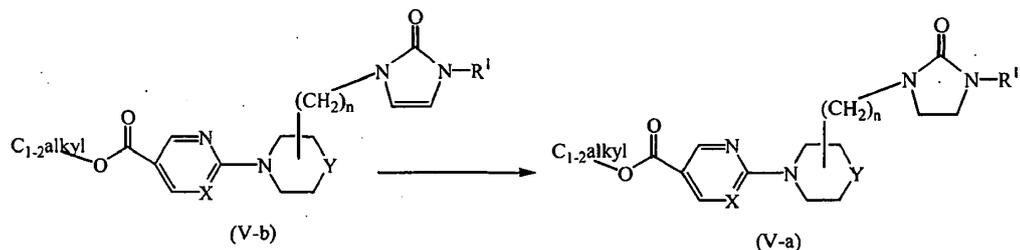


15

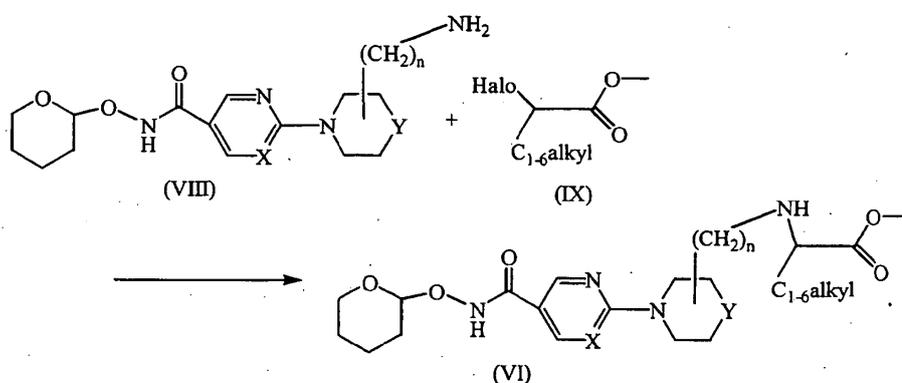
Los intermedios de fórmula (V) en la que Z es CH<sub>2</sub> y R<sup>2</sup> es hidrógeno, denominados en la presente memoria descriptiva intermedios de fórmula (Va) pueden ser preparados convirtiendo intermedios de fórmula (V), en la que Z es CH y la línea de puntos representa un enlace, denominados en la presente memoria descriptiva intermedios de fórmula (V-b), mediante hidrogenación catalítica del intermedio de fórmula (v-b) con hidrógeno en presencia de un catalizador como, por ejemplo, paladio sobre carbón (10%). La reacción se puede realizar en presencia de una base

20

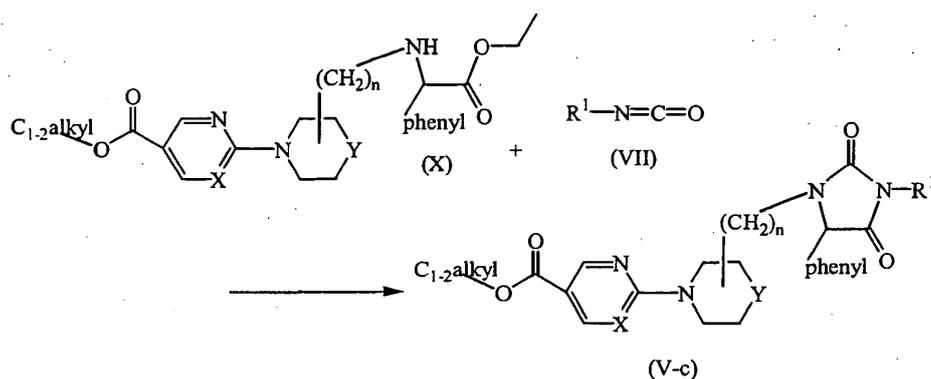
como trietilamina, en un disolvente adecuado como tetrahidrofurano.



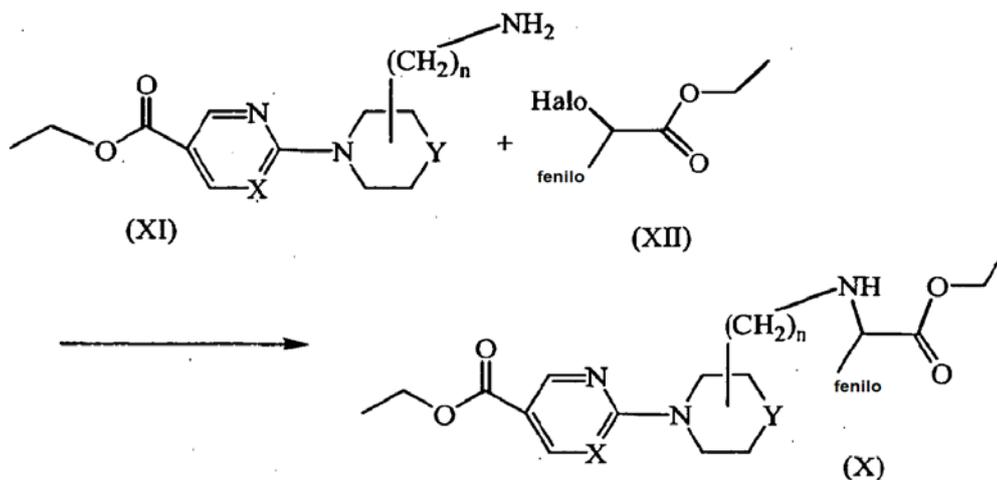
- 5 Los intermedios de fórmula (VI) en la que  $R^2$  es alquilo  $C_{1-6}$  (véase el dibujo) o fenilo, se pueden preparar haciendo reaccionar intermedios de fórmula (VIII) con intermedios de fórmula (IX), en la que  $R^2$  es alquilo  $C_{1-6}$  (véase el dibujo) o fenilo y halo es cloro o bromo, en presencia de carbonato de potasio y en presencia de un disolvente adecuado como acetonitrilo.



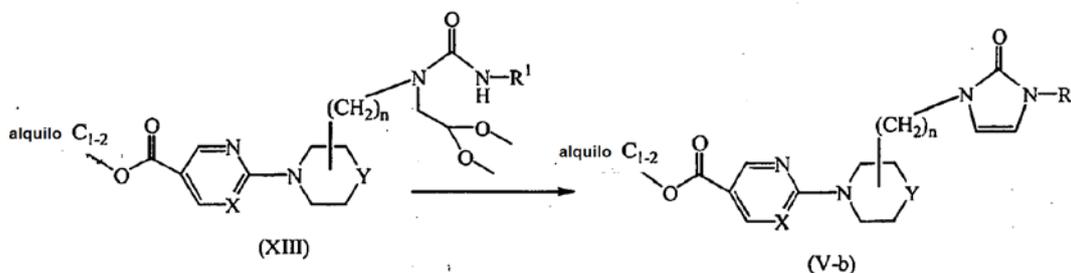
- 10 Los intermedios de fórmula (V), en la que Z es C=O y  $R^2$  es alquilo  $C_{1-6}$  o fenilo (véase el dibujo), denominados en la presente memoria descriptiva intermedios de fórmula (V-c), pueden ser preparados haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (X) en la que  $R^2$  es alquilo  $C_{1-6}$  o fenilo (véase el dibujo) con un intermedio de fórmula (VII) en presencia de un disolvente adecuado, como tetrahidrofurano.



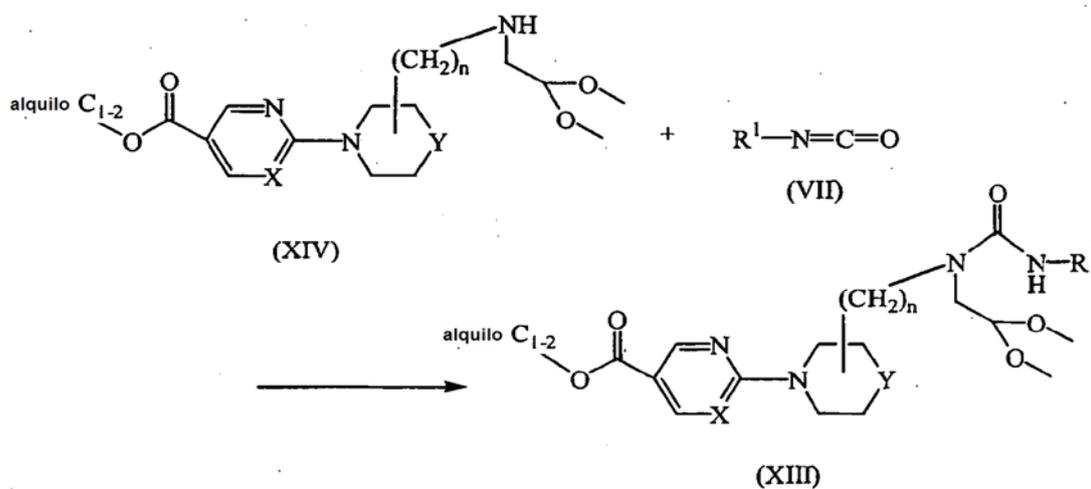
- 15 Los intermedios de fórmula (X) en la que  $R^2$  es alquilo  $C_{1-6}$  o fenilo (véase el dibujo), se pueden preparar haciendo reaccionar intermedios de fórmula (XI) con intermedios de fórmula (XII) en la que  $R^2$  es alquilo  $C_{1-6}$  o fenilo (véase el dibujo) y halo es, por ejemplo, cloro o bromo, en presencia de un reactivo adecuado como carbonato de potasio y en presencia de un disolvente adecuado como acetonitrilo.



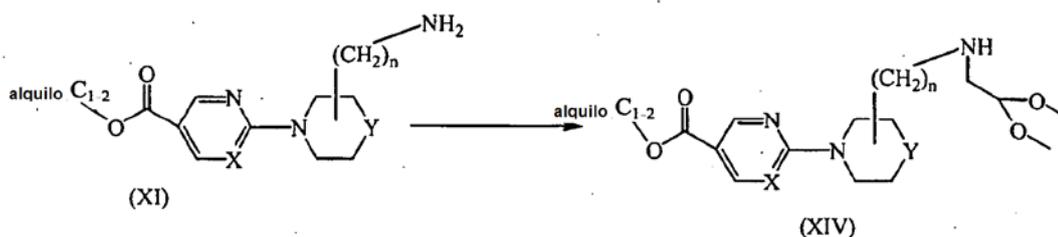
Los intermedios de fórmula (V-b) se pueden preparar convirtiendo intermedios de fórmula (XIII) en presencia de un ácido adecuado como ácido fórmico o ácido clorhídrico en un disolvente adecuado como metanol.



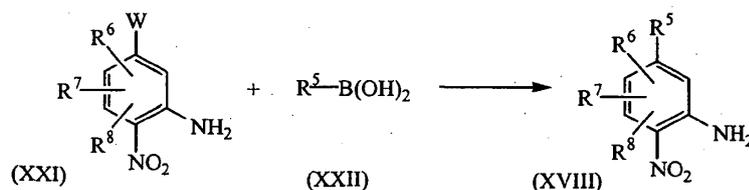
- 5 Los intermedios de fórmula (XIII) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XIV) con un intermedio de fórmula (VII) en presencia de una base como trietilamina, en un disolvente adecuado, como diclorometano o tetrahydrofurano.



- 10 Los intermedios de fórmula (XIV) se pueden preparar haciendo reaccionar intermedios de fórmula (XI) con glioxal-dimetil-acetal y triacetoxiborohidruro de sodio, en presencia de un disolvente adecuado como, por ejemplo, tetrahydrofurano o con 2-bromo-1,1-dietoxietano y carbonato de potasio en presencia de un disolvente adecuado como, por ejemplo, acetonitrilo.



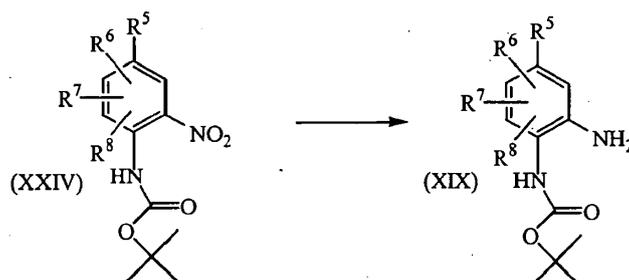
5 Los intermedios de fórmula (XVIII) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de fórmula (XXI), en la que W es un grupo lábil adecuado como, por ejemplo, bromo, con un ácido borónico apropiado de fórmula (XXII), en presencia de tri-*o*-tolilfosfina y carbonato de potasio. Dicha reacción se puede realizar en un disolvente adecuado como, por ejemplo dimetil-éter, en presencia de una base como carbonato de potasio.



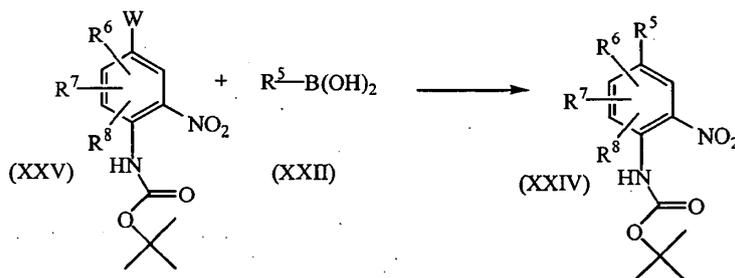
Los intermedios de fórmula (XXI) se pueden preparar haciendo reaccionar el nitrobenzeno apropiado de fórmula (XXIII) con hidrocloreuro de *O*-metil-hidroxilamina, en presencia de *t*-rec-butóxido de potasio y cloruro de cobre (I). Dicha reacción se puede realizar en un disolvente adecuado, como, por ejemplo, dimetil-éter.



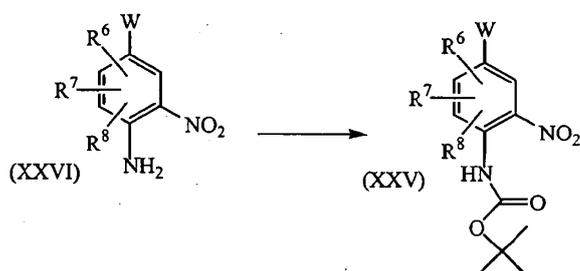
10 Los intermedios de fórmula (XIX) se pueden preparar haciendo reaccionar intermedios de fórmula (XXIV) con hidrógeno en presencia de 10% de paladio sobre carbón en un disolvente adecuado como, por ejemplo, metanol.



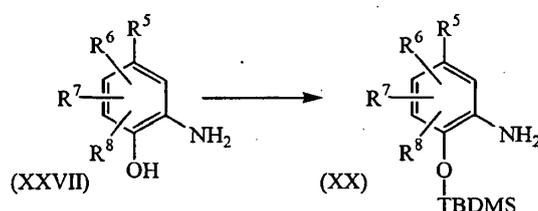
15 Los intermedios de fórmula (XXIV) se pueden preparar haciendo reaccionar el nitrofenil-carbamato de *tert*-butilo apropiado de fórmula (XXV), en la que W es un grupo lábil apropiado como, por ejemplo, bromo, con el ácido borónico de fórmula (XXII) en presencia de tetrakis (trifenilfosfina)paladio y carbonato de sodio. Dicha reacción se puede realizar en un disolvente adecuado como, por ejemplo, una mezcla de dimetil-éter y agua.



Los intermedios de fórmula (XXV) se pueden preparar haciendo reaccionar la nitroanilina apropiada de fórmula (XXVI) con anhídrido de butoxi-carbonilo terciario, en presencia de hidruro de sodio y en un disolvente adecuado, como, por ejemplo, N,N-dimetilformamida.



- 5 Los intermedios de fórmula (XX) se pueden preparar haciendo reaccionar el aminofenol apropiado de fórmula (XXVII) con terc-butil-cloro-dimetil-silano, en presencia de trietilamina en un disolvente adecuado como tetrahidrofurano.



- 10 Los compuestos de fórmula (I) y algunos de los intermedios pueden tener al menos un centro estereogénico en su estructura. Este centro estereogénico puede estar presente en una configuración R o S.

Los compuestos de fórmula (I) preparados en los procedimientos anteriormente descritos son generalmente mezclas racémicas de enantiómeros, que pueden ser separados unos de otros siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I) pueden ser convertidos en las correspondientes formas de sales diastereómeras mediante reacción con un ácido quiral adecuado. Dichas formas de sales diastereómeras son posteriormente separadas, por ejemplo, mediante cristalización selectiva o fraccionada y los enantiómeros son liberados a partir de las mismas por medio de un álcali. Una manera alternativa de separar las formas enantiómeras de los compuestos de fórmula (I) incluye una cromatografía líquida usando una fase estacionaria quiral. Dichas formas estereoquímicamente isómeras puras pueden ser derivadas también de las correspondientes formas estereoquímicamente isómeras puras de los materiales de partida apropiados, con la condición de que la reacción se produzca de forma estereoespecífica. Preferentemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizaría mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantiómeramente puros.

25 Los compuestos de fórmula (I), las sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y sus formas estereoisómeras tienen propiedades farmacológicas valiosas en cuanto que tienen un efecto inhibitorio de histona desacetilasa (HDAC).

30 La invención proporciona un método para inhibir el crecimiento anormal de células, incluidas células transformadas, administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. El crecimiento anormal de células se refiere al crecimiento de células independiente de los mecanismos reguladores normales (por ejemplo, pérdida de inhibición por contacto). Esto incluye la inhibición del crecimiento tumoral directamente provocando una detención del crecimiento, la diferenciación terminal y/o apoptosis de células cancerígenas e indirectamente inhibiendo la neovascularización de tumores.

35 Esta invención proporciona también un método para inhibir el crecimiento tumoral administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención a un sujeto, por ejemplo, un mamífero (y más particularmente, un ser humano) que necesita este tratamiento. En particular, esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de tumores mediante la administración de una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención. Ejemplos de tumores que pueden ser inhibidos, pero sin limitación, son cáncer de pulmón, por ejemplo, adenocarcinoma e incluso cáncer de pulmón de células no pequeñas) cánceres pancreáticos (por ejemplo, carcinoma pancreático como, por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino), cánceres de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer de próstata que incluye la enfermedad avanzada, tumores hematopoyéticos de línea linfocítica (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B o linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielocítica aguda (AML)), cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimal (por ejemplo, fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumores benignos de

piel (por ejemplo, queratoacantomas), carcinoma de mamas (por ejemplo, cáncer de mamas avanzado), carcinoma de riñón, carcinoma de ovarios, carcinoma de vejiga y carcinoma epidermal.

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

- 5 a) la sensibilización de tumores a radioterapia administrando el compuesto según la invención con anterioridad, durante o después de la irradiación del tumor para tratar el cáncer;
- b) tratar atopías y estados osteopatológicos como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, gota, poliartritis, artritis soriásica, espondilitis anquilosante y lupus sistémico eritematoso;
- c) inhibir la proliferación de células de músculos lisos que incluyen trastornos proliferativos vasculares, aterosclerosis y restenosis;
- 10 d) tratar estados inflamatorios y estados dermales como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, rinitis alérgica, enfermedad de ingerto frente a hospedante, conjuntivitis, asma, ARDS, enfermedad de Behcets, rechazo a trasplantes, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia, areata, escleroderma, exantema, eccema, dermatomiocitis, acné, diabetes, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis cística y bronquitis crónica;
- 15 e) tratar endometriosis, fibroides uterinos, hemorragia uterina disfuncional e hiperplasia endometrial;
- f) tratar vascularización ocular que incluye vasculopatía que afecta a vasos retinales y coroidales;
- g) tratar una disfunción cardíaca;
- h) inhibir estados inmunosupresores como el tratamiento de infecciones por HIV;
- i) tratar una disfunción renal;
- 20 j) suprimir trastornos endocrinos;
- k) inhibir una disfunción de gluconeogénesis;
- l) tratar una neuropatía, por ejemplo, enfermedad de Parkinson o una neuropatología que da lugar a un trastorno cognitivo por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o enfermedades neuronales relacionadas con poliglutamina;
- m) tratar trastornos psiquiátricos como, esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, ansiedad y psicosis;
- 25 n) inhibir una patología neuromuscular, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica;
- o) tratar una atrofia muscular espinal;
- p) tratar otros estados patológicos susceptibles de un tratamiento mediante la potenciación de la expresión de un gen;
- q) aumentar la terapia génica;
- 30 r) inhibir la adipogénesis;
- s) tratar parasitosis como la malaria.

Por tanto, la presente invención describe los compuestos de fórmula (I) de uso como una medicina, así como al uso de estos compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar uno o más de los estados anteriormente mencionados.

- 35 Los compuestos de fórmula (I), las sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y sus formas estereoisómeras pueden tener propiedades de diagnóstico valiosas en cuanto que pueden ser usados para detectar o identificar una HDAC en una muestra biológica, que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto marcado y una HDAC.

- 40 Los métodos de detección o identificación pueden usar estos compuestos que están marcados con agentes marcadores como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc. Ejemplos de los

radioisótopos incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ . Las enzimas habitualmente se hacen detectables mediante conjugación de un sustrato apropiado que, a su vez cataliza una reacción detectable. Ejemplos de los mismos incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa, preferentemente peroxidasa de rábano. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aecurina y luciferasa.

5

Las muestras biológicas pueden ser definidas como tejido corporal o fluidos corporales. Ejemplos de fluidos corporales son el fluido cerebroespinal, sangre, plasma, suero, orina, esputo, saliva y similares.

Considerando sus propiedades farmacológicas útiles, los presentes compuestos pueden ser formulados en diversas formas farmacéuticas para fines de administración.

10 Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto particular, en forma de sal de adición de bases o ácidos, como el ingrediente activo, se combina en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo que puede adoptar una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas están deseablemente en una forma de dosificación unitaria adecuada, preferentemente para una administración por vía

15 oral, rectal, percutánea o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, para preparar las composiciones en forma de dosificación oral, puede ser empleado cualquiera de los medios farmacéuticos habituales como, por ejemplo agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones de preparaciones líquidas orales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o vehículos sólidos como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos.

20 Debido a su facilidad de administración, las pastillas y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en el caso de que obviamente se empleen vehículos farmacéuticos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá habitualmente agua esterilizada, al menos en gran parte, aunque pueden ser incluidos otros ingredientes para ayudar a la solubilidad, por ejemplo, pueden ser preparadas soluciones inyectables, por ejemplo, en las que el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina

25 y solución de glucosa. Pueden ser preparadas también soluciones inyectables en cuyo caso pueden ser empleados vehículos apropiados, agentes suspensores y similares. En las composiciones adecuadas para una administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante, opcionalmente combinados con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no provoquen un efecto perjudicial significativo a la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la

30 administración a la piel y/o pueden ayudar a preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden ser administradas de diversas formas, por ejemplo, en forma de un parche transdermal, como una aplicación por extensión o como un ungüento.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas en una forma unitaria de dosificación para una facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de

35 dosificación como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones del presente documento se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Ejemplo de estas formas de dosificación unitarias de dosificación son los comprimidos (que incluyen comprimidos marcados o revestidos), cápsulas, píldoras, envases para polvos, láminas,

40 soluciones o suspensiones inyectables, cucharillas de té, cucharas de mesa y similares y sus múltiples formas segregadas.

Los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente la cantidad eficaz de los resultados de los ensayos presentados con posterioridad. En general, está contemplado que una cantidad terapéuticamente eficaz sería de

45 0,005 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal y, en particular, de 0,005 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser administrar la dosis necesaria en forma de dos, tres, cuatro más sub-dosis a intervalos apropiados durante todo el día. Dichas sub-dosis pueden ser formuladas como formas de dosificaciones unitarias que contengan, por ejemplo, 0,5 a 500 mg y, en particular, 10 mg a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Como otros aspectos de la presente invención, está prevista una combinación de un inhibidor de HDAC con otro agente anti-cancerígeno, especialmente para ser usado como una medicina, más específicamente en el tratamiento

50 de cáncer o enfermedades relacionadas.

Para el tratamiento de los estados anteriores, los compuestos de la invención pueden ser ventajosamente empleados en combinación con uno o más de otros agentes medicinales, más particularmente con otros agentes anti-cancerígenos. Ejemplos de agentes anti-cancerígenos son:

- compuestos de coordinación de platino, por ejemplo, cisplatino, carboplatino u oxadiplatino;

55 - compuestos de taxano, por ejemplo, paclitaxel o docetaxel;

- inhibidores de topoisomerasa I como compuestos de camptotecina, por ejemplo, irinotecano o topotecano;
  - inhibidores de topoisomerasa II, como derivados de podofilotoxina antitumoral, por ejemplo, etopósido o tenipósido;
  - alcaloides vinca antitumorales, por ejemplo, vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- 5 - derivados de nucleósidos antitumorales, por ejemplo, 5-fluorouracilo, gemcitabina o capecitabina;
- agentes de alquilación como mostaza de nitrógeno o nitrosourea, por ejemplo, ciclofosfamida, clorambucilo, carmustina o lomustina;
  - derivados de antraciclinas antitumorales, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina o mitoxantrona;
  - anticuerpos HER2, por ejemplo, trastuzumab;
- 10 - antagonistas de receptores de estrógenos o moduladores selectivos de receptores de estrógenos, por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, droloxifeno, faslodex o raloxifeno;
- inhibidores de aromatasas, por ejemplo, exemestano, anastrozol, letrozol y vorozol;
  - agentes de diferenciación como retinoides, vitamina D y agentes bloqueantes del metabolismo de ácido retanoico (RAMBA), por ejemplo acutano;
- 15 - inhibidores de ADN metil-transferasa, por ejemplo asacitidina;
- inhibidores de quinasa, por ejemplo, flavoperidol, mesilato de imatinib o gefitinib;
  - inhibidores de farnesiltransferasa;
  - otros inhibidores de HDAC
  - inhibidores de la trayectoria de ubiquitina-proteasoma, por ejemplo, Velcade; o
- 20 - Yondelis.
- La expresión “compuesto de coordinación de platino” se usa en la presente memoria descriptiva para indicar cualquier compuesto de coordinación de platino que inhibe el crecimiento de células tumorales, que proporcione platino en la forma de un ion.
- 25 La expresión “compuestos de taxano” indica una clase de compuestos que tiene el sistema de anillos del taxano y relacionados o derivados de extractos de ciertas especies de tejos (Taxus).
- La expresión “inhibidores de topoisomerasa” se usa para indicar enzimas que son capaces de alterar la topología del ADN en células eucarióticas. Son críticas para funciones celulares importantes y para la proliferación celular. Hay dos clases de topoisomerasas en células eucarióticas, a saber, tipo I y tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monómera con un peso molecular de aproximadamente 100.000. La enzima se une al ADN e introduce una rotura de cadena única transitoria, desenrolla la hélice doble (o permite que se desenrolle) y posteriormente vuelve a sellar la rotura antes de disociarse de la cadena de ADN. La topoisomerasa II tiene un mecanismo similar de acción que incluye la inducción de las roturas de las cadenas de ADN o la formación de radicales libres.
- 30
- La expresión “compuestos de camptotecina” se usa para indicar compuestos que están relacionados o que derivan del compuesto de camptotecina parental que es un alcaloide insoluble en agua derivado del árbol chino Camptothecin acuminata y del árbol indio Nothapodytes foetida.
- 35
- La expresión “compuestos de podofilotoxina” se usa para indicar compuestos que están relacionados o son derivados de la podofilotoxina parental que es extraída de la planta mandrágora.
- La expresión “alcaloides vinca antitumorales” se usa para indicar compuestos que están relacionados o son derivados de extractos de la planta bígaro (Vinca rosea).
- 40 La expresión “agentes de alquilación abarca un grupo diverso de productos químicos que tienen la característica común de tener la capacidad de contribuir, bajo condiciones fisiológicas, a grupos alquilo para macromoléculas biológicamente vitales como ADN. Con la mayoría de los agentes más importantes como las mostazas nitrogenadas

5 y las nitrosoureas, los restos de alquilación activos son generados *in vivo* después de reacciones complejas de degradación, algunas de las cuales son enzimáticas. Las acciones farmacológicas más importantes de los agentes de alquilación son las que perturban los mecanismos fundamentales involucrados en la proliferación celular, en particular la síntesis de ADN y la división celular. La capacidad de los agentes de alquilación para interferir con la función y la integridad del ADN en tejidos de proliferación rápida proporciona la base para sus aplicaciones terapéuticas y para muchas de sus propiedades tóxicas.

La expresión “derivados de antraciclina antitumorales” comprende antibióticos obtenidos a partir del hongo *Strep. peuticus var. Caesius* y sus derivados, caracterizados por tener una estructura de anillo de tetraciclina con un azúcar inusual, daunosamina, unido mediante un enlace glicosídico.

10 Se ha mostrado que la amplificación de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2) en carcinomas de mamas primarios, se correlaciona con un pronóstico clínico escaso para ciertos pacientes. El Trastuzumab es un anticuerpo kappa de IgG1 monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante altamente purificado que se une con afinidad y especificidad elevadas al dominio extracelular del receptor HER2.

15 Muchos cánceres de mama tienen receptores de estrógenos y el crecimiento de estos tumores puede ser estimulado mediante estrógenos. Las expresiones “antagonistas de receptores de estrógenos” y “moduladores de receptores de estrógenos selectivos” se usan para indicar inhibidores competitivos de estradiol que se unen al receptor de estrógenos (ER). Los moduladores de receptores de estrógenos selectivos, cuando se unen al ER inducen un cambio en la forma tridimensional del receptor, modulando su unión al elemento de respuesta de estrógenos (ERE) en el ADN.

20 En mujeres post-menopáusicas, la fuente principal de estrógenos en circulación es a partir de la conversión de andrógenos adrenales y de ovarios (androstenediona y testosterona) en estrógenos (estrone y estradiol) mediante la enzima aromatasas en tejidos periféricos. La privación de estrógenos a través de la inhibición o inactivación de aromatasas es un tratamiento eficaz y selectivo para algunas pacientes post-menopáusicas con cáncer de mama dependiente de hormonas.

25 La expresión “agente antiestrógenos” se usa en la presente memoria descriptiva para incluir no solamente antagonistas de receptores de estrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos, sino también inhibidores de aromatasas como se expuso con anterioridad.

30 La expresión “agentes de diferenciación” abarca compuestos que, de diversas formas pueden inhibir la proliferación celular e inducir la diferenciación. La vitamina D y los retinoides se conoce que desempeñan una función principal en la regulación del crecimiento y diferenciación de una amplia diversidad de tipos de células normales y malignas. Los agentes bloqueantes del metabolismo de ácido retinoico (RAMBA) aumentan los niveles de ácidos retinoicos endógenos inhibiendo el catabolismo mediado por citocromo P450 de ácidos retinoicos.

35 Los cambios de metilación de ADN están entre las anomalías más comunes en la neoplasia humana. La hipermetilación con los promotores de genes seleccionados está habitualmente asociada con la inactivación de los genes involucrados. La expresión “inhibidores de metil-transferasa de ADN” se usa para indicar compuestos que actúan a través de la inhibición farmacológica de ADN metil-transferasa y la reactivación de la expresión génica de supresores de tumores.

La expresión “inhibidores de quinasa” comprende inhibidores potentes de quinasa que están involucrados en el progreso del ciclo celular y la muerte celular programada (apoptosis).

40 La expresión “inhibidores de farnesiltransferasa” se usa para indicar compuestos que estaban diseñados para evitar la farnesilación de Ras y otras proteínas intracelulares. Se ha mostrado que tienen efecto sobre la proliferación y supervivencia de células malignas.

La expresión “otros inhibidores de HDAC” comprende, pero sin limitación:

- carboxilatos, por ejemplo, butirato, ácido cinámico, butirato de 4-fenilo o ácido valproico;

45 - ácidos hidroxámicos, por ejemplo, ácido suberoilánilido-hidroxámico (SAHA), análogos de SAHA que contienen piperazina, hidrozamato de biarilo A-161906 y sus análogos de carbazoil-éter, tetrahidropiridina y tetralona, aril-N-hidroxicarboxamidas bicíclicas, piroxamida, CG-1521, PXD-101, ácido sulfonamido-hidroxámico, LAQ-824, LBH-589, tricostatina A (TSA), oxamflatina, scriptaid, moléculas tríclicas relacionadas con scriptaid, ácido m-carboxi-cinámico, ácido bis-hidroxámico (CBHA), ácidos hidroxámicos de tipo CBHA, análogos de ácido trapoxin-hidroxámico, CRA-024781, R306465 y ácidos bezoil- y heteroaril-hidroxámicos relacionados, aminosuberatos y malonildiamidas;

50 - tetrapéptidos cíclicos, por ejemplo, trapoxima, apidicina, depsipéptidos, compuestos relacionados con spirucostatina, RedFK-228, tetrapéptidos cíclicos que contienen sulfhidrilo (SCOP), tetrapéptidos cíclicos que

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

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

- depudecina.

5 La expresión "inhibidores de la trayectoria de ubiquitina-proteasoma" es usada para identificar compuestos que inhiben la destrucción dirigida diana de proteínas celulares en la proteosoma, que incluyen proteínas reguladoras del ciclo celular.

10 Para el tratamiento de cáncer, los compuestos según la presente invención pueden ser administrados a un paciente como se describió anteriormente conjuntamente con irradiación. Irradiación significa radiación ionizante y, en particular radiación gamma, especialmente la emitida por aceleradores lineales o por radionúclidos que son de uso común hoy día. La irradiación de tumores por radionúclidos puede ser externa o interna.

La presente invención se refiere también a una combinación según la invención de un agente anti-cancerígeno y un inhibidor de HDAC según la invención.

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

15 La presente invención se refiere también a combinaciones según la invención para inhibir el crecimiento de células tumorales.

La presente invención se refiere también a un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto humano, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una combinación según la invención.

20 Esta invención proporciona adicionalmente un método para inhibir el crecimiento anormal de células, que incluyen células transformadas, administrando una cantidad eficaz de una combinación según la invención.

25 El otro agente médico e inhibidor de HDAC puede ser administrado de forma simultánea (por ejemplo, en composiciones separadas o unitarias) o secuencial, en cualquier orden. En este último caso, los dos compuestos serán administrados en un período y en una cantidad y de una manera que sean suficientes para asegurar que se consigue un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el método y el orden preferidos de administración y las respectivas cantidades y regímenes de dosificación para cada componente de la composición dependerán del otro agente médico particular y el inhibidor de HDAC que estén siendo administrados, de su vía de administración, del tumor particular que esté siendo tratado y del hospedante particular que esté siendo tratado. El método óptimo y el orden de administración de las cantidades de las dosificaciones y su régimen pueden ser fácilmente determinados por los expertos en la técnica usando métodos convencionales y considerando la información expuesta en la presente memoria descriptiva.

30

El compuesto de coordinación de platino se administra ventajosamente en una dosificación de 1 a 500 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, por ejemplo, 50 a 400  $\text{mg}/\text{m}^2$ , particularmente para cisplatino en una dosificación de aproximadamente 75  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para carboplatino en aproximadamente 300  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

35 El compuesto de taxano es administrado ventajosamente en una dosificación de 50 a 400 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, por ejemplo, 75 a 250  $\text{mg}/\text{m}^2$ , particularmente para paclitaxel en una dosificación de aproximadamente 175 a 250  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para docetaxel en aproximadamente 75 a 150  $\text{mg}/\text{m}^2$  pro transcurso de tratamiento.

40 El compuesto de camptotecina es administrada ventajosamente en una dosificación de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, por ejemplo, 1 a 300  $\text{mg}/\text{m}^2$ , particularmente para irinotecano en una dosificación de aproximadamente 100 a 350  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para topotecano en aproximadamente 1 a 2  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

45 El derivado de podofilotoxina antitumoral es ventajosamente administrado en una dosificación de 30 a 300 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, por ejemplo, 50 a 250  $\text{mg}/\text{m}^2$ , particularmente para ietopósido en una dosificación de aproximadamente 35 a 100  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para tenipósido en aproximadamente 50 a 250  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

50 E alcaloide vinca antitumoral es ventajosamente administrado en una dosificación de 2 a 30 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, particularmente para vinblastina en una dosificación de aproximadamente, 3 a 12  $\text{mg}/\text{m}^2$ , para vincristina en una dosificación de aproximadamente 1 a 2  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para vinorelbina en una dosificación de aproximadamente 10 a 30  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

El derivado de nucleósido antitumoral es ventajosamente administrado en una dosificación de 200 a 2500 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, por ejemplo, 700 a 1500  $\text{mg}/\text{m}^2$ , particularmente para 5-FU en de 200 a 500  $\text{mg}/\text{m}^2$ , para gencitabina en una dosificación de aproximadamente 800 a 1200  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para capecitabina en aproximadamente 1000 a 2500  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

5 Los agentes de alquilación como mostaza nitrogenada o nitroso urea son ventajosamente administrados en una dosificación de 100 a 500 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, por ejemplo, 120 a 200  $\text{mg}/\text{m}^2$ , particularmente para ciclofosfamida en una dosificación de aproximadamente 100 a 500  $\text{mg}/\text{m}^2$ , para cloranbucilo en una dosificación de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg, para carmustina en una dosificación de aproximadamente 150 a 200  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para lomustina en una dosificación de aproximadamente 100 a 150  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

10 El derivado de antraciclina antitumoral es ventajosamente administrado en una dosificación de 100 a 75 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, por ejemplo, 15 a 60  $\text{mg}/\text{m}^2$ , particularmente para doxorubicina en una dosificación de aproximadamente 40 a 75  $\text{mg}/\text{m}^2$ , para daunorubicina en una dosificación de aproximadamente 25 a 45 en  $\text{mg}/\text{m}^2$  y para hidarubicina en una dosificación de aproximadamente 10 a 15  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

15 El Trastuzumab es ventajosamente administrado en una dosificación de 1 a 5 mg por metro cuadrado ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de área superficial corporal, particularmente 2 a 4  $\text{mg}/\text{m}^2$  por transcurso de tratamiento.

20 El agente antiestrógeno es ventajosamente administrado en una dosificación de aproximadamente 1 a 100 mg al día, dependiendo del agente particular y del estado que esté siendo tratado. El tamoxifeno es ventajosamente administrado por vía oral en una dosificación de 5 a 50 mg, preferentemente 10 a 20 mg, dos veces al día, continuando la terapia durante un tiempo suficiente para conseguir y mantener un efecto terapéutico. El toremifeno es ventajosamente administrado por vía oral en una dosificación de aproximadamente 60 mg una vez al día, continuando la terapia durante un tiempo suficiente para conseguir y mantener un efecto terapéutico. El anastrozol es ventajosamente administrado por vía oral en una dosificación de aproximadamente 1 mg una vez al día. El droloxifeno es ventajosamente administrado por vía oral en una dosificación de aproximadamente 20- 100 mg una vez al día. El raloxifeno es ventajosamente administrado por vía oral en una dosificación de aproximadamente 60 mg una vez al día. El exemestano es ventajosamente administrado por vía oral en una dosificación de aproximadamente 25 mg una vez al día.

25 Estas dosificaciones pueden ser administradas, por ejemplo, una vez dos o más veces por transcurso del tratamiento, que puede ser repetido, por ejemplo, cada 7, 14, 21 o 28 días.

30 Considerando sus propiedades farmacológicas útiles, los componentes de las combinaciones según la invención, es decir, el otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC pueden ser formulados en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Los componentes pueden ser formulados separadamente en composiciones farmacéuticas individuales o en una composición farmacéutica unitaria que contenga ambos componentes.

35 La presente invención, por lo tanto, se refiere también a una composición farmacéutica que comprende el otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC junto con uno o más vehículos farmacéuticos.

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

40 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de una combinación según la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células tumorales.

45 La presente invención se refiere adicionalmente a un producto que contiene como primer ingrediente activo un inhibidor de HDAC según la invención y, como segundo ingrediente activo, un agente anti-cancerígeno, en forma de una preparación combinada para un uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que sufren cáncer.

#### Parte experimental

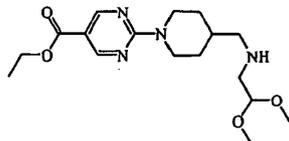
Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

50 En los sucesivos, "DMF" se define como N,N-dimetilformamida, "DCM" se define como diclorometano, "THF" se define como tetrahidrofurano, "TFA" se define como ácido trifluoroacético, "EtOAc" se define como acetato de etilo, "EtOH" se define como etanol, "MeOH" se define como metanol, "DIPE" se define como diisopropil-éter, "EDC" se define como monohidrocloruro de N'-(etilcarbonimidilo)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina y "HOBT" se define como 1-hidroxibenzotriazol.

## A. Preparación de los compuestos intermedios

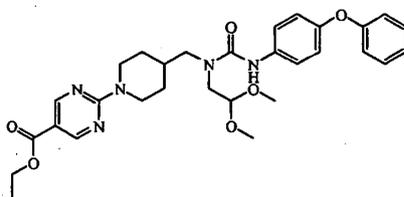
## Ejemplo A1

## a) Preparación de intermedio 1



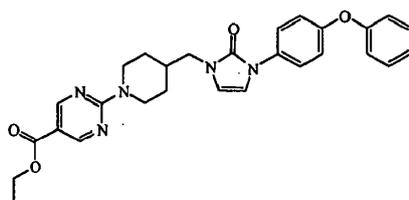
- 5 Una mezcla de éster etílico de ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinocarboxílico y dimetoxi-acetaldehído (0,0065 moles) en THF (30 ml) se agitó durante una hora a 50 °C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (0,0065 moles) y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió DCM (20 ml). La reacción se inactivó con agua (10 ml) y NaHCO<sub>3</sub>. Las capas se separaron. La capa orgánica se secó, se filtró y el disolvente se evaporó, produciendo el intermedio 1 (usado en la
- 10 siguiente etapa de la reacción, sin purificación adicional).

## b) Preparación de intermedio 2



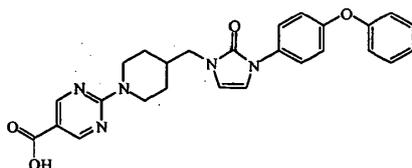
- Se disolvieron intermedio 1 (0,0010 moles) y trietilamina (0,0020 moles) en DCM (5 ml). Se añadió 1-isocianato-4-fenoxy-benceno (0,0015 moles). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió tris-(2-aminoetil)-amina-poliestireno HL (Novabiochem; Cat. No. 01-64-0170) (0,0016 moles). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente, seguidamente se filtró y el filtrado se concentró, produciendo el intermedio 2.
- 15

## c) Preparación de intermedio 3



- 20 Se añadió ácido fórmico (2 ml) al intermedio 2 (0,0010 moles). La mezcla de reacción se agitó durante una hora a 50 °C en un recipiente de reacción cerrado. El disolvente se evaporó a 50 °C en un dispositivo Genevac. El residuo se recogió en DCM (15 ml), se lavó dos veces con solución acuosa al 10% de NaHCO<sub>3</sub> (2 ml), se secó, seguidamente se aclaró nuevamente con DCM. El disolvente se evaporó, produciendo el intermedio 3 (usando en la siguiente etapa de reacción, sin purificación adicional).

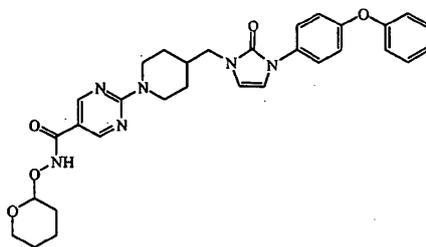
## 25 d) Preparación de intermedio 4



Se disolvió intermedio 3 (0,0005 moles) en THF (4 ml). Se añadió hidróxido de sodio 1 N (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente en un recipiente cerrado. Se añadió ácido clorhídrico 1N (2 ml), se mezcló y seguidamente el disolvente se evaporó, produciendo intermedio 4 (usado en la siguiente

etapa de reacción, sin purificación adicional).

e) Preparación de intermedio 5



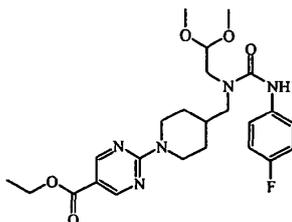
- 5 Se disolvieron intermedio 4 (máximo 0,0005 moles) monohidrocloreto de N'-(etilcarbonimidoil)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina, (0,00065 moles), 1-hidroxi-1H-benzotriazol (0,00065 moles) y trietilamina (0,00075 moles) en THF (15 ml) a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina[6723-30-4] (0,00065 moles) y la mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó. Se añadió DCM (25 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con una solución acuosa al 10% de NaCO<sub>3</sub> (3 ml), seguidamente se secó, (se filtró) a través de cartuchos Extrelut ® y el disolvente se evaporó. Cada residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa. Las fracciones de producto se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo el intermedio 5.
- 10

La siguiente tabla recoge los intermedios que se prepararon según uno de los ejemplos anteriores.

Interm. Nº 6; Ej. A1b	Interm. Nº 7; Ej. A1c
Interm. Nº 8; Ej. A1d	Interm. Nº 9; Ej. A1e

Ejemplo A2

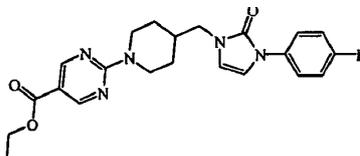
- 15 a) Preparación de intermedio 10



Se recogió intermedio 1 (0,0003 moles) en DCM (26 ml). Se añadió 1-fluoro-4-isocianato-benceno (0,0004 moles). Seguidamente se añadió trietilamina (0,0006 moles). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió tris-(2-aminoetil)-amina-poliestireno HL (Novabiochem Cat. No. 01-64-0170)

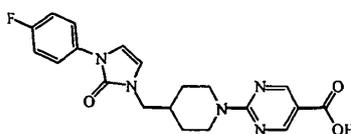
(0,0004 moles) y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente, seguidamente se filtró y el filtrado se evaporó, produciendo el intermedio 10.

b) Preparación de intermedio 11



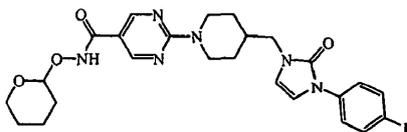
5 Se añadió ácido fórmico (1 ml) a intermedio 10 (0,0003 moles). La mezcla de reacción se agitó durante una hora a 50°C. El disolvente se evaporó, produciendo intermedio 11.

c) Preparación de intermedio 12



10 Se añadió hidróxido de sodio acuoso 1 N/THF 1:1 (0,0010 moles) a intermedio 11 (0,0003 moles) y la mezcla se agitó durante una noche a 50°C. Se añadió ácido clorhídrico acuoso 1N (0,0010 moles) y el disolvente se evaporó, produciendo el intermedio 12.

d) Preparación de intermedio 13



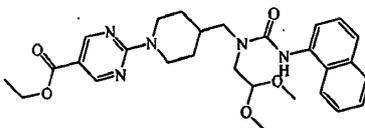
15 Se disolvió intermedio 12 (< 0,0003 moles) en DMF (1 ml). Seguidamente se añadió una solución de monohidrócloruro de N'-(etilcarbonylimidóil)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina (0,00004 moles), 1-hidroxil-1H-benzotriazol (0,0004 moles) y trietilamina (0,00045 moles) en THF (3ml) y DCM (1 ml). Seguidamente se añadió una solución de O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0004 moles) en DMF (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió DCM (20 ml) y la mezcla de reacción se lavó con solución acuosa al 10% de NaHCO<sub>3</sub>, seguidamente se secó sobre Extrelut®. El filtrado se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa. Las fracciones de producto se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo el intermedio 13.

Las siguientes tablas recogen los intermedios que se prepararon según uno de los ejemplos anteriores.

<p>Interm. Nº 41, Ex A1a</p>	
<p>Interm. Nº 28; Ej. A2a</p>	<p>Interm. Nº 29; Ej. A2b</p>
<p>Interm. Nº 30; Ej. A2c</p>	<p>Interm. Nº 31; Ej. A2d</p>

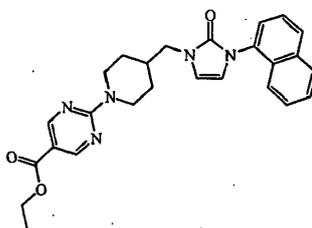
## Ejemplo A3

## a) Preparación de intermedio 14



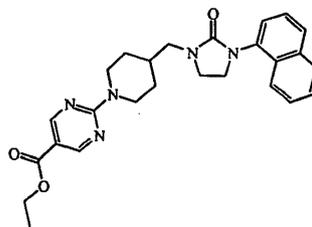
- 5 Se disolvieron intermedio 1 (0,0010 moles) y trietilamina (0,0020 moles) en DCM (5 ml). Se añadió 1-isocianato-naftaleno (0,0015 moles). Seguidamente se añadió tris-(2-aminoetil)-amina-poliestireno HL (Novabiochem; .Cat. No. 01-64-0170) (0.0016 moles). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente, seguidamente se filtró y el filtrado se evaporó, produciendo el intermedio 14.

## b) Preparación de intermedio 15



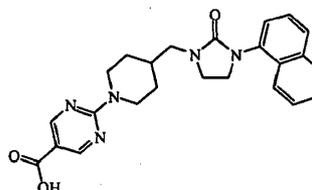
- 10 Se añadió ácido fórmico (2 ml) al intermedio 14 (0,0010 moles). La mezcla de reacción se agitó durante una hora a 50 °C en un recipiente de reacción cerrado. El disolvente se evaporó a 50°C. El residuo se recogió en DCM (15 ml), se lavó dos veces con solución acuosa al 10% de NaHCO<sub>3</sub> (2 ml), seguidamente se secó sobre Extrelut®, seguidamente se aclaró nuevamente con DCM. El disolvente se evaporó, produciendo el intermedio 15 (usado en la siguiente etapa de reacción, sin purificación adicional).

## 15 c) Preparación de intermedio 16



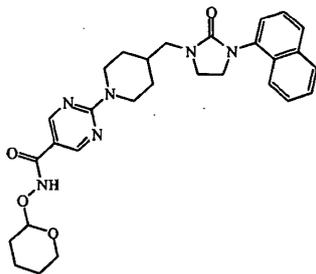
Una mezcla de intermedio 15 (0,0005 moles) y trietilamina (0,100 g) en THF (30 ml) se hidrogenó durante una noche a temperatura ambiente con Pd/C 10% (0,100 g) como catalizador. Después de la recogida de H<sub>2</sub> (1 equivalente) el catalizador se separó por filtración sobre dicalcita y el filtrado se evaporó, produciendo el intermedio 16.

## 20 d) Preparación de intermedio 17



- 25 Se disolvió intermedio 16 (0,0005 moles) en solución acuosa 1 N de hidróxido de sodio (3ml). Se añadió THF (3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente en un recipiente cerrado. Se añadió solución acuosa 1 N de ácido clorhídrico (3 ml) y el disolvente se evaporó, produciendo el intermedio 17 (usado en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional).

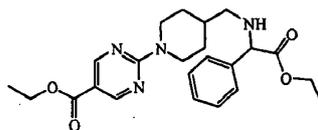
## e) Preparación de intermedio 18



5 Se disolvieron intermedio 17 (0,0005 moles) y monohidrocloreto de N'-(etilcarbonimidoyl)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina (0,00065 moles), 1-hidroxi-1H-benzotriazol (0,00065 moles) y trietilamina (0,00075 moles) en THF (15 ml) a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,00065 moles). La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó. Se añadió DCM (25 ml al residuo y la solución orgánica se lavó con solución acuosa al 10% de NaHCO<sub>3</sub> (3 ml), seguidamente se secó a través de cartuchos Extrelut®. El disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC preparatoria de fase inversa. Las fracciones de productos se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,026 g de intermedio 18.

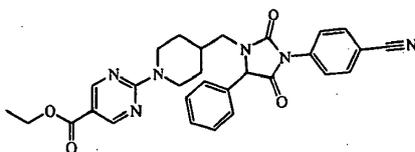
## Ejemplo A4

## a) Preparación de intermedio 19



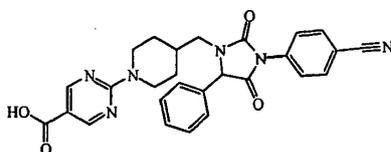
15 Una mezcla de éster etílico de ácido 2-[4-(aminometil)-piperidinil]-5-pirimidinocarboxílico (0,0189 moles), éster etílico de de ácido  $\alpha$ -cloro-bencenoacético (0,0199 moles) y carbonato de potasio (5,2 g) en acetonitrilo (125 ml) se agitó y se llevó a reflujo durante 15 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>) se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (8,5 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40  $\mu$ m) (eluyente: DCM/EtOAc 95/5 a 90/10). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 3,5 g (43%) de intermedio 19.

## 20 b) Preparación de intermedio 20



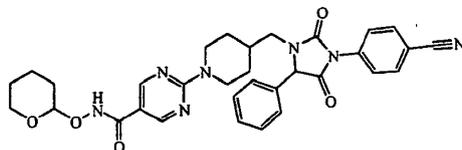
25 Se añadió 4-isocianato-benzonitrilo (0,0021 moles) a una mezcla de intermedio 19 (0,0014 moles) en THF (25 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (1 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (5  $\mu$ m) eluyente: DCM/MeOH 100/0 a 94/6). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó. El residuo (0,47 g) se recogió en EtOAc y se secó, produciendo 0,36 g del intermedio 20, punto de fusión 204°C.

## c) Preparación de intermedio 21



Una mezcla de intermedio 20 (0,0007 moles) en ácido clorhídrico N (15 ml) y dioxano (15 ml) se agitó y se llevó a reflujo durante 8 horas. El disolvente se evaporó. Se añadió agua (30 ml). El precipitado se filtró, se lavó con agua, seguidamente con DIPE y se secó, produciendo 0,34 g (94%) de intermedio 21.

d) Preparación de intermedio 22

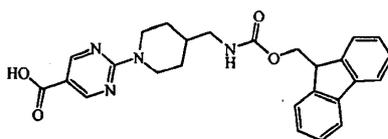


5

Se añadieron 1-hidroxil-1H-benzotriazol (0,001 moles) y seguidamente monohidrocloruro de N'-(etilcarbonimidoil)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina (0,001 mol) a una solución de intermedio 21 (0,0007 moles), O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,01 mol) y trietilamina (0,002 moles) en DCM/THF (35 ml) bajo flujo de N<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,5 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre kromasil® (5 μm) (eluyente: DCM/MeOH 100/0 a 95/5). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó. El residuo (0,3 g) se cristalizó en DIPE/dietil-éter. El precipitado se separó por filtración y se secó. El residuo (0,25 g) se secó a 70 °C durante 4 horas, produciendo 0,22 g (54%) de intermedio 22, punto de fusión 182°C.

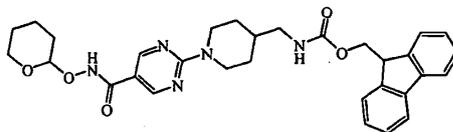
15 Ejemplo A5

a) Preparación de intermedio 23



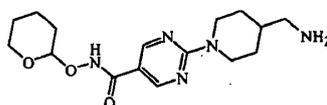
Una mezcla de éster etílico de ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-piridinocarboxílico, (0,0072 moles) en THF (40 ml) e hidróxido de sodio 1N (40 ml) se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió ácido clorhídrico 1N (40 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos. Se añadió carbonato de sodio (0,0216 moles). La mezcla se agitó durante 10 minutos. Se añadió gota a gota 1-[[9H-fluoren-9-imetoxi]carbonil]oxi]-2,5-pirrolidinona (0,0072 moles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, seguidamente se enfrió a 0 °C y se acidificó con ácido clorhídrico. El precipitado se filtró, se lavó con dietil-éter y se secó, produciendo 4,1 g (100%) de intermedio 23.

25 b) Preparación de intermedio 24



Se añadieron trietilamina (0,02 moles) monohidrocloruro de N'-(etilcarbonimidoil)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina, (0,0082 moles) y 1-hidroxil-1H-benzotriazol (0,0082 moles) a temperatura ambiente a una mezcla de intermedio 23 (0,0068 moles) en DCM/THF (200 ml) bajo flujo de N<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0082 moles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 10%, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (4 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 92/2/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 3,4 g (89%) de intermedio 24.

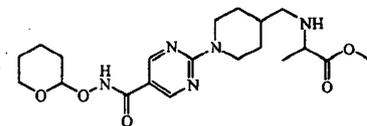
35 c) preparación de intermedio 25



## ES 2 377 446 T3

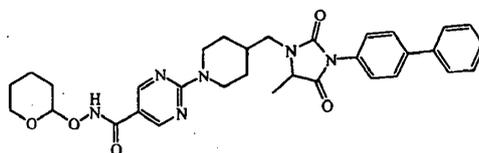
5 Una mezcla de intermedio 24 (0,0355 moles) y piperidina (0,089 moles) en DCM (400 ml) se agitó a 35 °C durante 75 horas. El disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40  $\mu$ m) (eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 80/20/2). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 6,7 g (56%). Una fracción (0,79 g) se cristalizó en dietil-éter. El precipitado se preparó por filtración y se secó, produciendo 0,62 g de intermedio 25, punto de fusión: 129°C.

d) Preparación de intermedio 26



10 Una mezcla de intermedio 25 (0,0053 moles), éster metílico de ácido 2-bromo-propanoico (0,0056 moles) y carbonato de potasio (0,1 mol) en acetonitrilo (75 ml) se agitó y se llevó a reflujo durante 3 horas, seguidamente se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (2,2 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40  $\mu$ m) (eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 97/3/0,1 a 9674/0,5). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,62 g (28%) de intermedio 26.

e) Preparación de intermedio 27

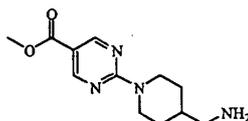


15 Se añadió 4-isocianato.1,1'-bifenilo (0,0009 moles) a temperatura ambiente a una solución de intermedio 26 (0,0006 moles) en THF (14 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. Esta fracción (0,75 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (5  $\mu$ m) (eluyente: DCM/MeOH 100/0 a 90/10). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,15 g (43%) de intermedio 27.

20

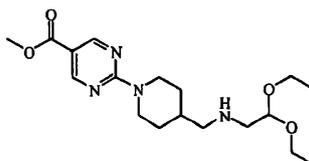
Ejemplo A6

a) Preparación de Intermedio 32



25 Una solución de éster metílico de ácido 2-cloro-5-pirimidinocarboxílico (0,058 moles) en N,N-dimetil-acetamida (80 ml) se añadió gota a gota a una solución de 4-piperidinometamina (0,116 moles) y N-etil-N-1-metiletil)-2-propanamina (0,145 moles) en N,N-dimetil-acetamida (150 ml) bajo flujo de N<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos, se vertió en hielo-agua y se extrajo con EtOAc y seguidamente con DCM. La capa orgánica se lavó con agua, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se cristalizó en DIPE. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 10 g(65%) de intermedio 32.

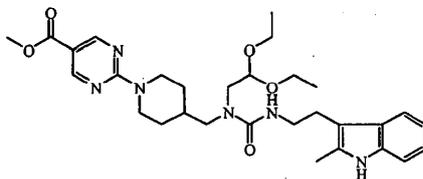
30 b) Preparación de intermedio 33



35 Una mezcla de intermedio 32 (0,012 moles) y carbonato de potasio (0,0383 moles) en acetonitrilo (150 ml) se agitó a reflujo durante 2 horas. Se añadió 2-bromo-1,1-dietoxi-etano (0,0479 moles). La mezcla se agitó y se llevó a reflujo durante 15 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (8 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40

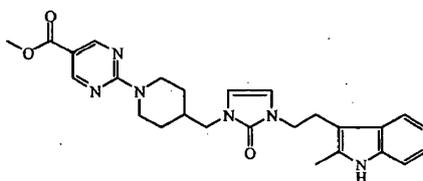
$\mu\text{m}$ ) (eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 98/2/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 1,9 g (43%) de intermedio 33.

c) preparación de intermedio 34



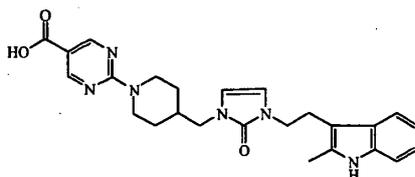
- 5 Una solución de intermedio 33 (0,0022 moles) y trietilamina (0,003 moles) en THF (25 ml) se añadió gota a gota a 5 °C a una solución de tricloro-metanol, carbonato (2:1) (0,0009 moles) en THF (15 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron gota a gota una solución de 2-metil-1H-indol-3-etanamina (0,0026 moles) y trietilamina (0,003 moles) en THF (25 ml). La mezcla se agitó a 50 °C durante 15 horas, se vertió en hielo-agua y se extrajo dos veces con EtOAc. La capa orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (1,6 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (5  $\mu\text{m}$ ) (eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 99/1/0,05 a 94/6/0,3). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,73 g de intermedio 34.
- 10

d) Preparación de intermedio 35



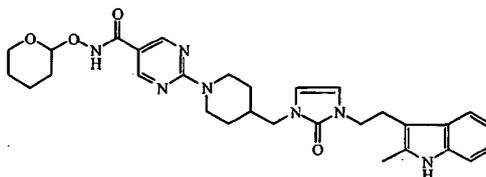
- 15 Una mezcla de intermedio 34 (0,0013 moles) en ácido clorhídrico 1 N (20 ml) y MeOH (20 ml) se agitó a 55 °C durante 3 horas. Se evaporó metanol. El residuo se basificó con carbonato de potasio. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó NaCl saturado, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,64 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40  $\mu\text{m}$ ) (eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 97/3/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,52 g (87%) de intermedio 35, punto de fusión 85 °C.
- 20

e) Preparación de intermedio 36



- 25 Una mezcla de Intermedio 35 (0,0011 moles) e hidróxido de litio (0,022 moles) en THF (20 ml) y agua (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas, seguidamente se recogió en ácido clorhídrico 3 N hasta que el pH se ajustó a 4. La mezcla se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó, produciendo 0,5 g (100%) de intermedio 36.

f) Preparación de intermedio 37

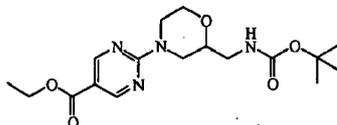


- 30 Se añadieron monohidrocloreto de N'-(etilcarbonimidóil)-N,N-dimetil-1,3-propanodiamina (0,0016 moles) y 1-hidroxi-1H-benzotriazol (0,0016 moles) a temperatura ambiente a una solución de intermedio 36 (0,001 mol), O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0016 moles) y trietilamina (0,0032 moles) en DCM/THF (50/50) (40 ml). La mezcla se

agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,74 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (10  $\mu\text{m}$ ) (eluyente: DCM/MeOH/ $\text{NH}_4\text{OH}$  97/3/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,49 g (80%) de intermedio 37, punto de fusión 116  $^\circ\text{C}$ .

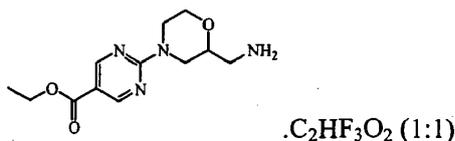
## 5 Ejemplo A7

## a) Preparación de Intermedio 38



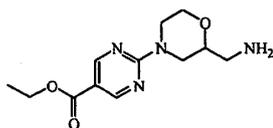
Una solución de éster etílico de ácido 2-(metilsulfonil)-5-mirimidinocarboxílico (0,0118 moles) en acetonitrilo (30 ml) se añadió gota a gota a una solución de éster 1,1-dimetiletilico de ácido (2-morfolinilmetil)-carbámico (0,0098 moles) y carbonato de potasio (0,0196 moles) en acetonitrilo (80 ml) bajo flujo de  $\text{N}_2$ . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y el disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo (5,6 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-35  $\mu\text{m}$ ) (eluyente: DCM/MeOH 99/1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó. El residuo se cristalizó en dietil-éter. El precipitado se filtró y se secó, produciendo 0,3 g de intermedio 38, punto de fusión 100  $^\circ\text{C}$ .

## b) Preparación de intermedio 39



Se añadió TFA (7,5 ml) a 0  $^\circ\text{C}$  a una mezcla de intermedio 38 (0,037 moles) en DCM (150 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El disolvente se evaporó. Se añadió dietil-éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 13,5 g (96%) de intermedio 39, punto de fusión 180  $^\circ\text{C}$ .

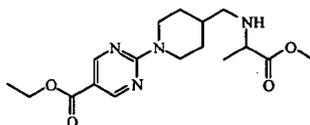
## c) Preparación de intermedio 40



Se añadió intermedio 39 (0,0105 moles) a una solución de carbonato de potasio al 10% (100 ml) en DCM (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y seguidamente se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y el disolvente se evaporó, produciendo 2,6 g de intermedio 40.

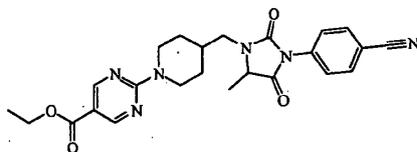
## Ejemplo A8

## a) Preparación de intermedio 42



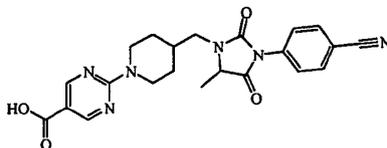
Una mezcla de éster etílico de ácido 2-[4-(aminometil)-1-piperidinil]-5-pirimidinocarboxílico (0,0007 moles), éster metílico de ácido 2-bromo-propanoico (0,007 mols) y carbonato de potasio (0,0015 moles) en acetonitrilo (5 ml) se agitó y se llevó a reflujo durante 3 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y el disolvente se evaporó, produciendo 0,24 g de intermedio 42.

## b) Preparación de intermedio 43



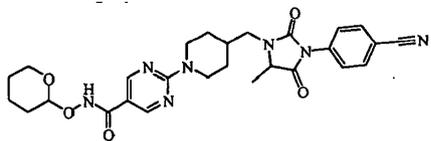
- 5 Se añadió 4-isocianato-benzonitrilo (0,0006 moles) a temperatura ambiente a una solución de intermedio 42 (0,0006 moles) en THF (15 ml). La mezcla se agitó y se llevó a reflujo durante 15 horas. Se añadió 4-isocianato-benzonitrilo (1 equivalente). La mezcla se agitó y se llevó a reflujo durante 24 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se recogió en un mínimo de DCM. El precipitado se eliminó por filtración. El filtrado se evaporó y se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (20 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 98/2/0,1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,16 g (48%) de intermedio 43.

## 10 c) Preparación de intermedio 44



- 15 Una mezcla de intermedio 43 (0,0003 moles) y monohidrato de hidróxido de litio (0,0007 moles) en THF (5 ml) y agua (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió ácido clorhídrico 1 N. La mezcla se evaporó hasta sequedad. Este producto se usó directamente en la siguiente etapa de la reacción, produciendo intermedio 44.

## d) Preparación de Intermedio 45

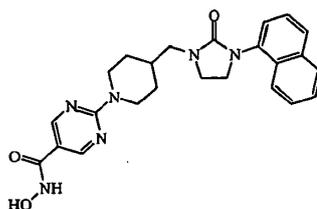


- 20 Una mezcla de intermedio 44 (0,0003 moles), O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,0004 moles), EDC (0,0004 moles) HOBT (0,0004 moles) y trietilamina (0,0005 moles) en DCM/THF (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo (0,2 g) se purificó mediante cromatografía de columna sobre kromasil® (10 μm) (eluyente: DCM/MeOH 99/1). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó, produciendo 0,108 g (59%) de intermedio 45, punto de fusión 120 °C.

## B. Preparación de los Compuestos finales

## 25 Ejemplo B1

## Preparación de compuesto 1

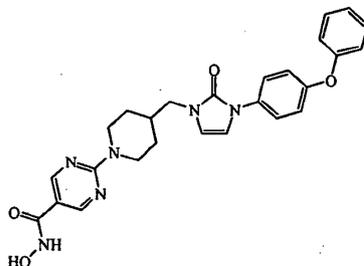


- 30 Se añadió TFA al 5% en DCM/MeOH (2 ml) a intermedio 18 (0,0005 moles), y la solución resultante se agitó en tubos sellados a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó bajo un flujo de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Se añadió nuevamente TFA al 5% en DCM/MeOH y la mezcla se agitó hasta que se

completó la desprotección (verificación mediante LC/MS). El disolvente se evaporó bajo flujo de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Se añadió 1,4-dioxano (2 ml) y se repitió el procedimiento de evaporación a 40 °C para proporcionar el producto final, produciendo 0,022 g de compuesto 1.

## Ejemplo B2

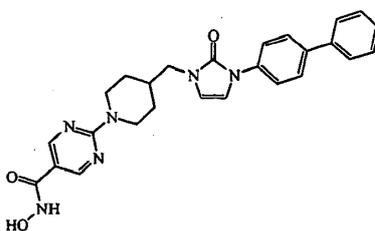
## 5 Preparación de compuesto 2



10 Se añadió TFA al 5% en DCM/MeOH 1/1 (4 ml) a intermedio 5 (máximo 0,0005 moles), y la solución resultante se agitó en tubos sellados a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó bajo un flujo de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Se añadió nuevamente TFA al 5% en DCM/MeOH 1/1 (4 ml) y la mezcla se agitó hasta que se completó la desprotección (verificado mediante LC/MS). El disolvente se evaporó bajo flujo de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Se añadió 1,4-dioxano (2 ml) y se repitió el procedimiento de evaporación a 40 °C para proporcionar los productos finales, produciendo compuesto 2.

## Ejemplo B3

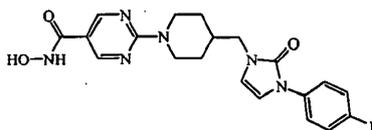
## Preparación de compuesto 3



15 20 Se añadió TFA al 5% DC/MeOH 1/1 (4 ml) al intermedio 9 (máximo 0,0005 moles), y la solución resultante se agitó en tubos sellados a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó bajo un flujo de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Se añadió nuevamente TFA al 5% en DCM/MeOH 1/1 (4 ml) y la mezcla se agitó hasta que se completó la desprotección (verificado mediante LC/MS). El disolvente se evaporó bajo flujo de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Se añadió 1,4-dioxano (2 ml) y se repitió el procedimiento de evaporación a 40 °C para proporcionar compuesto 3.

## Ejemplo B4

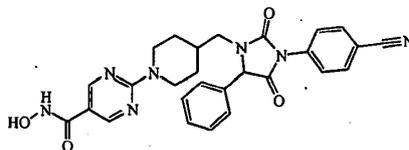
## Preparación de compuesto 4



25 Se añadió TFA al 5% en DCM/MeOH (2ml) a intermedio 13 (0,0003 moles), y la solución resultante se dejó en reposo durante 3 días a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó bajo un flujo de N<sub>2</sub> y este procedimiento se repitió hasta que producto era puro, produciendo el compuesto 4.

## Ejemplo B5

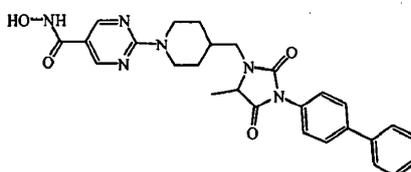
## Preparación de compuesto 5



- 5 Una mezcla de intermedio 22 (0,0003 moles) en TFA (1 ml), MeOH (20 ml) y DCM (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 96 horas. El DCM se evaporó. El precipitado se filtró, se lavó con un mínimo de MeOH, seguidamente con dietil-éter y se secó, produciendo 0,135 g (83%) de compuesto 5, punto de fusión 187 °C.

## Ejemplo B6

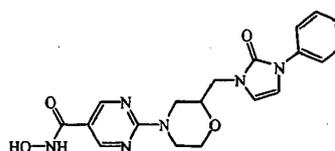
## Preparación de compuesto 6



- 10 Se añadió TFA (0,5 ml) a 5 °C a una solución de intermedio 27 (0,0002 moles) en MeOH (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (25 – 40 µm) (eluyente: DCM/MeOH/agua 80/20/2). Las fracciones puras se recogieron y el disolvente se evaporó. El residuo (0,09 g) se recogió en dietil-éter. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 0,072 g (56%) de compuesto 6, punto de fusión: 169 °C.

## 15 Ejemplo B7

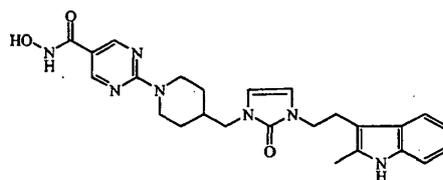
## Preparación de compuesto 12



- 20 Se añadió TFA al 5% en DCM/MeOH (2 ml) a intermedio 31 (0,0003 moles) y la solución resultante se dejó en reposo durante 3 días a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó bajo flujo de N<sub>2</sub> y este procedimiento se repitió hasta que el producto era puro, produciendo compuesto 12.

## Ejemplo B8

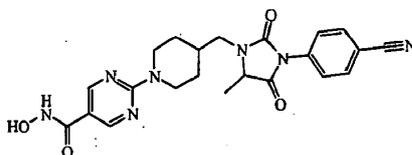
## Preparación de compuesto 35



- 25 Una mezcla de intermedio 37 (0,0008 moles) en TFA (2,2 ml) y MeOH (44 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evaporó. El precipitado se filtró, se lavó con MeOH, seguidamente con dietil-éter y se secó, produciendo 0,31 g (84%) de compuesto 35, punto de fusión 246 °C.

## Ejemplo B9

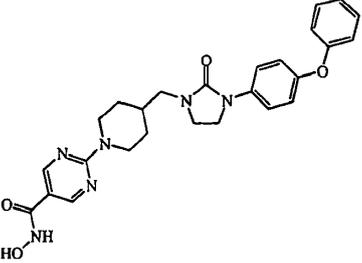
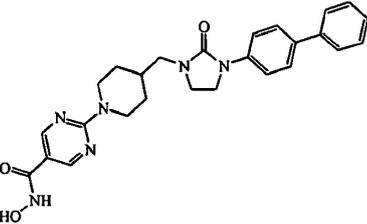
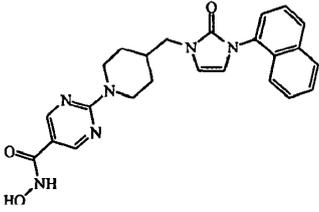
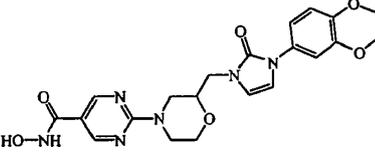
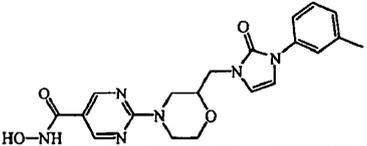
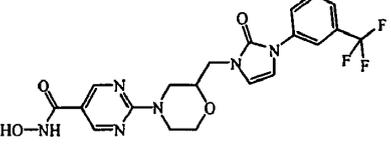
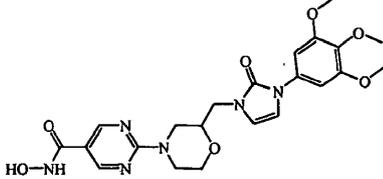
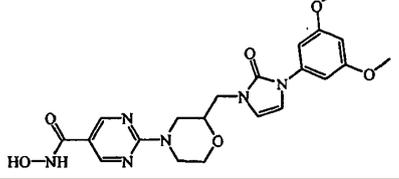
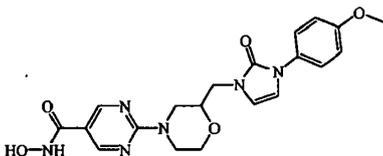
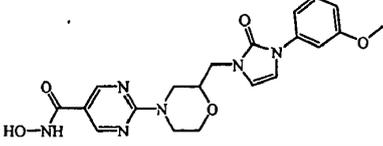
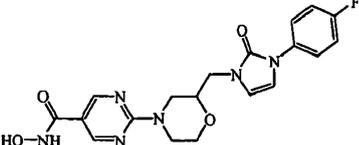
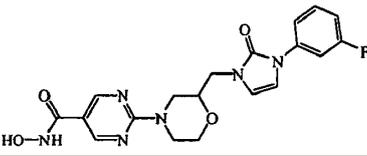
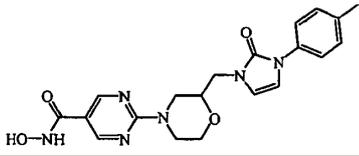
## Preparación de compuesto 36

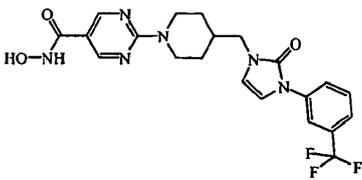
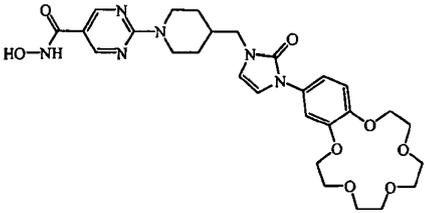
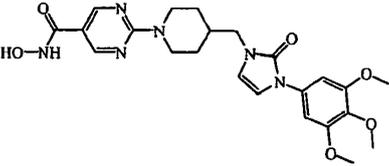
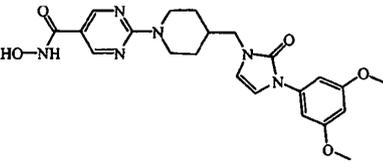
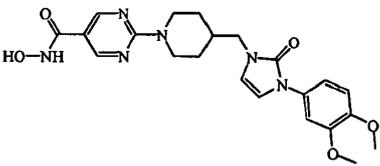
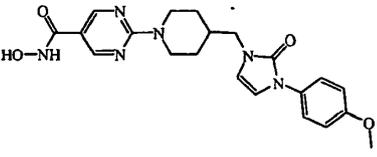
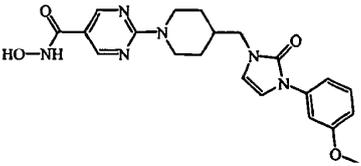
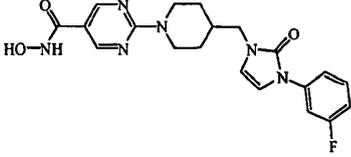
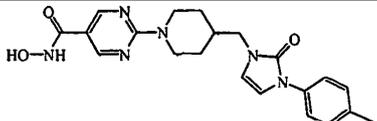
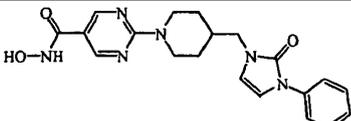
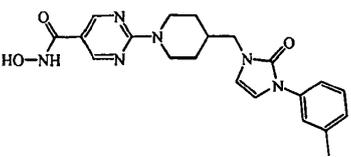
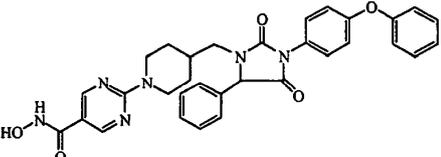
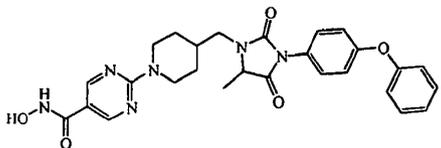
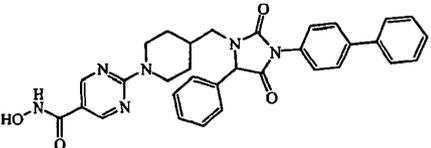


- 5 Una mezcla de intermedio 45 (0,0002 moles) en TFA (0,5 ml) y MeOH (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y el disolvente se evaporó hasta sequedad. El residuo se cristalizó en dietil-éter/2-propanona. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 0,05 g (66%) de compuesto 36, punto de fusión 135 °C.

Tabla F-1

Comp. Nº 1; Ej. [B1]; Rt: 3,86, (MH) <sup>+</sup> : 447, Método 1	Comp. Nº 2; Ej. [B2]; Rt: 4,25, (MH) <sup>+</sup> : 487, Método 1
Comp. Nº 3; Ej. [B3]; Rt: 4,3, (MH) <sup>+</sup> : 471, Método 1	Comp. Nº 4; Ej. [B4]; Rt: 5,61, (MH) <sup>+</sup> : 413, Método 2
Comp. Nº 5; Ej. [B5]; p,f, 187 °C; Rt: 7,93, (MH) <sup>+</sup> : 512, Método 3	Comp. Nº 6; Ej. [B6]; p,f, 169 °C; Rt: 8,23, (MH) <sup>+</sup> : 501, Método 3
Comp. Nº 12; Ej. [B7]; Rt: 4,68; (MH) <sup>+</sup> : 397, Método 1	Comp. Nº 35; Ej. [B8]; p,f, 246 °C; Rt: 7,84, (MH) <sup>+</sup> : 476, Método 4
Comp. Nº 36; Ej. [B9]; p,f, 135 °C; Rt: 7,16, (MH) <sup>+</sup> : 450, Método 3	

	
Comp. N° 7; Ej. [B1]; Rt: 4,28, (MH) <sup>+</sup> : 489, Método 1	Comp. N° 8; Ej. [B1]; Rt: 4,44, (MH) <sup>+</sup> : 473, Método 1
	
Comp. N° 9; Ej. [B2, B3]; Rt: 3,86, (MH) <sup>+</sup> : 445, Método 1	Comp. N° 10; Ej. [B4]; Rt: 4,78, (MH) <sup>+</sup> : 457, Método 1
	
Comp. N° 11; Ej. [B4]; Rt: 5,69, (MH) <sup>+</sup> : 411, Método 1	
	
Comp. N° 13; Ej. [B7]; Rt: 6,41, (MH) <sup>+</sup> : 465, Método 2	Comp. N° 14; Ej. [B7]; Rt: 4,99, (MH) <sup>+</sup> : 487, Método 2
	
Comp. N° 15; Ej. [B7]; Rt: 5,7, (MH) <sup>+</sup> : 457, Método 2	Comp. N° 16; Ej. [B7]; Rt: 5,13, (MH) <sup>+</sup> : 427, Método 2
	
Comp. N° 17; Ej. [B7]; Rt: 5,32, (MH) <sup>+</sup> : 427, Método 2	Comp. N° 18; Ej. [B7]; Rt: 5,2, (MH) <sup>+</sup> : 415, Método 2
	
Comp. N° 19; Ej. [B7]; Rt: 5,41, (MH) <sup>+</sup> : 415, Método 2	Comp. N° 20; Ej. [B7]; Rt: 5,64, (MH) <sup>+</sup> : 411, Método 2

	
Comp. N° 21; Ej. [B4]; Rt: 6,74, (MH) <sup>+</sup> : 463, Método 2	Comp. N° 22; Ej. [B4]; Rt: 4,89, (MH) <sup>+</sup> : 585, Método 2
	
Comp. N° 23; Ej. [B4]; Rt: 5,29, (MH) <sup>+</sup> : 485, Método 2	Comp. N° 24; Ej. [B4]; Rt: 6,02, (MH) <sup>+</sup> : 455, Método 2
	
Comp. N° 25; Ej. [B4]; Rt: 5,1, (MH) <sup>+</sup> : 455, Método 2	Comp. N° 26; Ej. [B4]; Rt: 5,49, (MH) <sup>+</sup> : 425, Método 2
	
Comp. N° 27; Ej. [B4]; Rt: 5,7, (MH) <sup>+</sup> : 425, Método 2	Comp. N° 28; Ej. [B4]; Rt: 5,86, (MH) <sup>+</sup> : 413, Método 2
	
Comp. N° 29; Ej. [B4]; Rt: 6,03, (MH) <sup>+</sup> : 409, Método 2	Comp. N° 30; Ej. [B4]; Rt: 5,41, (MH) <sup>+</sup> : 395, Método 2
	
Comp. N° 31; Ej. [B4]; Rt: 6,04, (MH) <sup>+</sup> : 409, Método 2	Comp. N° 32; Ej. [B5]; p,f, 154°C; Rt: 8,9, (MH) <sup>+</sup> : 579, Método 3
	
Comp. N° 33; Ej. [B6]; p,f, 149°C; Rt: 8,24, (MH) <sup>+</sup> : 517, Método 3	Comp. N° 34; Ej. [B6]; p,f, 158°C; Rt: 8,87, (MH) <sup>+</sup> : 563, Método 3

## Procedimiento A de HPLC general

El gradiente de HPLC fue suministrado por un sistema Alliance HT 2790 (Waters) que consistía en una bomba cuaternaria con degasificador, un dispositivo automático de toma de muestras, una estufa para la columna ajustada a 40 °C y un detector DAD. El flujo de la columna se desvió hacia el detector MS. Los detectores MS se configuraron una fuente de ionización por electropulverización. Se adquirieron espectros de masas explorando desde 100 hasta 1.000 en 1 segundo, un tiempo de residencia de 0,1 segundo. El voltaje de la aguja de capilaridad era de 3 kV y la

temperatura de la fuente se mantuvo a 140°C. Se usó nitrógeno como gas nebulizador. La adquisición de datos se realizó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

#### Procedimiento B de HPLC general

5 El gradiente de HPLC fue suministrado mediante un sistema AllianceHT 2795 (Waters) que consistía en una bomba cuaternaria con desgasificador, un dispositivo automático de toma de muestras y un detector DAD. El flujo de la columna se desvió hacia el detector MS. Los detectores MS se configuraron con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja de capilaridad era de 3 kV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 100°C. Se usó nitrógeno como gas nebulizador. La adquisición de datos se realizó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

10 Método 1. Además del procedimiento general A: se llevó a cabo una HPLC de fase inversa en una columna Xterra MS C18 (3,5 mm, 4,6 x 100 mm) con un caudal de 1,6 ml/ minuto. Se emplearon 3 fases móviles (fase móvil A: 95% de acetato de amonio 25 mM + 5% de acetonitrilo; fase móvil B: acetonitrilo; fase móvil C: metanol) para realizar un estado gradiente desde 100% de A hasta 50% de B y 50% de C en 6,5 minutos hasta 100% de b en 1 minuto, 100% de B durante 1 minuto y nuevo equilibrio con 100% de A durante 1,5 minutos. Se usó un volumen de inyección de 10  
15 µl.

El voltaje de cono era de 10 V para un modo de ionización positiva y 20 V para un modo de ionización negativa.

20 Método 2. Además del procedimiento general A: Se llevó a cabo una HPLC de fase inversa en una columna Xterra MS C18 (3,5 mm, 4,6 x 100 mm) con un caudal de 1,6 ml/ minuto. Se emplearon tres fases móviles (fase móvil A: 95% de acetato de amonio 25 mM + 5% de acetonitrilo; fase móvil B: acetonitrilo; fase móvil C: metanol) para realizar un estado gradiente desde 100% de A a 50% de B y 50% de C en 10 minutos hasta 100% de B en 1 minuto, 100% de B durante 3 minutos y nuevo equilibrio con 100% de A durante 1,5 minutos. Se usó un volumen de inyección de 10 µl.

25 Método 3. Además del procedimiento general B: Se llevó a cabo una HPLC de fase inversa en una columna Xterra-RPC C18 (5 µm, 3,9 x 150 mm) con un caudal de 1,0 ml/ minuto. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: 100% de acetato de amonio 7 mM; fase móvil B: 100% de acetonitrilo, para realizar un estado gradiente desde 85% de A, 15% de B (mantenido durante 3 minutos) hasta 20% de A, 80% de B en 5 minutos, mantenido a 20% de A y 80% de B durante 6 minutos y nuevo equilibrio con las condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 20 µl.

30 El voltaje de cono fue de 20 V para un modo de ionización positiva. Los espectros de masas se adquirieron explorando desde 100 hasta 900 en 0,8 segundos, usando un retraso entre exploraciones de 0,08 segundos.

Método 4. Además del procedimiento general B: idéntico al método 3, con la excepción de que la ionización es tanto positiva como negativa. El voltaje de cono fue de 20 V para un modo de ionización tanto positivo como negativo.

#### C. Ejemplo farmacológico:

35 El ensayo *in vitro* para la inhibición de histona desacetilasa (véase el ejemplo C.1) mide la inhibición de la actividad enzimática de HDAC obtenida con los compuestos de fórmula (I).

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

40 La solubilidad de un compuesto mide la capacidad de un compuesto para permanecer en solución. La solubilidad de un compuesto a diferentes valores del pH puede ser medida mediante el uso de un detector de nitrógeno quimioluminiscente (véase el ejemplo C.3).

45 Se ha mostrado que una amplia diversidad de agentes antitumorales activan la proteína p21 incluidos los agentes que deterioran el ADN y los inhibidores de histona desacetilasa. Los agentes que deterioran el ADN activan el gen p21 a través del supresor tumoral p53 mientras que los inhibidores de histona desacetilasa activan transcripcionalmente el gen p21 a través del factor de transcripción Sp1. Por tanto, los agentes que deterioran el ADN activan el promotor p21 a través del elemento de respuesta p53 mientras que los inhibidores de histona desacetilasa activan el promotor p21 a través de sitios sp1 (ubicado en la región de -60 bp a + 40 bp con relación a la caja TATA) conduciendo ambos a una expresión aumentada de la proteína p21. Cuando el promotor p21 en una  
50 célula consiste en un fragmento de promotor de 1300 BP de p21 que no comprende los elementos de respuesta p53, consecuentemente no tiene respuesta a agentes de deterioro del ADN. La capacidad de los compuestos para inducir p21 puede ser evaluada de diversas formas. Un primer método es tratar células tumorales con el compuesto de interés y, después de una lisis de las células, detectar la inducción de p21 con el ensayo inmunoabsorbente unido

a la enzima p21 (WAF1 ELISA de Oncogene). El ensayo de p21 es un inmunoensayo de enzima “en emparedado” que emplea anticuerpos tanto monoclonales de ratón como policlonales de conejo. Un anticuerpo policlonal de conejo, específico para la proteína p21 humana ha sido inmovilizado en la superficie de pocillos de plásticos proporcionados en el estuche de ensayo. Cualquier p21 presente en la muestra que va a ser ensayada se unirá al anticuerpo de captura. El anticuerpo monoclonal del detector biotinilado reconoce también la proteína p21 humana y se unirá a cualquier p21 que haya sido retenido por el anticuerpo de captura. A su vez, el anticuerpo detector está unido mediante estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano. La peroxidasa de rábano cataliza la conversión del sustrato cromógeno tetra-metilbencidina a partir de una solución incolora hasta una solución azul (o amarilla, después de la adición del reactivo de detención), cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteína p21 unida a la placa. El producto de reacción coloreado es cuantificado usando un espectrofotómetro. La cuantificación se consigue mediante la construcción de una curva estándar usando concentraciones conocidas de p21 (proporcionada liofilizada). Este ensayo puede medir la inducción de p21 como consecuencia del deterioro de ADN o como consecuencia de la inhibición de histona desacetilasa (véase el ejemplo C.4.a).

Otro método ensaya la capacidad de los compuestos para inducir p21 como consecuencia de la inhibición de HDAC a nivel celular. Las células pueden ser establemente transfectadas con un vector de expresión que contiene un fragmento de promotor de 1.300 bp de p21 que no comprende los elementos receptores de p23 y en el que un aumento de la expresión del gen reportero, en comparación con los niveles testigos, identifica el compuesto que tiene una capacidad de inducción de p21. El gen reportero es una proteína fluorescente y la expresión del gen reportero se mide como la cantidad de luz fluorescente emitida (véase el ejemplo C.4.b).

Los inhibidores específicos de HDAC no deben inhibir otras enzimas como las proteínas abundantes CYP P450. Las proteínas CYP P450 (expresadas por E. Coli) 3A4, 2D6 y 2G9 convierten sus sustratos específicos en una molécula fluorescente. La proteína CY P3A4 convierte 7-benciloxi-trifluorometil-cumarina (BFC) en 7-hidroxi-trifluorometil-cumarina. La proteína CYP 2D6 convierte 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil]-7-metoxi-4-metilcumarina (AMMC) en hidrocloreto de 3-[2-(N,N-dietilamino)etil]-7-hidroxi-4-metilcumarina y la proteína CYP 2C9 convierte 7-metoxi-4-trifluorometil-cumarina (MFC) en 7-hidroxi-trifluorometil-cumarina. Los compuestos que inhiben la reacción enzimática darán lugar a un aumento de la señal fluorescente (véase el ejemplo C.5).

#### Ejemplo C.1: Ensayo *in vitro* para la inhibición de histona desacetilasa:

Se usó el ensayo de la actividad fluorescente de HDAC/estuche de ensayo de descubrimiento de fármacos de Biomol (cat. Nº: AK- 500-0001). El ensayo de la actividad fluorescente de HDAC se basa en sustrato de flúor de Lys (lisil histona desacetilasa fluorógeno) y la combinación reveladora. El sustrato flúor de Lys comprende una cadena lateral de lisina acetilada. La desacetilación del sustrato sintetiza el sustrato de forma que, en una segunda etapa, el tratamiento con el revelador de flúor de Lys produce un fluoróforo.

Los extractos nucleares de HeLa (proveedor: biomol) se incubaron a 60 µg/ml con sustrato 75 µM. El sustrato flúor de Lys fue añadido en un tampón que contenía Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mM a pH 7,4. Después de 30 minutos, se añadió 1 volumen del revelador. El fluoróforo fue excitado con luz de 355 nm y la luz emitida (450 nm) fue detectada en un lector de placa fluorométrico. Para cada experimento, se realizaron en paralelo testigos (que contenían extracto nuclear HeLa y tampón), una incubación en blanco (que contenía tampón pero no extracto nuclear HeLa) y muestras (que contenían compuesto disuelto en DMSO y adicionalmente diluido en tampón y extracto nuclear HeLa). En un primer momento, los compuestos fueron ensayados a una concentración de 10<sup>-5</sup> M. Cuando los compuestos mostraron actividad a 10<sup>-5</sup> M, se hizo una curva de respuesta a la concentración en la que los compuestos fueron ensayados a concentraciones entre 10<sup>-5</sup> M y 10<sup>-9</sup> M. Todas las muestras fueron ensayadas cuatro veces. En cada ensayo se sustrajo el valor en blanco de los valores testigos y de las muestras. La muestra testigo representó un 100% de desacetilación del sustrato. Para cada muestra, la fluorescencia se expresó como un porcentaje del valor de los testigos. Cuando los valores apropiados de la IC<sub>50</sub> (concentración del fármaco necesaria para reducir la cantidad de metabolitos hasta un 50% del testigo) fueron contabilizados usando un análisis de probabilidades para datos graduados. En este caso, los efectos de los compuestos del ensayo se expresan como pIC<sub>50</sub> (el valor negativo del logaritmo de los valores de IC<sub>50</sub>) (véase la Tabla F-3).

#### Ejemplo C.2: Determinación de la actividad antiproliferativa sobre células A2780

Todos los compuestos ensayados se disolvieron en DMSO y se hicieron diluciones adicionales en medio de cultivo. Las concentraciones finales de DMSO nunca sobrepasaron un 0,1% (v/v) en los ensayos de proliferación celular. Los testigos contenían células A2780 y DMSO sin compuesto y las muestras en blanco contenían DMSO pero no células. Se disolvió MTT a 5 mg/ml en PBS. Se preparó un tampón de glicina compuesto por glicina 0,1 M y con NaCl 0,1 M tamponado a pH 10,5 con NaOH (1N) (todos los reactivos eran de la empresa Merck).

Las células humanas de carcinoma de ovario A2780 (una amable donación del Dr. T.C. Hamilton [Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, USA]) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, 50 µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal de ternera. Las células se mantuvieron rutinariamente en forma de cultivos monocapa a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron desplazadas una vez a la semana usando una solución de tripsina/EDTA a una relación de división de 1:40. Todos los medios y

complementos fueron obtenidos de la empresa Life Technologies. Las células estaban exentas de contaminación de micoplasmas según se determinó usando el estuche de ensayo de cultivos de tejidos Gen-Probe Mycoplasma (proveedor: BioMerieux).

5 Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos NUNC® (proveedor: Life Technologies) y se dejó que se adhirieran al plástico durante una noche. Las densidades usadas para las placas fueron de 1.500 células por pocillo en un volumen total de 200 µl de medio. Después de la adhesión de las células a las placas, se cambió el medio y se añadieron fármacos y/o disolventes hasta un volumen final de 200 µl. Después de cuatro días de incubación, el medio fue reemplazado mediante 200 µl de medio de nueva aportación y se valoraron la densidad y viabilidad celulares usando un ensayo basado en MTT. A cada pocillo se añadieron 25 µl de solución MTT y las  
10 células fueron adicionalmente incubadas durante 2 horas a 37°C. Seguidamente el medio fue cuidadosamente aspirado y el producto azul de MTT-formazano fue solubilizado mediante la adición de 25 µl de tampón de glicina seguidos de 100 µl de DMSO. Las placas de microensayo fueron agitadas durante 10 minutos en un agitador de microplacas y se midió la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro de 96 pocillos Emax (proveedor: Sopachem). En un experimento, los resultados de cada estado experimental son la media de 3 pocillos repetidos.  
15 Para fines de selección inicial, los compuestos fueron ensayados a una concentración única fija de 10<sup>-6</sup> M. Para compuestos activos, los experimentos se repitieron hasta establecer curvas completas de respuesta a la concentración. Para cada experimento, se realizaron en paralelo testigos (que no contenían fármaco) e incubación  
blanco (que no contenían células ni fármacos). El valor en blanco se sustrajo de todos los valores testigos y de las muestras. Para cada muestra, el valor medio para el crecimiento celular (en unidades de absorbancia) se expresó  
20 como un porcentaje del valor medio para el crecimiento celular del testigo. Cuando fue apropiado, los valores de la IC<sub>50</sub> (concentración del fármaco necesaria para reducir el crecimiento celular hasta un 50% del testigo, se contabilizaron usando análisis de probabilidades para datos graduados (Finney, D.J., Probit Analyses, 2<sup>nd</sup> Ed. Chapter 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962). En este caso, los efectos de los compuestos del ensayo se expresan como pIC<sub>50</sub> (el valor negativo del logaritmo para los valores de IC<sub>50</sub>) (véase la  
25 Tabla F-3).

#### Ejemplo C.3: Solubilidad/estabilidad

La solubilidad de un compuesto, a diferentes valores del pH puede ser medida mediante el uso de un detector de nitrógeno quimioluminiscente.

#### Ejemplo C.4: Capacidad de inducción de p21

30 Ejemplo C.4.a: Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima p21

Se aplicó en siguiente protocolo para determinar el nivel de expresión de proteína p21 en células de carcinoma de ovario humano A2780. Las células A2780 (20.000 células/ 180 µl) fueron sembradas en placas de 96 micropocillos en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, 50 µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal de ternera. 24 horas antes de la lisis de las células, se añadieron los compuestos a concentraciones finales de 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>,  
35 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> M. Todos los compuestos ensayados se disolvieron en DMSO y se hicieron diluciones adicionales en el medio de cultivo. 24 horas después de la adición del compuesto, las materias sobrenadantes se separaron de las células. Las células se lavaron con 200 µl de PBS enfriado con hielo. Los pocillos fueron aspirados y se añadieron 30 µl de tampón de lisis (Tris.HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, 1% de Nonidet p40 y 10% de glicerol). Las placas se incubaron durante una noche a -70 °C.

40 Se retiró el número apropiado de pocillos de microtitulación de la bolsa de papel aluminio y se colocaron en una sujeción de pocillos vacía. Se preparó una solución de trabajo (1 x) del tampón de lavado (20 x concentrado de lavado de placas: 100 ml de solución concentrada 20 veces de PBS y tensioactivo. Contiene 2% de cloroacetamida). El patrón liofilizado de p21 WAF fue reconstituido con H<sub>2</sub>O destilada y fue adicionalmente diluido con diluyente de muestras (proporcionado en el estuche de ensayo).

45 Las muestras se prepararon diluyéndolas 1:4 en diluyente de muestras. Las muestras (100 µl) y los patrones de p21 WAF1 (100 µl) fueron pipeteadas en los pocillos apropiados e incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron 3 veces con 1 x tampón de lavado y seguidamente se pipetearon 100 µl de reactivo de anticuerpo detector (una solución de anticuerpo p21 WAF1 monoclonal biotinilado) en cada pocillo. Los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente durante 1 hora y seguidamente se lavaron tres veces con 1x de tampón  
50 de lavado. El conjugado 400x (conjugado de peroxidasa estreptavidina: solución concentrada 400 veces) se diluyó y se añadieron 100 µl de la solución 1x a los pocillos. Los pocillos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y seguidamente se lavaron 3 veces con 1x de tampón de lavado y 1 vez con H<sub>2</sub>O destilada. Se añadió solución de sustrato (sustrato cromogénico) (100 µl) a los pocillos y los pocillos se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se añadió solución de detención a cada pocillo en el mismo orden en que se  
55 añadió la solución de sustrato previamente añadida. La absorbancia en cada pocillo se midió usando un lector de placas espectrofotométricas a longitudes de onda duales de 450/595 nm. Para cada experimento se realizaron en paralelo testigos (que no contenían fármacos) e incubación en blanco (que no contenía células ni fármacos). El valor de la muestra en blanco fue sustraído de todos los valores testigos y de las muestras. Para cada muestra, se

expresó el valor de la inducción de p21 WAF1 (en unidades de absorbancia) como el porcentaje del valor de p21 WAF1 presente en el testigo. Un porcentaje de inducción mayor que 130% se definió como una inducción significativa. Se ensayaron once compuestos y mostraron una inducción significativa.

#### Ejemplo C.4.b: Método celular

- 5 Se cultivaron células A2780 (ATCC) en medio RPMI 1640 complementado con 10% de FCS, L-glutamina 2mM y gentamicina 37 °C en un incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub>. Todas las soluciones de cultivo fueron proporcionadas por la empresa Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). Otros materiales fueron proporcionados por la empresa Nunc.

10 Se extrajo ADN genómico de células A2780 proliferantes y se usó como una plantilla para el aislamiento de TCR anidado del promotor p21. La primera amplificación se realizó para 20 ciclos a una temperatura de hibridación de 55 °C usando el par de oligonucleótidos GAGGGCGCGGTGCTTGG y TGCCGCCGCTCTCTCACCC con el ADN genómico como plantilla. El fragmento de 4,5 kb resultantes que contenía el fragmento de -4551 a +88 relativo a la caja de TATA fue nuevamente amplificado con los oligonucleótidos TCGGGTACCGAGGGCGCGGTGCTTGG y ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACCC durante 20 ciclos con hibridación a 88 °C dando lugar a un fragmento de 15 4,5 kb y posteriormente con el par de oligonucleótidos TCGGGTACCGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATC y ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACCC durante 20 ciclos con hibridación a 88°C, dando lugar a un fragmento de 1,3 kb que contenía el fragmento de -1300 a + 88 relativo a la caja de TATA. Los sitios de restricción XhoI y KpnI presentes en los oligonucleótidos (secuencia subrayada) fueron usados para la subclonación.

20 El reportero de luciferasa se separó del pGL3 básico y se sustituyó con el reportero ZsGreen (del plásmido pZsGreen1-N1) en los sitios de restricción KpnI y XdaI. El pGL3-básico-ZsGreen-1300 se construyó a través de la inserción del fragmento de 1,3 kb anteriormente mencionado de la región promotora p21 humana en pGL3-básico-ZsGreen y los sitios XhoI y KpnI. Todas las enzimas de restricción fueron proporcionadas por la empresa Boehringer Mannheim (Alemania). Se dispusieron en placas células A2780 en una placa de 6 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células, se incubaron durante 24 horas y fueron transfectadas con 2 µg de pGL3-básico-ZsGreen-1300 y 0,2 µg de vector pSV2neo usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Bruselas, Bélgica) como se describe por el fabricante. Las 25 células transfectadas fueron seleccionadas durante 10 días con G4180 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y se hicieron crecer suspensiones de células únicas. Después de tres semanas, se obtuvieron clones únicos.

30 Los clones seleccionados de A2780 fueron expandidos y sembrados a 10.000 células por pocillos en placas de 96 pocillos. 24 horas después de la sembradura, las células fueron tratadas durante 24 horas adicionales con compuestos (que afectan a los sitios st1 en la región promotora p21 proximal). Posteriormente, las células fueron fijadas con 4% de PFA durante 30' y fueron contra-teñidas con colorante Hoechst. La activación del promotor p21 que conduce a la producción ZsGreen y por tanto a la fluorescencia, se verificó mediante el dispositivo Ascent Fluoroskan (Thermo LabSystems, Bruselas, Bélgica).

35 Para cada experimento, se realizaron testigos (que no contenían fármaco) y una incubación en blanco (que no contenía células ni fármacos). El valor en blanco se sustrajo de todos los valores de los testigos y muestras. Para cada muestra, el valor para la inducción de p21 se expresó como el porcentaje del valor para p21 presente en el testigo. Un porcentaje de inducción mayor que 130% se definió como una inducción significativa.

Se ensayaron once compuestos y mostraron una indicción significativa.

#### Ejemplo C.5: Capacidad de inhibición de P450

- 40 Todos los compuestos ensayados se disolvieron en DMSO (5 mM) y se hizo una dilución adicional a  $5 \cdot 10^{-4}$  M en acetonitrilo. Se hicieron diluciones adicionales en tampón del ensayo (tampón de fosfato de NaK 0,1 M pH 7,4) y la concentración de disolvente final nunca fue mayor que 2%.

45 El ensayo para la proteína CYP3A4 comprende por pocillo 15 p moles de proteína p450/mg (en tampón de fosfato de NaK 0,01 M + 1,15% de KCl) y sistema de generación de NADPH (glucosa-6-fosfato 3,3 mM, 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADP 1,3 mM y MgSi<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 3,3 mM en tampón del ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 µl. Después de una pre-incubación de 5 minutos a 37 °C se comenzó la reacción enzimática con la adición de sustrato de zonda fluorescente 150 µM BFC en tampón del ensayo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se terminó después de la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Las determinaciones fluorescentes se llevaron a cabo a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Se incluyó ketoconazol (valor de IC<sub>50</sub> =  $3 \times 10^{-8}$  M) como compuesto de referencia en este experimento. El ensayo para la proteína CYP226 comprende por pocillos 6 p moles de proteína p450/mg (en tampón de fosfato de NaK 0,01 M + 1,15 % de KCl), Un sistema de generación de NADPH (glucosa-6-fosfato 0,41 mM, 0,4 u/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADP 0,0082 mM y MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,41 mM en tampón del ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 µl. Después de una pre-incubación de 5 55 minutos 37°C, se comenzó la reacción enzimática con la adición de 3 µM del sustrato de zona fluorescente ANMC en tampón del ensayo. Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, la reacción se terminó

## ES 2 377 446 T3

después de la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Se llevaron a cabo determinaciones fluorescentes a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Se incluyó quinidina (valor de  $IC_{50} < 5 \times 10^{-8} M$  como compuesto de referencia en este experimento.

5 El ensayo para la proteína CYP2C9 comprende por pocillo 15 p moles de D450/mg de proteína (en tampón de fosfato de NaK 0,01 M + 1,15% de KCl), un sistema de generación de NADPH (glucosa-6-fosfato-3,3 mM, 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADP 1,3 mM y  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  3,3 mM en tampón del ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100  $\mu$ l. Después de una pre-incubación de 5 minutos a 37°C, se comenzó la reacción enzimática con la adición de 200  $\mu$ M del sustrato de zonda fluorescente MFC en tampón del ensayo. Después de 10 una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se terminó después de la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Se llevaron a cabo determinaciones fluorescentes a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Se incluyó sulfafenazol (valor de  $IC_{50} = 6,8 \times 10^{-7} M$ ) como compuesto de referencia en este experimento.

15 Para fines de selección inicial, los compuestos fueron ensayados a una concentración fijada única de  $1 \times 10^{-5} M$ . Para compuestos activos, los experimentos se repitieron para establecer curvas completas de respuesta a la concentración. Para cada experimento, se realizaron en paralelo testigos (que no contenían fármacos) e incubación en blanco (que no contenía enzima ni fármacos). Todos los compuestos fueron ensayados por cuadruplicado. El valor en blanco se sustrajo de todos los valores testigos y de las muestras. Para cada muestra, el valor medio de la actividad de P450 de la muestra (en unidades de fluorescencia relativa) se expresó como un porcentaje del valor medio de la actividad de P450 del testigo. El porcentaje de inhibición se expresó como 100% menos el valor medio de la actividad de P450 de la muestra. Cuando fue apropiado, se calcularon los valores de  $IC_{50}$  (concentración del fármaco necesaria para reducir la actividad de P450 hasta un 50% del testigo. 20

Tabla F-3: Listas de los resultados de los compuestos que fueron ensayados según los ejemplos C.1 y C.2

Comp, Nº	Actividad enzimática pIC50	Actividad celular pIC50
1	7,1	6,0
2	7,5	6,9
3	7,8	7,1
4	7,6	6,2
5	7,1	6,2
6	7,2	6,3
7	6,9	6,5
8	6,4	6,7
9	7,3	6,5
10	7,2	5,6
11	7,3	6,2
12	7,5	6,2
13	7,3	6,1
14	6,8	5,2
15	7,3	5,9
16	7,2	5,9
17	7,4	6,1
18	7,2	5,9
19	7,4	6,3
20	7,3	6,3
21	7,4	6,3
22	7,2	5,3
23	7,2	5,9
24	7,4	6,2

Comp, Nº	Actividad enzimática pIC50	Actividad celular pIC50
25	7,4	6,2
26	7,4	6,3
27	7,5	6,2
28	7,6	6,2
29	7,7	6,2
30	7,5	6,2
31	7,7	6,2
32	6,6	6,0
33	7,0	6,0
34	7,2	6,2
35	7,9	6,3
36	7,0	5,8

#### D. Ejemplo de composición: Comprimidos revestidos con película

##### Preparación del núcleo del comprimido

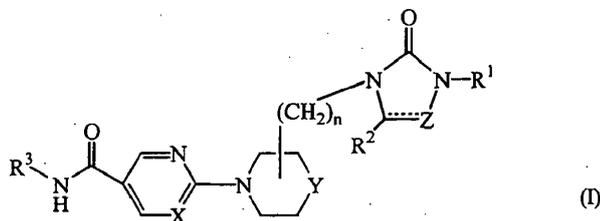
5 Una mezcla de 100 g de un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón se mezcla bien y posteriormente se humidifica con una solución de 5 g de dodecil-sulfato de sodio y 100 g de polivinilpirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. La mezcla de polvos seca se tamiza, se seca y se vuelve a tamizar. Seguidamente se añaden 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. El conjunto de mezcla bien y se comprime en forma de comprimidos, proporcionando 10.000 comprimidos, que comprenden cada uno 100 mg de un compuesto de fórmula (I).

##### 10 Revestimiento

15 A una solución de 10 g de metil-celulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se añade una solución de 5 g de etil-celulosa en 150 ml de diclorometano. Seguidamente se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3.propanotriol, se funden 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. Esta última solución se añade a la primera y seguidamente se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión coloreada concentrada y el conjunto se homogeneiza. Los núcleos de las pastillas se revisten con la mezcla así obtenida en un aparato de revestimiento.

## REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I)



5 las formas de N-óxido, las sales por adición farmacéuticamente aceptables y sus formas isómeras estereoquímicas, en la cual

cada X es independientemente N o CH;

cada Y es independientemente O, CH o CH<sub>2</sub> y cuando Y es CH entonces el sustituyente está unido al átomo Y de la estructura anular;

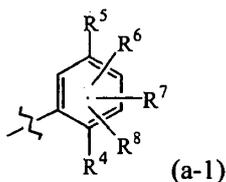
cada Z es independientemente C=O, CH<sub>2</sub> o CH y cuando z es CH entonces la línea de puntos es un enlace;

10 n es 0 ó 1 y cuando n es 0 entonces está previsto un enlace directo;

15 R<sup>1</sup> es fenilo, naftalenilo, heterociclilo, fenil-alquilo C<sub>1-6</sub>, naftalenil-alquilo C<sub>1-6</sub>, heterocicilil-alquilo C<sub>1-6</sub>; en que cada uno de dichos fenilo, naftalenilo o heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, polihalo-alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo, feniloxi, ciano, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino o dos sustituyentes tomados conjuntamente pueden formar el radical bivalente -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-;

R<sup>2</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o fenilo en que cada fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, feniloxi o ciano;

R<sup>3</sup> es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1)



20 en la cual

R<sup>4</sup> es hidroxilo o -NH<sub>2</sub>;

25 R<sup>5</sup> es hidrógeno, tienilo, furanilo o fenilo y cada tienilo, furanilo o fenilo puede estar opcionalmente sustituido con halo, amino, nitro, ciano, hidroxilo, fenilo, alquilo C<sub>1-6</sub> (di-alquil C<sub>1-6</sub>)amino, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, fenil-alquiloxi C<sub>1-6</sub>, hidroxil-alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>-carbonilo, hidroxicarbonilo, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilo, poli-halo-alquiloxi C<sub>1-6</sub>, poli-halo-alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilsulfonilo C<sub>1-6</sub>, hidroxicarbonil-alquilo C<sub>1-6</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino, aminosulfonilo, aminosulfonil-alquilo C<sub>1-6</sub>, isoxazolilo, aminocarbonilo, fenil-alqueno C<sub>2-6</sub>, fenil-alquino C<sub>3-6</sub> o piridinil-alquino C<sub>3-6</sub>;

R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, -NH<sub>2</sub>, nitro, furanilo, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, trifluorometilo, tienilo, fenilo, alquil C<sub>1-6</sub>-carbonilamino, aminocarbonil-alquilo C<sub>1-6</sub> o -C≡C-CH<sub>2</sub>-R<sup>9</sup>;

en que R<sup>9</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, hidroxilo, amino o alquiloxi C<sub>1-6</sub>; y

30 heterociclilo en lo que antecede es furanilo, tienilo, pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, dioxolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, piranilo, piridinilo, piperidinilo, dioxanilo, morfolinilo, ditianilo, tiomorfolinilo, piridazinilo,

pirimidinilo, pirazinilo, piperazinilo, triazinilo, tritiano, indolizino, indolilo, indolino, benzofuranilo, benzotiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, quinolizino, quinolino, cinolino, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo o naftiridinilo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el cual

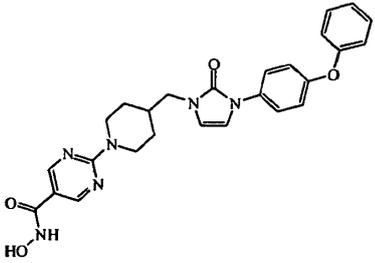
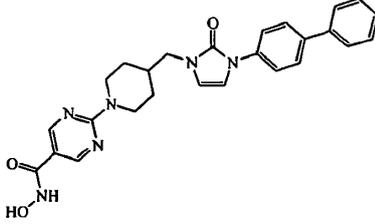
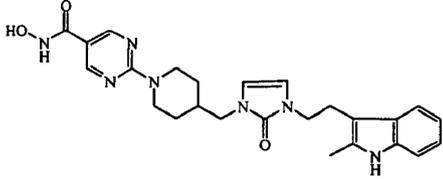
5 cada X es N; cada Y es independiente O o CH; n es 1; R<sup>1</sup> es fenilo, naftanelino o heterocicliil-alquilo C<sub>1-6</sub> en que cada uno de dichos fenilo, naftanelino o heterocicliil-alquilo C<sub>1-6</sub> está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquiloxi C<sub>1-6</sub>, poli-halo-alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo, feniloxi o ciano, o dos sustituyentes tomados conjuntamente pueden formar el radical bivalente

10 -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-; R<sup>2</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o fenilo; y R<sup>3</sup> es hidroxilo.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 y 2, en el cual

cada X es N; cada Y es CH; cada Z es CH; R<sup>1</sup> es fenilo o heterocicliil-alquilo C<sub>1-6</sub> en que cada uno de dichos fenilo, o heterocicliil-alquilo C<sub>1-6</sub> está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, fenilo o feniloxi; R<sup>2</sup> es hidrógeno; y R<sup>3</sup> es hidroxilo.

15 4. Un compuesto según la reivindicación 1, 2 y 3, en que dicho compuesto es el compuesto n° 3, compuesto n° 2 y compuesto n° 35.

	
<p>Comp. N° 2</p>	<p>Comp. N° 3</p>
	
<p>Comp. N° 35</p>	

20 5. Una composición farmacéutica, que comprende vehículos farmacéuticamente aceptables y como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 a 4.

6. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en el que se mezclan íntimamente los vehículos farmacéuticamente aceptables y un compuesto como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 4.

7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para ser usado como una medicina.

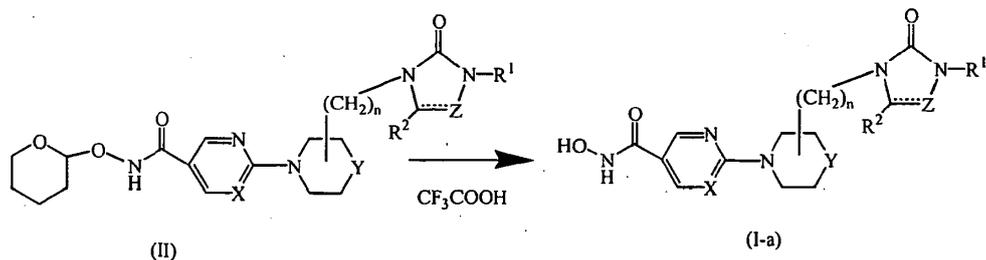
25 8. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

9. Una combinación de un agente anti-cancerígeno y un inhibidor de HDAC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

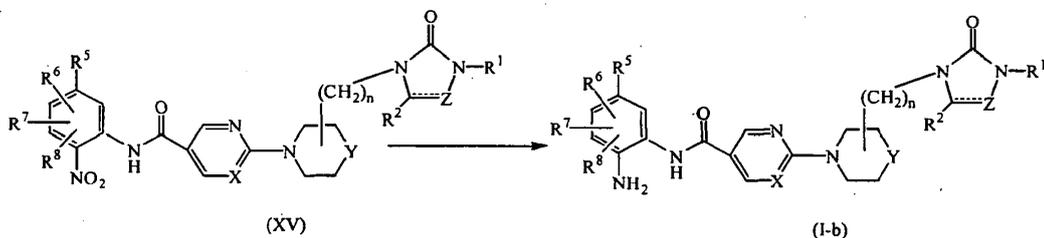
10. Un procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por

30 a) hacer reaccionar un intermedio de fórmula (II) con un ácido apropiado en un disolvente adecuado, produciendo un

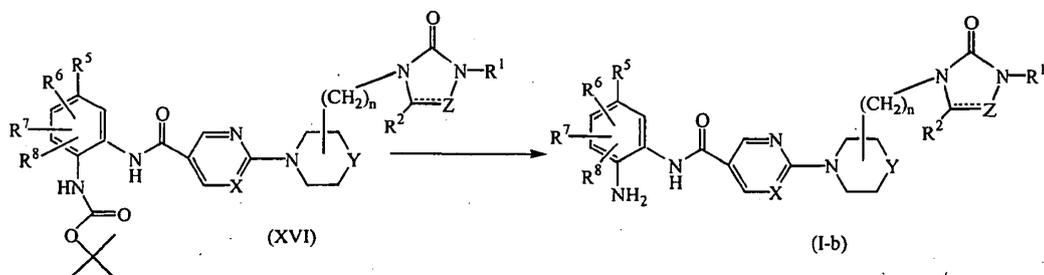
compuesto de fórmula (I), en la que R<sup>3</sup> es hidroxilo, denominado en la presente memoria descriptiva compuestos de fórmula (I-a)



- 5 b) hacer reaccionar un intermedio de fórmula (XV) con hidrato de cloruro de estaño (II) o con hidrógeno en presencia de 10% de paladio sobre carbón, en un disolvente adecuado, con la formación de un compuesto de fórmula (I) en la que R<sup>3</sup> es un radical de fórmula (a-1) y R<sup>4</sup> es -NH<sub>2</sub>, denominado en la presente memoria descriptiva compuestos de fórmula (I-b),



- 10 c) hacer reaccionar un intermedio de fórmula (XVI) con un ácido apropiado en un disolvente adecuado, con la formación de un compuesto de fórmula (I-b),



- d) hacer reaccionar un intermedio de fórmula (XVII), en la que TBDMS significa terc-butil(dimetil)silanilo, con fluoruro de tetrabutilamonio en un disolvente adecuado, con la formación de un compuesto de fórmula (I) en la que R<sup>3</sup> es un radical de fórmula (a-1) y R<sup>4</sup> es hidroxilo, denominado en la presente memoria descriptiva compuestos de fórmula (I-c)

