

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 334**

51 Int. Cl.:

C07D 491/08 (2006.01)

C07D 487/06 (2006.01)

C07D 491/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2004 E 04753367 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1633362**

54 Título: **Compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas para la inhibición de PARP**

30 Prioridad:

28.05.2003 US 473475 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.02.2013

73 Titular/es:

**EISAI INC. (100.0%)
100 TICE BOULEVARD
WOODCLIFF LAKE, NJ 07677, US**

72 Inventor/es:

**KALISH, VINCENT, J.;
ZHANG, JIE;
XU, WEIZHENG;
LI (JAMES), JIA-HE y
XING, AMY, D.**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 396 334 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

Compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas para la inhibición de PARP

- 5 Esta solicitud se basa en, y reivindica beneficios de prioridad nacional bajo 35 U.S.C. §119(e) a partir de la solicitud provisional n.º 60/473.475, presentada el 28 de mayo de 2003, de la que todo el contenido está incorporado en el presente documento por referencia.

10 La presente invención proporciona compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas para la inhibición de la enzima nuclear poli(adenosin 5'-difosfo-ribosa) polimerasa ["poli(ADP-ribosa) polimerasa" o "PARP", que también se denomina ADPRT (NAD:proteína (ADP-ribosil transferasa (polimerizante)), pADPRT (poli(ADP-ribosa) transferasa) y PARS (poli(ADP-ribosa) sintetasa). Además, la presente invención proporciona métodos de uso de inhibidores de PARP de la invención para evitar y/o tratar daño tisular que resulta del daño o muerte celular debido a necrosis o apoptosis; daño tisular neuronal que resulta de, por ejemplo, lesión por isquemia y reperfusión, tal como apoplejía isquémica cerebral, traumatismo craneal o lesión de médula espinal; trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas, tales como, por ejemplo, enfermedades de Parkinson o de Alzheimer y esclerosis múltiple; para evitar o tratar apoplejía vascular; para tratar o evitar trastornos cardiovasculares, tales como, por ejemplo, infarto de miocardio; para tratar otras afecciones y/o trastornos, tales como, por ejemplo, degeneración muscular relacionada con la edad, sida y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, artritis, aterosclerosis, ataxia telangiectasia, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes (tal como diabetes mellitus), trastornos inflamatorios intestinales (tales como colitis y enfermedad de Crohn), pancreatitis aguda, mucositis, choque hemorrágico, choque por oclusión de arteria esplácnica, insuficiencia multiorgánica (tal como la que implica cualquiera de los sistemas del riñón, hígado, renal, pulmonar, retiniano, pancreático y/o músculo esquelético) tiroiditis autoinmunitaria aguda, distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor agudo y crónico (tal como, dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico (tal como choque endotóxico), disfunción celular endotelial local y/o remota (tal como las que se reconocen por respuestas relajantes dependientes de endotelio y regulación por incremento de moléculas de adhesión), inflamación y envejecimiento de la piel; para alargar el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células, tal como, por ejemplo, como mediadores generales en la generación de oxidantes, mediadores proinflamatorios y/o citocinas, y mediadores generales de infiltración de leucocitos, sobrecarga de iones de calcio, peroxidación de fosfolípidos, metabolismo de óxido nítrico alterado y/o producción de ATP reducida; para alterar la expresión génica de células senescentes; o para radiosensibilizar células tumorales hipóxicas.

35 Algunos de los inhibidores de PARP usados en los métodos y composiciones farmacéuticas según la invención se pueden preparar fácilmente por técnicas estándar de química orgánica, utilizando las rutas sintéticas generales y los ejemplos descritos en las publicaciones Wu et al, The Protective Effect of GPI 18078, a Novel Water Soluble Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor in Myocardial Ischemia-Reprefusion Injury, Experimental Biology 2003 (FASEB), abril 11-15, 2003; Wu et al, Myocardial Protection and Anti-Inflammatory Effect of GPI 15427, a Novel Water Soluble Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor: Comparison with GPI 6150, Experimental Biology 2003 (FASEB), abril 11-15, 2003; Kalish et al, Design, Synthesis and SAR of PARP-1 Inhibitors, ISMC Meeting, Barcelona, 4 de septiembre de 2002; Xu et al, Design and Synthesis of Novel Potent Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors, 224^o ACS National Meeting, Boston, agosto 18-23, 2002; Williams et al, Intravenous Delivery of GPI 15427/C and GPI 16539/C, Potent Water-Soluble PARP Inhibitors, Reduces Infarct Volume Following Permanent and Transient Focal Cerebral Ischemia, Society for Neuroscience, Orlando FL, octubre 2002; Tentori L, et al Systemic administration of the PARP-1 inhibitor GPI 15427 increases the anti-tumor activity of temozolomide against metastatic melanoma. Medical Science Monitor, volumen 9, suplemento 1, p34, 2003; y Tentori et al, Poly(ADP- Ribose) Polymerase Inhibitor to Increase Temozolomide Efficacy Against Melanoma, Glioma and Lymphoma at the CNS Site AACR poster, abril 2003, patentes de los EE. UU. N.º 6.348.475, 6.545.011, RE36.397, 6.380.211, 6.235.748, 6.121.278, 6.197.785, 6.380.193, 6.346.536, 6.514.983, 6.306.889, 6.387.902, 6.201.020 y 6.291.425, todo el contenido de estas patentes, solicitudes y publicaciones de patente están incorporadas en el presente documento por referencia, como se establece en el presente documento en su totalidad.

55 Otros inhibidores de PARP pueden estar disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar fácilmente por un experto en la técnica usando técnicas estándar tales como las divulgadas en la patente de los EE. UU. N.º 6.291.425, todo el contenido de esta referencia está incorporado en el presente documento por referencia como se establece en el presente documento en su totalidad.

60 PARP (EC 2.4.2.30), también conocida como PARS (para poli(ADP-ribosa) sintetasa), o ADPRT (para NAD:proteína (ADP-ribosil) transferasa (polimerizante)), o pADPRT (para poli(ADP-ribosa) transferasa), es una proteína nuclear principal de 116 kDa. Está presente en casi todas las eucariotas. La enzima sintetiza poli(ADP-ribosa), un polímero de cadena ramificada que puede consistir en más de 200 unidades de ADP-ribosa de NAD. Los aceptores de proteínas de poli(ADP-ribosa) están directa o indirectamente implicados en el mantenimiento de la integridad del ADN. Incluyen histonas, topoisomerasas, polimerasas de ADN y ARN, ADN ligasas y endonucleasas dependientes de Ca²⁺ y Mg²⁺. La proteína PARP se expresa en un nivel alto en muchos tejidos, más notablemente en el sistema inmunitario, corazón, cerebro y células de líneas germinales. 78 En condiciones fisiológicas normales, hay una actividad PARP mínima. Sin embargo, el daño de ADN provoca una activación inmediata de PARP de hasta 500 veces. Entre las

muchas funciones atribuidas a PARP está su papel principal de facilitar la reparación del ADN por ADP-ribosilación y por lo tanto coordinar un número de proteínas de reparación de ADN. Como resultado de la activación de PARP, los niveles de NAD decrecen significativamente. Aunque se ha demostrado que muchos agentes endógenos y exógenos dañan el ADN y activan la PARP, parece que el peroxinitrito, formado de una combinación de ácido nítrico (NO) y superóxido, es un autor principal responsable de varias afecciones de enfermedades informadas in vivo, por ejemplo, durante choque e inflamación

La activación de PARP extensiva conduce a una disminución grave de NAD en células que sufren de daño de ADN masivo. La corta vida de poli(ADP-ribosa) (semivida < 1 min) da como resultado una tasa de recambio rápida. Una vez se forma la poli(ADP-ribosa), se degrada rápidamente por la poli(ADP-ribosa) glucosidolasa (PARG) constitutivamente activa, junto con fosfodiesterasa y (ADP-ribosa) proteína liasa. PARP y PARG forman un ciclo que convierte una gran cantidad de NAD a ADP-ribosa. En menos de una hora, la sobreestimulación de PARP puede provocar una bajada de NAD y ATP a menos del 20 % del nivel normal. Este escenario es especialmente perjudicial durante la isquemia cuando la falta de oxígeno ha comprometido drásticamente ya la producción de energía celular. Se asume que la producción de radicales libres subsiguiente durante la reperfusión es una causa principal de daño tisular. Parte del descenso de ATP, que es típico en muchos órganos durante la isquemia y la reperfusión, podría estar ligada a la disminución de NAD debido al recambio de poli(ADP-ribosa). Por tanto, se espera que la inhibición de PARP o PARG preserve el nivel de energía celular para potenciar supervivencia de tejidos isquémicos después del daño.

La síntesis de poli(ADP-ribosa) también está implicada en la expresión inducida de un número de genes esenciales para la respuesta inflamatoria. Los inhibidores de PARP suprimen la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos, selectina de tipo P y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en células endoteliales. Esta actividad subyace a los efectos antiinflamatorios fuertes mostrados por los inhibidores de PARP. La inhibición de PARP puede reducir la necrosis evitando la translocación y la infiltración de neutrófilos a los tejidos dañados. (Zhang, J. "PARP inhibition: a novel approach to treat ischaemia/reperfusion and inflammation-related injuries", capítulo 10 en Emerging Drugs (1999) 4: 209-221 Ashley Publications Ltd., y referencias citadas en el mismo.)

La producción de PARP se activa por fragmentos de ADN dañados que, una vez activada, cataliza la unión de hasta 100 unidades de ADP-ribosa a una variedad de proteínas nucleares, incluyendo histonas y a la propia PARP. Durante estreses celulares principales, la activación extensiva de PARP puede conducir rápidamente a daño o muerte celular a través de la disminución de depósitos de energía. Como se consumen cuatro moléculas de ATP por cada molécula de NAD (la fuente de sustrato de PARP y ADP-ribosa) regenerada, NAD disminuye por activación de PARP masiva y, en los esfuerzos para volver a sintetizar NAD, también se puede disminuir ATP.

Se ha informado de que la activación de PARP desempeña un papel clave en la neurotoxicidad inducida tanto por NMDA como por NO. Esto se ha demostrado en cultivos corticales y en láminas de hipocampo en los que la prevención de la toxicidad está directamente relacionado con la potencia de inhibición de PARP (Zhang et al., "Nitric Oxide Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Neurotoxicity", *Science*, 263:687-89 (1994) y Wallis et al., "Neuroprotection Against Nitric Oxide Injury with Inhibitors of ADP-Ribosylation", *NeuroReport*, 5:3, 245-48 (1993)). Por tanto, se ha reconocido el papel potencial de los inhibidores de PARP en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y traumatismo craneal incluso cuando el mecanismo de acción todavía no se ha dilucidado (Endres et al., "Ischemic Brain Injury is Mediated by the Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase", *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 17:1143-51 (1997) y Wallis et al., "Traumatic Neuroprotection with Inhibitors of Nitric Oxide and ADP-Ribosylation", *Brain Res.*, 710:169-77 (1996)).

De forma similar, se ha demostrado que inyecciones individuales de inhibidores de PARP han reducido el tamaño del infarto provocado por isquemia y reperfusión del corazón o del músculo esquelético en conejos. En estos estudios, una única inyección de 3-amino-benzamida (10 mg/kg), un minuto antes de la oclusión o bien un minuto antes de la reperfusión, provocó reducciones similares en el tamaño del infarto en el corazón (32-42%) mientras que 1,5-dihidroxiisoquinolina (1 mg/kg), otro inhibidor de PARP, redujo el tamaño del infarto en un grado comparable (38-48%). Thiemermann et al., "Inhibition of the Activity of Poly(ADP Ribose) Synthetase Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart and Skeletal Muscle", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:679-83 (1997). Estos resultados hacen razonable sospechar que los inhibidores de PARP podrían salvar el tejido del músculo esquelético o del corazón previamente isquémico.

La activación de PARP también se puede usar como una medida del daño después de lesiones neurotóxicas después de sobreexposición a cualquiera de glutamato (por medio de la estimulación de receptor de NMDA), intermediarios de oxígeno reactivos, proteína β -amiloide, N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o su metabolito activo N-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), que participan en afecciones patológicas tales como apoplejía, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Zhang et al., "Poly(ADP-Ribose) Synthetase Activation: An Early Indicator of Neurotoxic DNA Damage", *J. Neurochem.*, 65:3,1411-14 (1995). Otros estudios han continuado explorando el papel de la activación de PARP en células granulares del cerebelo in vitro y en neurotoxicidad por MPTP. Cosi et al., "Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Revisited. A New Role for an Old Enzyme: PARP Involvement in Neurodegeneration and PARP Inhibitors as Possible Neuroprotective Agents", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 825:366-79 (1997); y Cosi et al., "Poly(ADP-Ribose) Polymerase. Inhibitors Protect Against MPTP-induced Depletions of Striatal Dopamine and Cortical Noradrenaline in C57B1/6 Mice", *Brain Res.*, 729:264-69 (1996). La exposición neuronal

excesiva a glutamato, que sirve como neurotransmisor del sistema nervioso central predominante y actúa sobre los receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) y sobre otros receptores subtipo, se produce más frecuentemente como resultado de apoplejía u otros procesos neurodegenerativos. Las neuronas privadas de oxígeno liberan glutamato en grandes cantidades durante el daño cerebral isquémico, tal como durante una apoplejía o un ataque al corazón. Esta liberación en exceso de glutamato a su vez provoca sobreestimulación (excitotoxicidad) de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), AMPA, Kainato y MGR, que abren los canales iónicos y permiten el flujo de iones incontrolado (por ejemplo, Ca^{2+} y Na^+ dentro las células y K^+ fuera de las células), lo que conduce a una sobreestimulación de las neuronas. Las neuronas sobreestimuladas segregan más glutamato, creando un bucle de retroalimentación o efecto dominó que en última instancia da como resultado daño o muerte celular por medio de la producción de proteasas, lipasas y radicales libres. La activación excesiva de receptores de glutamato ha estado implicada en diversas enfermedades y afecciones neurológicas incluyendo epilepsia, apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, esquizofrenia, dolor crónico, isquemia y pérdida neuronal tras hipoxia, hipoglucemia, isquemia, traumatismo y daño nervioso. La exposición a glutamato y la estimulación con glutamato se han implicado también como una base para trastornos compulsivos, en particular drogodependencia. La evidencia incluye hallazgos en muchas especies animales, así como en cultivos corticales cerebrales tratados con glutamato o NMDA, de que los antagonistas del receptor de glutamato (es decir, los compuestos que bloquean al glutamato para unirse a o para activar a su receptor) bloquean el daño neuronal después de la apoplejía vascular. Dawson et al., "Protection of the Brain from Ischemia", *Cerebrovascular Disease*, 319-25 (H. Hunt Batjer ed., 1997). Los intentos para evitar la excitotoxicidad bloqueando los receptores de NMDA, AMPA, Kainato y MGR han resultado difíciles debido a que cada receptor tiene múltiples sitios a los que se puede unir el glutamato y por lo tanto, ha sido difícil encontrar una mezcla eficaz de antagonistas o un antagonista universal para evitar la unión de glutamato a todos los receptores y permitir la realización de pruebas de esta teoría. Además, muchas de las composiciones que son eficaces en el bloqueo de los receptores también son tóxicas para animales. Como tal, en la actualidad no hay ningún tratamiento eficaz conocido para las anomalías de glutamato.

La estimulación de los receptores de NMDA por glutamato, por ejemplo, activa la enzima neuronal óxido nítrico sintasa (nNOS), lo que conduce a la formación de óxido nítrico (NO), que también media en la neurotoxicidad. La neurotoxicidad de NMDA se puede evitar por tratamiento con inhibidores de óxido nítrico sintasa (NOS) o a través de alteración genética dirigida de nNOS in vitro. Dawson et al., "Nitric Oxide Mediates Glutamate Neurotoxicity in Primary Cortical Cultures", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:6368-71 (1991); and Dawson et al., "Mechanisms of Nitric Oxide-mediated Neurotoxicity in Primary Brain Cultures", *J. Neurosci.*, 13:6, 2651-61 (1993), Dawson et al., "Resistance to Neurotoxicity in Cortical Cultures from Neuronal Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice", *J. Neurosci.*, 16:8, 2479-87 (1996), Iadecola, "Bright and Dark Sides of Nitric Oxide in Ischemic Brain Injury", *Trends Neurosci.*, 20:3, 132-39 (1997), Huang et al., "Effects of Cerebral Ischemia in Mice Deficient in Neuronal Nitric Oxide Synthase", *Science*, 265:1883-85 (1994), Beckman et al., "Pathological Implications of Nitric Oxide, Superoxide and Peroxynitrite Formation", *Biochem. Soc. Trans.*, 21:330-34 (1993), y Szabo et al., "DNA Strand Breakage, Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase, and Cellular Energy Depletion are Involved in the Cytotoxicity in Macrophages and Smooth Muscle Cells Exposed to Peroxynitrite", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1753-58 (1996).

También se sabe que los inhibidores de PARP, tales como 3-aminobenzamida, afectan a la reparación de ADN, en general, en respuesta, por ejemplo, a peróxido de hidrógeno o a radiación gamma. Cristovao et al., "Effect of a Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor on DNA Breakage and Cytotoxicity Induced by Hydrogen Peroxide and γ -Radiation," *Terato., Carcino., and Muta.*, 16:219-27 (1996). Específicamente, Cristovao et al. observó una recuperación dependiente de PARP de roturas de cadenas de ADN en leucocitos tratados con peróxido de hidrógeno.

Se ha informado de que los inhibidores de PARP son eficaces en radiosensibilizar células tumorales y eficaces en evitar que las células tumorales se recuperen del daño de ADN potencialmente letal después de tratamiento con radiación, presumiblemente por su capacidad para evitar la reparación de ADN. Patentes de EE. UU. N.º 5.032.617; 5.215.738; y 5.041.653.

También existen indicios de que los inhibidores de PARP son útiles para tratar trastornos intestinales inflamatorios, tales como colitis. Salzman et al., "Role of Peroxynitrite and Poly(ADP-Ribose) Synthase Activation Experimental Colitis," *Japanese J. Pharm.*, 75, Sup. 1:15 (1997). Específicamente, se indujo colitis en ratas por administración intraluminal del hapteno ácido trinitrobencenosulfónico en etanol al 50 %. Las ratas tratadas recibieron 3-aminobenzamida, un inhibidor específico de la actividad de PARP. La inhibición de la actividad de PARP redujo la respuesta inflamatoria y restableció la morfología y el estado energético del colon distal. Véase también, Southan et al., "Spontaneous Rearrangement of Aminoalkylthioureas into Mercaptoalkylguanidines, a Novel Class of Nitric Oxide Synthase Inhibitors with Selectivity. Towards the Inducible Isoform", *Br. J. Pharm.*, 117:619-32 (1996); y Szabo et al., "Mercaptoethylguanidine and Guanidine Inhibitors of Nitric Oxide Synthase React with Peroxynitrite and Protect Against Peroxynitrite-induced Oxidative Damage", *J. Biol. Chem.*, 272:9030-36 (1997).

También existe evidencia de que los inhibidores de PARP son útiles para tratar la artritis. Szabo et al., "Protective Effects of an Inhibitor of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Collagen-Induced Arthritis," *Japanese J. Pharm.*, 75, Supp. 1:102 (1997); Szabo et al., "DNA Strand Breakage, Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase, and Cellular Energy Depletion are Involved in the Cytotoxicity in Macrophages and Smooth Muscle Cells Exposed to Peroxynitrite," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1753-58 (March 1996); and Bauer et al., "Modification of Growth Related Enzymatic Pathways

and Apparent Loss of Tumorigenicity of a ras-transformed Bovine Endothelial Cell Line by Treatment with 5-Iodo-6-amino-1,2-benzopyrone (INH2BP)", *Intl. J. Oncol.*, 8:239-52 (1996); y Hughes et al., "Induction of T Helper Cell Hyporesponsiveness in an Experimental Model of Autoimmunity by Using Nonmitogenic Anti-CD3 Monoclonal Antibody", *J. Immuno.*, 153:3319-25 (1994).

5 Además, parece que los inhibidores de PARP son útiles para tratar la diabetes. Heller et al., "Inactivation of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene Affects Oxygen Radical and Nitric Oxide Toxicity in Islet Cells," *J. Biol. Chem.*, 270:19,11176-80 (May 1995). Heller et al. usó células de ratones con genes de PARP inactivados y encontró que estas células mutantes no mostraron disminución de NAD⁺ después de la exposición a radicales que dañan el ADN. También se encontró que las células mutantes eran más resistentes a a la toxicidad de NO.

15 Los inhibidores de PARP han mostrado ser útiles para tratar choque endotóxico o choque séptico. Zingarelli et al., "Protective Effects of Nicotinamide Against Nitric Oxide-Mediated Delayed Vascular Failure in Endotoxic Shock: Potential Involvement of PolyADP Ribosyl Synthetase," *Shock*, 5:258-64 (1996), sugiere que la inhibición del ciclo de reparación de ADN activado por la poli(ADP ribosa) sintetasa tiene efectos protectores frente a la insuficiencia vascular en el choque endotóxico. Zingarelli et al. encontró que la nicotinamida protege frente a la insuficiencia vascular mediada por NO, retrasada, en el choque endotóxico. Zingarelli et al. también encontró que las acciones de la nicotinamida pueden estar relacionadas con la inhibición de la activación mediada por NO del ciclo de reparación de ADN que consume energía, activado por la poli(ADP ribosa) sintetasa. Cuzzocrea, "Role of Peroxynitrite and Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in the Vascular Failure Induced by Zymosan- activated Plasma," *Brit. J. Phann.*, 122:493-503 (1997).

25 Los inhibidores de PARP se han usado para tratar el cáncer. Suto et al., "Dihydroisoquinolinones: The Design and Synthesis of a New Series of Potent Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase", *Anticancer Drug Des.*, 7:107-17 (1991). Además, Suto et al. patente de los EE. UU. N.º 5.177.075, analiza varias isoquinolinas usadas para potenciar los efectos letales de la radiación ionizante o de agentes quimioterapéuticos sobre las células tumorales. Weltin et al., "Effect of 6(5H)- Phenanthridinone, an Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase, on Cultured Tumor Cells", *Oncol. Res.*, 6:9, 399-403 (1994), analiza la inhibición de la actividad de PARP, la proliferación reducida de células tumorales y el efecto sinérgico marcado cuando las células tumorales se tratan conjuntamente con un fármaco alquilante.

30 Otro uso para los inhibidores de PARP es el tratamiento de lesiones nerviosas periféricas y el síndrome de dolor patológico resultante conocido como dolor neuropático, tal como el inducido por lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático común y en el que se produce la alteración trans-sináptica del asta posterior de la médula espinal caracterizada por hiper cromatosis de citoplasma y nucleoplasma (denominadas neuronas "oscuras"). Mao et al., *Pain*, 72:355-366 (1997).

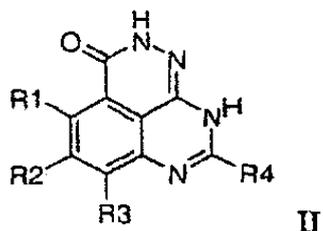
40 Los inhibidores de PARP también se han usado para alargar el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de células incluyendo el tratamiento de enfermedades tales como envejecimiento de la piel, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, osteoartritis, osteoporosis, distrofia muscular, enfermedades degenerativas de músculo esquelético que implican senescencia replicativa, degeneración muscular relacionada con la edad, senescencia inmunitaria, sida y otras enfermedades de senescencia inmunitaria; y para alterar la expresión génica de células senescentes. WO 98/27975.

45 Se han descrito un gran número de inhibidores de PARP conocidos en Banasik et al., "Specific Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Synthetase and Mono(ADP-Ribosyl)-Transferase", *J. Biol. Chem.*, 267:3,1569-75 (1992), y en Banasik et al., "Inhibitors and Activators of ADP- Ribosylation Reactions", *Molec. Cell. Biochem.*, 138:185-97 (1994). Sin embargo, el uso eficaz de estos inhibidores de PARP, de las formas analizadas anteriormente, se ha limitado por la producción concurrente de efectos secundario no deseados (Milam et al., "Inhibitors of Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Synthesis: Effect on Other Metabolic Processes", *Science*, 223:589-91 (1984)).

50 Sigue existiendo una necesidad de inhibidores de PARP eficaces y potentes que produzcan efectos secundarios mínimos. La presente invención proporciona compuestos, composiciones para, y métodos de, inhibición de la actividad de PARP para tratar y/o evitar el daño celular, de tejidos y/o de órganos que resulta del daño o muerte celular debidos, por ejemplo, a necrosis o apoptosis. Los compuestos y composiciones de la presente invención son específicamente útiles en mejorar, tratar y/o evitar el daño celular o de tejido neuronal, incluyendo el que sigue a una lesión por isquemia o reperusión focal. En general, la inhibición de la actividad de PARP evita que las células pierdan energía, evitando la despolarización irreversible de las neuronas, y por tanto, proporciona neuroprotección. Sin querer limitarse por ninguna teoría mecanística, la inhibición de la actividad de PARP por el uso de los compuestos, composiciones y métodos de la presente invención se cree que protege las células, tejidos y órganos por protección frente a efectos adversos de los radicales libres reactivos y del óxido nítrico. Por lo tanto, la presente invención también proporciona métodos de tratamiento y/o prevención de células, tejido y/u órganos de daño o lesión inducido por radicales libres reactivos y/u óxido nítrico.

65 La presente invención proporciona compuestos que inhiben la poli(ADP-ribosa) polimerasa ("PARP"), composiciones que contienen estos compuestos y métodos para usar estos inhibidores de PARP para tratar, evitar y/o mejorar los efectos de las afecciones descritas en el presente documento.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula:



5 en la que

R1 es H, halógeno, alcoxi C1-C6, alquilo lineal o ramificado C1-C6; R2 es H, halógeno, alcoxi C1-C6, o alquilo lineal o ramificado C1-C6; R3 es H; y

10 R4 es independientemente H, amino, -CO-NH-NH₂, CH₂R6 o CH₂NR₆R₇ en la que R6 y R7 son cada uno independientemente alquilo C1-C6 sustituido con hidrógeno, alquilo, fenilo o heterocicloalquilo.

Un compuesto de fórmula II

15 en la que

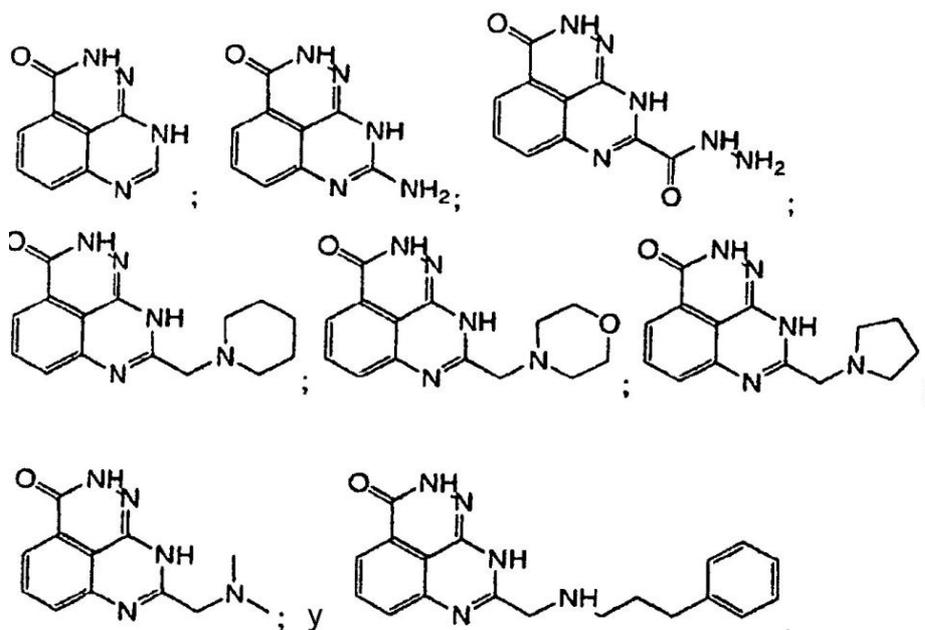
R1 es H, F, Cl, metoxi, o metilo:

20 R2 es H, F, Cl, metoxi, o metilo:

R3 es H: y

25 R4 es independientemente H, amino, -CO-NH-NH₂, -CH₂R6 o -CH₂NR₆R₇ en la que R6 y R7 son cada uno independientemente alquilo C1-C6 sustituido con hidrógeno, alquilo, fenilo, or heterocicloalquilo.

El compuesto como se define anteriormente, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica como se define anteriormente, caracterizada porque comprende además temozolimida.

5 La presente invención proporciona un compuesto como se define anteriormente o una composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento de daño tisular que resulta de daño o muerte celular debido a necrosis o apoptosis, enfermedades o daño tisular mediado neuronal, daño tisular neuronal que resulta de lesión por isquemia y reperfusión, y trastornos neurológicos, trastornos cardiovasculares, cirugía de derivación cardíaca, tratamiento de depresión y deterioro cognitivo debido a déficit neuronal después de cirugía de derivación de
10 arteria coronaria, artritis, diabetes, ataxia telangiectasia, caquexia, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, trastornos intestinales inflamatorios, inflamación, gota, dolor crónico, dolor agudo, dolor neuropático, daño nervioso, lesión del nervio periférico, insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico, choque hemorrágico, esclerosis múltiple, enfermedades o trastornos relacionados con el tiempo de vida o la capacidad proliferativa de las células y enfermedades o afecciones de enfermedades inducidas o
15 exacerbadas por senescencia celular en un animal.

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado de enfermedad o lesión física, daño cerebral traumático, daño físico en la médula espinal, apoplejía y enfermedad
20 desmielinizante.

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en daño tisular cardiovascular, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, angina de pecho, choque cardiogénico, cirugía de derivación de arteria coronaria, paro
25 cardíaco y reanimación cardiopulmonar.

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que la enfermedad o afección de enfermedad inducida o exacerbada por células con senescencia celular se selecciona del grupo que consiste en envejecimiento de la piel, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, osteoartritis, osteoporosis, distrofia muscular, degeneración muscular relacionada con la edad, senescencia inmunitaria, y sida.
30

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que dicha lesión por isquemia o reperfusión cerebral es lesión cerebral después de paro cardíaco y reanimación cardiopulmonar.
35

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que el choque septicémico es choque endotóxico.

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno intestinal es colitis.
40

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno intestinal es enfermedad de Crohn.

45 Compuesto como se define anteriormente, o composición farmacéutica como se define anteriormente, para su uso en un método de radiosensibilizar células tumorales en un animal.

Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que las células tumorales se seleccionan del grupo que consiste en tumores que producen ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cérvix, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer endometrial, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma hodgkiniano, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas y/o de células no pequeñas), efusión peritoneal maligna, efusión pleural
50 maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer de ovario (de células germinales), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinomas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasias trofoblásticas, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de la vulva y tumor de Wilm.
55

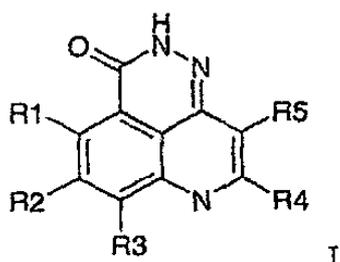
60 Compuesto como se define anteriormente, o composición farmacéutica como se define anteriormente, para su uso en un método de mantenimiento de la viabilidad de un órgano animal en un animal.

65 Compuesto o composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en un método de tratamiento, en el que la viabilidad está comprometida por el grupo seleccionado de insuficiencia multiorgánica, donación de órganos y trasplante.

Compuesto como se define anteriormente, junto con temozolimida para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero.

- 5 Compuesto como se define anteriormente, para su uso en un método de tratamiento, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, linfoma y glioblastoma multiforme.

En el presente documento se describen compuestos de fórmula I:



10

o una sal, profármaco, metabolito o hidrato farmacéuticamente aceptable;

en la que:

15

R1 es H, halógeno, alcoxi, o alquilo inferior;

R2 es H, halógeno, alcoxi, o alquilo inferior;

20

R3 es independientemente H, amino, hidroxilo, -N-N, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH, un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

25

R4 es independientemente H, amino, hidroxilo, -N-N, -CO-N-N, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH, un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; y

30

R5 es independientemente H, amino, hidroxilo, -N-N, -CO-N-N, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

35

En el presente documento se describen compuestos en los que

40

R1 es H, F, Cl, metoxi, o metilo;

R2 es H, F, Cl, metoxi, o metilo;

45

R3 es independientemente H, amino, hidroxilo, -N-N, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno, opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH, un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido;

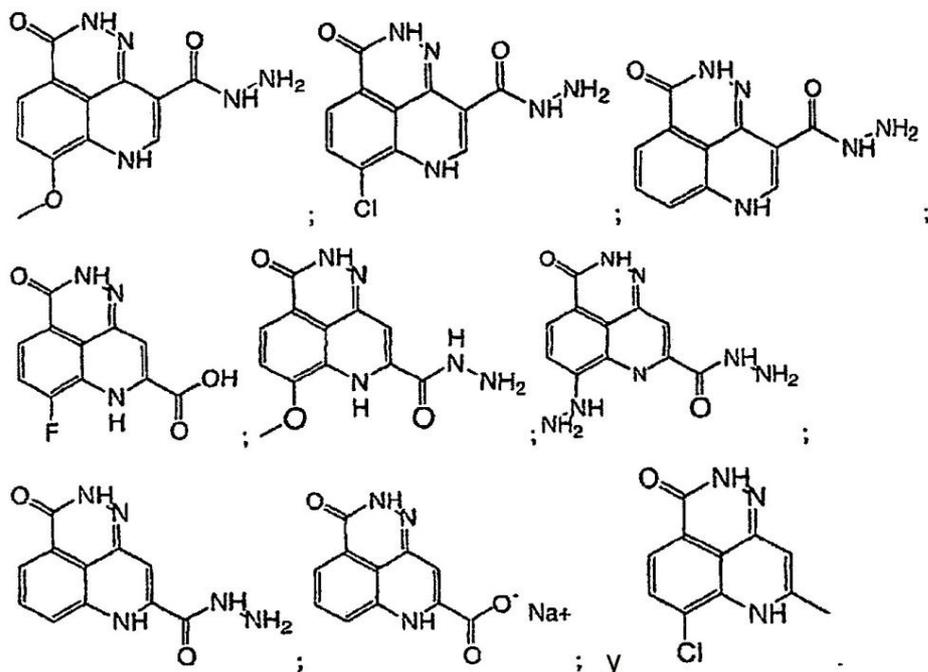
50

R4 es independientemente H, amino, hidroxilo, -N-N, -CO-N-N, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH, un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido; y

55

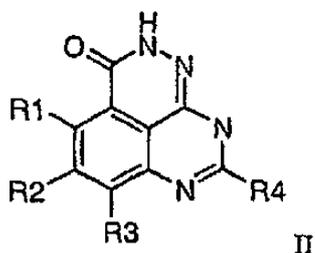
R5 es independientemente H, amino, hidroxilo, -N-N, -CO-N-N, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH, un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido.

En el presente documento se describen compuestos



5

En el presente documento se describen compuestos de fórmula II:



10 en la que

R1 es H, halógeno, alcoxi, o alquilo inferior;

R2 es H, halógeno, alcoxi, o alquilo inferior;

15

R3 es independientemente H, amino, hidroxilo, -NH-NH₂, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, -COR₈, en la que R₈ es H, -OH, un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, o -OR₆ o -NR₆R₇ en la que R₆ y R₇ son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; y

20

R4 es independientemente H, amino, hidroxilo, -NH-NH₂, -CO-NH-NH₂, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, -COR₈, en la que R₈ es H, -OH, un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, o -OR₆ o -NR₆R₇ en la que R₆ y R₇ son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

25

En el presente documento se describen compuestos en los que

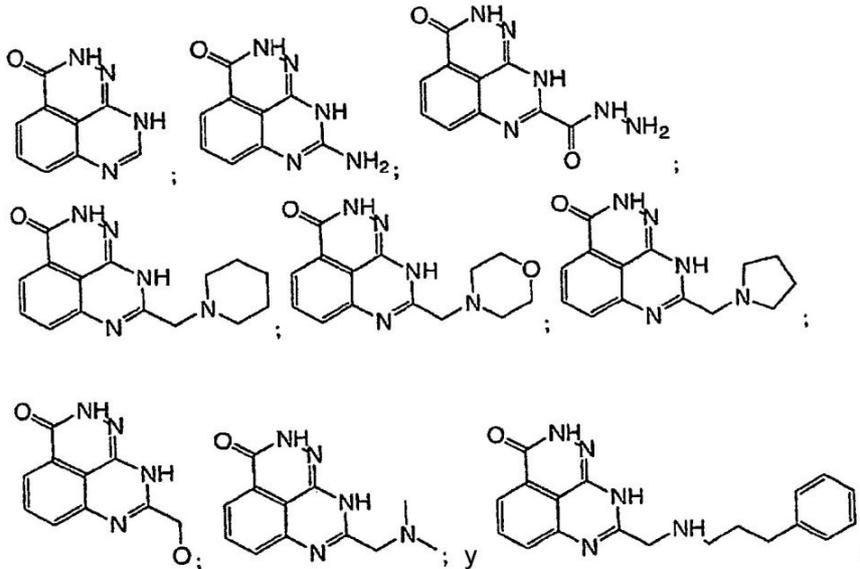
30 R1 es H, F, Cl, metoxi, o metilo;

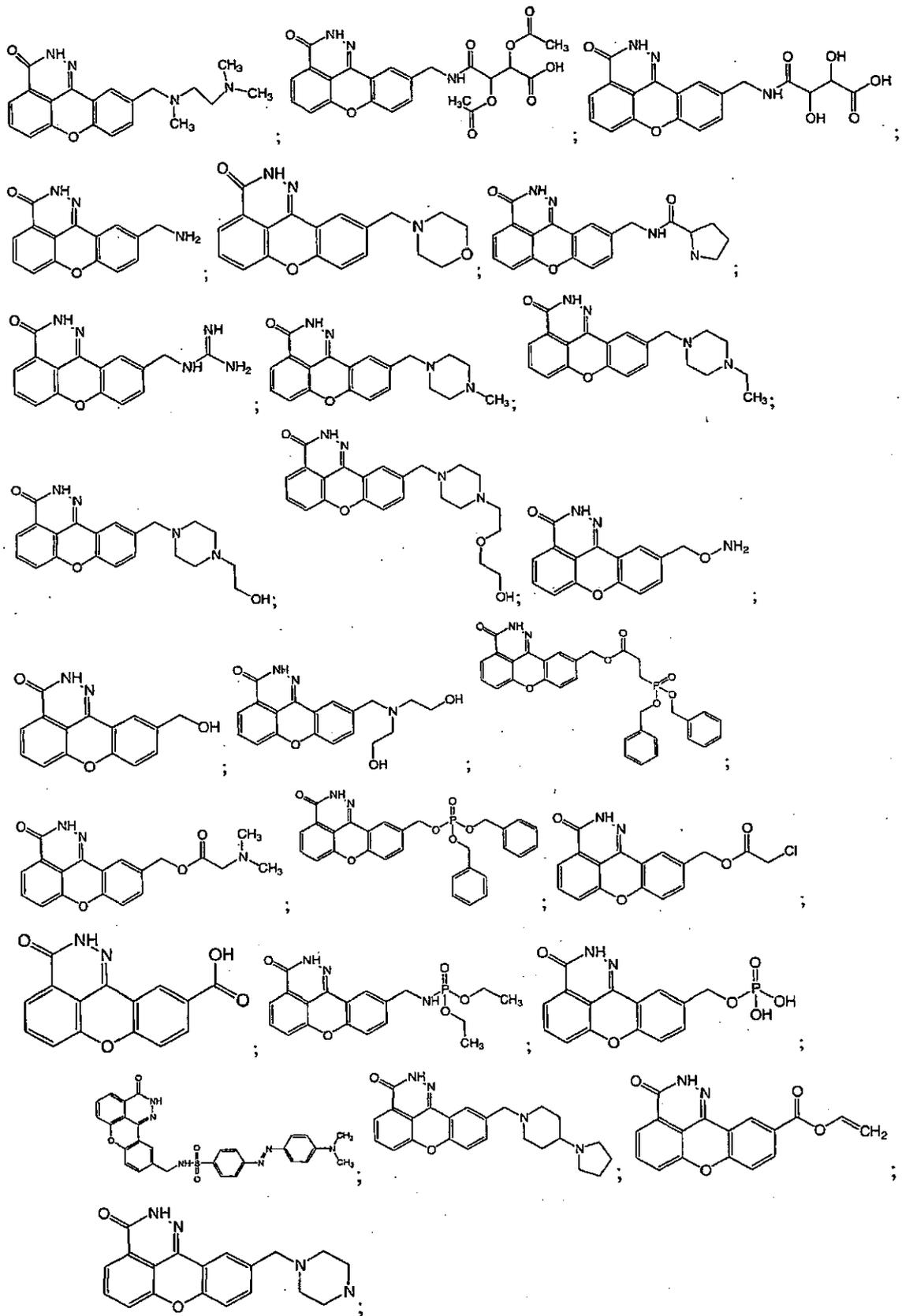
R2 es H, F, Cl, metoxi, o metilo;

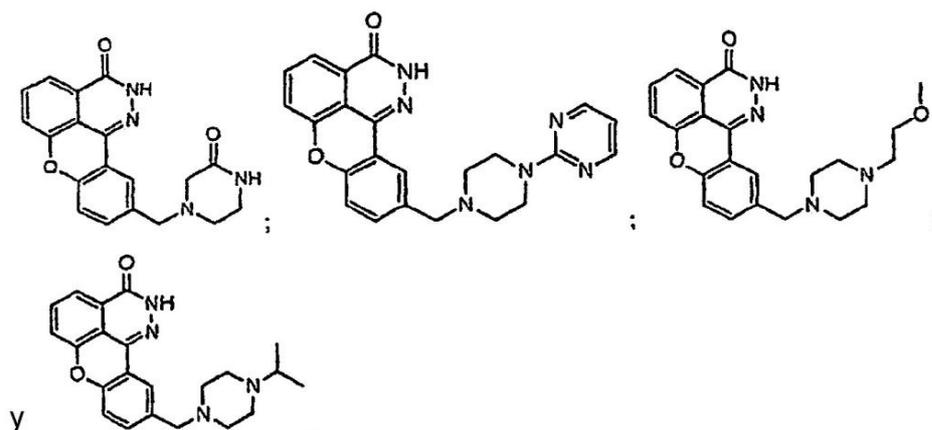
R3 es independientemente H, amino, hidroxilo, -NH-NH2, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH, un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido; y

5 R4 es independientemente H, amino, hidroxilo, -NH-NH2, -CO-NH-NH2, amino sustituido con halógeno, -O-alquilo, -O-arilo, o un alquilo, alqueno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, -COR8, en la que R8 es H, -OH, un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido, u -OR6 o -NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente hidrógeno o un alquilo o alqueno opcionalmente sustituido.

10 En el presente documento se describen compuestos







En general, los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar o evitar el daño o muerte celular debido a necrosis o apoptosis, lesión por isquemia y reperfusión cerebral o enfermedades neurodegenerativas en un animal, tal como un ser humano. Los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden usar para alargar el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células y por tanto se pueden usar para tratar o evitar enfermedades asociadas a las mismas; alteran la expresión génica de las células senescentes; y radiosensibilizan células tumorales hipóxicas. Preferentemente, composiciones y composiciones de la invención se pueden usar para tratar o evitar el daño tisular que resulta de daño o muerte celular debido a necrosis o apoptosis, y/o lograr actividad neuronal, mediada o bien no mediada por toxicidad de NMDA. Los compuestos de la presente invención no se limitan a ser útiles en el tratamiento de la neurotoxicidad mediada por glutamato y/o las vías biológicas mediadas por NO. Además, los compuestos de la invención se pueden usar para tratar o evitar otro daño tisular relacionado con la activación de PARP, como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona compuestos que inhiben la actividad de la polimerasa in vitro e/o in vivo de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), y composiciones que contienen los compuestos divulgados.

La presente invención proporciona métodos para inhibir, limitar y/o controlar la actividad de la polimerasa in vitro e/o in vivo de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en soluciones, células, tejidos, órganos o sistemas de órganos. En el presente documento se describen métodos de limitar o inhibir la actividad de PARP en un mamífero, tal como un ser humano, localmente o bien sistémicamente.

En el presente documento se describen métodos para tratar y/o evitar enfermedades, síndromes y/o afecciones exacerbadas por o que implican el incremento de la generación de PARP. Estos métodos implican la aplicación o administración de los compuestos de la presente invención a células, tejidos, órganos o sistemas de órganos de una persona que necesita dicho tratamiento o prevención.

En el presente documento se describen métodos para tratar y/o evitar daño tisular cardiovascular que resulta de lesión por isquemia o reperfusión cardíaca. La lesión por reperfusión, por ejemplo, se produce en la finalización de procedimientos de derivación cardíaca o durante paro cardíaco cuando el corazón, una vez impedido de recibir sangre, comienza a reperfundir y estos métodos implican la administración de los compuestos y composiciones de la presente invención preferentemente antes de, o inmediatamente después de la reperfusión, de modo que la lesión por reperfusión se evita, se trata o se reduce. En el presente documento se describen métodos de prevención y/o tratamiento de apoplejía vascular, trastornos cardiovasculares.

En el presente documento se describen métodos in vitro o in vivo para alargar o incrementar el tiempo de vida y/o la capacidad de proliferación de las células y por lo tanto, también métodos para tratar y/o evitar enfermedades asociadas con las mismas e inducidas o exacerbadas por senescencia celular, incluyendo el envejecimiento de la piel, aterosclerosis, osteoartritis, osteoporosis, distrofia muscular, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, degeneración muscular relacionada con la edad, senescencia inmunitaria, sida y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, y otras enfermedades asociadas con senescencia celular y envejecimiento, así como para alterar la expresión génica de células senescentes.

En el presente documento se describen métodos de tratamiento o prevención o mejora del efecto del cáncer y/o para radiosensibilizar células tumorales hipóxicas que vuelven a las células más susceptibles al tratamiento con radiación y de este modo evitan que las células tumorales se recuperen del daño potencialmente letal del ADN después del tratamiento con radiación. Un método de esta realización se refiere a radiosensibilizar de forma específica y preferente células tumorales que vuelve a las células tumorales más susceptibles a tratamiento con radiación que las células no tumorales.

En el presente documento se describen métodos de prevención y/o tratamiento de apoplejía vascular, trastornos

cardiovasculares; para tratar otras afecciones y/o trastornos tales como degeneración muscular relacionada con la edad, sida y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, artritis, aterosclerosis, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas de músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, senescencia inmunitaria, trastornos intestinales inflamatorios (tales como colitis y enfermedad de Crohn), pancreatitis aguda, mucositis, choque hemorrágico, choque por oclusión de arteria esplácnica, insuficiencia multiorgánica (tal como la que implica cualquiera de los sistemas del riñón, hígado, renal, pulmonar, retiniano, pancreático y/o músculos esqueléticos), tiroiditis autoinmunitaria aguda, distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor crónico y/o agudo (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque séptico (tal como choque endotóxico), disfunción celular endotelial local y/o remota (tal como las que se reconocen por respuestas relajantes dependientes de endotelio y regulación por incremento de moléculas de adhesión), inflamación y envejecimiento de la piel.

En otra realización, a una persona diagnosticada con isquemia retiniana aguda o apoplejía vascular aguda se le administra inmediatamente por vía parenteral, por administración intravenosa intermitente o bien continua, un compuesto de la presente invención como una dosis individual o bien una serie de dosis divididas del compuesto. Después de este tratamiento inicial, y dependiendo de los síntomas neurológicos presentes en la persona, opcionalmente, la persona puede recibir el mismo compuesto o un compuesto diferente de la invención en forma de otra dosis parenteral. El compuesto de la invención se puede administrar por administración intermitente o continua por medio de la implantación de un sistema de administración de matriz polimérica biodegradable, biocompatible, que contiene el compuesto, o por medio de una bomba subdural insertada para administrar el compuesto directamente al área de infarto del cerebro.

En el presente documento se describen métodos para alargar el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células, tales como, por ejemplo, en el uso de compuestos de la invención como mediadores generales en la generación de oxidantes, mediadores proinflamatorios y/o citocinas, y/o mediadores generales de infiltración de leucocitos, sobrecarga de iones de calcio, peroxidación de fosfolípidos, metabolismo de óxido nítrico alterado y/o producción de ATP reducida.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efecto del compuesto 43 a 40 mg/kg IV pre- y post 3 VO MCAO transitoria (infarto total e infarto regional).

Los compuestos de la presente invención pueden tratar o evitar el daño tisular que resulta de daño o muerte celular debido a necrosis o apoptosis; pueden mejorar el daño tisular neuronal o cardiovascular, incluyendo el que sigue a isquemia focal, infarto de miocardio y lesión por reperfusión; pueden tratar diversas enfermedades y afecciones provocadas o exacerbadas por actividad de PARP; pueden alargar o incrementar el tiempo de vida o la capacidad proliferativa de células; pueden alterar la expresión génica de células senescentes; y pueden radiosensibilizar las células. En general, la inhibición de la actividad de PARP evita que las células pierdan energía, evitando, en el caso de células neurales, la despolarización irreversible de las neuronas, y por lo tanto, proporciona neuroprotección. Sin pretender vincularse a ninguna teoría particular, se cree que la activación de PARP puede desempeñar un papel común aún en otros mecanismos excitotóxicos, quizás aún por descubrir, además de la producción de radicales libres y NO.

Por las razones anteriores, la presente invención se refiere además a un método de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos identificados anteriormente en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de PARP, para tratar o evitar un daño tisular que resulta de daño o celular debido a necrosis o apoptosis, para lograr actividad neuronal no mediada por toxicidad de NMDA, para tratar daño tisular neuronal que resulta de lesión por isquemia y reperfusión, trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas, para evitar o tratar apoplejía vascular; para tratar o evitar trastornos cardiovasculares; para tratar otras afecciones y/o trastornos tales como degeneración muscular relacionada con la edad, sida y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, artritis, aterosclerosis, ataxia telangiectasia, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas de músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes, traumatismo craneal, senescencia inmunitaria, trastornos intestinales inflamatorios (tales como colitis y enfermedad de Crohn), distrofia muscular, osteoartritis, osteoporosis, dolor crónico y/o agudo (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque séptico (tal como choque endotóxico) y envejecimiento de la piel, para alargar el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células; para alterar la expresión génica de células senescentes; o para radiosensibilizar células tumorales hipóxicas. La presente invención también se refiere al tratamiento de enfermedades y afecciones en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos identificados anteriormente.

La presente invención se refiere a un método de tratamiento, prevención o inhibición de un trastorno neurológico en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos identificados anteriormente. En otra realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado de enfermedad o lesión física, lesión cerebral traumática, daño físico a la médula espinal, apoplejía asociada con daño cerebral, isquemia focal, isquemia global, lesión por reperfusión, enfermedad desmielinizante y trastorno neurológico relacionado con la neurodegeneración. Otra realización es en la que la lesión por reperfusión es una apoplejía vascular. Otra realización es en la que la neuropatía periférica está

provocada por el síndrome de Guillain-Barre. Otra realización es en la que la enfermedad desmielinizante y el trastorno neurológico se refiere a neurodegeneración. Otra realización es en la que la lesión por reperfusión es una apoplejía vascular. Otra realización preferida es en la que la enfermedad desmielinizante es esclerosis múltiple. Otra realización es en la que el trastorno neurológico relacionado con la neurodegeneración se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

Otra realización es un método de tratamiento, prevención o inhibición de una cardiovasculopatía en un animal, tal como angina de pecho, infarto de miocardio, isquemia cardiovascular y daño tisular cardiovascular relacionado con la activación de PARP, administrando a dicho animal una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención.

La presente invención también contempla el uso de un compuesto de la presente invención para inhibir la actividad de PARP, para tratar, evitar o inhibir el daño tisular que resulta de daño o muerte celular debido a necrosis o apoptosis, para tratar, evitar o inhibir un trastorno neurológico en un animal.

En otra realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por estado de enfermedad o lesión física, lesión cerebral traumática, daño físico a la médula espinal, apoplejía asociada con daño cerebral, isquemia focal, isquemia global, lesión por reperfusión, enfermedad desmielinizante y trastorno neurológico relacionado con la neurodegeneración.

Otra realización es en la que la lesión por reperfusión es una apoplejía vascular. Otra realización más es en la que la neuropatía periférica está provocada por el síndrome de Guillain-Barre. Otra realización es en la que la enfermedad desmielinizante es esclerosis múltiple. Otra realización es en la que el trastorno neurológico relacionado con la neurodegeneración se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

La presente invención también contempla el uso de un compuesto de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y trastornos en un animal descritos en el presente documento.

En otra realización, la enfermedad o trastorno es un trastorno neurológico.

En otra realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado de enfermedad o lesión física, lesión cerebral traumática, daño físico a la médula espinal, apoplejía asociada con daño cerebral, isquemia focal, isquemia global, lesión por reperfusión, enfermedad desmielinizante y trastorno neurológico relacionado con la neurodegeneración. Otra realización es en la que la lesión por reperfusión es una apoplejía vascular. Otra realización más es en la que la neuropatía periférica está provocada por el síndrome de Guillain-Barre.

Otra realización es en la que la enfermedad desmielinizante es esclerosis múltiple. Otra realización es en la que el trastorno neurológico relacionado con la neurodegeneración se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

Además, los métodos se pueden usar para tratar cáncer y para radiosensibilizar células tumorales. El término "cáncer" se interpreta en sentido amplio. Los compuestos de la presente invención pueden ser "agentes anticancerígenos", término que también abarca "agentes de crecimiento celular antitumorales" y "agentes antineoplásicos". Por ejemplo, los métodos son útiles para tratar cánceres y radiosensibilizar células tumorales en cánceres tales como tumores que producen ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cérvix, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer endometrial, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma hodgkiniano, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas y/o de células no pequeñas), efusión peritoneal maligna, efusión pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer de ovario (de células germinales), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinomas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasmas trofoblásticos, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de la vulva y tumor de Wilm.

Los métodos también pueden tratar cáncer en un mamífero con una cantidad eficaz de temozolimida y un compuesto de la presente invención. El cáncer puede ser melanoma, linfoma y glioblastoma multiforme.

Los radiosensibilizadores se conocen por incrementar la sensibilidad de las células cancerosas a los efectos tóxicos de radiación ionizante. Se han sugerido varios mecanismos para el modo de acción de los radiosensibilizadores en la literatura incluyendo: los radiosensibilizadores celulares hipóxicos (por ejemplo, compuestos de 2-nitroimidazol y compuestos de dióxido de benzotriazina) promueven la reoxigenación del tejido hipóxico y/o catalizan la generación de radicales oxígeno perjudiciales; los radiosensibilizadores de células no hipóxicas (por ejemplo, pirimidinas halogenadas) pueden ser análogos de bases de ADN e incorporarse preferentemente en el ADN de células

cancerosas y de este modo promover la rotura inducida por radiación de moléculas de ADN y/o evitar los mecanismos de reparación de ADN normales; y se han propuesto como hipótesis diversos otros mecanismos de acción potenciales para radiosensibilizadores en el tratamiento de enfermedad.

5 Muchos protocolos de tratamiento de cáncer emplean actualmente radiosensibilizadores activados por la radiación electromagnética de rayos X. Los ejemplos de radiosensibilizadores activados de rayos X incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodeoxiuridina (BUdR), 5-yododeoxiuridina (IUdR), bromodeoxicitidina, fluorodeoxiuridina (FUdR), hidroxiurea, cisplatino y análogos y derivados terapéuticamente
10 efectivos de los mismos.

El tratamiento fotodinámico (PDT) de cánceres emplea la visible como activador de radiación del agente sensibilizante. Los ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen los siguientes, pero no se limitan a: derivados de hematoporfirina, Photofrin, derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño SnET2, feorbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc y análogos y derivados terapéuticamente
15 efectivos de los mismos.

Los radiosensibilizadores se pueden administrar junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos diferentes, incluyendo pero sin limitarse a: compuestos que promueven la incorporación de radiosensibilizadores a las células diana; compuestos que controlan el flujo de productos terapéuticos, nutrientes y oxígeno a las células diana; agentes quimioterápicos que actúan en el tumor con o sin radiación adicional; u otros compuestos terapéuticamente eficaces para tratar cáncer u otra enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos
20 adicionales que se pueden usar junto con radiosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a: 5-fluorouracilo, leucovorina, 5'-amino-5'desoxitimidina, oxígeno, carbógeno, transfusiones de eritrocitos, perfluorocarburos (por ejemplo, Fluosol-DA), 2,3-DPG, BW12C, bloqueantes de canales de calcio, pentoxifilina, compuestos antiangiogénesis, hidralazina y LBSO. Los ejemplos de agentes quimioterápicos que se pueden usar junto con radiosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a: adriamicina, camptotecina, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, interferón (alfa, beta y gamma), interleucina 2, irinotecán, paclitaxel, topotecán y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.
25

30 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 El análisis anterior referido a la utilidad de las realizaciones preferidas y la administración de los compuestos de la presente invención también se aplica a la composición farmacéutica de la presente invención.

40 El término "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier vehículo, diluyente, excipiente, agente de suspensión, agente lubricante, coadyuvante, transportador, sistema de administración, emulsionante, disgregante, absorbente, conservante, tensioactivo, colorante, aromatizante o edulcorante.

45 Para estos fines, la composición de la invención se puede administrar por vía oral, parenteral, por pulverización por inhalación, adsorción, absorción, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, intraventricular, por medio de un depósito implantado en formulaciones de dosificación que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, o por cualquier otra forma de dosificación conveniente. El término parenteral, como se usa en el presente documento, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperiotoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal e intracraneal o técnicas de infusión.

50 Cuando se administra por vía parenteral, normalmente, la composición estará en una forma inyectable estéril, de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión) que es preferentemente isotónica con la sangre del recipiente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de estas formas inyectables estériles son suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. Las formas inyectables estériles también pueden ser soluciones o suspensiones inyectables estériles en diluyentes o disolventes
55 parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, como soluciones en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de cloruro de sodio isotónico y solución de Hank. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolventes o medios de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete y aceite de sésamo. Los ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo y ácido oleico y sus derivados glicéridos, incluyendo aceite de oliva y aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxiethyladas, son útiles en la preparación de inyectables. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener diluyentes y dispersantes de alcohol de cadena larga.
60

65 La solución salina estéril y los compuestos a menudo son suficientemente solubles en agua para prepararse como solución para todas las necesidades previsibles. El vehículo puede contener cantidades menores de aditivos, tales

como sustancias que potencian la solubilidad, isotonicidad y estabilidad química, por ejemplo antioxidantes, tampones y conservantes.

5 Las formulaciones adecuadas para administración nasal o bucal (tales como formulaciones de dispensación en polvo de autopropagación) puede comprender aproximadamente de un 0,1% a aproximadamente un 5% p/p, por ejemplo, un 1% p/p de principio activo. Las formulaciones para uso médico humano de la presente invención comprenden un principio activo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para ello y opcionalmente otro(s) ingrediente(s) terapéutico(s).

10 Cuando se administra por vía oral, normalmente la composición se formulará en formas de dosificación unitaria, tales como comprimidos, sobres, polvo, gránulos, perlas, pastillas masticables, cápsulas, líquidos, suspensiones acuosas o soluciones, o formas de dosificación similares, usando equipo y técnicas convencionales conocidas en la técnica. Normalmente, estas formulaciones incluyen un vehículo sólido, semisólido o líquido. Los vehículos ejemplares incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao, aceite de teobroma, alginatos, tragacanto, gelatina, jarabe, metilcelulosa, monolaurato de polioxietileno sorbitán, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y similares.

15 La composición de la invención se puede administrar como una cápsula o comprimido que contenga una dosis individual o dividida del inhibidor. La composición también se puede administrar como una solución, suspensión o emulsión estéril, en una dosis individual o dividida. Los comprimidos pueden contener vehículos tales como lactosa y almidón de maíz, y/o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Las cápsulas pueden contener diluyentes incluyendo lactosa y almidón de maíz seco.

20 Un comprimido se puede fabricar comprimiendo o moldeando el principio activo, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios. Se pueden preparar comprimidos prensados comprimiendo, en una máquina adecuada, el principio activo en una forma fluida tal como polvo o gránulos, mezclada opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente activo de superficie o agente dispersante. Se pueden fabricar comprimidos moldeados moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del principio activo en polvo y un vehículo adecuado humedecido con un diluyente líquido inerte.

25 Los compuestos de esta invención también se pueden administrar por vía rectal en forma de supositorios. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y que por lo tanto se funda en el recto para liberar el fármaco. Estos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

30 Las composiciones y los métodos de la invención también pueden utilizar tecnología de liberación controlada. Por tanto, por ejemplo, los compuestos según la invención se pueden incorporar dentro de una matriz polimérica hidrófoba para una liberación controlada durante un periodo de días. Después, la composición de la invención se puede moldear en un implante sólido, o parche aplicado externamente, adecuado para proporcionar concentraciones eficaces de los inhibidores de PARP durante un periodo de tiempo prolongado sin la necesidad de una redosificación frecuente. Estas películas de liberación controlada son muy conocidas en la técnica. Otras realizaciones son sistemas de administración transdérmica. Otros ejemplos de polímeros empleados comúnmente para este fin que se pueden usar en la presente invención incluyen copolímero de etileno-acetato de vinilo no degradable y copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables que se pueden usar de manera externa o interna. Determinados hidrogeles, tales como poli(metacrilato de hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico) también pueden ser útiles, pero para ciclos de liberación más cortos que los otros sistemas de liberación de polímero, tales como los mencionados anteriormente.

35 En otra realización, el vehículo es un polímero biodegradable sólido o mezcla de polímeros biodegradables con características de liberación temporal y cinética de liberación apropiadas. Después, la composición de la invención se puede moldear dentro de un implante sólido adecuado para proporcionar concentraciones eficaces de los compuestos de la invención durante un periodo de tiempo prolongado sin la necesidad de una redosificación frecuente. La composición de la presente invención se puede incorporar dentro del polímero o mezcla de polímeros biodegradable de cualquier manera adecuada conocida por un experto en la técnica y puede formar una matriz homogénea con el polímero biodegradable, o se puede encapsular de algún modo dentro del polímero, o se puede moldear dentro de un implante sólido.

40 En una realización, el polímero o mezcla de polímeros biodegradables se usa para formar un "depósito" blando que contenga la composición farmacéutica de la presente invención que se pueda administrar como un líquido fluidizable, por ejemplo, por inyección, pero que permanezca suficientemente viscoso para mantener la composición farmacéutica dentro del área localizada alrededor del sitio de inyección. El tiempo de degradación del depósito formado de este modo puede variar desde varios días hasta unos pocos años, dependiendo del polímero seleccionado y de su peso molecular. Con el uso de una composición de polímero en forma inyectable, se puede eliminar incluso la necesidad de realizar una incisión. En cualquier acontecimiento, un "depósito" de administración fluida se ajustará a la forma del espacio que ocupa con el cuerpo con un traumatismo mínimo en los tejidos que lo rodean. La composición farmacéutica de la presente invención se usa en cantidades que son terapéuticamente eficaces, y puede depender del perfil de liberación deseado, la concentración de la composición farmacéutica requerida para el efecto de

sensibilización y el periodo de tiempo en el que la composición farmacéutica tenga que ser liberada para el tratamiento.

Los inhibidores de PARP se usan en la composición en cantidades que sean terapéuticamente eficaces. Las composiciones se pueden esterilizar y/o pueden contener coadyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para la regulación de la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con métodos de mezcla, granulación o recubrimiento convencionales, y contienen aproximadamente de un 0,1 a un 75% en peso, de forma preferente aproximadamente de un 1 a un 50% en peso, del principio activo.

Para que sea terapéuticamente eficaz como dianas del sistema nervioso central, los compuestos de la presente invención deben penetrar rápidamente en la barrera hematoencefálica cuando se administran de forma periférica. Los compuestos que no pueden penetrar en la barrera hematoencefálica se pueden administrar eficazmente por una vía intraventricular u otro sistema de administración apropiado adecuado para la administración al cerebro.

Las dosis de los compuestos incluyen unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad eficaz de compuesto activo. Por una cantidad eficaz se quiere decir una cantidad suficiente para inhibir la PARP y derivar sus efectos beneficiosos a través de la administración de una o más de las unidades de dosificación farmacéutica. Además, la dosis es suficiente para evitar o reducir los efectos de la apoplejía vascular u otras enfermedades neurodegenerativas.

Para un uso médico, la cantidad requerida del principio activo para lograr un efecto terapéutico variará con el compuesto particular, la vía de administración, el mamífero en tratamiento y el trastorno o enfermedad particular que se va a tratar. Una dosis sistemática adecuada de un compuesto de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo para un mamífero que padece, o que probablemente padece, cualquier de las afecciones que se describen anteriormente en el presente documento está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del compuesto del principio activo, siendo la dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg.

Se entiende, sin embargo, que un nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de muchos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se va a tratar y la forma de administración.

Se entiende que un médico o veterinario experto determinará y prescribirá fácilmente la cantidad eficaz del compuesto para tratamiento profiláctico o terapéutico de la afección para la que se administra el tratamiento. Al proceder de este modo, el médico o veterinario podría emplear un bolo intravenoso seguido de una infusión intravenosa y administraciones repetidas, por vía parenteral u oral, según se considere apropiado. Aunque es posible que el principio activo se administre solo, es preferible presentarlo como una composición.

Cuando se preparan formas de dosificación que incorporan las composiciones de la invención, los compuestos también se pueden mezclar con excipientes convencionales, tales como aglutinantes, incluyendo gelatina, almidón pregelatinizado, y similares; lubricantes, tales como aceite vegetal hidrogenado, ácido esteárico, y similares; diluyentes, tales como lactosa, manosa y sacarosa; disgregantes, tales como carboximetilcelulosa y glicolato sódico de almidón; agentes de suspensión, tales como povidona, poli(alcohol vinílico), y similares; absorbentes, tales como dióxido de silicio; conservantes, tales como metilparabeno, propilparabeno y benzoato de sodio; tensioactivos, tales como lauril sulfato de sodio, polisorbato 80 y similares; colorantes tales como colorantes y lacas de F.D.& C.; aromatizantes; y edulcorantes.

La presente invención se refiere al uso de compuestos de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en un animal descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "alquilo" quiere decir una cadena de hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado que comprende un número designado de átomos de carbono. Por ejemplo, una cadena de hidrocarburo de alquilo lineal o ramificado C₁-C₆ contiene de 1 a 6 átomos de carbono, e incluye pero no se limita a sustituyentes tales como metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, y similares, a menos que se establezca de otro modo.

"Alquenilo" quiere decir una cadena de hidrocarburo insaturado ramificado o no ramificado que comprende un número designado de átomos de carbono. Por ejemplo, una cadena de hidrocarburo de alquenilo lineal o ramificada C₂-C₆ contiene de 2 a 6 átomos de carbono que tienen al menos un doble enlace, e incluye pero no se limita a sustituyentes tales como etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, iso-butenilo, terc-butenilo, n-pentenilo, n-hexenilo y similares, a menos que se establezca de otro modo.

"Alcoxi", quiere decir el grupo -OR en el que R es alquilo, como se define en el presente documento. R también puede ser una cadena de hidrocarburo saturada ramificada o no ramificada que contenga de 1 a 6 átomos de carbono.

"Ciclo", usado en el presente documento como un prefijo, se refiere a una estructura caracterizada por un anillo cerrado.

- 5 "Halo" quiere decir al menos un resto de floro, cloro, bromo o yodo, a menos que se establezca de otro modo.

Los compuestos de "amino" incluyen amina (NH₂) así como un amino sustituido.

- 10 "Ar", "arilo" o "heteroarilo" quiere decir un resto que está sustituido o no sustituido, en especial un anillo cíclico o cíclico condensado e incluye un anillo mono-, bi- o tricíclico, carbo- o heterocíclico, en el que el anillo está no sustituido o bien sustituido en de una a cinco posición/ posiciones con halo, haloalquilo, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, alquilo de cadena lineal o ramificada C₁-C₆, alquenilo de cadena lineal o ramificada C₂-C₆, alcoxi C₁-C₆, alqueniloxi C₂-C₆, fenoxi, benciloxi, amino, tiocarbonilo, éster, tioéster, ciano, imino, alquilamino, aminoalquilo, sulfhidrilo, tioalquilo, y sulfonilo; en el que los tamaños de anillo individual son de 5-8 miembros; en el que el anillo heterocíclico contiene 1-4
- 15 heteroátomo(s) seleccionados del grupo que consiste en O, N o S; en el que las alquilaminas aromáticas o terciarias están opcionalmente oxidados en un N-óxido correspondiente. Los heteroarilos pueden estar unidos a otros anillos o sustituidos a través del heteroátomo y/o átomo de carbono del anillo. Los restos de arilo o heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, bencilo, naftilo, pirrolilo, pirrolidinilo, piridinilo, pirimidinilo, purinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, furilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazolilo y tienilo.

- 20 "Fenilo" incluye todos los radicales fenilo isoméricos posibles, opcionalmente monosustituidos o multisustituidos con sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en amino, trifluorometilo, alquilo de de cadena lineal o ramificada C₁-C₆, alquenilo de de cadena lineal o ramificada C₂-C₆, carbonilo, tiocarbonilo, éster, tioéster, alcoxi, alquenoxi, ciano, nitro, imino, alquilamino, aminoalquilo, sulfhidrilo, tioalquilo, sulfonilo, hidroxilo, halo, haloalquilo, NR₂ en el que R₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de de cadena lineal o ramificada -(C₁-C₆)-, alquenilo o alquinilo de de cadena lineal o ramificada (C₃-C₆), y alquilo puente (C₁-C₄) en el que dicho alquilo puente forma un anillo heterocíclico con el nitrógeno de NR₁ y termina con uno de los átomos de carbono de dicha cadena de alquilo o alquenilo, y en el que dicho anillo heterocíclico está opcionalmente condensado a un grupo Ar.

- 30 El cicloalquilo que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo incluye anillos C₃-C₈ saturados, tales como anillos C₅ o C₆, en el que en los heteroátomos 1-4 seleccionados de O, N o S puede estar opcionalmente sustituido con un átomo de carbono del anillo. Los cicloalquilos contienen opcionalmente al menos un heteroátomo, como se describe anteriormente, pueden estar sustituidos por o condensados a al menos un arilo o heteroarilo de 5 ó 6 miembros: Otros cicloalquilos que contienen un heteroátomo incluyen pirrolidinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo,
- 35 piperidinilo, piperazinilo, morfolino y tiomorfolino.

- Los compuestos de la presente invención poseen uno o más centros asimétricos y por tanto se pueden producir como mezclas (racémicas y no racémicas) de estereoisómeros, o como enantiómeros o diastereómeros individuales. Los estereoisómeros individuales se pueden obtener usando un material de partida ópticamente activo, redisolviendo una
- 40 mezcla racémica o no racémica de un intermedio en algún estado apropiado de la síntesis, o por redisolución del compuesto de la presente invención. Se entiende que los estereoisómeros individuales así como las mezclas (racémicas y no racémicas) de estereoisómeros están abarcadas por el alcance de la presente invención.

- Los "isómeros" son compuestos diferentes que tienen la misma fórmula molecular e incluyen isómeros cíclicos tales como (iso)indol y otras formas isoméricas de restos cíclicos. Los "estereoisómeros" son isómeros que difieren sólo en la forma en la que están dispuestos los átomos en el espacio. Los "enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Los "diastereoisómeros" son estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí. "Mezcla racémica" quiere decir una mezcla que contiene partes iguales de enantiómeros individuales. "Mezcla no racémica" es una mezcla que comprende partes desiguales de enantiómeros o
- 50 estereoisómeros individuales.

- Los compuestos de la invención son útiles en forma de base libre, en forma de sales farmacéuticamente aceptables, hidratos farmacéuticamente aceptables, ésteres farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, profármacos farmacéuticamente aceptables, metabolitos farmacéuticamente aceptables, y en forma de estereoisómeros farmacéuticamente aceptables. Estas formas están todas dentro del alcance de la invención. En la práctica, el uso de estas formas equivale al uso del compuesto neutro.
- 55

- "Sal farmacéuticamente aceptable", "hidrato", "éster" o "solvato" se refiere a una sal, hidrato, éster o solvato de los compuestos según la invención que posee la actividad farmacológica deseada y que no es ni biológicamente ni de otro modo indeseable. Se pueden usar ácidos orgánicos para producir sales, hidratos, ésteres o solvatos tales como acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, p-toluensulfonato, bisulfato, sulfamato, sulfato, naftilato, butirato, citrato, camforato, camforsulfonato, ciclopentano-propionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato heptanoato, hexanoato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metano-sulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, tosilato y undecarioato. Se pueden usar ácidos inorgánicos para producir sales, hidratos, ésteres o solvatos tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato y tiocianato.
- 60
- 65

Los ejemplos de sales de bases, hidratos, ésteres o solvatos adecuados incluyen hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de amoníaco, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, litio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales de aluminio y sales de cinc.

5 Las sales, hidratos, ésteres o solvatos también se pueden formar con bases orgánicas. Las bases orgánicas adecuadas para la formación de sales de adición de bases, hidratos, ésteres o solvatos de los compuestos de la presente invención incluyen los que son no tóxicos y suficientemente fuertes para formar dichas sales, hidratos ésteres o solvatos. Con fines de ilustración, la clase de dichas bases orgánicas puede incluir mono-, di- y trialquilaminas, tales como metilamina, dimetilamina, trietilamina y dicitclohexilamina; mono-, di- o trihidroxialquilaminas, tales como mono-, di- y trietanolamina; aminoácidos, tales como arginina y lisina; guanidina; N-metil-glucosamina; N-metil-glucamina; L-glutamina; N-metil-piperazina; morfolina; etilendiamina; N-bencil-fenetilamina; (trihidroxi- metil)aminoetano; y similares. Véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 66:1, 1-19 (1977). En consecuencia, los grupos que contienen nitrógeno básicos se pueden cuaternizar con agentes, incluyendo: haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo, tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; y haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y fenetilo.

20 Las sales de adición de ácido, hidratos, ésteres o solvatos de los compuestos básicos se pueden preparar disolviendo la base libre de un inhibidor de PARP de la presente invención en una solución acuosa o de alcohol acuosa u otro disolvente adecuado que contenga el ácido o base apropiada y aislando la sal evaporando la solución. De forma alternativa, la base libre del inhibidor de PARP de la presente invención se puede hacer reaccionar con un ácido, así como hacer reaccionar el inhibidor de PARP que tiene un grupo ácido en él con una base, de modo que las reacciones estén en un disolvente orgánico, en ese caso la sal se separa directamente o se puede obtener concentrando la solución.

30 "Profármaco farmacéuticamente aceptable" se refiere a un derivado de los compuestos según la invención que sufre una biotransformación antes de presentar su(s) efecto(s) farmacológico(s). El profármaco se formula con el/los objetivo(s) de mejorar la estabilidad química, mejorar la aceptación y cumplimiento por parte del paciente, mejorar la biodisponibilidad, prologar la duración de la acción, mejorar la selectividad de órganos, mejorar la formulación (por ejemplo, incrementar la hidrosolubilidad), y/o disminuir los efectos secundarios (por ejemplo, toxicidad). El profármaco se puede preparar fácilmente a partir de los compuestos según la invención usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Burger's Medicinal Chemistry and Drug Chemistry, quinta ed., Vol. 1, p. 172-178, 949-982 (1995). Por ejemplo, los compuestos según la invención se pueden transformar en profármacos convirtiendo uno o más de los grupos hidroxilo o carboxilo en ésteres.

40 "Metabolito farmacéuticamente aceptable" se refiere a profármacos que han sufrido una transformación metabólica. Después de entrar en el organismo, la mayoría de los fármacos son sustratos para reacciones químicas que pueden cambiar sus propiedades físicas y efectos biológicos. Estas conversiones metabólicas, que normalmente afectan a la polaridad del compuesto, alteran la forma en la que se distribuyen los fármacos en y se excretan desde el organismo. Sin embargo, en algunos casos, el metabolismo de un fármaco se requiere por su efecto terapéutico. Por ejemplo, los fármacos antineoplásicos de la clase de antimetabolitos se deben convertir a sus formas activas después de que se hayan transportado en una célula cancerosa. Puesto que la mayoría de los fármacos sufren una transformación metabólica de algún tipo, las reacciones bioquímicas que desempeñan un papel en el metabolismo de los fármacos pueden ser numerosas y diversas. El sitio principal del metabolismo del fármaco es el hígado, aunque también pueden participar otros tejidos.

50 El término "enfermedades neurodegenerativas" incluye, pero no se limita a enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

55 El término "daño nervioso" se refiere a cualquier daño en el tejido nervioso y a cualquier discapacidad o muerte que resulte del mismo. La causa de daño nervioso puede ser metabólica, tóxica, neurotóxica, yatrogénica, térmica o química, e incluye sin limitación, isquemia, hipoxia, accidente cerebrovascular, traumatismo, cirugía, presión, efecto másico, hemorragia, radiación, vasoespasmo, enfermedad neurodegenerativa, infección, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), proceso de mielinación/desmielinación, epilepsia, trastorno cognitivo, anomalía de glutamato y efectos secundarios de los mismos.

60 El término "neuroprotector" se refiere al efecto de reducir, detener o mejorar el daño nervioso, y proteger, resucitar o revivir el tejido nervioso que ha sufrido daño nervioso.

El término "evitar la neurodegeneración" incluye la capacidad de evitar una enfermedad neurodegenerativa o evitar una neurodegeneración adicional en pacientes que ya padecen o que tienen síntomas de una enfermedad neurodegenerativa.

65 El término "tratar" se refiere a:

(i) evitar que se produzca una enfermedad, trastorno o afección en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección, pero que aún no se ha diagnosticado que la tenga;

(ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir detener su desarrollo; y

(iii) mitigar la enfermedad, trastorno o afección, es decir provocar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección.

La expresión "daño tisular neuronal que resulta de lesión por isquemia y reperusión y enfermedades neurodegenerativas" incluye daño debido a neurotoxicidad, tal como el observado en apoplejía vascular e isquemia global y focal.

El término "isquemia" se refiere a anemia tisular localizada debida a una obstrucción de la entrada de sangre arterial. La isquemia global se produce bajo condiciones en las que el flujo sanguíneo a todo el cerebro cesa durante un periodo de tiempo, tal como puede resultar de un paro cardíaco. La isquemia focal se produce bajo condiciones en las que una porción del cerebro se priva de su suministro de sangre normal, tal como puede resultar de una oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, lesión craneal traumática, edema y tumores cerebrales.

El término "cardiovasculopatía" se refiere a infarto de miocardio, angina de pecho, isquemia vascular o de miocardio, y afecciones relacionadas como conocerá un experto en la técnica, que implican disfunción de o daño tisular al corazón o vasculatura, y en especial, pero sin limitarse a, daño tisular relacionado con la activación de PARP.

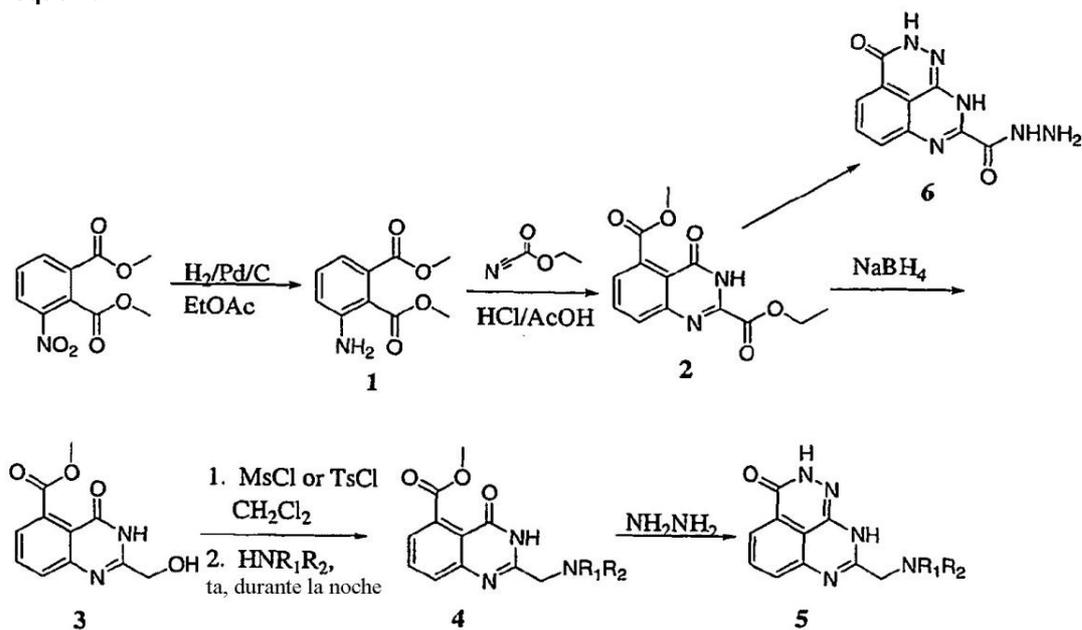
El término "radiosensibilizador", como se usa en el presente documento, se define como una molécula, tal como una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente efectivas para incrementar la sensibilidad de las células a radiosensibilizarse a radiación electromagnética y/o para promover el tratamiento de enfermedades que se pueden tratar con radiación electromagnética. Las enfermedades que se pueden tratar con radiación electromagnética incluyen enfermedades neoplásicas, tumores benignos y malignos y células cancerosas. El tratamiento con radiación electromagnética de otras enfermedades no enumeradas en el presente documento también se contempla por la presente invención. Los términos "radiación electromagnética" y "radiación", como se usan en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, radiación que tiene la longitud de onda de 10^{-20} a 10^0 metros. Las realizaciones preferidas de la presente invención emplean la radiación electromagnética de: radiación gamma (de 10^{-20} a 10^{-13} m), radiación de rayos X (de 10^{-11} a 10^{-9} m), luz ultravioleta (de 10 nm a 400 nm), luz visible (de 400 nm a 700 nm), radiación infrarroja (de 700 nm a 1,0 mm) y radiación de microondas (de 1,0 mm a 30 cm).

Muchos de los inhibidores de PARP se pueden sintetizar por métodos conocidos a partir de materiales de partida que se conocen, pueden estar comercialmente disponibles o se pueden preparar por método usado para preparar los correspondientes compuestos en la literatura. Véase, por ejemplo, Suto et al., "Dihydroiso-quinolinones: The Design and Synthesis of a New Series of Potent Inhibitors of Poly(ADP-ribose) Polymerase", *Anticancer Drug Des.*, 6:107-17 (1991), que divulga procesos para sintetizar varios inhibidores de PARP diferentes.

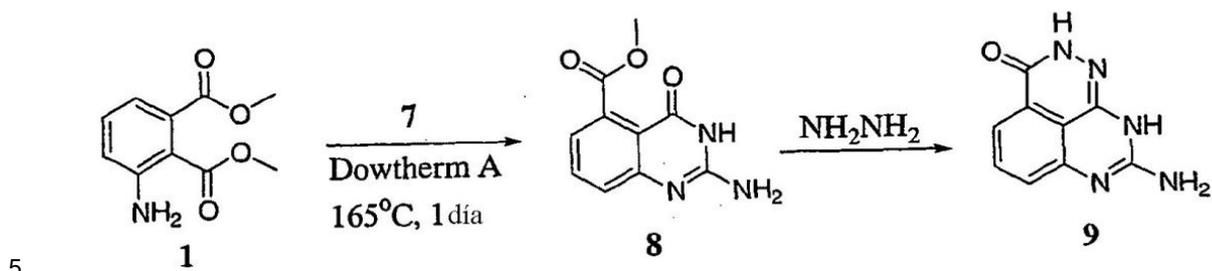
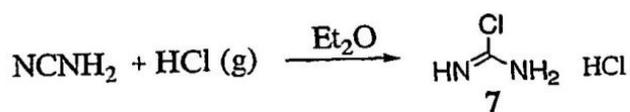
Los derivados de quinazolin-ona y ftalazin-ona de la presente invención se representan por las fórmulas I y II definidas previamente. Como ejemplo, los derivados de la presente invención se pueden preparar de manera convencional como se ilustra a continuación por los esquemas 1-8. Los anillos en los derivados de quinazolin-ona y ftalazin-ona se pueden sustituir genéricamente como se establece en la fórmula I y II. Dichos derivados de partida se conocen en la literatura química y son accesibles por procesos conocidos por un experto en la técnica.

Los derivados de diazabenzo[de]antracen-3-ona de la presente invención se pueden preparar de manera convencional como se ilustra a continuación por los esquemas 9-11.

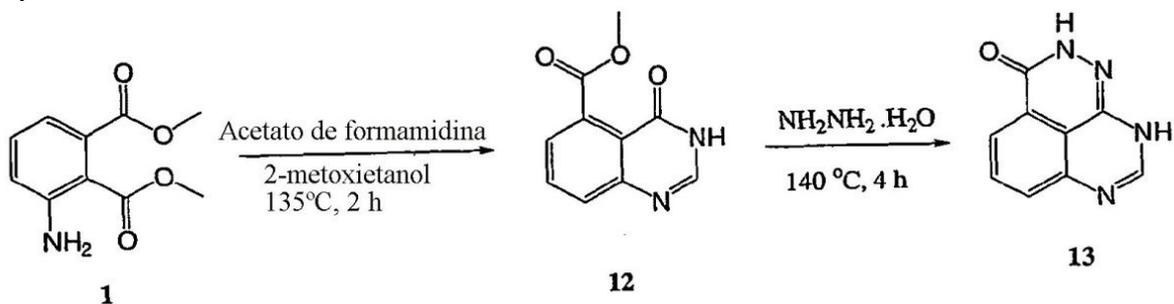
Esquema 1



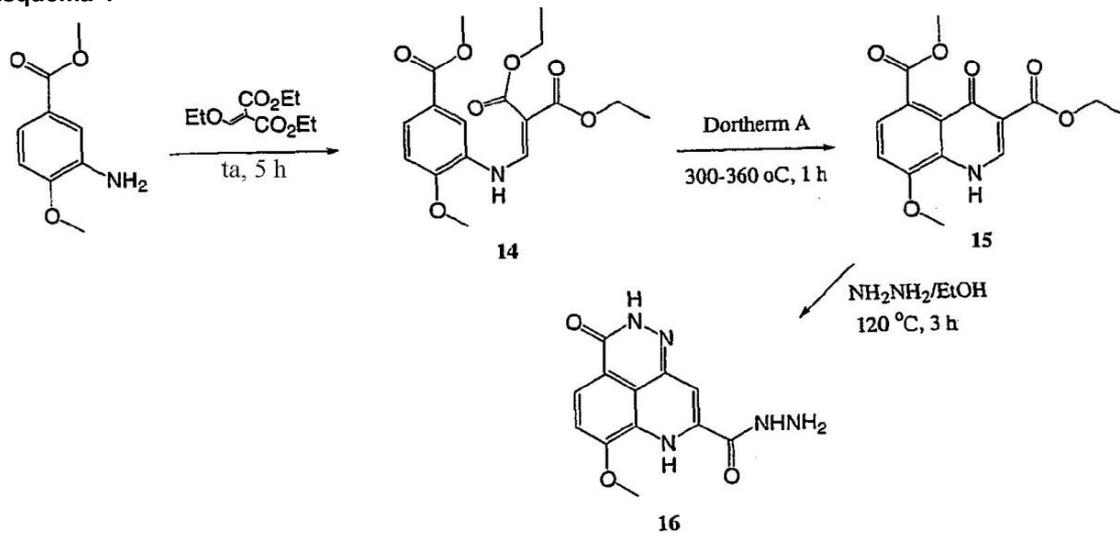
Esquema 2



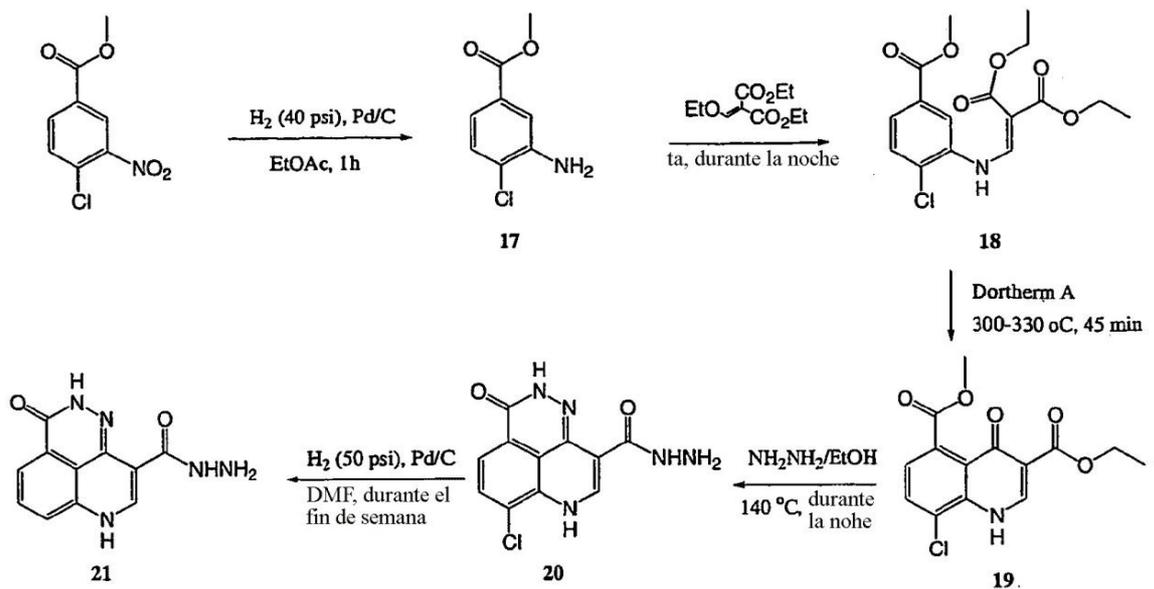
Esquema 3



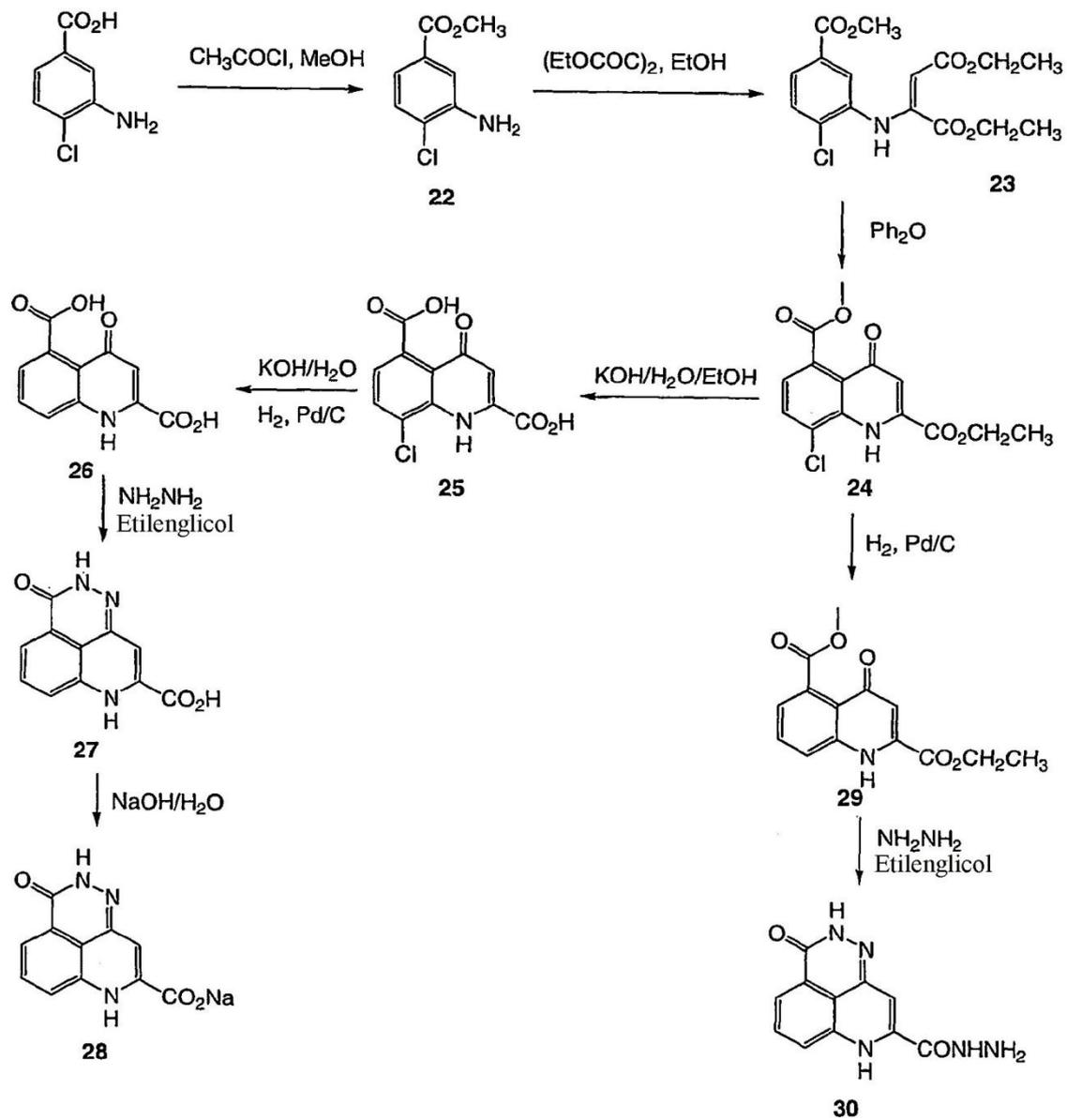
Esquema 4



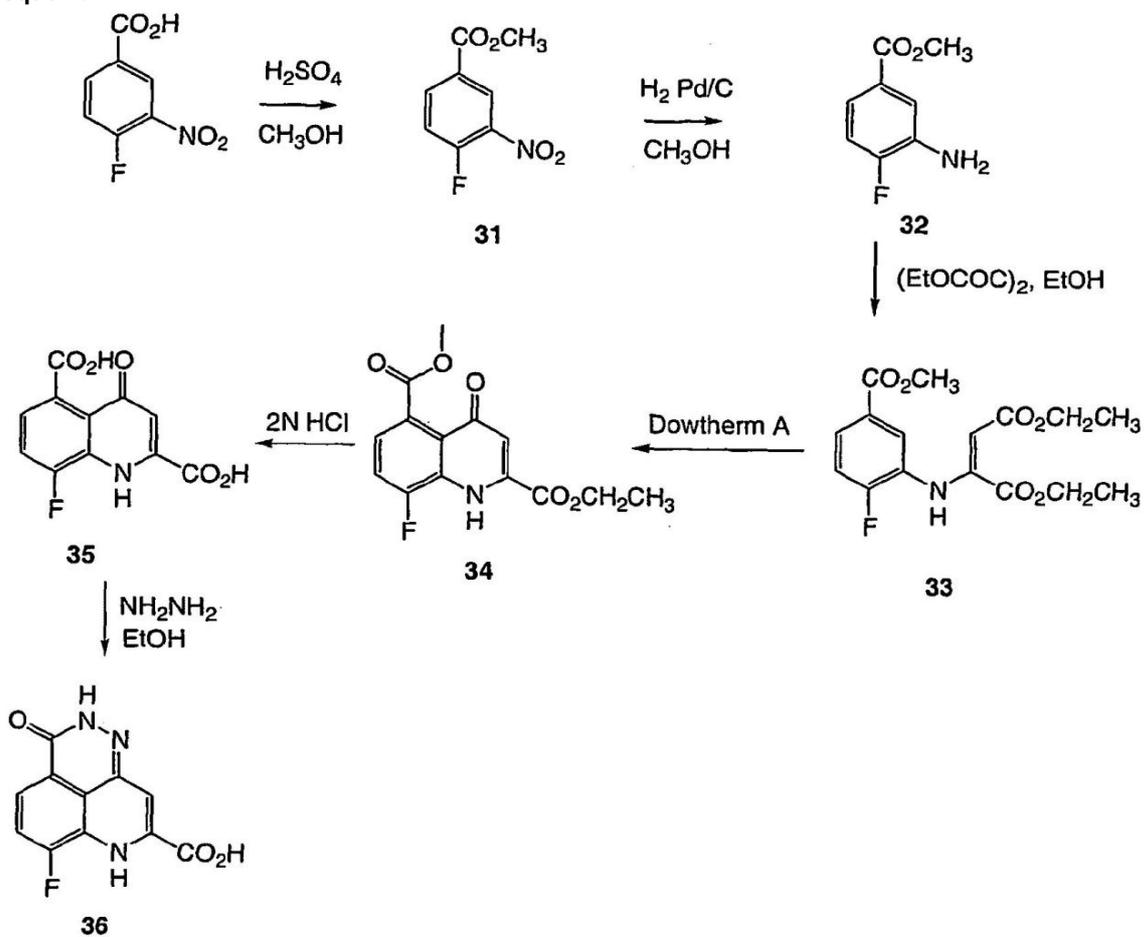
Esquema 5



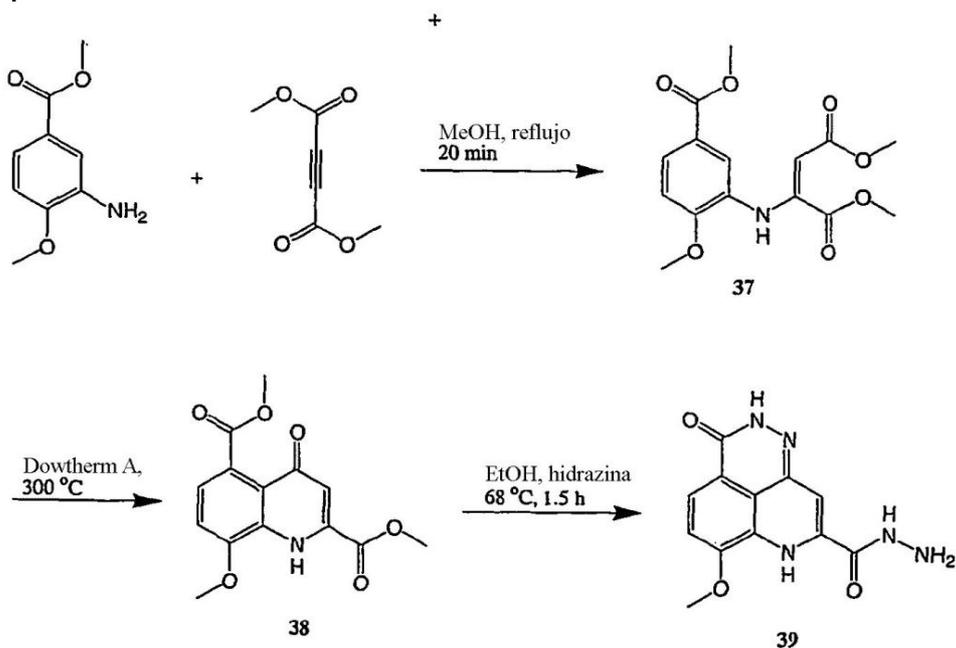
Esquema 6



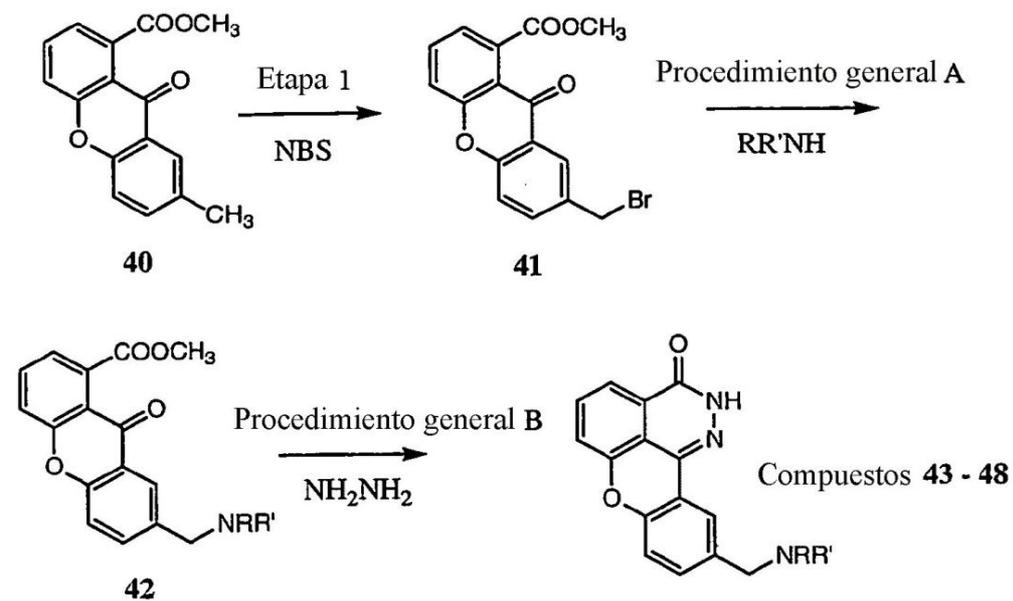
Esquema 7



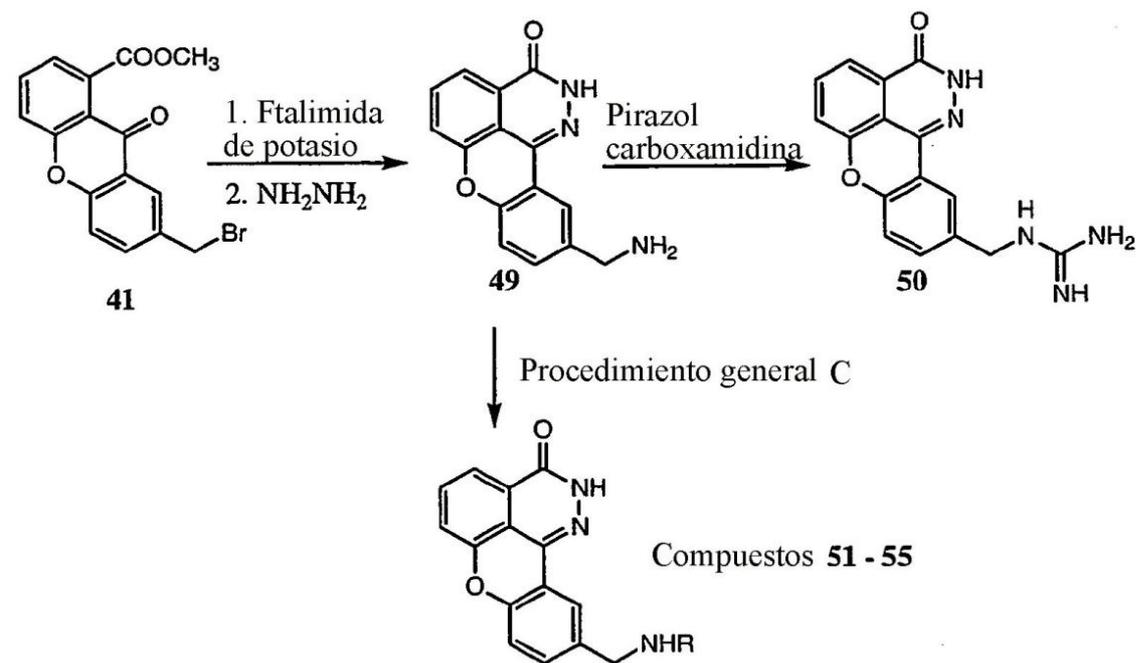
Esquema 8



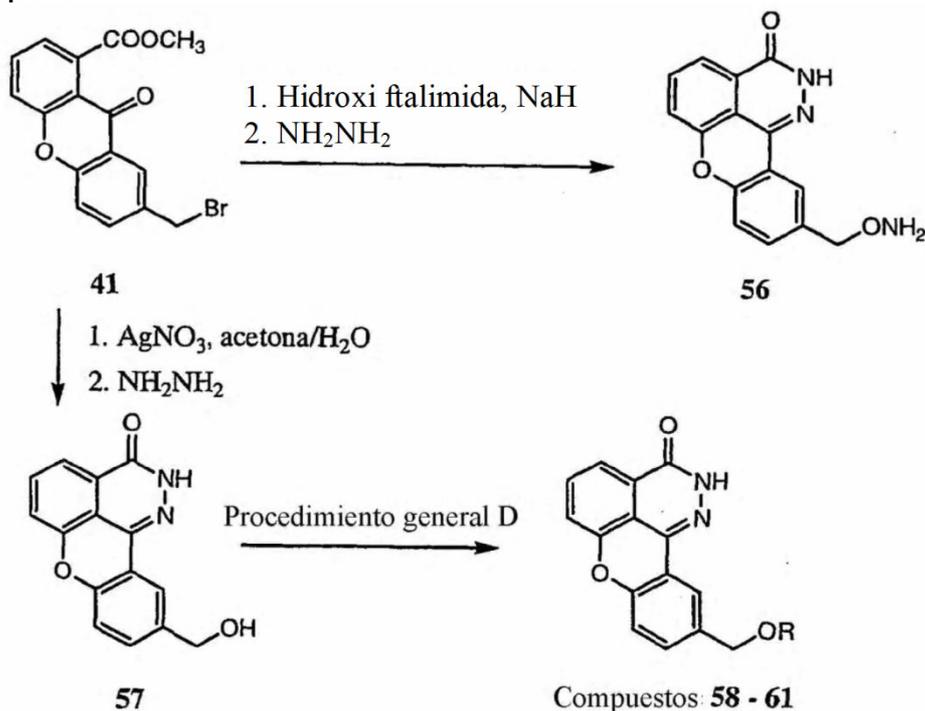
Esquema 9



Esquema 10



Esquema 11



5 Otras maneras, variaciones o secuencias de preparación de los compuestos de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

10 Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en forma de base libre, en forma de sales de base si es posible, y en forma de sales de adición, así como en forma de ácido libre. Todas estas formas están dentro del alcance de esta invención. En la práctica, el uso de la forma de sal equivale al uso de la forma de base. Las sales farmacéuticamente aceptables dentro del alcance de la presente invención son las derivadas de ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y ácido sulfúrico; y ácidos orgánicos tales como ácido etanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido p-toluensulfónico, y similares, dando el clorhidrato, sulfonato, etanosulfonato, benzenosulfonato, p-toluensulfonato, y similares, respectivamente, o los derivados de bases tales como bases orgánicas e inorgánicas adecuadas. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables con compuestos de la presente invención incluyen bases orgánicas que son no tóxicas y suficientemente fuertes para formar dichas sales. Estas bases orgánicas y el uso de las mismas se entenderán fácilmente por los expertos en la técnica. Solo con fines de ilustración, estas bases orgánicas pueden incluir mono-, di- y trialkilaminas, tales como metilamina, dietilamina y trietilamina; mono-, di- o trihidroxialquilaminas tales como mono-, di- y trietanolamina; aminoácidos tales como arginina y lisina; guanidina; N-metilglucosamina; N-metilglucamina; L-glutamina; N- metilpiperazina; morfolina; etilendiamina; N-bencilfenetilamina; tris(hidroximetil)aminoetano; y similares.

25 Las sales de adición de ácido de los compuestos básicos se pueden preparar disolviendo la base libre del compuesto de la presente invención en solución acuosa o de alcohol acuosa u otros disolventes adecuados que contienen el ácido o base apropiada y aislar la sal evaporando la solución, o haciendo reaccionar la base libre del compuesto de la presente invención con un ácido así como haciendo reaccionar el compuesto de la presente invención que tiene un grupo ácido en él con una base de modo que las reacciones sean en un disolvente orgánico, caso en el que la sal se separa directamente o se puede obtener por concentración de la solución.

30 Los compuestos de la presente invención contienen uno o más átomos de carbono asimétricos. Por lo tanto, la invención contiene los estereoisómeros individuales y mezclas de los mismos así como los compuestos racémicos. Los isómeros individuales se pueden preparar o aislar por métodos conocidos en la técnica.

35 Los compuestos de la invención presentan actividad farmacológica y, por lo tanto, son útiles como productos farmacéuticos. Adicionalmente, los compuestos presentan actividad del sistema nervioso central y vesicular cardíaco.

Ensayos de PARP

Cl_{50}

40 Un método conveniente para determinar la Cl_{50} de un compuesto inhibidor de PARP es un ensayo de PARP usando

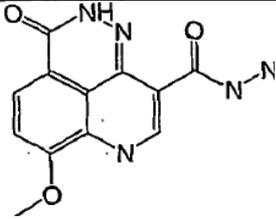
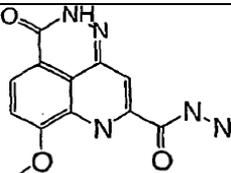
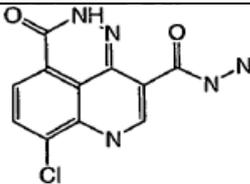
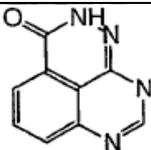
una PARP humana recombinante purificada de Trevigan (Gaithersburg, MD), como sigue: Se establece el ensayo de enzima de PARP en hielo en un volumen de 100 microlitros que consiste en Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), MgCl₂ 1 mM, KCl 28 mM, NaCl 28 mM, 0,1 mg/ml of ADN de esperma de arenque activado con DNasa I (Sigma, MO), [3H]nicotinamida adenin-dinucleótido 3,0 micromolar (470 mci/mmol), 7 microgramos/ml de enzima de PARP, y varias concentraciones de los compuestos que se van a someter a prueba. La reacción se inicia incubando la mezcla a 25°C. Después de 15 minutos de incubación, se termina la reacción añadiendo 500 microlitros de ácido tricloroacético al 20% (p/v) helado. El precipitado formado se transfiere a un filtro de fibra de vidrio (Packard Unifilter-GF/B) y se lava tres veces con etanol. Después de que se seque el filtro, se determina la radioactividad por recuento de centelleo. Se encontró que los compuestos de la presente invención tiene una actividad enzimática potente en el intervalo de de unos pocos nM a 20 µM en CI₅₀ en este ensayo de inhibición.

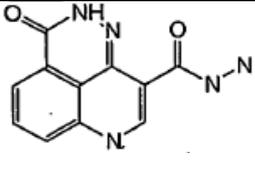
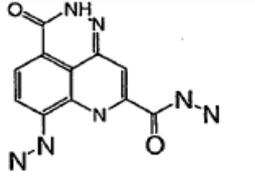
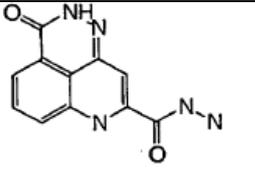
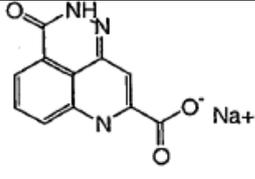
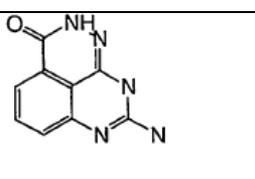
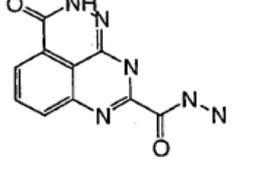
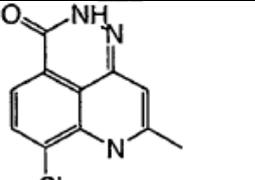
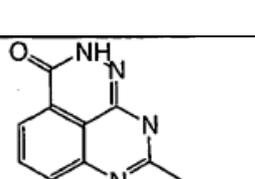
CE₅₀

Se usó un ensayo de muerte celular inducida por H₂O₂ para determinar el efecto citoprotector de los inhibidores de PARP. Se mantuvieron células P388D1 (CCL-46, ATCC), derivadas de tumor de tipo macrófago murino, en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero de caballo al 10% y L-glutamina 2 mM. Se estableció el ensayo de citotoxicidad en una placa de 96 pocillos. En cada pocillo, se sembraron 190 µl de células a una densidad de 2 x 10⁶/ml. Para determinar la CE₅₀, la concentración de un compuesto requirió lograr una reducción de un 50% de muerte celular, se llevó a cabo un experimento de respuesta a la dosis. Se añadieron los inhibidores de PARP al medio hasta una concentración final de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 µM. Después de 15 min. de incubación con un inhibidor de PARP, se añadieron 5 µl de H₂O₂ recién preparado a las células hasta una concentración final de 2 mM. Se devolvieron las células al incubador a 37 °C durante 4 h. Al final de la incubación, se muestrearon 25 µl de sobrenadante del medio celular para determinar el nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada de las células muertas. Se determinó la actividad de LDH monitorizando la tasa de disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm. Se usó el grupo sin tratamiento con fármaco para calcular el total de muerte celular debida al tratamiento con H₂O₂. Cada punto de datos era un promedio de cuadruplicado. Se determinó la CE₅₀ a partir de una curva de respuesta a la dosis.

Usando los ensayos de PARP descritos anteriormente, se obtuvieron valores de CI₅₀ y CE₅₀ aproximados para los siguientes compuestos:

Tabla I

Estructura	CI ₅₀ (µM)	CE ₅₀ (µM)
	20	
	20	
	0,749	
	0,039	0,35

	0,014	0,1
	2,79	
	0,026	0,51
	0,16	1,7
	0,091	0,64
	0,021	0,24
	0,12	
	0,026	0,36

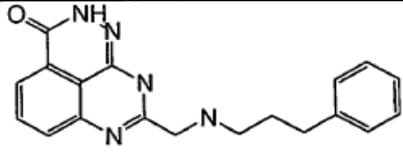
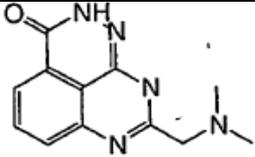
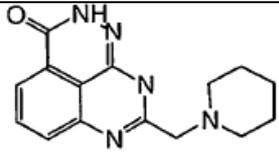
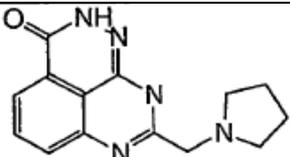
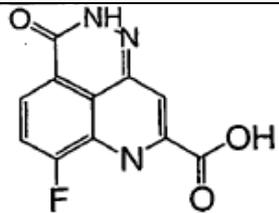
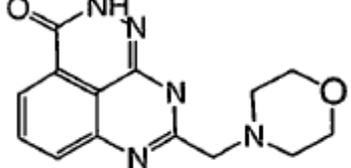
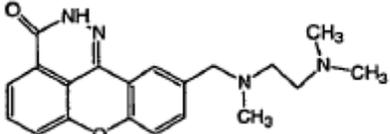
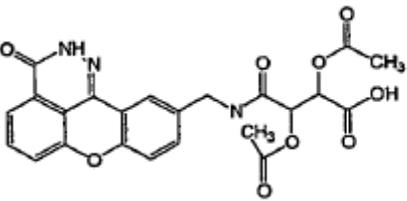
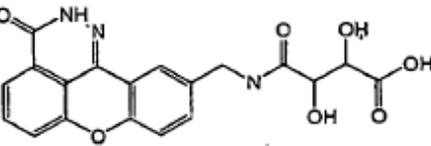
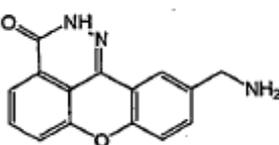
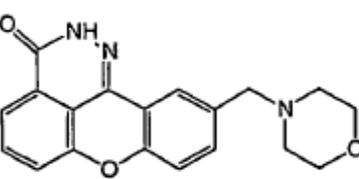
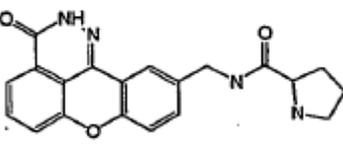
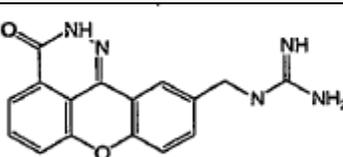
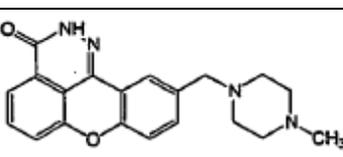
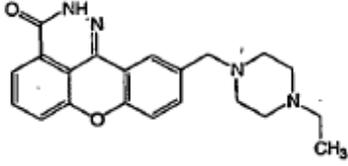
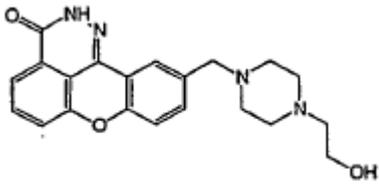
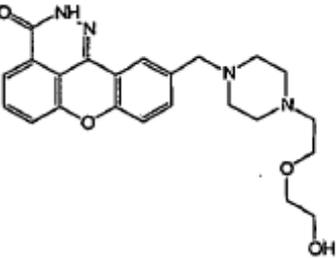
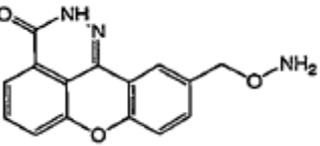
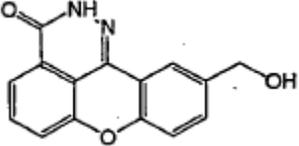
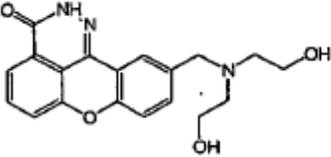
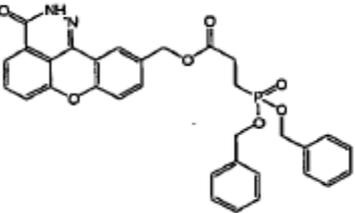
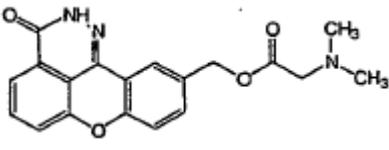
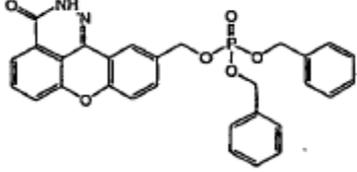
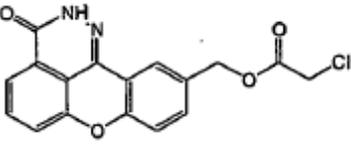
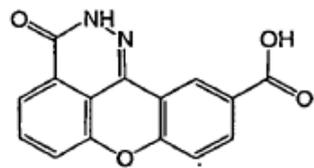
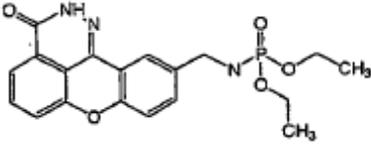
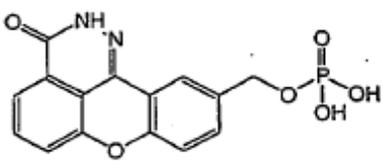
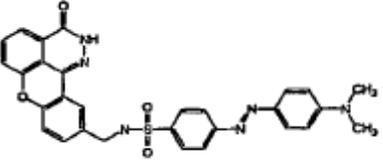
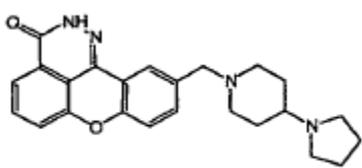
	0,087	0,01
	0,019	0,13
	0,019	0,12
	0,018	
	20	
	0,018	

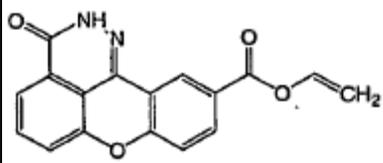
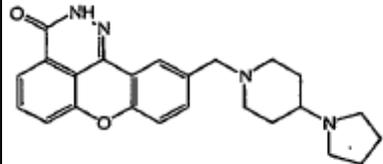
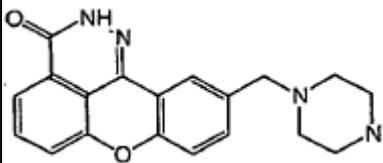
Tabla 2

Estructura	CI50 (μM)	CE50 (μM)
 10-[[2-(dimetilamino-etil)-metil-amino]-metil]-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracen-3-ona	0,1	0,17

	0,035	2,08
	0,021	5,27
	0,019	2,08
	0,067	0,3
	0,03	0,08
	0,035	1
	0,074	0,13

	0,06	0,12
	0,101	0,08
	0,128	0,075
	0,165	0,47
	0,092	0,41
	0,038	
	0,413	

	0,125	
	0,086	0,52
	0,177	
	0,167	
	0,275	
	0,034	0,75
	1,3	
	0,244	

	0,089	I
	0,036	0,3
	0,048	0,27

Los ejemplos 1, 2, 3, 16, 17, 18 y 19 son ejemplos de la presente invención. Los ejemplos 4-15 no son ejemplos de la presente invención.

Ejemplo 1

5

Preparación de derivados de quinazolina (5a, 5b, 5c y 6) (esquema 1)

10 **3-aminoftalato de dimetilo (1)** A una solución de 3-nitroftalato de dimetilo (12 g, 50 mmol) en EtOAc (200 ml) se le añadió 10% Pd/C (3 g). Se hidrogenó la mezcla resultante bajo H₂ (50 psi) en un aparato de hidrogenación de Parr a temperatura ambiente durante la noche. Se separó por filtración el catalizador en una almohadilla de celite y se concentró el filtrado a vacío para proporcionar un aceite amarillo (1, 10,5 g, 100%). RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,16 (t, J = 7,4, 8,2 Hz, 1H), 6,82 (dd, J = 1,0, 7,4 Hz, 1H), 6,70 (dd, J = 1,1, 8,4 Hz, 1H), 5,14 (s, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,76 (s, 3H).

15 **5-metil 4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-2,5-dicarboxilato de 2-etilo (2)** Se calentó una mezcla de 1 (2,1 g, 10 mmol) en ácido acético (10 ml), cianoformato de etilo (1,0 g, 10 mmol), y HCl 1N en ácido acético (10,5 ml) hasta 120 °C y se agitó durante 2,5 h. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo en bruto por cromatografía ultrarrápida (de MeOH al 0,5% en CH₂Cl₂ a MeOH al 1% en CH₂Cl₂) para proporcionar un sólido blanco (2,2,35 g, 85%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7,91 (d, J = 4,2 Hz, 2H), 7,59 (t, J = 4,2 Hz, 1H), 4,38 (q, J = 7,1, 7,3, 14 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 20 1,35 (t, J = 7,3, 7,1 Hz, 3H).

25 **2-hidroximetil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-5-carboxilato de 5-metilo (3)** A una solución de 2 (2,0 g, 7,25 mmol) en EtOH (100 ml) se le añadió NaBH₄ (0,55 g, gran exceso) a 0 °C. Se dejó que la mezcla resultante se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 6 h. Se retiró el disolvente y se añadieron EtOAc (50 ml) y H₂O (20 ml). Se extrajo la capa acuosa con EtOAc y CH₂Cl₂. Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄) y se concentró a vacío. Se purificó el residuo en bruto por cromatografía ultrarrápida (de MeOH al 1% en CH₂Cl₂ a MeOH al 5% en CH₂Cl₂) para proporcionar un sólido blanco (3, 1,0 g, 59%). RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ 7,72 (t, J = 7,4, 8,2 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,82 (s, 3H).

30 **3,4-dihidro-4-oxo-2-(dimetilamino)metil-5-quinazolin-carboxilato de 5-metilo (4a)** A una suspensión de 3 (130 mg, 0,55 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml) a temperatura ambiente se le añadió cloruro de metanosulfonilo (47 ul, 0,61 mmol) bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche seguido de adición de clorhidrato de dimetilamina (68 mg, 0,83 mmol) y Et₃N (168 mg, 1,67 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla resultante durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción a vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida (de MeOH al 1% en CH₂Cl₂ a MeOH al 2,5% en CH₂Cl₂) para proporcionar un sólido blanco (4a, 70 mg, 48%). RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,63-7,75 (m, 2H), 7,36 (dd, J = 1,9, 6,5 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,46 (s, 2H), 2,31 (s, 3H).

40 **3,4-dihidro-4-oxo-2-(1-piperidinilmetil)-5-quinazolinocarboxilato de 5-metilo (4b)** A una solución de 3 (125 mg, 0,53 mmol) en CH₂Cl₂ (8 ml) se le añadió Et₃N (81 mg, 0,80 mmol) y cloruro de p-toluensulfonilo (826 mg, 0,59 mmol) a 0 °C. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. Se retiraron los disolventes a vacío. Al aceite resultante se le añadió EtOH (5 ml) y piperidina (54 mg, 0,64 mmol) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción a 50 °C durante 1,5 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se

retiró el disolvente a vacío. Se añadieron EtOAc (40 ml) y H₂O (25 ml) y se lavó la capa acuosa con EtOAc (2x40 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo en bruto por cromatografía ultrarrápida (MeOH al 10% en CH₂Cl₂) para proporcionar un aceite amarillo claro (4b, 50 mg, 31 %). RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,74-7,65 (m, 2H), 7,43 (dd, 7=1,8, 6,8 Hz, 1H), 5,28 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 1,58-1,41 (m, 10H); EM (ES+): 302,03.

3,4-dihidro-4-oxo-2-(1-pirrolidinilmetil)-5-quinazolinocarboxilato de metilo (4c) A una solución de 3 (125 mg, 0,53 mmol) en CH₂Cl₂ (8 ml) se le añadió Et₃N (81 mg, 0,80 mmol) y cloruro de p-toluensulfonilo (826 mg, 0,59 mmol) a 0 °C. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. Se retiraron los disolventes a vacío. Al aceite resultante se le añadió EtOH (5 ml) y pirrolidina (55 mg, 0,77 mmol) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción a 50 °C durante 1,5 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se retiró el disolvente a vacío. Se añadieron EtOAc (40 ml) y H₂O (25 ml) y se lavó la capa acuosa con EtOAc (2x40 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo en bruto por cromatografía ultrarrápida (MeOH al 10% en CH₂Cl₂) para proporcionar un aceite amarillo claro (4c, 40 mg, 26 %) que se usó directamente en la siguiente etapa.

2,9-dihidro-8-[(dimetilamino)metil]-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona (5a) A una solución de 4a (70 mg, 0,27 mmol) en EtOH (4 ml) se le añadió NH₂NH₂ (2 ml) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla resultante hasta 100 °C y se agitó durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción a vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida (de MeOH al 2% en CH₂Cl₂ con NH₄OH al 0,5% a MeOH al 4% MeOH en CH₂Cl₂ con NH₄OH al 0,5%) para proporcionar un sólido amarillo (5a, 30 mg, 45%). Pf > 240 °C (dec.); RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 11,9 (s a, 1H), 7,78 (dd, J = 0,76, 7,6 Hz, 1H), 7,67 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 3,42 (s, 2H), 2,43 (s, 6H); EM (ES-): 242,14; Anal. Calc. para C₁₂H₁₃N₅O₂·(0,25H₂O): C, 58,17; H, 5,49; N, 28,27. Hallado: C, 57,91; H, 5,46; N, 28,55.

2,9-dihidro-8-[(1-piperidinilmetil)-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona (5b) A una solución de 4b (50 mg, 0,17 mmol) en EtOH (3 ml) se le añadió hidrazina (2,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 120 °C durante 18 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió EtOAc (20 ml) y H₂O (20 ml). Se lavó la capa acuosa con EtOAc. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera (10 ml), se secó (Na₂SO₄). Se purificó el residuo en bruto por cromatografía ultrarrápida (MeOH al 10% en CH₂Cl₂) para proporcionar un aceite amarillo claro (5b, 23,6 mg, 49 %). Pf: 250-252 °C; RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 10,01 (s, 1H), 7,80 (d, J = 7,87 Hz, 1H), 7,50 (t, J = 7,73, 1H), 7,45 (s, 1H), 3,45 (s, 2H), 2,40-2,60 (m, 4H), 1,50-1,45 (m, 6H); EM (ES+): 284; Anal. Calc. para C₁₅H₁₇N₅O₁·(0,5H₂O): C, 61,63; H, 6,21; N, 23,96. Hallado: C, 61,53; H, 6,21; N, 23,81.

2,9-dihidro-8-[(1-pirrolidinilmetil)-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona (5c) A una solución de 4c (40 mg, 0,14 mmol) en EtOH (5 ml) se le añadió hidrazina (2,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 120 °C durante 18 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió EtOAc (20 ml) y H₂O (20 ml). Se lavó la capa acuosa con EtOAc. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera (10 ml) y se secó (Na₂SO₄). Se purificó el residuo en bruto por cromatografía ultrarrápida (MeOH al 10% en CH₂Cl₂) para proporcionar un sólido blanco (5c, 15 mg, 40%). Pf: 230-232 °C; RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 10,70 (s, 1H), 8,25 (d, J = 7,63 Hz, 1H), 8,10 (t, J = 7,82 Hz, 1H), 7,75-7,80 (m, 1H), 3,80 (s, 2H), 3,0 (s, 4H), 2,30 (s, 4H); EM (ES+): 270,07; Anal. Calc. para C₁₄H₁₅N₅O₁·(0,23H₂O): C, 59,17; H, 5,39; N, 24,25. Hallado: C, 59,16; H, 5,51; N, 24,39.

Hidrazida 3-oxo-2,9-dihidro-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-8-carboxilica (6) Se sometió a reflujo una mezcla de 2 (200 mg, 0,72 mmol) en NH₂NH₂ (3 ml) durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se retiró el NH₂NH₂ en exceso a vacío. Se lavó el residuo en bruto con MeOH y CH₂Cl₂ para proporcionar un sólido amarillo (6, 100 mg, 56%). Pf > 300 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 11,93 (s, 1H), 9,94 (s a, 1H), 7,76 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,64 (dd, J = 0,94, 7,8 Hz, 1H), 7,59 (dd, J = 0,94, 7,8 Hz, 1H), 4,68 (s a, 2H); EM (ES+): 245,34; Anal. Calc. para C₁₀H₈N₆O₂·(0,8 H₂O): C, 46,44; H, 3,74; N, 32,5. Hallado: C, 45,99; H, 3,89; N, 32,89.

50 Ejemplo 2

Preparación de 8-amino-2,9-dihidro-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona (9) (esquema 2)

Clorhidrato de cloroformamida (7) A una solución de cianamida (1 g, 23,78 mmol) en Et₂O (20 ml) se le burbujeó gas HCl hasta que no se formó más precipitado. Se filtró el precipitado y se secó a vacío sobre KOH para proporcionar un sólido blanco (7, 2,5 g, 93%) que se usó directamente en la siguiente etapa. EM (ES+): 116,12.

2-amino-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-5-carboxilato de 5-metilo (8) A una solución de 1 (2,75 g, 13 mmol) en Dowtherm A (25 ml) se le añadió 7 (1,5 g, 13 mmol) y Me₂SO₂ (7,96 g, 84,5 mmol) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción hasta 165 °C y se agitó durante 2 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó por cromatografía ultrarrápida (de MeOH al 5% en CH₂Cl₂ a MeOH al 10% en CH₂Cl₂) para proporcionar un sólido blanco (8, 2,5 g, 88%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 11,05 (s a, 1H), 7,56 (dd, J = 7,5, 8,2 Hz, 1H), 7,25 (dd, 7=0,95, 8,2 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,50 (s a, 2H), 3,76 (s, 3H).

8-amino-2,9-dihidro-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona (9) Se calentó una mezcla de 8 (200 mg, 0,91 mmol) en EtOH/NH₂NH₂ (1:1, 10 ml) hasta 100 °C y se agitó durante la noche. Se dejó que la mezcla de reacción se enfriara

hasta temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante y se lavó con EtOH para proporcionar un sólido amarillo (9, 176 mg, 87%). Pf > 300 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 11,40 (s a, 1H), 7,61 (t, J = 7,8, 8,0 Hz, 1H), 7,44 (dd, J = 0,95, 8,0 Hz, 1H), 7,15 (dd, J = 0,95, 7,8 Hz, 1H), 6,33 (s, 2H); EM (ES+): 202,18; Anal. Calc. para C₉H₇N₅O.(1N₂H₄): C, 46,35; H, 4,75; N, 42,04. Hallado: C, 46,2; H, 4,83; N, 41,76.

5

Ejemplo 3

Preparación de 2,9-dihidro-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona (13) (esquema 3)

10 4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-5-carboxilato de 5-metilo (12) A una solución de 1 (2,0 g, 9,57 mmol) en 2-metoxietanol (30 ml) se le añadió acetato de formamida (2,5 g, 24,0 mmol) a temperatura ambiente. Se sometió a reflujo la mezcla de reacción a 135 °C durante 2 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Se retiró el disolvente y se añadió agua. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con H₂O, y se secó a vacío. El sólido blanquecino resultante (12, 1 g, 50%) se usó directamente en la siguiente etapa. RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ 8,01 (s, 1H), 7,72-7,80 (m, 1H), 7,68 (dd, J = 1,3, 1,1, 8,4, 8,2 Hz, 1H), 7,37 (dd, J = 1,1, 1,3, 7,1, 7,2 Hz, 1H), 3,83 (s, 3H).

15

2,9-dihidro-3H-piridazino[3,4,5-de]quinazolin-3-ona (13) Se sometió a reflujo una mezcla de 12 (1,0 g, 5,0 mmol) en EtOH/NH₂NH₂ (1:1, 20 ml) a 140 °C durante 4 h. Se dejó que la mezcla de reacción se enfriara hasta temperatura ambiente. Se retiró parcialmente el disolvente y se filtró el precipitado resultante y se lavó con EtOH para proporcionar un sólido amarillo (13,400 mg, 43%). Pf > 300 °C; RMN de ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 11,74 (s a, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,74 (t, J = 7,8, 8,0 Hz, 1H), 7,62 (dd, J = 0,96, 1,1, 7,8, 8,0 Hz, 1H), 7,33 (dd, J = 0,96, 7,8 Hz, 1H); EM (ES+): 187; Anal. Calc. para C₉H₆N₄O: C, 58,06; H, 3,25; N, 30,09. Hallado: C, 57,77; H, 3,32; N, 30,29.

20

Ejemplo 4

25

Preparación de 9-[(hidrozinooxi)carbonil]-2,7-dihidro-6-metoxi 3H-pirido-[4,3,2-de] ftalazin-3-ona (16) (esquema 4)

30 **[[[2-metoxi-5-(metoxicarbonil)fenil]amino]metilen] propanodioato de dietilo (14)** Se agitó una mezcla de 3-amino-4-metoxibenzoato de metilo (2,0 g, 11 mmol) y etoximetilenmalonato de metilo (5 ml) a temperatura ambiente durante 5 h. Se añadió agua y se filtró el precipitado, se lavó con H₂O y Et₂O, se secó a vacío para proporcionar un sólido amarillo (14, 3,9 g, 100%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 11,98 (d, 7 = 14 Hz, 1H), 8,51 (d, J = 14 Hz, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,75 (dd, 7 = 1,7, 8,6 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 4,20 (q, J = 7,1, 14 Hz, 2H), 4,14 (q, J = 7,1, 14 Hz, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 1,20-1,29 (m, 6H).

30

35 **1,4-dihidro-8-metoxi-4-oxo-3,5-quinolindioato de 3-etil 5-metilo (15)** Se calentó una suspensión de 14 (1,0 g, 2,85 mmol) en Dowtherm A (10 ml) a 300 ~ 360 °C durante 1 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con Et₂O, y se secó a vacío para proporcionar un sólido amarillo (15, 1,3 g, 46%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 12,09 (s a, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,29 (q, J = 8,2, 20 Hz, 2H), 4,20 (q, 7 = 7,2, 14, 7,1 Hz, 2H), 4,02 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 1,25 (t, J = 7,1, 7,2 Hz, 3H).

40

45 **9-[(hidrozinooxi)carbonil]-2,7-dihidro-6-metoxi-3H-pirido-[4,3,2-de] ftalazin-3-ona (16)** Se sometió a reflujo una mezcla de 15 (400 mg, 1,31 mmol) en EtOH/NH₂NH₂ (1:1,10 ml) a 140 °C durante 3 h. Se dejó que la mezcla de reacción se enfriara hasta temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante y se lavó con Et₂O para proporcionar un sólido amarillo (16, 80 mg, 22%). Pf > 300 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) 11,83 (s, 1H), 10,24 (s, 1H), 10,07 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,73 (d, 7 = 8,5 Hz, 1H), 7,55 (d, 7 = 8,4 Hz, 1H), 4,57 (d, 7 = 3,8 Hz, 2H), 4,04 (s, 3H); Anal. Calc. para C₁₂H₁₁N₅O₃.(1H₂O): C, 49,48; H, 4,5; N, 24,04. Hallado: C, 49,44; H, 4,53; N, 24,17.

Ejemplo 5

50 Preparación de 9-[(hidrozinooxi)carbonil]-2,7-dihidro-3H-pirido- [4,3,2-de] ftalazin-3-ona (21) (esquema 5)

55 **4-cloro-3-aminobenzoato de metilo (17)** A una solución de 4-cloro-3- nitrobenzoato de metilo (3,0 g, 13,9 mmol) en EtOAc (50 ml) se le añadió 10% Pd/C (0,64 g). Se hidrogenó la mezcla resultante bajo H₂ (50 psi) en un aparato de hidrogenación de Parr a temperatura ambiente durante 1 h. Se separó por filtración el catalizador en una almohadilla de celite y se concentró el filtrado a vacío para proporcionar un aceite oscuro (17, 2,0 g, 77%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 7,40 (d, 7 = 2,1 Hz, 1H), 7,30 (d, 7 = 8,2 Hz, 1H), 7,08 (dd, 7 = 2,1, 8,4 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H).

55

60 **[[[2-cloro- 5-(metoxicarbonil)fenil]amino]metilen] propanodioato de dietilo (18)** Se agitó una mezcla de 17 (2,0 g, 10,7 mmol) y etoximetilen-malonato de dietilo (5 ml) a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua y se filtró el precipitado resultante, se lavó con H₂O y Et₂O, se secó a vacío para proporcionar un sólido amarillo (18, 3,0 g, 79%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 11,20 (d, 7 = 13 Hz, 1H), 8,54 (d, 7 = 8,4 Hz, 1H), 8,05 (d, 7 = 1,3 Hz, 1H), 7,73 (d, 7 = 8,2 Hz, 1H), 7,69 (dd, 7 = 1,7, 8,4 Hz, 1H), 4,22 (q, 7 = 7,1, 14 Hz, 2H), 4,16 (q, 7 = 7,1, 14 Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 1,25 (t, 7 = 7,1 Hz, 3H), 1,25 (t, 7 = 7,1 Hz, 3H).

60

65 **9-[(hidrozinooxi)carbonil]-2,7-dihidro-6-cloro-3H-pirido-[4,3,2-de] ftalazin-3-ona (20)** Se calentó una suspensión de 14 (1,0 g, 2,81 mmol) en Dowtherm A (10 ml) a 300 ~ 330 °C durante 45 min. Se enfrió la mezcla de reacción hasta

temperatura ambiente. Se retiró la mayoría del disolvente a vacío. Se usó la solución directamente en la siguiente etapa.

A la solución anterior se le añadió EtOH/NH₂NH₂ (1:1, 10 ml) a temperatura ambiente y se sometió a reflujo la mezcla de reacción a 140 °C durante la noche. Después de la reacción, se dejó que la mezcla de reacción se enfriara hasta temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante y se lavó con Et₂O para proporcionar un sólido amarillo (20, 220 mg, 28%). Pf > 300 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 10,05 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,86 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,58 (d, 7 = 8,2 Hz, 1H), 4,55 (s, 2H); Anal. Calc. para C₁₁H₈ClN₅O₂: C, 46,09; H, 3,16; N, 24,43; Cl, 12,37. Hallado: C, 45,79; H, 3,35; N, 24,88; Cl, 12,25.

9-[(hidrozinooxi)carbonil]-2,7-dihidro-3H-pirido-[4,3,2-de] ftalazin-3-ona (21) A una suspensión de 20 (110 mg, 0,40 mmol) en DMF (50 ml) se le añadió 10% Pd/C (100 mg). Se hidrogenó la mezcla resultante bajo H₂ (40 psi) en un aparato de hidrogenación de Parr a temperatura ambiente durante la noche. Se separó por filtración el catalizador en una almohadilla de celite y se lavó con Et₂O. Se concentró el filtrado a vacío para proporcionar un sólido amarillo (21, 20 mg, 21%). Pf > 300 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 12,17 (s, 1H), 11,77 (d, 7 = 5,7 Hz, 1H), 10,54 (s, 1H), 8,17 (d, 7 = 6,3 Hz, 1H), 7,82 (t, 7 = 7,8 Hz, 1H), 7,73 (d, 7 = 7,6 Hz, 1H), 7,55 (d, 7 = 8,2 Hz, 1H); Anal. Calc. para C₁₁H₉N₅O₂·(1,7H₂O): C, 48,25; H, 4,56; N, 25,57. Hallado: C, 48,44; H, 4,06; N, 25,12.

Ejemplo 6

Preparación de derivados de ftalazina (27, 28 y 30) (esquema 6)

4-cloro-3-amino-benzoato de metilo (22). A una solución de ácido 4-cloro-3-amino-benzoico (10,0 g, 58,3 mmol) en metanol (50 ml) se le añadió cloruro de acetilo (13,0 ml) gota a gota a temperatura ambiente. Después de la adición, se calentó la mezcla de reacción a 70 °C durante 3 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se retiró el disolvente a presión reducida y se añadió agua (100 ml). Se neutralizó la solución resultante con NaHCO₃ seguido de extracción con EtOAc (3 x 100 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄) y se concentró a vacío para proporcionar un aceite amarillo (22, 10,5 g, 97%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 7,41 (??d, 7 = 2,1 Hz, 1H), 7,31 (d, 7 = 8,4 Hz, 1H), 7,09 (dd, 7 = 2,1, 8,4 Hz, 1H), 5,66 (s a, 2H), 3,80 (s, 3H).

Éster dietílico del ácido 2-[2-cloro-5-(metoxicarbonil)fenilamino]-2-butenodioico (23). A una solución de 22 (5,00 g, 26,9 mmol) en etanol (50 ml) se le añadió éster dietílico del ácido but-2-inoico (5,02 g, 29,5 mmol) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción a 90 °C durante 18 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se retiró el disolvente a presión reducida. Se lavó el residuo en bruto con una solución de 1:1 hexanos/éter dietílico (100 ml) para proporcionar un sólido blanco (23, 9,08 g, 95,1%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 9,80 (s, 1H), 7,65-7,66 (m, 2H), 7,38 (s, 1H), 5,54 (s, 1H), 4,13-4,22 (m, 4H), 3,83 (s, 3H), 1,22 (t, 7 = 7,1 Hz, 3H), 1,11 (t, 7 = 7,1 Hz, 3H).

Éster 2-etil 5-metilico del ácido 8-cloro-4-oxo-1,4-dihidro-2,5-quinolindicarboxílico (24). Se calentó una suspensión de 23 (9,00 g, 25,4 mmol) en bifenil éter (100 ml) hasta 250 °C y se agitó durante 3 h. Después, se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos a EtOAc) para proporcionar un aceite incoloro (24, 3,88 g, 49,4%). RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 9,39 (s a, 1H), 7,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,96 (s, 1H), 4,54 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 4,00 (s, 3H), 1,46 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

Ácido 8-cloro-4-oxo-1,4-dihidro-2,5-quinolindicarboxílico (25). A una solución de 24 (10,0 g, 32,3 mmol) en etanol (100 ml) se le añadió una solución de KOH acuoso al 10% (100 ml) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción a 100 °C durante 24 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se acidificó la solución acuosa resultante con HCl 2N hasta pH = 6,5, en el que precipitó un sólido y se recogió a través de una filtración. Se lavó el sólido con H₂O (100 ml) and Et₂O (100 ml), y se secó a vacío a 60°C para dar un sólido blanquecino (25, 8,00 g, 92,9%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 7,97 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,90 (s, 1H).

Ácido 4-oxo-1,4-dihidro-2,5-quinolindicarboxílico (26). A una solución de 25 (7,90 g, 29,5 mmol) en solución de KOH acuosa al 10% (100 ml) se le añadió 10% Pd/C (0,500 g). Se hidrogenó la mezcla de reacción (50 psi) en un aparato de hidrogenación de Parr a temperatura ambiente durante 4 h. Se separó por filtración el catalizador en una almohadilla de celite y se acidificó el filtrado con HCl 2N hasta pH = 6,5, en el que precipitó un sólido y se recogió a través de filtración. Se lavó el sólido con H₂O (100 ml) y Et₂O (100 ml), y se secó a vacío a 60°C para dar un sólido blanquecino (26, 6,79 g, 98,6%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 7,8,12 (d, 7 = 8,2 Hz, 1H), 7,76 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 7,48 (d, 7 = 8,2 Hz, 1H), 6,74 (s, 1H).

Ácido 3-oxo-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de] ftalazin-8-carboxílico (27). A una solución de 26 (23,1 g, 99,1 mmol) en etilenglicol (300 ml) calentada hasta 140 °C se le añadió cuidadosamente hidrato de hidrazina (4,75 g, 95,0 mmol) gota a gota. Se calentó la mezcla de reacción hasta 150 °C y se agitó durante 44 h. La retirada del 90% del etilenglicol a vacío dio un precipitado, que se lavó con metanol (100 ml) y dietil éter (100 ml) para dar un sólido amarillo (27, 16,5 g, 72,7%). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 11,85 (s, 1H), 10,43 (s, 1H), 7,61-7,63 (m, 2H), 7,43-7,46 (m, 1H), 6,49 (s, 1H).

Sal de sodio del ácido 3-oxo-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de] ftalazin-8-carboxílico (28) A una solución de NaOH (1 g) en agua (100 ml) se le añadió **27** (1,00 g, 4,36 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h. Se separó por filtración cualquier material insoluble a través de un embudo de vidrio poroso fino y se concentró la capa acuosa a vacío para proporcionar un sólido amarillo (**28**, 0,898 g, 82,1%). RMN de ^1H (D_2O , 300 MHz) δ 7,23 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 5,91 (s, 1H). Anal. Calc. para for $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ (1,0 H_2O y 2,45NaOH): C, 35,98; H, 2,87; N, 11,44. Hallado: C, 35,76; H, 2,86; N, 11,82.

Éster 2-etil 5-metilico del ácido 4-oxo-1,4-dihidro-2,5-quinolindicarboxílico (29). A una suspensión de **24** (4,50 g, 14,5 mmol) en EtOAc (100 ml) se le añadió Et_3N (50 ml). Se calentó la mezcla de reacción hasta 50°C para generar una solución transparente. Se añadió cuidadosamente 10% Pd/C (0,500 g). Se hidrogenó la mezcla de reacción (50 psi) en un aparato de hidrogenación de Parr a temperatura ambiente durante 4 h. Después, se separó por filtración el catalizador en una almohadilla de celite y se lavó el filtrado con agua (100 ml). Se extrajo la capa acuosa con EtOAc (100 ml) y se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO_4), se filtró y se concentró. Se lavó el residuo en bruto con Et_2O (100 ml) para dar un sólido blanquecino (**29**, 3,46 g, 99,1%). RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz) δ 8,05 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,75 (t, J = 8,6 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,63 (s, 1H), 4,44 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 1,37 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Hidrazida del ácido 3-oxo-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de] ftalazin-8-carboxílico (30). A una solución de **29** (1,38 g, 5,02 mmol) en etilenglicol (25 ml) se le añadió hidrato de hidrazina (1,00 g, 20,0 mmol). Se calentó la mezcla de reacción hasta 180 °C y se agitó durante 18 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se filtró el precipitado amarillo resultante, se lavó con Et_2O (100 ml), se secó a vacío a 90°C durante 6 h para dar un sólido amarillo (**30**, 1,10 g, 90,2%). RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz) δ 11,89 (s, 1H), 10,51 (s, 1H), 10,09 (s, 1H), 7,62-7,68 (m, 2H), 7,46-7,49 (m, 1H), 6,57 (s, 1H), 4,60 (s a, 2H); Anal. Calc. para $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_2$: C, 54,32; H, 3,73; N, 28,79. Hallado: C, 54,42; H, 3,72; N, 28,86.

Ejemplo 7

Preparación de ácido 6-fluoro-3-oxo-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de] ftalazin-8-carboxílico (36) (esquema 7)

4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (31). A una solución de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico (15,0 g, 81,1 mmol) en MeOH (500 ml) se le añadió H_2SO_4 (1 ml) y se calentó la mezcla de reacción a 70 °C durante 72 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se neutralizó la solución de reacción hasta pH = 7,0 con NaHCO_3 , después se concentró a vacío. Se añadió H_2O (300 ml) y se lavó con EtOAc (3 x 300 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO_4) y se concentró a vacío para dar un aceite amarillo (**31**, 16,0 g, 99,0%). RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,76 (dd, $J = 2,3, 7,3$ Hz, 1H) 8,30-8,34 (m, 1H), 7,39 (t, $J = 10,1$ Hz, 1H), 3,98 (s, 3H).

4-fluoro-3-aminobenzoato de metilo (32) A una solución de **31** (16,0 g, 80,3 mmol) en MeOH (250 ml) se le añadió 10% Pd/C (0,500 g). Se hidrogenó la mezcla de reacción (50 psi) en un aparato de hidrogenación de Parr a temperatura ambiente durante 4 h. Se separó por filtración el catalizador de una almohadilla de celite y se concentró el filtrado a vacío para proporcionar un aceite incoloro (**32**, 12,2 g, 90,0%). RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,48 (dd, $J = 2,1, 8,6$ Hz, 1H), 7,39-7,43 (m, 1H), 7,02 (dd, $J = 8,6, 10,7$ Hz, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,84 (s a, 2H).

Éster dietílico del ácido 2-[2-fluoro-5-(metoxicarbonil)fenilamino]-2-butenedioico (33) A una solución de **32** (5,00 g, 29,6 mmol) en etanol (200 ml) se le añadió éster dietílico del ácido but-2-inoico (6,29 g, 37,0 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h. Después, se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo por cromatografía ultrarrápida (hexanos a 25% EtOAc en hexanos) para dar un aceite amarillo (**33**, 7,63 g, 76,5%). RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9,64 (s a, 1H), 7,72-7,78 (m, 1H), 7,62 (dd, $J = 7,8, 1,9$ Hz, 1H), 7,12 (t, $J = 10,3$ Hz, 1H), 5,61 (s, 1H), 4,19-4,27 (m, 4H), 3,89 (s, 3H), 1,31 (t, $J = 7,0, 3\text{H}$), 1,20 (t, $J = 7,0, 3\text{H}$).

Éster 2-etil 5-metilico del ácido 8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-2,5-quinolindicarboxílico (34). Se calentó una suspensión de **33** (25,0 g, 73,7 mmol) en Dowtherm A (200 ml) hasta 300 °C durante el transcurso de 30 minutos y después se agitó a 300 °C durante 1 h. Se enfrió la solución de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos a EtOAc) para proporcionar un sólido blanco (**34**, 12,1 g, 56,1%). RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9,19 (s a, 1H), 7,42 (t, $J = 8,2, 1\text{H}$), 7,21-7,25 (m, 1H), 6,92 (s, 1H), 4,51 (q, $J = 7,1, 2\text{H}$), 3,99 (s, 3H), 1,46 (t, $J = 7,0, 3\text{H}$).

Ácido 8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-2,5-quinolindicarboxílico (35). A una solución de HCl acuosa 2 N (200 ml) se le añadió **34** (10,0 g, 34,1 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 100 °C durante 18 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante y se secó a vacío a 60 °C durante 18 h para proporcionar un sólido blanquecino (**35**, 8,11 g, 94,7%). RMN de ^1H NMR (DMSO-d_6 , 300 MHz) δ 7,65 (t, $J = 8,2, 1\text{H}$), 1,39-1,43 (m, 1H), 6,93 (s, 1H).

Ácido 6-fluoro-3-oxo-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de] ftalazin-8-carboxílico (36). A una solución de **35** (0,600 g, 2,39 mmol) en EtOH (5 ml) se le añadió hidrazina (0,0840 g, 2,63 mmol). Se calentó la mezcla resultante a 90 °C durante 24 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con Et_2O (25 ml), y se secó a vacío a 60°C durante 6 h para dar un sólido blanco (**36**, 0,484 g, 74,5%). RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 300

MHz) δ 7,25-8,30 (m, 1H), 7,51-7,57 (m, 1H), 7,06 (s, 1H); Anal. Calc. para $C_{11}H_6N_3O_3F$ ($2H_2O$): C, 46,65; H 3,56; N 14,84. Hallado: C, 46,80; H, 3,59; N, 14,86.

Ejemplo 8

5 Preparación de hidrozida del ácido 6-metoxi-3-oxo-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-8-carboxílico (39) (esquema 8)

10 **Éster dimetílico del ácido 2-[2-metoxi-5-(metoxicarbonil)fenilamino]-2-butenodioico (37)** A una solución de 3-amino-4-metoxibenzoato de metilo (5,0 g, 27,6 mmol) en MeOH (60 ml) se le añadió acetilendicarboxilato de dimetilo (4,31 g, 30,36 mmol) a temperatura ambiente. Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 20 min y después se enfrió a temperatura ambiente; Se retiró el disolvente. Se trituró el residuo en bruto en éter para dar un sólido amarillo (37,4,35 g, 49%). RMN de 1H NMR (DMSO- d_4 , 400 MHz) δ 9,8 (s, 1H), 7,90 (dd, $J = 1,9$ Hz, 8,6 Hz, 1H), 7,50-7,60 (m, 1H), 7,35 (d, $J = 8,59$ Hz, 1H), 5,50 (s, 1H), 4,08 (s, 3H), 4,0 (s, 3H), 3,90 (s, 3H), 3,85 (s, 3H).

15 **Éster dimetílico del ácido 8-metoxi-4-oxo-1,4-dihidro-2,5-quinolindicarboxílico (38)** Se calentó una suspensión de 37 (4,20 g, 12,99 mmol) en Dowtherm A (30 ml) a 300 °C durante 35 min mientras se monitorizó por TLC y después se enfrió hasta 0 °C. Se filtró el precipitado resultante y se lavó con Et₂O para proporcionar un sólido blanco (37, 2,0 g, 53%). RMN de 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10,0 (s, 1H), 7,34 (d, $J = 7,84$ Hz, 1H), 7,30 (d, $J = 8,09$ Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,77 (s, 3H).

20 **Hidrozida del ácido 6-metoxi-3-oxo-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-8-carboxílico (39)** A una suspensión de 38 (0,45 g, 1,54 mmol) en EtOH (20 ml) se le añadió hidrazina (1 ml) a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción a 68 °C durante 1,5 h y después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se filtró el precipitado resultante y se lavó con Et₂O para proporcionar un sólido blanco (39, 0,31 g, 74%). RMN de 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 10,5 (s a, 1H), 9,0 (s a, 1H), 7,15-7,25 (m, 2H), 7,1 (s a, 1H), 6,8 (s a, 1H), 4,90 (s a, 2H), 4,03 (s, 3H). Pf: 305-307 °C; Anal. Calc. para $C_{12}H_{11}N_5O_3$ ($0,75H_2O$): C, 50,26; H, 4,39; N, 24,42. Hallado: C, 50,33; H, 4,46; N, 22,04.

Ejemplo 9

30 Preparación de derivados de diazabeno[de]antracen-3-ona 43 - 48 (esquema 9)

35 **Éster metílico del ácido 7-bromometil-9-oxoxanteno-1-carboxílico (41)**. Se pueden usar agentes de brominación incluyendo N-bromosuccinimida, bromo, bromo complejo tal como bromuro de piridinio, y similares, para convertir el éster metílico del ácido 7-metil-9-oxoxanteno-1-carboxílico 40 en el éster metílico del ácido 7-bromometil-9-oxoxanteno-1-carboxílico 41. Los disolventes incluyen hidrocarburos clorados, disolventes apróticos dipolares y varios éteres. La temperatura puede variar desde 0 - 100 °C. Por ejemplo, se agita una suspensión de 7-metil-9-oxoxanteno-1-carboxílico (0,1 mol), N-bromosuccinimida (0,12 mol) y peróxido de benzoilo 10 mg) en tetracloruro de carbono seco (300 ml) a 60 °C durante 6 horas. Se filtra la mezcla y se lava el sólido sucesivamente con pequeñas cantidades de cloroformo, agua y éter, y después se seca para dejar un producto deseado como sólido blanco. Por ejemplo, a una solución de un compuesto 40 (1,97 g, 7,4 mmol) en tetracloruro de carbono (400 ml) se le añadió N-bromosuccinimida (1,44 g, 8,1 mmol) y una cantidad catalítica de peróxido de benzoilo (45 mg, 3%). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 6 h y se enfrió a temperatura ambiente. Se separó por filtración el precipitado blanco. Se retiraron los disolventes y se recristalizó el residuo a partir de EtOAc y hexanos. Se obtuvo el producto en bruto (2,05 g) y la recristalización adicional dio un producto sólido blanco puro 41 (1,15 g, 45%). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) de 2: 8,27 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,80 -7,72 (m, 2H), 7,57 (dd, $J = 8,5$ and 1,1 Hz, 1H), 7,48 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,33 (dd, $J = 7,0$ y 1,1 Hz, 1H), 4,57 (s, 2H), 4,00 (s, 3H).

50 El desplazamiento del grupo bromo del compuesto 41 con nucleófilos tales como amina usando el procedimiento general A proporciona el compuesto 42. Se puede ciclar el cetoéster 42 con hidrazina usando el procedimiento general B para dar productos finales deseados. Compuestos 43-48.

Procedimiento general A

55 A una solución del compuesto de bromo (41,10 mmol) en DMF seco (100 ml) se le añade carbonato de potasio (100 mmol) y amina secundaria (10 mmol). Se calentó la mezcla de reacción hasta 70 °C durante 6 horas y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añade agua (100 ml) a la mezcla de reacción, seguido de acetato de etilo (200 ml). Se recoge la capa orgánica, se lava con agua, salmuera y se seca sobre sulfato de sodio. Se retiran los disolventes a vacío. Se purifica el residuo por cromatografía en columna en gel de sílice usando acetato de etilo/hexanos como eluyente para dar el producto 42 con un rendimiento de un 50 - 90%. Por ejemplo, un procedimiento para preparar el intermedio para sintetizar el compuesto 43: A una solución del compuesto 41 (1,53 g, 4,4 mmol) en CH_3CN (50 ml) se le añadió K_2CO_3 (1,2 g, 8,7 mmol) y 1-metilpiperazina (0,51 ml, 4,6 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante la noche y se enfrió a temperatura ambiente. Se filtró el sólido y se evaporaron los disolventes. Se sometió a post-tratamiento el residuo con acetato de etilo y agua por procedimiento normal. Cromatografía en columna o extracción de ácido/base (al residuo se le añadieron 150 ml de HCl 1 N y 150 ml de EtOAc. Se separó la capa acuosa y se lavó con 100 ml de EtOAc. Después, a la capa acuosa se le añadió NaOH 6 N NaOH hasta pH > 9. Se extrajo la

solución con 100 ml de EtOAc, dos veces. Se combinaron las capas orgánicas, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄. Se evaporaron los disolventes para dar un aceite 42a (0,95 g, 59%). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 42a: 8,18 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,75 - 7,71 (m, 2H), 7,56 (dd, J = 8,5 y 1,1 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,32 (dd, J = 7,0 y 1,1 Hz, 1H), 4,04 (s, 3H), 3,58 (s, 2H), 2,45 (a, 8H), 2,27 (s, 3H).

5

Procedimiento general B

Se puede formar un anillo de benzopirano[4,3,2-de]ftalazina por condensación del éster de cetona con hidrazina. A una solución de cetoéster 42 (5 mmol) en etanol absoluto (10 ml) se le añade hidrazina anhidra en etanol (1 ml) gota a gota a temperatura ambiente. Se somete a reflujo la solución durante la noche y se enfría a temperatura ambiente. Se añade agua helada (100 ml) y se separa un sólido blanco. Se recoge el sólido por filtración a vacío y se lava con agua y una pequeña cantidad de metanol para dar un producto sólido blanco con un rendimiento de un 40 - 85 %.

10

10-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (43). A una solución de compuesto 42a (0,91 g, 2,5 mmol) en EtOH (15 ml) en reflujo se le añade monohidrato de hidrazina (2 ml, 41 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 5 h y se enfrió. Se retiraron los disolventes y se añadió agua. Se separó por filtración el precipitado, se lavó con EtOH al 15% y se recogió para proporcionar un sólido blanco (0,85 g, 98%) 43. EM (ES+): 349; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 12,61 (s, 1H), 7,99 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,92 - 7,85 (m, 2H), 7,68 (dd, J = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,45 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,52 (s, 2H), 2,40 (s a, 8H), 2,18 (s, 3H). Anal. Calc. para C₂₀H₂₀N₄O₂: C, 68,95; H, 5,79; N, 16,08. Hallado: C, 69,04; H, 5,75; N, 16,2.

15

20

10-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (44). Preparado a partir del compuesto 41 y 1-etilpiperazina de acuerdo con el procedimiento general A y B. La purificación del compuesto por cristalización en etanol dio un producto sólido blanco 44. EM (ES+): 363; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,62 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,93 - 7,86 (m, 2H), 7,70 (dd, J = 7,0 y 2,0 Hz, 1H), 7,47 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,55 (s, 2H), 2,52 - 2,30 (a, 10H), 1,04 (m, 3H). Anal. Calc. para C₂₁H₂₂N₄O₂·(0,3H₂O): C, 68,57; H, 6,19; N, 15,23. Hallado: C, 68,21; H, 6,19; N, 15,38.

25

10-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-ilmetil]-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (45). Preparado a partir del compuesto 41 y N-(2-hidroxietil)piperazina de acuerdo con el procedimiento general A y B. La purificación del compuesto por cristalización en etanol dio un producto sólido blanco 45. EM (ES+): 379; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,62 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,92 - 7,85 (m, 2H), 7,69 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 3,53 - 3,48 (m, 4H), 2,50 - 2,35 (m, 10H). Anal. Calc. para C₂₁H₂₂N₄O₃: C, 66,65; H, 5,86; N, 14,81. Hallado: C, 66,39; H, 5,80; N, 14,94.

30

35

10-[4-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etil]-piperazin-1-ilmetil]-2H-7-oxa-1,2-diazabeno[de]antracén-3-ona (46). Preparado a partir del compuesto 41 y 1-hidroxietiletoxipiperazina de acuerdo con el procedimiento general A y B. La purificación del compuesto por cristalización en etanol dio un producto sólido blanco 7. EM (ES+): 423. RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,62 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,93 - 7,95 (m, 2H), 7,69 (dd, J = 7,0 y 2,0 Hz, 1H), 7,47 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,57 - 3,50 (m, 4H), 3,47 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 2,49 - 37 (m, 10H). Anal. Calc. para C₂₃H₂₆N₄O₄·(0,15H₂O): C, 64,97; H, 6,23; N, 13,18. Hallado: C, 64,95; H, 6,21; N, 13,24.

40

10-[[Bis-(2-hidroxi-etil)-amino]-metil]-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (47). Preparado a partir del compuesto 41 y dietanolamina de acuerdo con el procedimiento general A y B. La purificación del compuesto por cristalización en etanol dio un producto sólido blanco 47. EM (ES+): 354; Pf 222-225 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,59 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,91 - 7,84 (m, 2H), 7,67 (dd, J = 7,0 y 2,0 Hz, 1H), 7,52 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,70 (s, 2H), 3,47 (t, J = 6,4 Hz, 4H), 2,56 (t, J = 6,4 Hz, 4H). Anal. Calc. para C₁₉H₁₉N₃O₄: C, 64,58; H, 5,42; N, 11,89. Hallado: C, 64,32; H, 5,44; N, 11,90.

45

10-(4-pirrolidin-1-il-piperidin-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (48).

Preparado a partir del compuesto 41 y 4-(1-pirrolidinil)piperidina de acuerdo con el procedimiento general A y B. La purificación del compuesto por cristalización en etanol dio un producto sólido blanco 48. EM (ES+): 403; Pf 258-264 °C; RMN de ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 9,93 (s, 1H), 8,06 (m, 2H), 7,81 (t, J 8,0 Hz, 1H), 7,55 (dd, J = 8,0, 1,0 Hz, 1H), 7,50 (dd, J = 8,0, 2,5 Hz, 1H), 7,26 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 3,55 (s, 2H), 2,90 (m, 2H), 2,61 (m, 4H), 2,06 (m, 2H), 1,87 - 1,62 (m, 9H). Anal. Calc. para C₂₄H₂₆N₄O₂·(0,5H₂O): C, 70,05; H, 6,61; N, 13,62. Hallado: C, 70,25; H, 6,42; N, 13,59.

55

Ejemplo 10

Preparación de derivados de diazabeno[de]antracén-3-ona 49 - 55 (esquema 10)

60

10-aminometil-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (49). A una solución de éster metílico del ácido 7-bromometil-9-oxoxantales-1-carboxílico 41 (0,70 g, 2,0 mmol) en DMF anhidro (10 ml) se le añadió ftalimida de potasio (0,44 g, 2,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 3 horas, después se enfrió y se retiró el disolvente a vacío. Al residuo se le añadieron 100 ml de acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera, después se secó con MgSO₄. Se retiró el disolvente a vacío para proporcionar el compuesto blanco (0,53 g, 63 %). Se disolvió el

65

sólido blanco (0,53 g) en solución de hidrazina (5 ml) y etanol (10 ml). Se agitó la mezcla de reacción a reflujo durante 3 horas. Se concentró la solución a vacío. A la solución concentrada se le añadió agua. Se formó un precipitado blanco y se separó por filtración. Se secó el sólido blanco para proporcionar el compuesto 49 (0,30 g, 87%). EM (FAB (M+)): 266; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,60 (a, 1H), 8,04 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,92 - 7,80 (m, 2H), 7,68 (dd, J = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,50 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,76 (s, 2H); Anal. Calc. para C₁₅H₁₁N₃O₂: C, 67,92; H, 4,18; N, 15,84. Hallado: C, 67,67; H, 4,20; N, 15,64.

N-(3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-10-ilmetil)-guanidina (50).

10 A una solución de 49 (0,10 g, 0,38 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió diisopropil etilamina (0,83 mmol) y clorhidrato de 1H-pirazol-carboxamidina (0,12g, 0,81 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió dietil éter para formar un precipitado blanco. Se recogió el precipitado y se recrystalizó en EtOAc para proporcionar un sólido blanco 50 (0,11 g, sal HCl al 83%). EM (ES-): 306; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,62 (s, 1H), 8,04 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,92 - 7,84 (m, 2H), 7,71 (dd, J = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,50 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,47 (s, 2H); Anal. Calc. para C₁₆H₁₃N₅O₂·ClH: C, 55,58; H, 4,27; N, 19,76; Cl, 10,38. Hallado: C, 55,94; H, 4,17; N, 19,32; Cl, 10,12.

Procedimiento general C

20 A una solución del compuesto 49 en disolventes orgánicos (tales como DMF, dioxano) se le añadió cloruro de ácido o anhídrido. Se agitó la mezcla de reacción a varias temperaturas. Se retiraron los disolventes a vacío y se purificó el producto por recrystalización.

25 **Ácido 2,3-diacetoxi-N-(3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-10-ilmetil)-succinámico (51).** A una solución del compuesto 49 (0,20 g, 0,76 mmol) en dioxano (20 ml) se le añadió anhídrido tartárico de diacetilo (0,17 g, 0,80 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el disolvente a vacío. Se recrystalizó el residuo en CH₂Cl₂. Se proporcionó un sólido blanco 51 con un rendimiento de un 95 %. EM: (ES+): 482; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,66 (s, 1H), S.86 (d, J = 6,2 Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,92 - 7,86 (m, 2H), 7,70 (dd, J = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,40 - 7,36 (m, 2H), 5,56 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 5,51 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 4,45 (dd, J = 15,0 y 6,3 Hz, 1H), 4,29 (dd, J = 15,0 y 6,3 Hz, 1H), 2,14 (s, 3H), 1,98 (s, 3H); Anal. Calc. para C₂₃H₁₉N₃O₉·(1,2H₂O): C, 54,92; H, 4,29; N, 8,35. Hallado: C, 54,89; H, 3,82; N, 8,39.

35 **Ácido 2,3-dihidroxi-N-(3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-10-ilmetil)-succinámico (52).** Se disolvió el compuesto 51 en una solución de NaOH (2,5 equivalentes) en H₂O/dioxano. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche a 40 °C, después se acidificó hasta pH = 3. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo. Se secó la capa orgánica con MgSO₄. Se retiró el disolvente a vacío para proporcionar un sólido blanco 52 con un rendimiento de un 25 %. EM: (ES+): 398; Pf: 181 - 185 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,54 (s, 1H), 8,32 (t, 7 = 6,2 Hz, 1H), 7,93 (d, 7 = 2,0 Hz, 1H), 7,90 - 7,80 (m, 2H), 7,62 (dd, 7 = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,40 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,30 - 4,19 (m, 4H); Anal. Calc. para C₁₉H₁₅N₃O₇ (3H₂O): C, 50,56; H, 4,69; N, 9,31. Hallado: C, 50,59; H, 4,07; N, 9,28.

(3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-10-ilmetil)-amida del ácido pirrolidin-2-carboxílico (53).

45 A una solución del compuesto 49 (0,5 mmol) en DMF se le añadió trietilamina (0,6 mmol) y cloruro de Fmoc-L-prolina (0,6 mmol) lentamente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se vertió agua en la mezcla de reacción. Se formó un precipitado blanco y se recogió a través de filtración. Se recrystalizó el sólido blanco para proporcionar un sólido blanco con un rendimiento de un 65 %.

50 Se disolvió el sólido blanco en piridina al 20 % en DMF. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua a la solución. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo. Se recogió la capa orgánica, se lavó con salmuera y se secó. Se retiró el disolvente para proporcionar un sólido blanco 53 con un rendimiento de un 54 %. EM (ES+): 363; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,64 (s, 1H), 8,59 (t, 7 = 5,8 Hz, 1H), 7,98 (d, 7 = 2,0 Hz, 1H), 7,90 - 7,82 (m, 2H), 7,72 (dd, 7 = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,43 (dd, 7 = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,36 (d, 7 = 8,5 Hz, 1H), 4,35 (d, 7 = 3,8 Hz, 2H), 3,62 (m, 1H), 2,98 (t, 7 = 5,2 Hz, 1H), 2,87 (m, 1H), 1,99 (m, 1H), 1,73 (m, 1H), 1,64 (m, 2H); Anal. Calc. para C₂₀H₁₈N₄O₃·(1,2H₂O): C, 62,56; H, 5,35; N, 14,59. Hallado: C, 62,75; H, 5,34; N, 14,52.

Éster dietílico del ácido (3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-10-ilmetil)-fosforamídico (54).

60 A una solución del compuesto 49(0,5 mmol) en DMF anhidro (20 ml) se le añadió clorofosfato de dietilo (1,5 mmol). Después se 3 horas, se concentró la solución a vacío y se añadieron 50 ml de agua. Se extrajo la capa acuosa con 30 ml de EtOAc, dos veces. Se combinaron las capas orgánicas y se lavó con 30 ml de salmuera. Se secó la capa orgánica con MgSO₄. Se retiró el disolvente para proporcionar un sólido blanco, que se recrystalizó en un 10 % de EtOAc en hexanos para proporcionar un sólido blanco 54 con un rendimiento de un 50 %. EM (ES-): 400; Pf: 222,3 - 224,5 °C; RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz): 10,21 (s, 1H), 8,10 (d, 7 = 2,5 Hz, 1H), 8,03 (d, 7 = 7,5 Hz, 1H), 7,79 (t, 7 = 8,0 Hz, 1H), 7,52 (d, 7 = 8,0 Hz, 1H), 7,47 (dd, 7 = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 1,32 (t, 7 = 6,5 Hz, 6H);

65 Anal. Calc. para C₁₉H₂₀N₃O₅P (0,3H₂O): C, 56,10; H, 5,10; N, 10,33. Hallado: C, 56,00; H, 5,03; N, 10,13.

4-(4-dimetilamino-fenilazo)-N-(3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-

benzo[de]antracén-10-ilmetil)-bencenosulfonamida (55). A una solución del compuesto 49(0,5 mmol) en DMF anhidro (20 ml) se le añadió cloruro de 4-dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonilo (0,5 mmol). Se agitó la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción a vacío y se añadieron 50 ml de 50 % de EtOAc en hexanos. Se formó el precipitado blanco y se recogió a través de filtración. Se recristalizó el producto en bruto en etanol al 50% para proporcionar un sólido naranja 55 con un rendimiento de un 59 %. EM (ES+): 553; Pf: > 300 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,63 (s, 1H), 7,90 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,86 - 7,74 (m, 6H), 7,67 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,62 (dd, J = 6,6 y 2,5 Hz, 1H), 7,44 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,15 (s, 2H), 3,09 (s, 6H); Anal. Calc. para C₂₉H₂₄N₆O₄S·(1,3H₂O): C, 60,47; H, 4,65; N, 14,59; S, 5,57 Hallado: C, 60,72; H, 4,93; N, 15,39; S, 4,93.

Ejemplo 11

15 Preparación de derivados de diazabenzo[de]antracén-3-ona 56 - 61 (esquema 11)

10-aminoximetil-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (56). A una solución de hidroxifalimida (3,6 mmol) en DMF anhidro se le añadió anhídrido sódico al 60 % en aceite mineral (3,6 mmol). Se agitó la solución durante 20 minutos a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió el compuesto 41 (3,0 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante dos horas y se retiró el disolvente a vacío. Al residuo se le añadieron 100 ml de acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera y después se secó sobre MgSO₄. Se retiró el acetato de etilo a vacío. Se proporcionó un sólido blanco con un rendimiento del 70 %. Se añadió el sólido blanco a la mezcla de hidrazina y alcohol etílico. Se agitó la mezcla durante 2 h a reflujo. Se concentró la solución a vacío. A la solución concentrada se le añadió agua. Se formó un precipitado blanco, se separó por filtración y se lavó con agua adicional. Se recogió el sólido blanco y se secó para dar un producto sólido blanco **56** con un rendimiento del 85 %. EM (ES+): 282; Pf: 294 - 296 °C; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,64 (s, 1H), 8,04 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,92 - 7,86 (m, 2H), 7,73 (dd, J = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,50 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,64 (s, 2H); EM: (ES+): 282; Anal. Calc. para C₁₅H₁₁N₃O₃: C, 64,05; H, 3,94; N, 14,94. Hallado: C, 64,24; H, 4,00; N, 14,97.

10-hidroximetil-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (57). A una solución del compuesto 41 (4,2 mmol) en 20ml de agua y 20ml de acetona se le añadió nitrato de plata (8,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 50 °C durante 2 horas. Se separó por filtración el precipitado negro. Se concentró el filtrado a vacío. Al residuo se le añadieron 100 ml de acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera y después se secó sobre MgSO₄. Se retiraron los disolventes a vacío para proporcionar un sólido blanco con un rendimiento de un 86 %. Se añadió el sólido blanco a la mezcla de hidrazina y alcohol etílico. Se agitó la mezcla durante 2 h a reflujo. Se concentró la solución a vacío. A la solución concentrada se le añadió agua. Se formó un precipitado blanco, se separó por filtración y se lavó con agua adicional. Se recogió el sólido blanco y se secó para dar un producto sólido blanco **57** con un rendimiento del 95 %. EM (ES+): 267; RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,56 (s, 1H), 7,99 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,91 - 7,81 (m, 2H), 7,63 (dd, J = 7,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,50 (d, J = 6,0 Hz, 2H); Anal. Calc. para C₁₅H₁₀N₂O₃(0,08hidrazina): C, 67,02; H, 3,87; N, 11,25. Hallado: C, 67,29; H, 3,82; N, 11,51.

Procedimiento general D

A una solución del compuesto 57 en disolventes orgánicos (tales como DMF, dioxano) se le añadió cloruro de ácido o anhídrido. Se agitó la mezcla de reacción a varias temperaturas. Se retiraron los disolventes a vacío y se purificó el producto por recristalización.

Éster dibencilico del ácido [2-(3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-10-ilmetoxi)-etil]-fosfónico (58). A una solución de dibencilfosfito (2,6 mmol) en 10 ml de THF se le añadió acrilato de etilo (3,0 mmol), K₂CO₃ (16 mmol), and 0,3 ml of (Bn₄NH)₂SO₄ al 50% p/p. Se agitó la mezcla de reacción a 45 °C durante la noche. Se añadió agua. Se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo. Se recogió la capa orgánica y se secó con MgSO₄. Se retiró el disolvente para proporcionar un aceite transparente de ácido 3-bis(benciloxi)fosforilpropanoico con un rendimiento del 90 %. RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz): 7,33 (m, 10H), 4,90-5,10 (m, 4H), 3,61 (s, 3H), 2,50-2,60 (m, 2H), 2,00-2,15 (m, 2H).

A una solución del compuesto 57 (0,5 mmol) en DMF anhidro se le añadió ácido 3-bis(benciloxi)fosforilpropanoico (0,75 mmol) y EDC (0,75 mmol) y DMAP (cantidad catalítica). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el disolvente a vacío. Al residuo se le añadieron 100 ml de acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua y se secó sobre MgSO₄. Se retiró el disolvente para proporcionar un aceite incoloro, que se recristalizó en EtOAc/hexanos para proporcionar un sólido blanco **58** con un rendimiento de un 40 %. EM (ES-): 581; Pf: 173 - 175 °C. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz): 10,01 (s, 1H), 8,11 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,82 (t, J = 8,5 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,35 - 7,22 (m, 11H), 5,09 (s, 2H), 4,98 (m, 4H), 2,62 (m, 2H), 2,12 (m, 2H); Anal. Calc. para C₃₂H₂₇N₂O₇P: C, 65,98; H, 4,67; N, 4,81. Hallado: C, 65,69; H, 4,82; N, 5,09.

Éster 3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-10-ilmetílico del ácido dimetilamino-acético (59). A

una solución del compuesto 57 (0,5 mmol) en DMF anhidro se le añadió dimetil glicina (0,75 mmol) y EDC (0,75 mmol) y DMAP (cantidad catalítica). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se retiró el disolvente a vacío. Al residuo se le añadieron 100 ml de acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, después se secó sobre MgSO₄. Se retiraron los disolventes para proporcionar un aceite incoloro, que se recristalizó en EtOAc/hexanos para proporcionar un sólido blanquecino 59 con un rendimiento de un 30 %. EM (ES+): 352; Pf: 227 - 230 °C; RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz): 10,15 (s, 1H), 8,14 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,06 (dd, J = 8,0 y 1,0 Hz, 1H), 7,80 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,53 (dd, J = 8,0 y 1,0 Hz, 1H), 7,47 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 3,26 (s, 2H), 2,37 (s, 6H); Anal. Calc. para C₁₉H₁₇N₃O₄: C, 64,95; H, 4,86; N, 11,96. Hallado: C, 64,95; H, 4,78; N, 12,14.

10 **Éster 3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracen-10-ilmetílico del éster dibencilico del ácido fosfórico (60).** A una solución del compuesto 57 (0,25 mmol) en DMF anhidro se le añadió fosfato de dibencilo (0,80 mmol) y trifetilfosfina (0,80 mmol). Se agitó la mezcla de reacción mientras se añadía lentamente azodicarboxilato de diisopropilo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se retiró el disolvente a vacío. Al residuo se le añadieron 100 ml de acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera, después se secó sobre MgSO₄. Se retiraron los disolventes para proporcionar un aceite amarillo. Se recristalizó el aceite en EtOAc/hexanos para proporcionar un sólido blanquecino 60 con un rendimiento del 40 %. EM (ES+): 527; Pf: 223 - 225 °C; RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz): 9,91 (s, 1H), 8,13 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,11 (dd, J = 8,0 y 1,0 Hz, 1H), 7,85 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,59 (dd, J = 8,0 y 1,0 Hz, 1H), 7,45 (dd, J = 8,5 y 1,0 Hz, 1H), 7,36 - 7,26 (m, 11H), 5,08 (m, 6H). Anal. Calc. para C₂₉H₂₃N₂O₆P: (0,15hidrazina): C, 65,56; H, 4,48; N, 6,06. Hallado: C, 65,55; H, 4,33; N, 6,09.

20 **Éster mono-(3-oxo-2,3-dihidro-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracen-10-ilmetílico) del ácido fosfórico (61).** A una solución del compuesto 57 (0,25 mmol) en DMF anhidro se le añadió 1H-tetrazol (2,5 mmol) y di-terc-butyl-N,N-dietilfosforamidita (1,25 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. A la solución se le añadió hidroperóxido de t-butilo. Se agitó la mezcla de reacción durante otra hora. Se enfrió la mezcla de reacción hasta 0 °C y se añadieron 15 ml de solución de NaHSO₃ al 15 % en agua a la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla durante otros 15 minutos. Se neutralizó la mezcla hasta pH = 8,5 y se extrajo con acetato de etilo. Se recogió la capa orgánica, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. Se retiraron los disolventes a vacío para proporcionar un sólido blanquecino, que se recristalizó en EtOAc/hexanos para dar el intermedio con un rendimiento del 78 %.

30 Se disolvió el sólido blanquecino en 10 ml de CH₂Cl₂ y se añadieron 4 ml de TFA a la solución. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se retiró el disolvente a vacío. Se recristalizó el residuo en acetato de etilo para proporcionar un sólido amarillo 61 con un rendimiento del 60%. EM (ES+): 347; Pf: 246 - 252 °C. RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 12,64 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,93 - 7,85 (m, 2H), 7,67 (dd, J = 7,0 y 2,0 Hz, 1H), 7,53 (dd, J = 8,5 y 2,0 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,95 (d, J = 7,5 Hz, 2H); Anal. Calc. para C₁₅H₁₁N₂O₆P: C, 52,04; H, 3,2; N, 8,09. Hallado: C, 51,76; H, 3,38; N, 8,21.

Ejemplo 12

40 Efecto de isquemia cerebral focal de 10-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracen-3-ona (43)

Se les dejó a las ratas libre acceso a agua y a pienso para ratas (Wayne, Chicago, IL) hasta cirugía. El alojamiento y la anestesia coinciden con las directrices establecidas por el Institutional Animal Studies Committee, y están de acuerdo con la PHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, USDA Regulations, y con AVMA Panel on Euthanasia guidelines.

50 Los animales se anestesiaron con isoflurano (inducción, 3%; mantenimiento, 1,25% en O₂) a través de una máscara facial. Durante las breves cirugías, los animales se mantuvieron calientes en una manta térmica. Se inserta un catéter iv en la vena femoral izquierda para la administración de fármacos. Después, se expone la arteria cerebral media (MCA) derecha realizando una incisión cutánea vertical entre el ojo y la oreja derecha y se retira el cráneo que la cubre con una fresa dental. Para oclusión transitoria, se aplica un microclip Codman a la arteria al nivel de la vena cerebral inferior. Para oclusión permanente de MCA, se coagula la arteria al nivel de la vena cerebral inferior con una unidad de cauterización bipolar (Valleylab NS2000, Boulder, CO), y se corta para evitar una referusión espontánea. Ambas arterias carótidas comunes (CCA) que se habían aislado previamente y liberado de tejidos blandos y nervios se ligan a continuación usando clips para aneurismas no traumáticos. Después de cerrar las heridas con clips quirúrgicos, se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia y se devolvieron a su jaula en una sala calentada a 27 °C.

60 Para la estrategia pre-post dosificación, en primer lugar se administraron fármacos como un bolo iv 30 min antes de MCAO y después 30 min antes de la reperfusión, es decir, una hora post-MCAO. Noventa minutos después de MCAO, los animales se volvieron a anestesiarse brevemente con isoflurano, y se retiraron los clips de la carótida. Se devolvieron los animales a la sala caliente durante la noche.

65 24 horas después de MCAO transitoria o bien permanente, los animales se sacrificaron con CO₂ y se les retiraron las cabezas con guillotina. Se retiraron los cerebros, se enfriaron en solución salina y se cortaron en secciones coronarias de 2 mm usando una matriz de cerebro de rata (Harvard Bioscience, South Natick, MA). Se incubaron las láminas de cerebro en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) que contenía TTC al 2% e EC 37 durante 10 min. y después

se almacenó en formalina tamponada neutra al 10%. Se determina el área de sección transversal de la región no teñida con TTC para cada lámina de cerebro usando un analizador de imágenes (MetaMorph, Universal Imaging Corp., West Chester, PA). Se calcula el volumen total de infarto en el hemisferio derecho por suma total del directo (TTC-negativo). Se someten a prueba los volúmenes con infarto en grupos tratados con vehículo y con fármaco (n=8) para determinar la diferencia estadística significativa usando una prueba t de Student (figura 1).

Ejemplo 13

Protección miocárdica de 10-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (43)

En el presente estudio, se investigó los efectos de 43 en el modelo de isquemia y reperfusión cardiaca regional. En el modelo de isquemia cardiaca regional, se sometieron ratas SD macho anestesiadas con tiopental a oclusión de arteria coronaria LAD durante 30 min seguido de 2 h de reperfusión. Se cuantificó el tamaño del infarto por el método de tinción con TTC y se expresó como porcentaje de área en riesgo. La administración de 43 en bolo iv. pre-isquemia más otro bolo iv. post-isquemia ejerce una protección cardiaca significativa en una dosis que varía desde 10 a 40 mg/kg.

La lesión por reperfusión provocada por radicales libres no se limita a isquemia cerebral. También contribuye significativamente al daño de otros órganos incluyendo el corazón y el músculo esquelético. Se ha demostrado que los inhibidores de PARP reducen el tamaño del infarto provocado por isquemia y reperfusión de corazón y músculo esquelético del conejo. Las evidencias sugieren que la lesión por reperfusión para isquemia cerebral y de miocardio puede tener un mecanismo común ya que ambas lesiones son debidas a la activación de PARP como resultado de daño de ADN por radicales libres. La inhibición transitoria de la actividad de PARP es un enfoque novedoso para el tratamiento de lesión por isquemia-reperfusión del corazón.

Se ocluyó la arteria coronaria descendente anterior izquierda de ratas Sprague-Dawley durante 30 minutos. A esto le siguieron 90 - 120 minutos de reflujo sanguíneo. Se administraron los compuestos inhibidores de PARP por vía intraperitoneal (ip), 60 minutos pre-, o por vía intravenosa (iv), 15 o 5 minutos pre- y 25 minutos post-inicio de la isquemia. Se determinó el tamaño del infarto por tinción con TTC y se determinó el área de riesgo por medio de inyección de colorante azul.

Los inhibidores de PARP presentaron una reducción significativa en el tamaño del infarto en este modelo, esto es, se reduce el volumen del infarto entre un 36%, $p = 0,001$.

Ejemplo 14

10-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diaza-benzo[de]antracén-3-ona (43) potencia la sensibilidad in vitro de líneas celulares de melanoma, linfoma y glioblastoma multiforme a TMZ

Líneas celulares

Se cultivaron la línea celular de melanoma murino B16 de origen C57BL/6J (H-2^b/H-2^b) y la línea celular de linfoma L5178Y de origen DBA/2 (H-2^d/H-2^d) (ATCC, Manassas, VA), en RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10% (Invitrogen, Milán, Italia), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Flow Laboratories, Mc Lean, VA), a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Se cultivó la línea celular de glioblastoma multiforme humana SJGBM2 en DMEM (Invitrogen) complementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM y antibióticos. La línea celular SJGBM2 fue un amable regalo del Dr. Peter J. Houghton (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, EE. UU.).

Fármacos

TMZ se proporcionó por el Schering-Plough Research Institute (Kenilworth, NJ, EE. UU. Se prepararon soluciones madre de los fármacos disolviendo TMZ en dimetil sulfóxido y 43 en PBS 70 mM sin potasio.

Estudios in vitro

Se trataron las células con 43 (0,1-20 µM) o con TMZ (1-250 µM). Para los experimentos destinados a evaluar el efecto potenciador de 43 sobre la inhibición del crecimiento tumoral inducido por TMZ, se añadió agente de metilación a cultivos celulares 15 min después de que se usó 43 en concentraciones no tóxicas, y que podían abrogar la actividad de PARP. La concentración final de dimetil sulfóxido siempre fue menor de un 0,1% (v/v) y no contribuyó a la toxicidad (datos no mostrados).

Se cultivaron las células durante tres días y se evaluaron la apoptosis o el análisis del ciclo celular diariamente por análisis de citometría de flujo del contenido en ADN como se describió previamente (Tentori 1997). En resumen, se lavaron las células con PBS y se fijaron en etanol al 70% a -20°C durante 18 h. Se resuspendieron los sedimentos centrifugados en 1 ml de solución hipotónica que contenía yoduro de propidio (50 µg/ml), citrato de sodio al 0,1%, Triton-X al 0,1%, y RNasa (10 µg/ml) y se incubó en la oscuridad a 37°C durante 15 min. Se cerró la recogida de datos

utilizando dispersión de luz directa para excluir restos celulares y agregados. Se midió la fluorescencia de yoduro de propidio en una escala lineal usando un citómetro de flujo FACScan (Becton and Dickinson, San Jose, CA, EE. UU.). Se registraron todos los datos y se analizaron usando el programa informático Cell Quest. Para el análisis del ciclo celular se usó el programa informático Mod-fit (Becton and Dickinson).

5 Se analizó la supervivencia a largo plazo por un ensayo de formación de colonias. Se sembraron células de melanoma y glioblastoma que crecían exponencialmente en placas de 6 pocillos a una densidad de 2×10^2 /pocillo y se dejó que se unieran durante 18 h; después se trataron las células con los compuestos a estudio y se cultivaron para permitir la formación de colonias. Después de 10 días, se fijaron las colonias (definidas como un clúster de >50 células) y se
10 tiñeron con rodamina B violeta básico 10 (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, EE. UU.). Se sembraron células de linfoma sin tratar y tratadas a 1 célula/pocillo en placas de 96 pocillos (de fondo plano) y se cultivaron. Después de 10 días, se contaron las colonias para determinar la eficacia de clonación usando un microscopio óptico (Tentori 2001b).

15 Se evaluó la quimiosensibilidad de las líneas celulares para TMZ, 43 o para la combinación de fármacos en términos de CI_{50} , es decir, la concentración del fármaco expresada en μM , que pueden inhibir la capacidad de formación de colonias en un 50%. Se calculó la CI_{50} sobre la línea de regresión en la que se representó el número de colonias frente a la concentración de fármaco.

Estudios in vivo

20 El método de trasplante intracraneal se realizó como se describió previamente (Tentori 2002b). Se inyectaron células (10^4 en 0,03 ml de RPMI-1640) por vía intracraneal (ic) a través del área medio-central del hueso frontal con una profundidad de 2 mm, usando una microjeringuilla de vidrio de 0,1 ml y una aguja desechable de calibre 27.

25 Se inyectaron células B16 de melanoma o L5178Y de linfoma murino (10^4) por vía ic en ratones B6D2F1 (C57BL/6 x DBA/2) macho. Se inyectaron células SJGBM2 de glioblastoma multiforme humano (10^6) por vía ic en ratones BALB/c atímicos macho (genotipo nu/nu). Antes de la exposición del tumor, se anestesiaron los animales con cetamina (100 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) en solución de NaCl al 0,9% (10 ml/kg/ip).

30 Se realizó la evaluación histológica de crecimiento de tumor en el cerebro 1-5 días después de la exposición de tumor, para seleccionar la periodicidad del tratamiento. Se fijaron los cerebros en formaldehído tamponado con fosfato al 10%, se cortaron a lo largo del plano axial y se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones histológicas (de 5 μm de grosor) con hematoxilina-eosina y se analizaron por microscopía óptica.

35 Se evaluó la toxicidad a fármaco tratando ratones intactos (5/grupo) con los compuestos a estudio, usados como agentes individuales o en combinación. Se trataron los grupos de control sólo con vehículos. Se midió el peso corporal tres veces semanalmente y se registraron las supervivencias durante 3 semanas después del último tratamiento. Se evaluó la toxicidad en base a muertes relacionadas con fármaco aparentes y pérdida de peso corporal [es decir, (peso inicial - peso más bajo/peso inicial) x 100%]. La muerte se consideró relacionada con fármaco cuando se produjo dentro de los 7 días después del último tratamiento. Se disolvió 43 en PBS 70 mM sin potasio, y se inyectó por vía intravenosa (iv) a diferentes dosis (40-200 mg/kg) para establecer la dosis tolerada máxima.

45 Se disolvió TMZ en dimetil sulfoxido (40 mg/ml), se diluyó en solución salina (5 mg/ml) y se administró por vía ip a dosis usadas comúnmente para estudios preclínicos in vivo (Friedman 1995; Middleton 2000; Kokicnakis 2001). Se realizaron experimentos usando diferentes dosis y programas de TMZ + 43 para determinar la dosis tolerada máxima de la combinación de fármacos. Se administró 43 15 min. antes de la administración de TMZ. A los ratones de control se les inyectaron siempre vehículos de fármaco.

50 En ratones que llevaban el tumor, el tratamiento se inició el día 2 después de la exposición, cuando la infiltración de tumor en el tejido cerebral circundante era histológicamente evidente. Puesto que la actividad antitumoral de los inhibidores de PARP y TMZ se puede mejorar por una modalidad fraccionada de tratamiento (Tentori 2002b), la dosis tolerada máxima de la combinación de fármaco se dividió en administraciones diarias de 100 mg/kg de TMZ + 40 mg/kg de 43 durante 3 días.

55 Se monitorizaron los ratones para determinar la mortalidad durante 90 días. Se determinaron los tiempos de supervivencia medios (MST) y se calculó el porcentaje de incremento del tiempo de vida (ILS) como: $\{[MST \text{ (días) de ratones tratados/MST (días) de ratones de control}] - 1\} \times 100$. Se evaluó la eficacia de los tratamientos comparando las curvas de supervivencia entre los grupos tratados y de control.

60 Para evaluar la capacidad de diferentes tratamientos para reducir el crecimiento tumoral, se realizó un examen histológico de los cerebros usando animales adicionales que no se consideraron para el análisis de supervivencia. Se sacrificaron ratones en diferentes puntos temporales después de la exposición de tumor, se seleccionaron dentro del intervalo de MST de animales de que llevan el tumor sin tratar.

65 También se evaluó la eficacia del tratamiento de TMZ \pm 43 en melanoma de crecimiento subcutáneo (sc). Con este fin,

se inocularon sc células B16 ($2,5 \times 10^5$) en el flanco del animal. Se midieron los tumores con calibradores y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: [(anchura) x longitud]/2. Se inició el tratamiento 6 días después de la exposición, cuando el volumen de los nódulos tumorales alcanzó 100-150 mm³. Se monitorizó el crecimiento de melanoma midiendo los nódulos tumorales cada 3 días durante 3 semanas.

5 Para evaluar la influencia de los fármacos a estudio sobre la generación de metástasis artificiales, se inyectaron células B16 ($2,5 \times 10^5$ en 0,02 ml) en la vena de la cola de ratones B6D2F1. Los animales se trataron con los fármacos a estudio usando el programa de 3 días (véase anteriormente). Dos semanas después de la exposición de tumor, se sacrificaron los animales, se les retiraron los pulmones y se fijaron en solución de Bouin para distinguir los nódulos tumorales del tejido pulmonar. Se determinó el número de metástasis usando un microscopio de disección.

10 Todos los procedimientos que implicaban ratones y su cuidado se realizaron cumpliendo con las directrices nacionales e internacionales (European Economy Community Council Directive 86/109, OLJ318, Dec. 1, 1987 y NIH Guide for care and use of laboratory animals, 1985).

15 **Análisis estadístico**

Se generaron curvas de supervivencia por estimación del límite de producto de Kaplan-Meier y se evaluaron las diferencias estadísticas entre los diversos grupos por análisis de orden logarítmico (programa informático Primer of Biostatistics, McGraw-Hill, Nueva York, NY). Para el análisis estadístico del crecimiento tumoral y número de metástasis, se evaluó la significancia de las diferencias entre los grupos experimentales por la prueba t.. Las P son bilaterales (programa informático Microsoft Excel).

20 Inicialmente, se expusieron células B16, SJGBM2 y L5178Y a 43 1-25 μ M como agente individual. Se analizó el crecimiento celular por el ensayo de formación de colonias y los resultados indicaron que 43 presentó algo de inhibición de crecimiento intrínseco y que el melanoma de B16 era más susceptible al efecto antiproliferativo inducido por 43 con respecto a las líneas celulares de SJGBM2 y L5178Y.

25 Para cada línea celular, se sometieron a prueba concentraciones de 43 carentes de efectos tóxicos (0,3-1,2 μ M) para determinar su capacidad para potenciar la inhibición del crecimiento inducida por TMZ. En todas las líneas celulares de tumor, el inhibidor de PARP incrementó la inhibición del crecimiento inducida por TMZ. En el caso de la línea celular B16, se logró la potenciación máxima de inhibición del crecimiento inducida por TMZ a una concentración de 0,6 μ M (10 veces). En células B16, 43 a la concentración de 1,2 μ M indujo una inhibición del crecimiento del $18 \pm 3\%$ con respecto al control y no se consideró para estudios de combinación con TMZ. Para las líneas celulares SJGBM2 y L5178Y, se observó el incremento máximo del efecto inhibidor del crecimiento de TMZ a 43 1,2 μ M (~4 veces para SJGBM2 y ~10 veces para L5178Y, respectivamente). En las líneas celulares SJGBM2 y L5178Y, 43 2,5 μ M mostró un efecto inhibidor del crecimiento intrínseco, por lo tanto esta concentración no se sometió a prueba junto con TMZ.

30 En las células B16 y SJGBM2, TMZ+43 provocaron principalmente citostasis sin inducción de apoptosis, mientras que en las células de linfoma de L5178Y la combinación de fármacos indujo también apoptosis (datos no mostrados).

35 **Ejemplo 14**

45 La administración sistémica de 10-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diaza- benzo[de]antracen-3-ona (43) + TMZ potencia la supervivencia de ratones que llevan melanoma, linfoma o glioblastoma multiforme en el sitio de CNS

Se sometió a prueba inicialmente la actividad antitumoral de la combinación de fármacos, en la dosis más alta tolerable (TMZ 100 mg/kg/día ip + 43 40 mg/kg/día iv, durante 3 días), en melanoma de B16 de crecimiento subcutáneo en ratones B6D2F1 y se comparó con los efectos inducidos por TMZ o 43 usados como agentes individuales. Los resultados muestran que 43 potenció significativamente ($P < 0,0001$) los efectos antitumorales de TMZ, mientras que el tratamiento sólo con 43 no afectó al crecimiento tumoral.

50 Se usó el mismo programa de fármaco para investigar si la administración sistémica de 43, que puede cruzar la barrera hematoencefálica, podría incrementar la eficacia de TMZ también frente a melanoma de B16 con crecimiento en el sitio de CNS. Se inició el tratamiento de fármaco 2 días después de la exposición de tumor, cuando la infiltración neoplásica del tejido cerebral se evidenció en secciones histológicas. Los resultados muestran que el incremento en el tiempo de supervivencia inducido por la combinación de 43 + TMZ era significativamente mayor ($P < 0,0001$) que el provocado por TMZ como agente individual. El incremento en la supervivencia detectado en el grupo tratado con la combinación de fármacos se acompañó con una reducción marcada del crecimiento de tumor. Los estudios histológicos revelaron una infiltración tumoral pronunciada y difusa en el cerebro de ratones de control o tratados con 43, infiltración limitada pero multifocal en ratones tratados con TMZ, mientras que solo unas pocas células de melanoma con infiltración en animales tratados con 43 + TMZ.

65 El inhibidor de PARP 43 también incrementó la actividad antimetastásica de TMZ frente a melanoma de B16. De hecho, el número de metástasis pulmonares observado después del tratamiento con 43 + TMZ era significativamente

menor ($P = 0,004$) que el detectado en ratones tratados con TMZ usado como agente individual.

La administración sistémica de 43 + TMZ incrementó significativamente la supervivencia de ratones B6D2F1 que llevan linfoma de L5178Y creciendo en el cerebro. El incremento en el tiempo de supervivencia medio inducido por la combinación de fármacos era significativamente mayor que el provocado por TMZ usado como agente individual.

Después, se investigó la eficacia del tratamiento de fármaco usando un modelo ortotópico de un xenoinjerto de glioblastoma multiforme humano en ratones atímicos. Los resultados indican que la administración sistémica de 43 + TMZ prolongó significativamente la supervivencia de ratones que llevan tumor con respecto a los controles o a animales tratados con los agentes individuales. Cabe destacar que en este modelo tumoral, TMZ era completamente ineficaz.

El examen microscópico de animales de control inyectados con SJGBM2 reveló una implicación cerebral multifocal. El tratamiento con 43 + TMZ dio como resultado una disminución en el número de sitios de infiltración neoplásica. En el grupo de control, todos los animales presentaron infiltración tumoral en al menos dos regiones del cerebro distantes del sitio de inyección, mientras que en el grupo tratado con la combinación de fármacos sólo 2/7 ratones mostraron este patrón (regiones cerebrales totales infiltradas por células tumorales: control, 24; 43 + TMZ: 13; $P = 0,0007$). Además, los cerebros de los ratones de control mostraron grandes masas tumorales tanto en el sitio de inyección como en el parénquima que rodea los ventrículos; por el contrario, los animales tratados con 43 + TMZ mostraron una infiltración tumoral mínima.

Ejemplo 16

Medida de la expresión génica alterada en ARNm de células senescentes

Se puede medir la expresión génica con células BJ de fibroblasto humanas que, en la duplicación de la población (PDL) 94, se plaquean en medio de crecimiento regular y después de cambian a medio sérico bajo para reflejar condiciones fisiológicas descritas en Linskens, et al., Nucleic Acids Res. 23:16:3244-3251 (1995). Se usa un medio de DMEM/199 complementado con suero bovino fetal al 0,5%. Se tratan las células diariamente durante 13 días. Se tratan las células de control con y sin el disolvente usado para administrar el inhibidor de PARP. Se someten a prueba las células de control jóvenes y viejas sin tratar para su comparación. Se prepara el ARN a partir de células de control y tratadas de acuerdo con las técnicas descritas en la publicación PCT N.º 96/13610 y se lleva a cabo una transferencia de bandas Northern. Se analizan sondas específicas para genes relacionados con senescencia, y se comparan células tratadas y de control. Al analizar los resultados, el menor nivel de expresión génica se establece de forma arbitraria en 1 para proporcionar una base para comparación. Tres genes particularmente relevantes a cambios relacionados con la edad en la piel son colágeno, colagenasa y elastina. West, Arch. Derm. 130:87-95 (1994). Se espera que la expresión de elastina de las células tratadas con el inhibidor de PARP se incremente significativamente en comparación con las células de control. La expresión de elastina debe ser significativamente mayor en células jóvenes en comparación con células senescentes, y por tanto, el tratamiento con el inhibidor de PARP debe provocar niveles de expresión de elastina en células senescentes para cambiar los niveles similares a los hallados en células mucho más jóvenes. De forma similar, se debe observar un efecto beneficioso en

la expresión de colagenasa y colágeno con el tratamiento con los inhibidores de PARP.

Ejemplo 17

Medida de la expresión génica alterada de proteína en células senescentes

Se puede medir la alteración de la expresión génica con aproximadamente 105 células BJ, a PDL 95-100 que se plaquean y se hacen crecer en platos de 15 cm. El medio de crecimiento es DMEM/199 complementado con suero bovino fetal al 10%. Se tratan diariamente las células durante 24 horas con los inhibidores de PARP (100 $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$ de medio), documento WO 99/11645. Se lavan las células con solución tamponada de fosfato (PBS), después se permeabiliza con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos, después se lava con PBS, y se trata con metanol frío al 100% durante 10 minutos. Se retira el metanol y se lavan las células con PBS, y después se trata con suero al 10% para bloquear la unión de anticuerpo no específica. Se añade aproximadamente 1 ml de las soluciones de anticuerpo disponibles comercialmente apropiadas (dilución 1:500. Vector) a las células y se incuban la mezcla durante 1 hora. Se aclaran las células y se lavan tres veces con PBS. Se añade un segundo anticuerpo, IgG anti-ratón de cabra (1 ml) con una etiqueta de biotina junto con 1 ml de una solución que contenía estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina y 1 ml de reactivo NBT (Vector). Se lavan las células y se observan colorimétricamente los cambios en la expresión génica. Se monitorizan cuatro genes específicos de senescencia (colágeno I, colágeno III, colagenasa, e interferón gamma) en células senescentes tratadas con el inhibidor de PARP y los resultados deben mostrar una disminución en la expresión de interferón gamma sin un cambio observable en los niveles de expresión de los otros tres genes, lo que demuestra que los inhibidores de PARP pueden alterar la expresión génica específica de senescencia.

Ejemplo 18Capacidad proliferativa extendida o incrementada y tiempo de vida de las células

- 5 Para demostrar la efectividad del presente método para extender la capacidad proliferativa y el tiempo de vida de las células, se descongelan líneas celulares de fibroblasto humanas (W138 de duplicación de la población (PDL) 23 o células BJ de PDL 71) y se plaquean en matraces T75 y se dejan crecer en medio normal (DMEM/M199 más suero bovino fetal al 10%) durante aproximadamente una semana, tiempo en el que las células son confluentes y por lo tanto los cultivos están preparados para subdividirse. En el momento de la división, se aspira el medio y se aclaran las
- 10 células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se tripsinizan. Se cuentan las células con un contador Coulter y se plaquean a una densidad de 10^5 células por cm^2 en placas de cultivo tisular de 6 pocillos en medio DMEM/199 complementado con suero bovino fetal al 10% y cantidades variables (0,10 μM , y 1 mM: de una solución madre 100X en medio DMEM/M199) de un inhibidor de PARP. Se repite este proceso cada 7 días hasta que parece que todas las células dejan de dividirse. Las células sin tratar (control) alcanzan la senescencia y dejan de
- 15 dividirse después de aproximadamente 40 días en el cultivo. Parece que el tratamiento de las células con 3-AB 10 μM tiene poco o ningún efecto en contraste con el tratamiento con 3-AB 100 μM que parece que alarga el tiempo de vida de las células y el tratamiento con 3-AB 1 mM que incrementa drásticamente el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células. Las células tratadas con 3-AB 1 mM aún se dividían después de 60 días en el cultivo.

Ejemplo 19Efectos neuroprotectores de los inhibidores de PARP en lesión por constricción crónica (CCI) en ratas

- 25 Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho adultas, de 300-350 g, con 50 mg/kg de pentobarbital de sodio por vía intraperitoneal. Se realiza ligadura de los nervios exponiendo un lado de los nervios ciáticos de la rata y diseccionando un segmento del nervio de 5-7 mm de largo y cerrando con cuatro ligaduras flojas a 1,0-1,5-mm, seguido de implantación de un catéter intratecal e inserción de un tubo de polietileno aclarado con sulfato de gentamicina (PE-10) en el espacio subaracnoideo a través de una incisión en la cisterna magna. El extremo caudal del catéter se introduce cuidadosamente en la aplicación lumbar y el extremo rostral se asegura con cemento dental a un tornillo incrustado en
- 30 el cráneo y se cierra la herida de la piel con grapas para heridas.

- Se evalúa la hiperalgesia térmica al calor radiante usando una prueba de retirada de la pata. Se sitúa la rata en un cilindro de plástico sobre una placa de vidrio de 3 mm de grosor con una fuente de calor radiante desde un bulbo de protección situado directamente debajo de la superficie plantar de la pata trasera de la rata. Se define la latencia de
- 35 retirada de la pata como el tiempo que pasa desde el inicio de la estimulación con calor radiante hasta la retirada de la pata trasera de la rata.

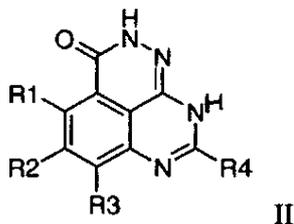
- Se evalúa la hiperalgesia mecánica situando la rata en una jaula con un fondo fabricado de lámina metálica perforada con muchos orificios cuadrados muy pequeños. Se registra la duración de la retirada de la pata después de pinchar
- 40 superficie de la mitad de la planta de la pata trasera de la rata con la punta de un alfiler de seguridad insertado a través del fondo de la jaula.

- Se evalúa la mecano-alodinia situando una rata en una jaula similar a la de la prueba anterior y aplicando filamentos de von Frey en orden ascendente con una fuerza de plegamiento que varía desde 0,07 hasta 76 g a la superficie de la
- 45 mitad de la planta de la pata trasera de la rata. Se aplica un filamento de von Frey perpendicular a la piel y se presiona lentamente hasta que se dobla. Se define la fuerza umbral de respuesta como el primer filamento en la serie que provoca al menos una clara retirada de pata de entre cinco aplicaciones.

- Se observan neuronas oscuras de forma bilateral dentro del cuerno dorsal de la médula espinal, en particular en láminas 1-13, de ratas 8 días después de la ligadura de nervio ciático unilateral en comparación con las ratas testigos quirúrgicas. Se sometieron a prueba varias dosis de inhibidores de PARP en este modelo y se mostró que se reduce
- 50 tanto la incidencia de neuronas negras como el comportamiento del dolor neuropático en ratas CCI.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



5 en la que

R1 es H, halógeno, alcoxi C1-C6 o alquilo lineal o ramificado C1-C6;

10 R2 es H, halógeno, alcoxi C1-C6 o alquilo lineal o ramificado C1-C6;

R3 es H; y

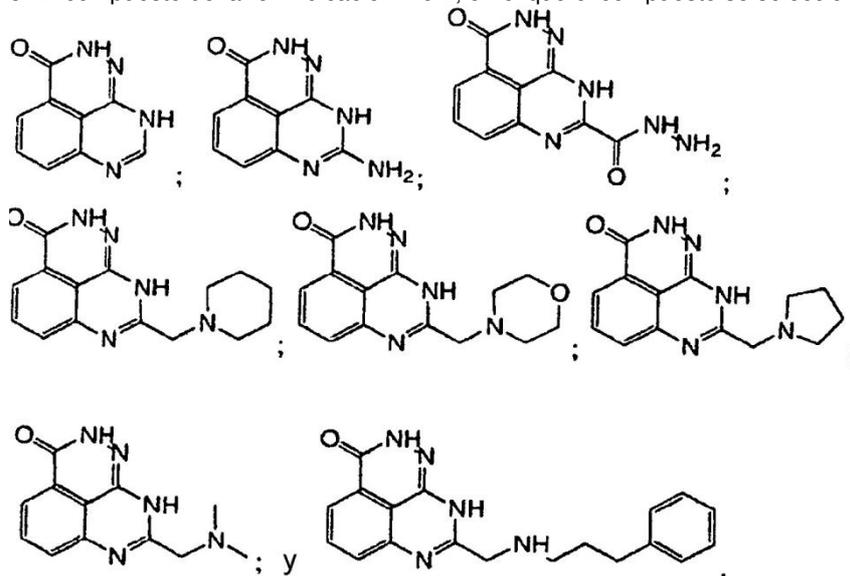
15 R4 es independientemente H, amino, -CO-NH-NH₂, CH₂R6 o CH₂NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente alquilo C1-C6 sustituido con hidrógeno, alquilo, fenilo o heterocicloalquilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1: en el que

20 R1 es H, F, Cl, metoxi o metilo; R2 es H, F, Cl, metoxi o metilo; R3 es H; y

R4 es independientemente H, amino, -CO-NH-NH₂, -CH₂R6 o -CH₂NR6R7 en la que R6 y R7 son cada uno independientemente alquilo C1-C6 sustituido con hidrógeno, alquilo, fenilo o heterocicloalquilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



25

4. Una composición farmacéutica que comprende:

30 una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, caracterizado porque comprende además temozolimida.

35 6. Compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o composición farmacéutica como se define en la reivindicación 4 ó 5, para su uso en un método de tratamiento de daño tisular que resulta de daño o muerte celular debido a necrosis o apoptosis, enfermedades o daño tisular mediado neuronal, daño tisular neuronal que resulta de lesión por isquemia y reperfusión, y trastornos neurológicos, trastornos cardiovasculares, cirugía de

- derivación cardíaca, tratamiento de depresión y deterioro cognitivo debido a déficit neuronal después de cirugía de derivación de arteria coronaria, artritis, diabetes, ataxia telangiectasia, caquexia, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, trastornos intestinales inflamatorios, inflamación, gota, dolor crónico, dolor agudo, dolor neuropático, daño nervioso, lesión del nervio periférico, insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico, choque hemorrágico, esclerosis múltiple, enfermedades o trastornos relacionados con el tiempo de vida o la capacidad proliferativa de las células y enfermedades o afecciones de enfermedades inducidas o exacerbadas por senescencia celular en un animal.
- 5
7. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado de enfermedad o lesión física, daño cerebral traumático, daño físico en la médula espinal, apoplejía y enfermedad desmielinizante.
- 10
8. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en daño tisular cardiovascular, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, angina de pecho, choque cardiogénico, cirugía de derivación de arteria coronaria, paro cardíaco y reanimación cardiopulmonar.
- 15
9. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento, en el que la enfermedad o afección de enfermedad inducida o exacerbada por células con senescencia celular se selecciona del grupo que consiste en envejecimiento de la piel, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, osteoartritis, osteoporosis, distrofia muscular, degeneración muscular relacionada con la edad, senescencia inmunitaria, y sida.
- 20
10. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento, en el que dicha lesión por isquemia o reperfusión cerebral es lesión cerebral después de paro cardíaco y reanimación cardiopulmonar.
- 25
11. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento, en el que el choque septicémico es choque endotóxico.
- 30
12. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno intestinal es colitis.
- 35
13. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento, en el que el trastorno intestinal es enfermedad de Crohn.
- 40
14. Compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica como se define en la reivindicación 4 ó 5, para su uso en un método de radiosensibilización de células tumorales en un animal.
- 45
15. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 14, para su uso en un método de tratamiento, en el que las células tumorales se seleccionan del grupo que consiste en tumores que producen ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cervix, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer endometrial, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma hodgkiniano, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas y/o de células no pequeñas), efusión peritoneal maligna, efusión pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer de ovario (de células germinales), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinomas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasias trofoblásticas, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de la vulva y tumor de Wilm.
- 50
16. Compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica como se define en la reivindicación 4 ó 5, para su uso en un método de mantenimiento de la viabilidad de un órgano animal en un animal.
- 55
17. Compuesto o composición farmacéutica de la reivindicación 16, para su uso en un método de tratamiento, en el que la viabilidad está comprometida por el grupo seleccionado de insuficiencia multiorgánica, donación de órganos y trasplante.
- 60
18. Compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, junto con temozolimida para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un mamífero.
- 65
19. Compuesto de la reivindicación 18, para su uso en un método de tratamiento, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, linfoma y glioblastoma multiforme.