

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 986**

51 Int. Cl.:

C07D 213/78 (2006.01)

C07D 239/42 (2006.01)

C07D 409/14 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2007 E 07703886 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 1979326**

54 Título: **Derivados de piridina y pirimidina como inhibidores de histona desacetilasa**

30 Prioridad:

19.01.2006 EP 06100570

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

01.03.2013

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (100.0%)
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:

**MARCONNET-DECRANE, LAURENCE,
FRANÇOISE, BERNADETTE;
GAURRAND, SANDRINE, FRANÇOISE,
DOMINIQUE y
ANGIBAUD, PATRICK, RENÉ**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 396 986 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de piridina y pirimidina como inhibidores de histona desacetilasa

- 5 Esta invención se refiere a compuestos que tienen actividad enzimática inhibidora de histona desacetilasa (HDAC). Se refiere además a procesos para su preparación, a composiciones que los comprenden, así como a los compuestos para su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, para inhibir HDAC y como medicamento, por ejemplo como medicamento para inhibir estados proliferativos, tales como cáncer y psoriasis.
- 10 Las histonas nucleares se conocen como componentes integrales y dinámicos de la maquinaria responsable de la regulación de la transcripción génica y otros procesos con molde de ADN tales como replicación, reparación, recombinación y segregación de cromosomas. Son el sujeto de modificaciones postraduccionales incluyendo acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ribosilación de ADP.
- 15 La(s) histona desacetilasa(s), denominada(s) en el presente documento "HDAC", son enzimas que catalizan la eliminación de la modificación de acetilo en residuos de lisina de proteínas, incluyendo las histonas nucleosómicas del núcleo H2A, H2B, H3 y H4. Junto con histona acetiltransferasa(s), denominada(s) en el presente documento "HAT", las HDAC regulan el nivel de acetilación de las histonas. El balance de acetilación de histonas nucleosómicas desempeña un papel importante en la transcripción de muchos genes. La hipoacetilación de histonas está asociada con una estructura de cromatina condensada dando como resultado la represión de la transcripción génica, mientras que las histonas acetiladas están asociadas con una estructura de cromatina más abierta y una activación de la transcripción.
- 20 Se han descrito once HDAC estructuralmente relacionadas y se dividen en dos clases. Las HDAC de clase I consisten en HDAC 1, 2, 3, 8 y 11 mientras que las HDAC de clase II consisten en HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10. Los miembros de una tercera clase de HDAC no están estructuralmente relacionados con las HDAC de clase I y clase II. Las HDAC de clase I/II funcionan mediante mecanismos dependientes de zinc, mientras que las HDAC de clase III son dependientes de NAD.
- 25 Además de las histonas, otras proteínas también han sido el sustrato para la acetilación, en particular factores de transcripción tales como p53, GATA-1 y E2F; receptores nucleares tales como el receptor de glucocorticoides, los receptores tiroideos, los receptores de estrógeno; y proteínas reguladoras del ciclo celular tales como pRb. Se ha vinculado la acetilación de proteínas con la estabilización de proteínas, tal como la estabilización de p53, acumulación de cofactores y aumento de la unión de ADN. p53 es un supresor tumoral que puede inducir la detención del ciclo celular o la apoptosis en respuesta a una variedad de señales de estrés, tales como daño de ADN. La diana principal para la detención del ciclo celular inducida por p53 parece ser el gen p21. Tras su activación mediante p53, se ha identificado p21 en virtud de su asociación con complejos de ciclina/cinasa dependiente de ciclina que da como resultado la detención del ciclo celular en las fases tanto G1 como G2, su regulación por incremento durante la senescencia y su interacción con el antígeno nuclear de células proliferantes.
- 30 El estudio de inhibidores de HDAC indica que desempeñan un papel importante en la detención del ciclo celular, la diferenciación celular, la apoptosis y la inversión de fenotipos transformados.
- 35 El inhibidor tricostatina A (TSA), por ejemplo, provoca la detención del ciclo celular en las fases tanto G1 como G2, invierte el fenotipo transformado de diferentes líneas celulares e induce la diferenciación de células de leucemia de Friend y otros. Se ha notificado que TSA (y el ácido suberoilanhidrohídrico SAHA) inhibe el crecimiento celular, induce la diferenciación terminal y previene la formación de tumores en ratones (Finnin *et al.*, Nature, 401: 188-193, 1999).
- 40 También se ha notificado que la tricostatina A es útil en el tratamiento de fibrosis, por ejemplo fibrosis hepática y cirrosis hepática. (Geerts *et al.*, solicitud de patente europea EP 0827742, publicada el 11 de marzo de 1998).
- 45 El farmacóforo para inhibidores de HDAC consiste en un dominio de unión a metal, que interacciona con el sitio activo que contiene zinc de las HDAC, un dominio de ligador y un dominio de reconocimiento de superficie o región de ocupación, que interacciona con residuos en el borde del sitio activo.
- 50 Se ha notificado también que los inhibidores de las HDAC inducen la expresión del gen p21. La activación transcripcional del gen p21 por estos inhibidores se promueve mediante modificación de cromatina, seguido por acetilación de histonas H3 y H4 en la región del promotor de p21. Esta activación de p21 se produce de manera independiente de p53 y por tanto los inhibidores de HDAC funcionan en células con genes p53 mutados, un distintivo de numerosos tumores.
- 55 Además, los inhibidores de HDAC pueden tener actividades indirectas tales como un aumento de la respuesta inmunitaria del huésped e inhibición de la angiogénesis tumoral y por tanto pueden suprimir el crecimiento de tumores primarios e impedir la metástasis (Mai *et al.*, Medicinal Research Reviews, 25: 261-309, 2005).
- 60
- 65

En vista de lo anterior, los inhibidores de HDAC pueden tener gran potencial en el tratamiento de enfermedades o estados proliferativos celulares, incluyendo tumores con genes p53 mutados.

5 La solicitud de patente EP 1472216 publicada el 14 de agosto de 2003 da a conocer hidroxamatos bicíclicos como inhibidores de histona desacetilasa.

10 Las solicitudes de patente EP 1485099, EP 1485348, EP 1485353, EP 1485354, EP 1485364, EP 1485365, EP 1485370, EP 1485378 publicadas el 18 de septiembre de 2003, entre otras, dan a conocer ácidos piperazinilpirimidinilhidroxámicos sustituidos como inhibidores de histona desacetilasa, además el documento EP 1485365 da a conocer R306465.

15 La solicitud de patente EP 1492534 publicada el 9 de octubre de 2003 da a conocer compuestos de ácido carbámico que comprenden un enlace de piperazina, como inhibidores de HDAC. La solicitud de patente EP 1495002 publicada el 23 de octubre de 2003 da a conocer compuestos de piperazinilfenilbenzamida sustituidos, como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente EP 1501508 publicada el 13 de noviembre de 2003 da a conocer benzamidas como inhibidores de histona desacetilasas.

20 La solicitud de patente WO 04/009536 publicada el 29 de enero de 2004 da a conocer derivados que contienen un grupo conector alquilo entre el grupo arilo y el hidroxamato, como inhibidores de histona desacetilasas.

25 La solicitud de patente EP 1525199 publicada el 12 de febrero de 2004 da a conocer hidroxamatos bicíclicos sustituidos con (hetero)arilalquenilo, como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente EP 1572626 publicada el 24 de junio de 2004 da a conocer derivados de (2-amino-fenil)-amida de ácido arilen-carboxílico, como agentes farmacológicos.

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

La solicitud de patente EP 1585735 publicada el 29 de julio de 2004 da a conocer derivados de hidroxamato de arilo sustituidos como inhibidores de histona desacetilasas.

35 La solicitud de patente EP 1592667 publicada el 19 de agosto de 2004 da a conocer derivados de O-fenilendiaminas monoaciladas como agentes farmacológicos.

40 La solicitud de patente EP 1590340 publicada el 19 de agosto de 2004 da a conocer derivados de diaminofenileno como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente EP 1592665 publicada el 26 de agosto de 2004 da a conocer derivados de benzamida como inhibidores de histona desacetilasas.

45 La solicitud de patente WO 04/072047 publicada el 26 de agosto de 2004 da a conocer indoles, benzimidazoles y naftimidazoles como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente EP 1608628 publicada el 30 de septiembre de 2004 da a conocer hidroxamatos unidos a sistemas de anillo heterocíclico no aromático como inhibidores de histona desacetilasas.

50 La solicitud de patente EP 1613622 publicada el 14 de octubre de 2004 da a conocer derivados de oxima como inhibidores de histona desacetilasas.

55 La solicitud de patente EP 1611088 publicada el 28 de octubre de 2004 da a conocer derivados de hidroxamato como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente WO 05/028447 publicada el 31 de marzo de 2005 da a conocer benzimidazoles como inhibidores de histona desacetilasas.

60 Las solicitudes de patente WO 05/030704 y WO 05/030705 publicadas el 7 de abril de 2005 dan a conocer benzamidas como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente WO 05/040101 publicada el 6 de mayo de 2005 da a conocer hidroxamatos conectados a acilurea y conectados a sulfonilurea como inhibidores de histona desacetilasas.

65 La solicitud de patente WO 05/040161 también publicada el 6 de mayo de 2005 da a conocer hidroxamatos unidos a biarilo como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente WO 05/075469 publicada el 18 de agosto de 2005 da a conocer ácidos tiazolilhidroxámicos y ácidos tiadiazolilhidroxámicos como inhibidores de histona desacetilasas.

- 5 La solicitud de patente WO 05/086898 publicada el 22 de septiembre de 2005 da a conocer ácidos hidroxámicos heteropentacíclicos como inhibidores de histona desacetilasas.

La solicitud de patente WO 05/092899 publicada el 6 de octubre de 2005 da a conocer alquenilbenzamidas como histona desacetilasas. Los compuestos de la presente invención difieren de la técnica anterior en estructura, en su actividad farmacológica y/o potencia farmacológica.

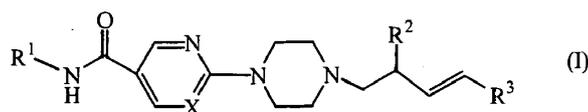
El problema que debe solucionarse es proporcionar inhibidores de histona desacetilasas con alta actividad celular y enzimática que tengan una biodisponibilidad y/o potencia *in vivo* aumentadas.

- 15 Los compuestos novedosos de la presente invención solucionan el problema descrito anteriormente. Los compuestos de la presente invención pueden mostrar una excelente actividad celular y enzimática que inhibe las histona desacetilasas. Igualmente, los compuestos pueden tener una elevada capacidad para activar el gen p21, a nivel tanto celular como *in vivo*. Pueden tener un perfil farmacocinético deseable y baja afinidad por las enzimas P450, lo que reduce el riesgo de interacción fármaco-fármaco adversa permitiendo también un mayor margen de seguridad.

Las características ventajosas de los presentes compuestos son la estabilidad metabólica y/o la capacidad de inducción de p21. Más en particular, los compuestos de la presente invención tienen una estabilidad aumentada en microsomas de hígado humano y/o tienen capacidades inductoras del promotor de p21 *in vivo* potenciadas.

25

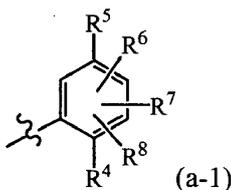
Esta invención se refiere a compuestos de fórmula (I):



- 30 las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, en la que

X es N o CH;

- 35 R¹ es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1)



en la que

40

R⁴ es hidroxilo o amino;

R⁵ es hidrógeno, tienilo, furanilo o fenilo y cada tienilo, furanilo o fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos halógeno, amino, nitro, ciano, hidroxilo, fenilo, alquilo C₁₋₆, (dialquilo C₁₋₆)amino, alquiloxilo C₁₋₆, fenilalquiloxilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, hidroxicarbonilo, alquilcarbonilo C₁₋₆, polihaloalquiloxilo C₁₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, alquilsulfonilo C₁₋₆, hidroxicarbonilalquilo C₁₋₆, alquilcarbonilamino C₁₋₆, aminosulfonilo, aminosulfonilalquilo C₁₋₆, isoxazolilo, aminocarbonilo, fenilalquenilo C₂₋₆, fenilalquinilo C₃₋₆ o piridinilalquinilo C₃₋₆;

45

R⁶, R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente hidrógeno, amino, nitro, furanilo, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquiloxilo C₁₋₆, trifluorometilo, tienilo, fenilo, alquilcarbonilamino C₁₋₆, aminocarbonilalquilo C₁₋₆ o -C≡C-CH₂-R⁹;

50

en el que R⁹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, hidroxilo, amino o alquiloxilo C₁₋₆;

55

R² es amino, alquilamino C₁₋₆, arilalquilamino C₁₋₆, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, cicloalquilamino C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilamino C₁₋₆, glutarimidilo, maleimidilo, ftalimidilo, succinimidilo, hidroxilo, alquiloxilo C₁₋₆,

feniloxilo, estando el resto fenilo en dicho grupo feniloxilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, ciano, alquiloxicarbonilo C₁₋₆ y trifluorometilo;

5 R³ es fenilo, naftalenilo o heterociclilo; en el que

10 cada uno de dichos grupos fenilo o naftalenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, arilo, hidroxilo, ciano, amino, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, hidroxicarbonilo, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquioximetilo C₁₋₆, aminometilo, alquilaminometilo C₁₋₆, alquilcarbonilaminometilo C₁₋₆, alquilsulfonilaminometilo C₁₋₆, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo C₁₋₆ y heterociclilo;

15 arilo es fenilo o naftalenilo; estando cada uno de dichos grupos fenilo o naftalenilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, trifluorometilo, ciano e hidroxicarbonilo; y

20 heterociclilo es furanilo, tienilo, pirrolilo, pirrolinilo, piroldinilo, dioxolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, imidazolínilo, imidazolidinilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, piranilo, piridinilo, piperidinilo, dioxanilo, morfolinilo, ditianilo, tiomorfolinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piperazinilo, triazinilo, tritiano, indolizínilo, indolilo, indolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indazolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, quinolizínilo, quinolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo o naftiridinilo; estando

25 cada uno de dicho grupos heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, ciano, amino y mono- o di(alquil C₁₋₄)amino.

30 El término "inhibidor de histona desacetilasas" o "inhibidor de histona desacetilasa" se usa para identificar un compuesto, que puede interactuar con una histona desacetilasa e inhibir su actividad, más particularmente su actividad enzimática. Inhibir la actividad enzimática de histona desacetilasa significa reducir la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona. Preferiblemente, tal inhibición es específica, es decir el inhibidor de histona desacetilasa reduce la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir algún otro efecto biológico no relacionado.

35 Tal como se usa en las definiciones anteriores y a continuación en el presente documento, halógeno es genérico para flúor, cloro, bromo y yodo; alquilo C₁₋₂ radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal que tienen 1 ó 2 átomos de carbono tales como, por ejemplo metilo o etilo; alquilo C₁₋₆ define alquilo C₁₋₂ y radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal y ramificada que tienen de 3 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo propilo, butilo, 1-metiletilo, 2-metilpropilo, pentilo, 2-metil-butilo, hexilo, 2-metilpentilo y similares; polihaloalquilo C₁₋₆ define alquilo C₁₋₆ que contiene tres sustituyentes de halógeno idénticos o diferentes por ejemplo trifluorometilo; alqueno C₂₋₆ define radicales hidrocarbonados de cadena lineal y ramificada que contienen un doble enlace y tienen de 2 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, etenilo, 2-propenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 3-metil-2-butenilo y similares; alquino C₃₋₆ define radicales hidrocarbonados de cadena lineal y ramificada que contienen un triple enlace y que tienen de 3 a 6 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, 2-propinilo, 3-butinilo, 2-butinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 3-hexinilo y similares; cicloalquilo C₃₋₇ incluye grupos hidrocarbonados cíclicos que tienen de 3 a 7 carbonos, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexinilo, cicloheptilo y similares.

50 Las sales de adición farmacéuticamente aceptables abarcan sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y sales de adición de base farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, pretenden comprender las formas de sal de adición de ácido no tóxicas terapéuticamente activas que pueden formar los compuestos de fórmula (I). Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades básicas pueden convertirse en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables tratando dicha forma de base con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálidos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico; ácidos sulfúrico; nítrico; fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, trifluoroacético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-amino-salicílico, pamoico y similares. Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades ácidas pueden convertirse en sus sales de adición de base farmacéuticamente aceptables tratando dicha forma de ácido con una base orgánica o inorgánica adecuada. Las formas de sal de base apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metal alcalino y alcalinotérreo, por ejemplo las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, por ejemplo la benzatina, *N*-metil-D-glucamina, sales de hidrabamina y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término “sales de adición de ácido o base” también comprende los hidratos y las formas de adición de disolvente que pueden formar los compuestos de fórmula (I). Ejemplos de tales formas son por ejemplo hidratos, alcoholatos y similares.

5 El término “formas estereoquímicamente isoméricas de compuestos de fórmula (I)”, tal como se usa en el presente documento, define todos los posibles compuestos constituidos por los mismos átomos unidos mediante la misma secuencia de enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables, que pueden presentar los compuestos de fórmula (I). A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación
10 química de un compuesto abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles que puede presentar dicho compuesto. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de fórmula (I) tanto en forma pura como en mezcla entre sí pretenden abarcarse dentro del alcance de la presente invención.

15 Las formas de *N*-óxido de los compuestos de fórmula (I) pretenden comprender los compuestos de fórmula (I) en la que uno o varios átomos de nitrógeno se oxidan para dar el denominado *N*-óxido, particularmente los *N*-óxidos en los que uno o más de los nitrógenos de piperidina, piperazina o piridazinilo están *N*-oxidados.

20 Algunos de los compuestos de fórmula (I) también pueden existir en sus formas tautoméricas. Tales formas aunque no se indican explícitamente en la fórmula anterior pretenden incluirse dentro del alcance de la presente invención.

Siempre que se use a continuación en el presente documento, el término “compuestos de fórmula (I)” pretende incluir además las sales de adición farmacéuticamente aceptables y todas las formas estereoisoméricas.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos “histona desacetilasa” y “HDAC” pretenden referirse a una cualquiera de una familia de enzimas que eliminan grupos acetilo de los grupos ϵ -amino de residuos de lisina en el extremo N-terminal de una histona. A menos que se indique lo contrario por contexto, el término “histona” pretende referirse a cualquier proteína de histona, incluyendo H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5, de cualquier especie. Las proteínas o productos génicos de HDAC humanos, incluyen, pero no se limitan a, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9, HDAC-10 y HDAC-11. La histona desacetilasa también puede derivarse a partir de una fuente protozoaria o fúngica.

35 Un primer grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que R¹ es hidroxilo.

Un segundo grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en la que R⁵ es distinto de hidrógeno.

40 Un tercer grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en los que es aplicable una o más de las siguientes restricciones:

a) X es N;

45 b) R¹ es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1) en la que R⁴ es amino, R⁵ es hidrógeno o tienilo y R⁶, R⁷ y R⁸ son cada uno hidrógeno;

c) R² es amino, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, ftalimidilo, succinimidilo o feniloxilo, estando el resto fenilo en dicho grupo feniloxilo opcionalmente sustituido con un sustituyente halógeno (por ejemplo fluoro); y

50 d) R³ es fenilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆ y polihaloalquilo C₁₋₆.

Un cuarto grupo de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en los que es aplicable una o más de las siguientes restricciones:

55 a) X es N;

b) R¹ es hidroxilo;

60 c) R² es amino, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, ftalimidilo, succinimidilo o feniloxilo, estando el resto fenilo en dicho grupo feniloxilo opcionalmente sustituido con un sustituyente halógeno (por ejemplo fluoro); y

d) R³ es fenilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆ y polihaloalquilo C₁₋₆.

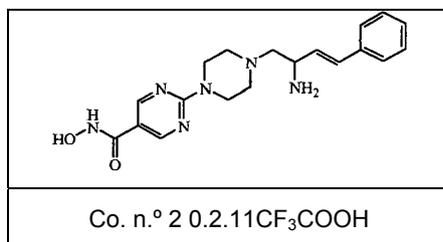
65 Un grupo adicional de compuestos interesantes consiste en los compuestos de fórmula (I) en los que R³ es fenilo o

naftalenilo, estando cada uno de dichos grupos fenilo o naftalenilo sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, arilo, hidroxilo, ciano, amino, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, hidroxicarbonilo, alquioxicarbonilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquioximetilo C₁₋₆, aminometilo, alquilaminometilo C₁₋₆, alquilcarbonilaminometilo C₁₋₆, alquilsulfonilaminometilo C₁₋₆, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo C₁₋₆ y heterociclilo.

Un grupo de compuestos preferidos consiste en los compuestos de fórmula (I) en los que es aplicable una o más de las siguientes restricciones:

- 10 a) X es N;
- b) R¹ es hidroxilo;
- 15 c) R² es amino; y
- d) R³ es fenilo opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado de halógeno, preferiblemente fluoro, y alquioxilo C₁₋₆, preferiblemente metoxilo.

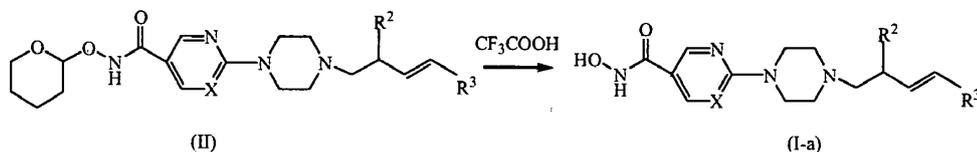
20 Un compuesto especialmente preferido de fórmula (I) es el compuesto n.º 2 al que se hace referencia a continuación:



25 Los compuestos de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables y *N*-óxidos y formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos pueden prepararse de manera convencional. Los materiales de partida y algunos de los productos intermedios son compuestos conocidos y están comercialmente disponibles o pueden prepararse según procedimientos de reacción convencionales como se conocen generalmente en la técnica o tal como se describen en las solicitudes de patente EP 1485099, EP 1485348, EP 1485353, EP 1485354, EP 1485364, EP 1485365, EP 1485370 y EP 1485378. A continuación en el presente documento se describirán algunos métodos de preparación en más detalle. En los ejemplos se describen otros métodos para obtener compuestos finales de fórmula (I).

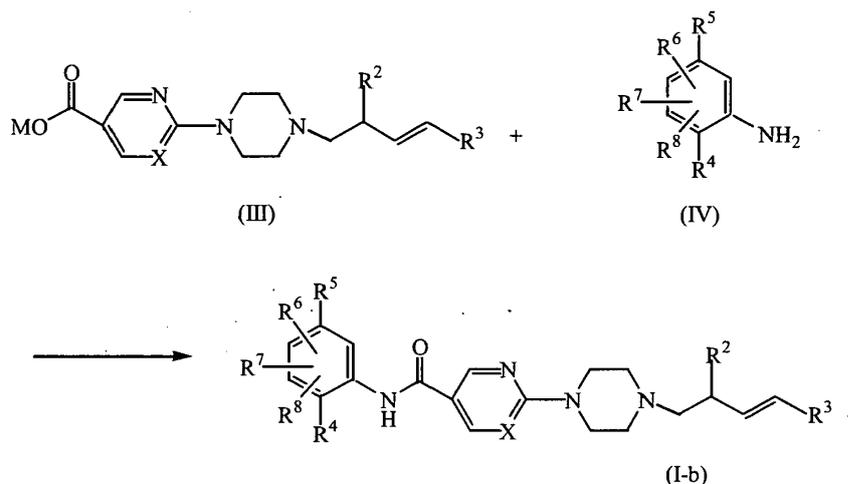
30 A continuación se describen procedimientos específicos para la preparación de los compuestos de fórmula (I):

35 a) Los ácidos hidroxámicos de fórmula (I), en la que R¹ es hidroxilo, denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-a), pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (II), con un ácido apropiado, tal como por ejemplo, ácido trifluoroacético. Dicha reacción se realiza en un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, metanol o diclorometano.

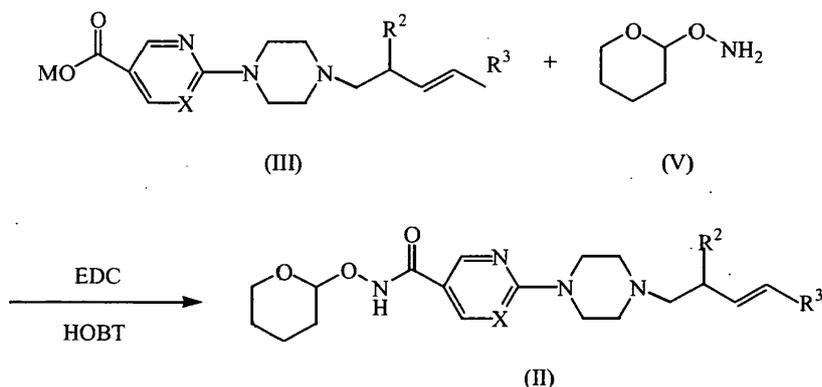


40 b) Los compuestos de fórmula (I), en la que R¹ es un radical de fórmula (a-1), denominados en el presente documento compuestos de fórmula (I-b), pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (III) en la que M representa hidrógeno o un metal alcalino por ejemplo sodio o litio, con un producto intermedio de fórmula (IV), en presencia de reactivos apropiados tal como por ejemplo hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP). La reacción puede realizarse en presencia de una base tal como trietilamina, en un disolvente adecuado, tal como, por ejemplo, una mezcla de diclorometano y tetrahidrofurano.

45

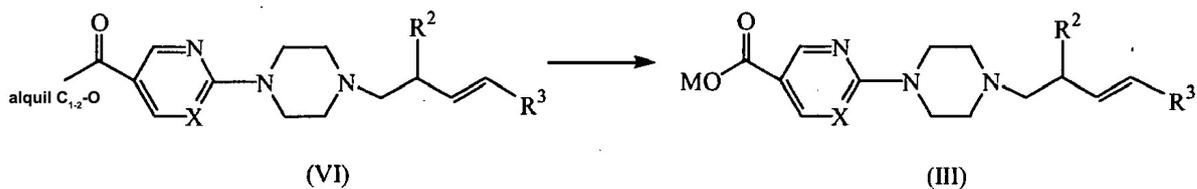


5 Los productos intermedios de fórmula (II) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (III) con un producto intermedio de fórmula (V) en presencia de reactivos apropiados tales como monoclóhidrato de *N*-(etilcarbonimidóil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina (EDC) y 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (HOBT). La reacción puede realizarse en presencia de una base tal como trietilamina, en un disolvente adecuado tal como una mezcla de diclorometano y tetrahidrofurano.

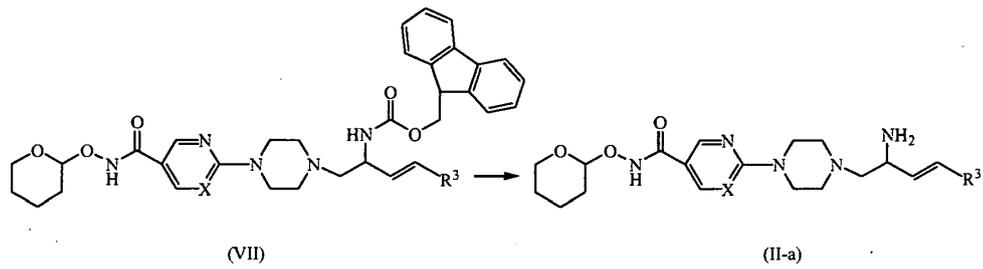


10 Los compuestos de fórmula (I) también pueden convertirse unos en otros mediante transformaciones de grupo funcional o reacciones conocidas en la técnica, dependiendo de la sensibilidad de otros grupos en la molécula, por ejemplo hidrólisis de ésteres carboxílicos para dar el alcohol o ácido carboxílico correspondiente; los alcoholes pueden convertirse en ésteres y éteres; las aminas primarias pueden convertirse en aminas secundarias o terciarias; las aminas primarias o secundarias pueden convertirse en amidas o sulfonamidas; un radical yodo en un grupo fenilo puede convertirse en un grupo éster mediante inserción de monóxido de carbono en presencia de un catalizador de paladio adecuado.

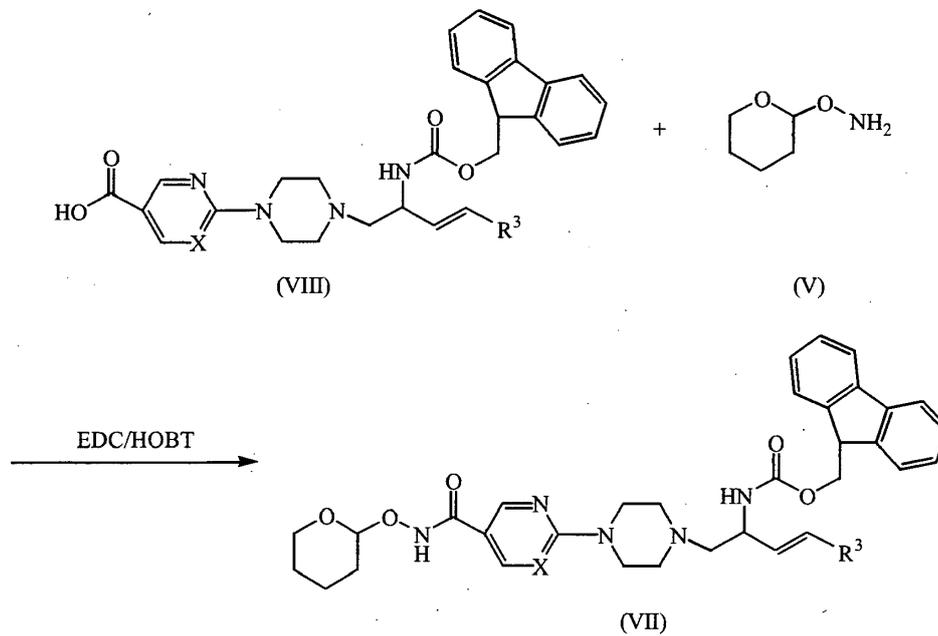
20 Los productos intermedios de fórmula (III) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (VI) con una disolución ácida apropiada, por ejemplo ácido clorhídrico, o una base de metal alcalino apropiada, por ejemplo hidróxido de sodio, en un disolvente adecuado por ejemplo un alcohol tal como etanol o propanol, o THF.



25 Los productos intermedios de fórmula (II), en la que R² es amino, denominados en el presente documento productos intermedios de fórmula (II-a), pueden prepararse haciendo reaccionar el producto intermedio de fórmula (VII) con piperidina en un disolvente adecuado, por ejemplo diclorometano.

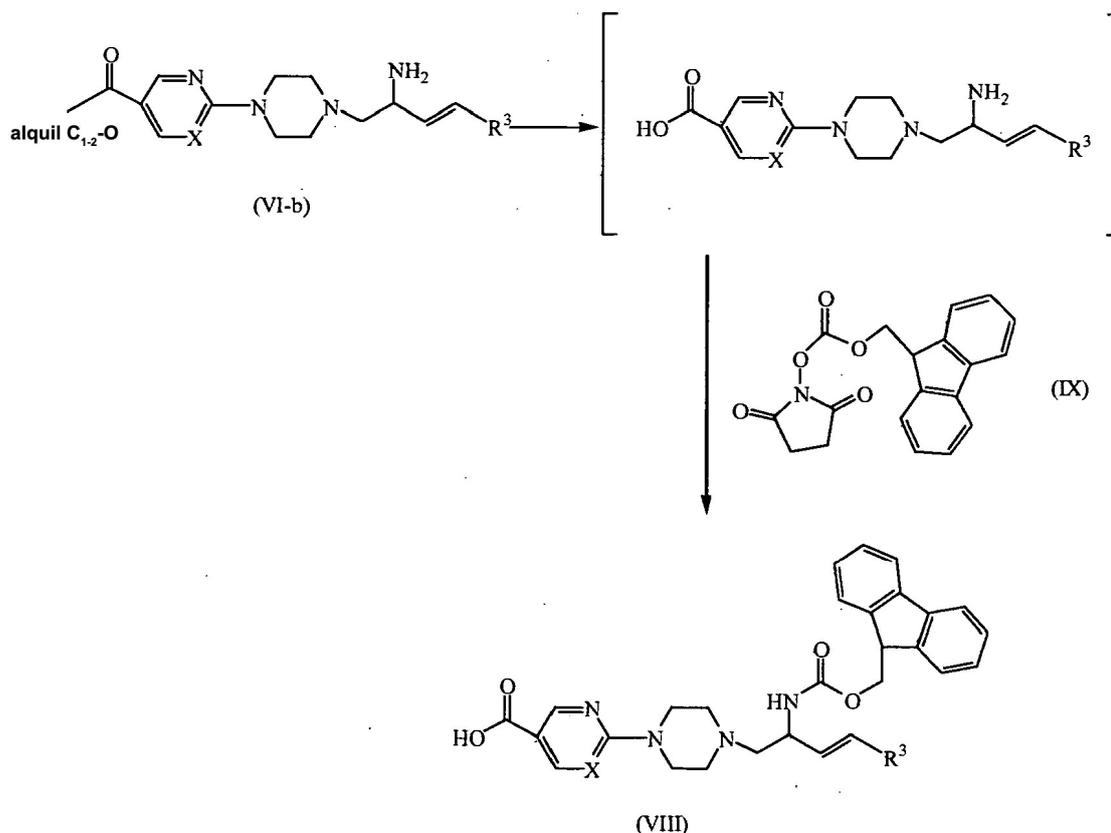


5 Los productos intermedios de fórmula (VII) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (VIII) con un producto intermedio de fórmula (V), en presencia de reactivos apropiados tales como monoclóhidrato de *N*-(etilcarbonimidóil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina (EDC) y 1-hidróxi-1*H*-benzotriazol (HOBT). La reacción puede realizarse en presencia de una base tal como trietilamina, en un disolvente adecuado tal como una mezcla de diclorometano y tetrahidrofurano.



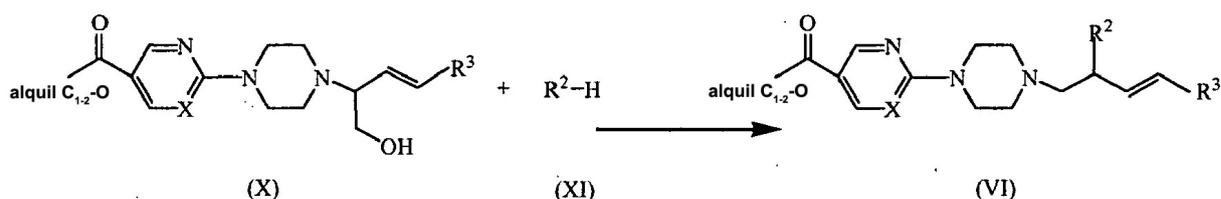
10 Los productos intermedios de fórmula (VIII) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (VI-b) con hidróxido de sodio, en un disolvente adecuado, tal como tetrahidrofurano, seguido por neutralización con ácido clorhídrico, adición de carbonato de sodio y adición de un producto intermedio de fórmula (IX).

15



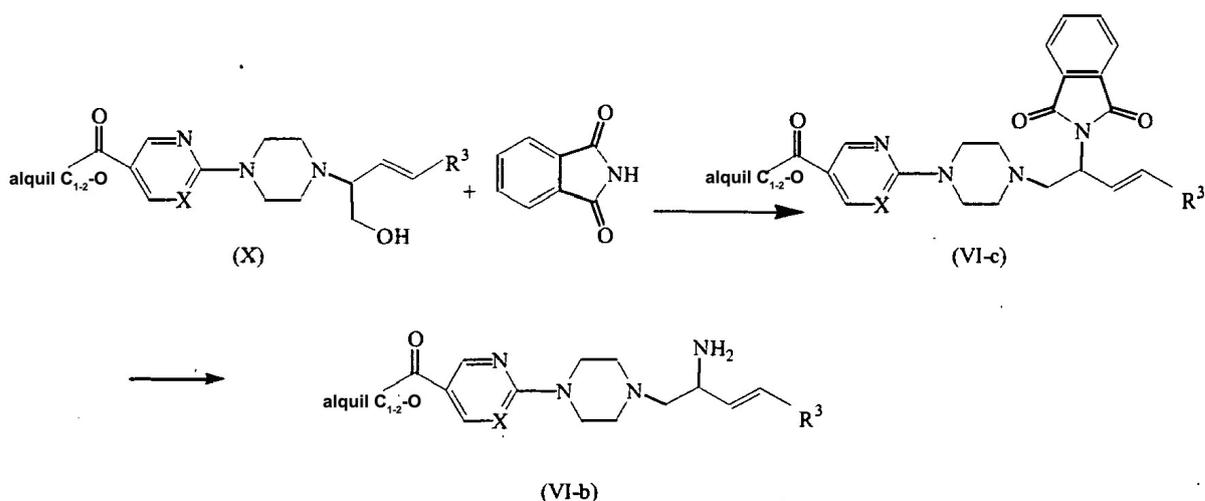
Los productos intermedios de fórmula (VI), en la que R² es un grupo alquilcarbonilamino C₁₋₆, pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (VI-b) con un agente acilante de alquilo C₁₋₆ apropiado tal como un haluro, por ejemplo un cloruro, en presencia de una base tal como trietilamina, en un disolvente adecuado, por ejemplo diclorometano.

Los productos intermedios novedosos de fórmula (VI) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (X) con azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD), tri-*n*-butilfosfina (PBU₃) y un nucleófilo apropiado R²H (XI) en un disolvente adecuado tal como diclorometano.

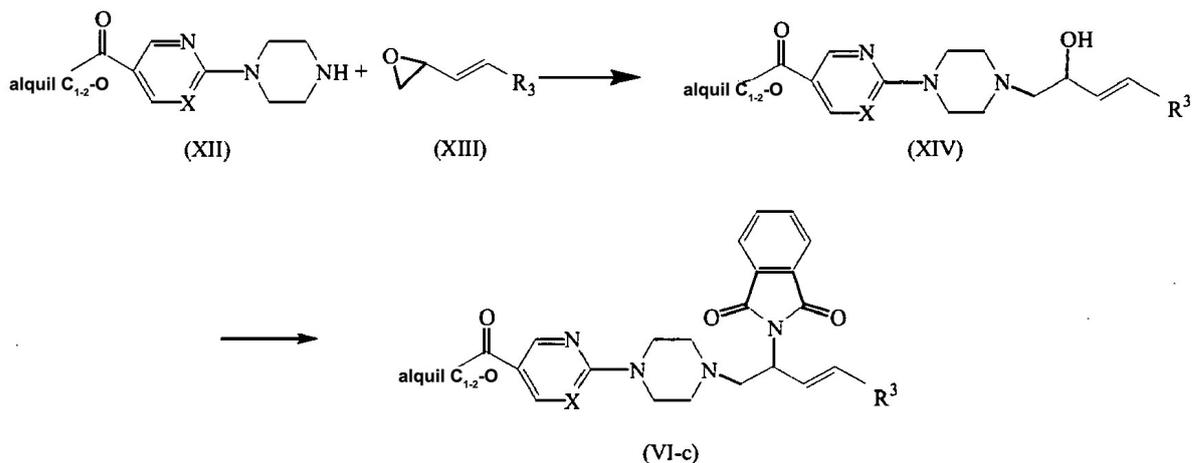


Un compuesto de fórmula (VI) en la que R² es un grupo feniloxilo opcionalmente sustituido puede prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (X) con un compuesto de fenol opcionalmente sustituido correspondiente. Un compuesto de fórmula (VI), en la que R² es un grupo ftalimidilo, también puede prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (X) con ftalimida. Alternativamente, un compuesto de fórmula (VI) en la que R² es un grupo succinimidilo puede prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (X) con succinimida.

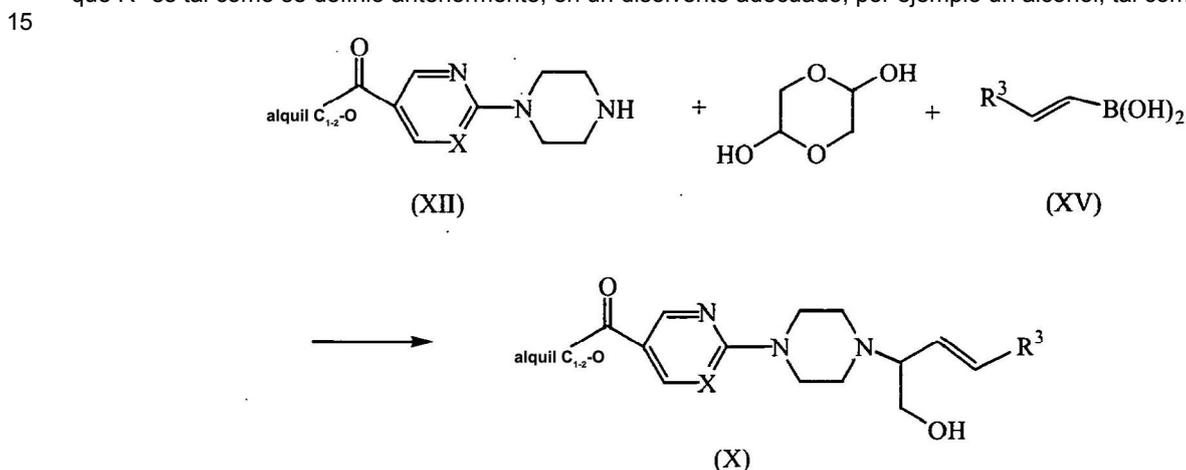
Los productos intermedios anteriores de fórmula (VI-b) pueden prepararse, (a) haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (X) con azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD), tri-*n*-butilfosfina (PBU₃) y ftalimida en un disolvente adecuado tal como diclorometano para formar un producto intermedio de fórmula (VI-c); y (b) haciendo reaccionar el producto intermedio resultante de fórmula (VI-c) con hidrazina monohidratada en un disolvente adecuado tal como etanol.



5 Alternativamente, los productos intermedios de fórmula (VI-c) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (XII) con un epóxido apropiado de fórmula (XIII) preparado según el procedimiento descrito en Synlett, 2002 (8) 1265-1268, en un disolvente adecuado tal como por ejemplo THF, para formar un producto intermedio de fórmula (XIV) que luego puede convertirse en un producto intermedio de fórmula (VI-c) tras reacción con azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD), tri-*n*-butilfosfina (PBU₃) y ftalimida en un disolvente adecuado tal como diclorometano.

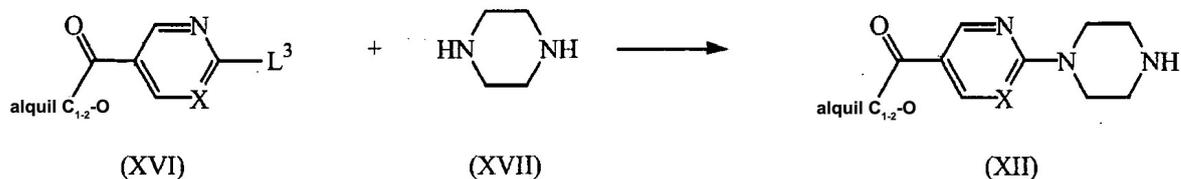


10 Los productos intermedios novedosos de fórmula (X) pueden prepararse en una única etapa, haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (XII) con 1,4-dioxan-2,5-diol y un ácido borónico apropiado de fórmula (XV), en la que R³ es tal como se definió anteriormente, en un disolvente adecuado, por ejemplo un alcohol, tal como etanol.



Los productos intermedios de fórmula (XII) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de

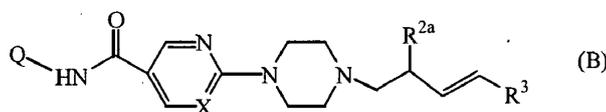
fórmula (XVI) en la que L^3 es un grupo saliente tal como un grupo organosulfonilo, por ejemplo un grupo metanosulfonilo, con piperazina (XVII) en presencia de una base tal como carbonato de potasio, en un disolvente adecuado, por ejemplo acetonitrilo.



5

La presente invención también se refiere a productos intermedios de fórmulas (II), (III), (VI) y (X) anteriores, denominados colectivamente compuestos de fórmula (B) en la que Q es alquiloxicarbonilo C_{1-2} , MO_2C (en el que M es hidrógeno o un metal alcalino) o tetrahidropiraniioxiaminocarbonilo, R^{2a} es tal como se definió para R^2 o alternativamente es hidroximetilo y X y R^3 son tal como se definieron para la fórmula (I), y las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos.

10



15 Pueden definirse grupos de compuestos interesantes, preferidos, más preferidos y los más preferidos para los productos intermedios anteriores según los grupos definidos para los compuestos de fórmula (I).

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

20

Los compuestos de fórmula (I) tal como se preparan en los procesos descritos anteriormente en el presente documento son generalmente mezclas racémicas de enantiómeros, que pueden separarse entre sí siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I) pueden convertirse en las formas de sal diastereoméricas correspondientes mediante reacción con un ácido quiral adecuado. Dichas formas de sal diastereoméricas se separan posteriormente, por ejemplo, mediante cristalización selectiva o fraccionada y los enantiómeros se liberan de la misma mediante álcali. Una manera alternativa para separar las formas enantioméricas de los compuestos de fórmula (I) implica cromatografía de líquidos usando una fase estacionaria quiral. Dichas formas estereoquímicamente isoméricas puras también pueden derivarse de las formas estereoquímicamente isoméricas puras correspondientes de los materiales de partida apropiados, siempre que la reacción se produzca de manera estereoespecífica. Preferiblemente si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizaría mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

25

30

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y formas estereoisoméricas de los mismos tienen propiedades farmacológicas valiosas ya que tienen un efecto inhibitor de histona desacetilasa (HDAC).

35

También se describe un método para inhibir el crecimiento anómalo de células, incluyendo células transformadas, mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. El crecimiento anómalo de células se refiere al crecimiento celular independiente de mecanismos reguladores normales (por ejemplo pérdida de inhibición de contacto). Esto incluye la inhibición del crecimiento tumoral tanto directamente provocando detención del crecimiento, diferenciación terminal y/o apoptosis de células cancerosas, como indirectamente, inhibiendo la neovascularización de tumores.

40

También se describe un método para inhibir el crecimiento tumoral mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesita dicho tratamiento. En particular, esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de tumores mediante la administración de una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención. Ejemplos de tumores que pueden inhibirse son, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (por ejemplo adenocarcinoma e incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas), cánceres pancreáticos (por ejemplo carcinoma pancreático tal como, por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino), cánceres de colon (por ejemplo carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer de próstata incluyendo la enfermedad avanzada, tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico (por ejemplo leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielógena aguda (LMA)), cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (SMD), tumores de origen mesenquimatoso (por ejemplo fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo cáncer de mama avanzado),

50

55

carcinoma de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico.

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

- 5 a) la sensibilización de tumores frente a radioterapia administrando el compuesto según la invención antes, durante o tras la irradiación del tumor para tratar el cáncer;
- b) tratar artropatías y estados osteopatológicos tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, gota, poliartritis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y lupus eritematoso sistémico;
- 10 c) inhibir la proliferación celular de músculo liso incluyendo trastornos proliferativos vasculares, aterosclerosis y reestenosis;
- d) tratar estados inflamatorios y estados dérmicos tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, rinitis alérgica, enfermedad de injerto contra huésped, conjuntivitis, asma, SDRA, enfermedad de Behcet, rechazo de trasplantes, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, escleroderma, exantema, eczema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis quística y bronquitis crónica;
- 15 e) tratar endometriosis, mioma uterino, sangrado uterino disfuncional e hiperplasia endometrial;
- f) tratar la vascularización ocular incluyendo vasculopatía que afecta a los vasos retinianos y coroidales;
- g) tratar una disfunción cardíaca;
- 25 h) inhibir estados inmunosupresores tales como el tratamiento de infecciones por VIH;
- i) tratar la disfunción renal;
- 30 j) suprimir los trastornos endocrinos;
- k) inhibir la disfunción de gluconeogénesis;
- l) tratar una neuropatología por ejemplo enfermedad de Parkinson o una neuropatología que da como resultado un trastorno cognitivo, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o enfermedades neuronales relacionadas con poliglutamina;
- 35 m) tratar trastornos psiquiátricos por ejemplo esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, ansiedad y psicosis;
- 40 n) inhibir una patología neuromuscular, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica;
- o) tratar la atrofia muscular espinal;
- p) tratar otros estados patológicos susceptibles de tratamiento potenciando la expresión de un gen;
- 45 q) potenciar la terapia génica;
- r) inhibir la adipogénesis;
- 50 s) tratar parasitosis tal como malaria.

Por tanto, la presente invención da a conocer los compuestos de fórmula (I) para su uso como medicamento así como el uso de estos compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar uno o más de los estados mencionados anteriormente.

55 Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y formas estereoisoméricas de los mismos pueden tener propiedades de diagnóstico valiosas ya que pueden usarse para detectar o identificar una HDAC en una muestra biológica que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto marcado y una HDAC.

60 Los métodos de detección o identificación pueden usar compuestos que están marcados con agentes de marcaje tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc. Los ejemplos de los radioisótopos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C . Las enzimas habitualmente se hacen detectables mediante conjugación de un sustrato apropiado que a su vez cataliza una reacción detectable. Los ejemplos del mismo incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa, preferiblemente peroxidasa del rábano. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina,

65

ecuatorina y luciferasa.

Las muestras biológicas pueden definirse como tejido corporal o fluidos corporales. Ejemplos de fluidos corporales son líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero, orina, esputo, saliva y similares.

5 En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los compuestos objeto pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto particular, en forma de sal de adición de ácido o base, como principio activo se combina en mezcla profunda con un vehículo farmacéuticamente aceptable, pudiendo adoptar dicho vehículo una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas están de manera deseable en una forma de dosificación unitaria adecuada, preferiblemente, para la administración por vía oral, por vía rectal, por vía percutánea o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y disoluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos.

20 Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de dosificación unitaria oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros componentes, para ayudar a la solubilidad por ejemplo. Pueden prepararse disoluciones inyectables, por ejemplo, en las que el vehículo comprende solución salina, disolución de glucosa o una mezcla de solución salina y disolución de glucosa. También pueden prepararse suspensiones inyectables, en cuyo caso pueden emplearse vehículos líquidos, agentes de suspensión y similares apropiados. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no provocan un efecto perjudicial significativo para la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse de diversas maneras, por ejemplo, como parche transdérmico, como formulación de vertido en la cruz o como pomada.

35 Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de dosificación unitaria por la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas de dosificación unitarias son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de las mismas. Los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente la cantidad eficaz a partir de los resultados de prueba presentados a continuación en el presente documento. En general se contempla que una cantidad terapéuticamente eficaz sería de desde 0,005 mg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal, y en particular desde 0,005 mg/kg hasta 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis en intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis pueden formularse como formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de 0,5 a 500 mg, y en particular de 10 mg a 500 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria.

50 Como otro aspecto de la presente invención se prevé una combinación de un inhibidor de HDAC con otro agente anticancerígeno, especialmente para su uso como medicamento, más específicamente en el tratamiento de cáncer o enfermedades relacionadas.

Para el tratamiento de los estados anteriores, los compuestos de la invención pueden emplearse ventajosamente en combinación con uno o más de otros agentes medicinales, más particularmente, con otros agentes anticancerígenos. Ejemplos de agentes anticancerígenos son:

- 55
- compuestos de coordinación de platino por ejemplo cisplatino, carboplatino u oxaliplatino;
 - compuestos de taxano por ejemplo paclitaxel o docetaxel;

60

 - inhibidores de topoisomerasa I tales como compuestos de camptotecina por ejemplo irinotecán o topotecán;
 - inhibidores de topoisomerasa II tales como derivados de podofilotoxina antitumorales por ejemplo etopósido o tenipósido;

65

 - alcaloides de la vinca antitumorales por ejemplo vinblastina, vincristina o vinorelbina;

- derivados de nucleósido antitumorales por ejemplo 5-fluorouracilo, gemcitabina o capecitabina;
 - agentes alquilantes tales como mostaza de nitrógeno o nitrosourea por ejemplo ciclofosfamida, clorambucilo, carmustina o lomustina;
- 5
- derivados de antraciclina antitumorales por ejemplo daunorubicina, doxorubicina, idarubicina o mitoxantrona;
 - anticuerpos de HER2 por ejemplo trastuzumab;
- 10
- antagonistas de receptores de estrógeno o moduladores de receptores de estrógeno selectivos por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, droloxifeno, faslodex o raloxifeno;
 - inhibidores de aromatasa tales como exemestano, anastrozol, letrozol y vorozol;
- 15
- agentes de diferenciación tales como retinoides, vitamina D y agentes de bloqueo del metabolismo de ácido retinoico (RAMBA) por ejemplo acutano;
 - inhibidores de ADN metil transferasa por ejemplo azacitidina;
- 20
- inhibidores de cinasa por ejemplo flavoperidol, mesilato de imatinib o gefitinib;
 - inhibidores de farnesil transferasa;
 - otros inhibidores de HDAC;
- 25
- inhibidores de la ruta ubiquitina-proteasoma por ejemplo Velcade; o
 - Yondelis.
- 30
- El término “compuesto de coordinación de platino” se usa en el presente documento para indicar cualquier compuesto de coordinación de platino que inhibe el crecimiento de células tumorales que proporciona platino en forma de un ión.
- 35
- El término “compuestos de taxano” indica una clase de compuestos que tienen el sistema de anillo de taxano y relacionados con o derivados de extractos de determinadas especies de árboles de tejo (*Taxus*).
- 40
- El término “inhibidores de topoisomerasa” se usa para indicar enzimas que pueden alterar la topología de ADN en células eucariotas. Son críticas para funciones celulares importantes y la proliferación celular. Existen dos clases de topoisomerasas en células eucariotas, concretamente tipo I y tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monomérica de aproximadamente 100.000 de peso molecular. La enzima se une a ADN e introduce una ruptura monocatenaria transitoria, desenrolla la doble hélice (o le permite que se desenrolle) y posteriormente sella nuevamente la ruptura antes de disociarse de la hebra de ADN. La topoisomerasa II tiene un mecanismo de acción similar que implica la inducción de rupturas de hebras de ADN o la formación de radicales libres.
- 45
- El término “compuestos de camptotecina” se usa para indicar compuestos que están relacionados con o se derivan del compuesto de camptotecina original que es un alcaloide insoluble en agua derivado del árbol chino *Camptothecin acuminata* y el árbol indio *Nothapodytes foetida*. El término “compuestos de podofilotoxina” se usa para indicar compuestos que están relacionados con o se derivan de la podofilotoxina original, que se extrae de la planta de la mandrágora.
- 50
- El término “alcaloides de la vinca antitumorales” se usa para indicar compuestos que están relacionados con o se derivan de extractos de la planta vincapervinca (*Vinca rosea*).
- 55
- El término “agentes alquilantes” abarca un grupo diverso de productos químicos que tienen la característica común de que tienen la capacidad de contribuir, en condiciones fisiológicas, con grupos alquilo a macromoléculas biológicamente vitales tal como ADN. Con la mayoría de los agentes más importantes tales como las mostazas de nitrógeno y las nitrosoureas, los restos alquilantes activos se generan *in vivo* tras reacciones de degradación complejas, algunas de las cuales son enzimáticas. Las acciones farmacológicas más importantes de los agentes alquilantes son las que alteran los mecanismos fundamentales relativos a la proliferación celular en particular síntesis de ADN y división celular. La capacidad de los agentes alquilantes para interferir con la función de ADN y la integridad en tejidos que proliferan rápidamente proporciona la base para sus aplicaciones terapéuticas y para muchas de sus propiedades tóxicas.
- 60
- 65
- El término “derivados de antraciclina antitumorales” comprende antibióticos obtenidos del hongo *Strep. peiticus var. caesius* y sus derivados, caracterizados porque tienen una estructura de anillo de tetraciclina con un azúcar no habitual, daunosamina, unido mediante un enlace glicosídico.

5 Se ha mostrado que la amplificación de la proteína del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER 2) en carcinomas de mama primarios se correlaciona con un mal pronóstico clínico para determinados pacientes. El trastuzumab es un anticuerpo anti-IgG1 kappa monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante altamente purificado que se une con alta afinidad y especificidad al dominio extracelular del receptor de HER2.

10 Muchos cánceres de mama tienen receptores de estrógeno y el crecimiento de estos tumores puede estimularse mediante estrógeno. Los términos “antagonistas de receptores de estrógeno” y “moduladores de receptores de estrógeno selectivos” se usan para indicar inhibidores competitivos de estradiol que se unen al receptor de estrógeno (RE). Los moduladores de receptores de estrógeno selectivos, cuando están unidos al RE, inducen un cambio en la forma tridimensional del receptor, modulando su unión al elemento sensible al estrógeno (ERE) en el ADN.

15 En mujeres posmenopáusicas, la fuente principal de estrógeno circulante es de la conversión de andrógenos adrenales y ováricos (androstenediona y testosterona) en estrógenos (estrone y estradiol) mediante la enzima aromatasa en tejidos periféricos. La privación de estrógeno a través de la inhibición o inactivación de aromatasa es un tratamiento eficaz y selectivo para algunas pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama dependiente de hormonas.

20 El término “agente antiestrogénico” se usa en el presente documento para incluir no sólo antagonistas de receptores de estrógeno y moduladores de receptores de estrógeno selectivos sino también inhibidores de aromatasa tal como se comentó anteriormente.

25 El término “agentes de diferenciación” abarca compuestos que pueden, de diversas maneras, inhibir la proliferación celular e inducir la diferenciación. Se conoce que la vitamina D y los retinoides desempeñan un papel principal en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares normales y malignos. Los agentes de bloqueo del metabolismo de ácido retinoico (RAMBA) aumentan los niveles de ácidos retinoicos endógenos inhibiendo el catabolismo mediado por citocromo P450 de ácidos retinoicos.

30 Los cambios de metilación del ADN están entre las anomalías más comunes en la neoplasia humana. La hipermetilación dentro de los promotores de genes seleccionados está asociada habitualmente con la inactivación de los genes implicados. El término “inhibidores de ADN metil transferasa” se usa para indicar compuestos que actúan a través de la inhibición farmacológica de ADN metil transferasa y la reactivación de la expresión del gen oncosupresor.

35 El término “inhibidores de cinasa” comprende inhibidores de cinasas potentes que están implicados en la progresión del ciclo celular y la muerte celular programada (apoptosis).

40 El término “inhibidores de farnesil transferasa” se usa para indicar compuestos que se diseñaron para impedir la farnesilación de Ras y otras proteínas intracelulares. Se ha mostrado que tienen un efecto sobre la proliferación y supervivencia de células malignas.

El término “otros inhibidores de HDAC” comprende pero no se limita a:

45 - carboxilatos por ejemplo butirato, ácido cinámico, 4-fenilbutirato o ácido valproico;

50 - ácidos hidroxámicos por ejemplo ácido suberoilanhilidahidroxámico (SAHA), piperazina que contiene análogos de SAHA, hidroxamato de biarilo A-161906 y sus análogos de carbozolid éter, tetrahidropiridina y tetralona, aril-*N*-hidroxicarboxamidas bicíclicas, piroxamida, CG-1521, PXD-101, ácido sulfonamidahidroxámico, LAQ-824, LBH-589, tricostatina A (TSA), oxamflatina, scriptaid, moléculas tricíclicas relacionadas con scriptaid, ácido *m*-carboxicinámico, ácido bishidroxámico (CBHA), ácidos hidroxámicos similares a CBHA, análogo de ácido trapoxinhidroxámico, CRA-024781, R306465 y ácidos benzoil y heteroarilhidroxámicos relacionados, aminosuberatos y malonildiamidas;

55 - tetrapéptidos cíclicos por ejemplo trapoxina, apidicina, depsipéptido, compuestos relacionados con espirucostatina, RedFK-228, tetrapéptidos cíclicos que contienen sulfhidrilo (SCOP), tetrapéptidos cíclicos que contienen ácido hidroxámico (CHAP), TAN-174s y azumamidas;

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

60 - depudecina.

El término “inhibidores de la ruta ubiquitina-proteasoma” se usa para identificar compuestos que inhiben la destrucción dirigida de proteínas celulares en el proteasoma, incluyendo proteínas reguladoras del ciclo celular.

65 Para el tratamiento de cáncer, los compuestos según la presente invención pueden administrarse a un paciente tal como se describió anteriormente, junto con irradiación. La irradiación significa radiación ionizante y en particular

radiación gamma, especialmente la emitida por aceleradores lineales o por radionúclidos que se usan de manera común hoy en día. La irradiación del tumor mediante radionúclidos puede ser externa o interna.

5 La presente invención también se refiere a una combinación según la invención de un agente anticancerígeno y un inhibidor de HDAC según la invención.

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

10 La presente invención también se refiere a una combinación según la invención para inhibir el crecimiento de células tumorales.

También se describe un método de inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto humano que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una combinación según la invención.

15 También se describe un método para inhibir el crecimiento anómalo de células, incluyendo células transformadas, administrando una cantidad eficaz de una combinación según la invención.

20 El otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo en composiciones separadas o unitarias) o secuencialmente en cualquier orden. En el último caso, los dos compuestos se administrarán dentro de un periodo y en una cantidad y manera que sea suficiente para asegurar que se logra un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el método y el orden de administración preferidos y las cantidades y regímenes de dosificación respectivos para cada componente de la combinación dependerán del otro agente medicinal e inhibidor de HDAC particular que esté administrándose, su vía de administración, el tumor particular que
25 esté tratándose y el huésped particular que esté tratándose. El método y el orden de administración óptimos y las cantidades y el régimen de dosificación pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica usando métodos convencionales y en vista de la información expuesta en el presente documento. El compuesto de coordinación de platino se administra ventajosamente en una dosificación de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 50 a 400 mg/m^2 , particularmente para cisplatino en una
30 dosificación de aproximadamente 75 mg/m^2 y para carboplatino en aproximadamente 300 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El compuesto de taxano se administra ventajosamente en una dosificación de 50 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 75 a 250 mg/m^2 , particularmente para paclitaxel en una
35 dosificación de aproximadamente 175 a 250 mg/m^2 y para docetaxel en aproximadamente de 75 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El compuesto de camptotecina se administra ventajosamente en una dosificación de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 1 a 300 mg/m^2 , particularmente para irinotecán en
40 una dosificación de aproximadamente 100 a 350 mg/m^2 y para topotecán en aproximadamente de 1 a 2 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El derivado de podofilotoxina antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 50 a 250 mg/m^2 , particularmente para etopósido en una dosificación de aproximadamente 35 a 100 mg/m^2 y para tenipósido en aproximadamente de 50 a
45 250 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El alcaloide de la vinca antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 2 a 30 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, particularmente para vinblastina en una dosificación de
50 aproximadamente 3 a 12 mg/m^2 , para vincristina en una dosificación de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 y para vinorelbina en dosificación de aproximadamente 10 a 30 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

El derivado de nucleósido antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 200 a 2500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 700 a 1500 mg/m^2 , particularmente para 5-FU en una dosificación de 200 a 500 mg/m^2 , para gemcitabina en una dosificación de aproximadamente 800 a
55 1200 mg/m^2 y para capecitabina en aproximadamente de 1000 a 2500 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

Los agentes alquilantes tales como mostaza de nitrógeno o nitrosourea se administran ventajosamente en una dosificación de 100 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 120 a
60 200 mg/m^2 , particularmente para ciclofosfamida en una dosificación de aproximadamente 100 a 500 mg/m^2 , para clorambucilo en una dosificación de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg , para carmustina en una dosificación de aproximadamente 150 a 200 mg/m^2 y para lomustina en una dosificación de aproximadamente 100 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

65 El derivado de antraciclina antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área de superficie corporal, por ejemplo de 15 a 60 mg/m^2 , particularmente para doxorubicina

en una dosificación de aproximadamente 40 a 75 mg/m², para daunorubicina en una dosificación de aproximadamente 25 a 45 mg/m² y para idarubicina en una dosificación de aproximadamente 10 a 15 mg/m² por ciclo de tratamiento.

- 5 El trastuzumab se administra ventajosamente en una dosificación de 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m²) de área de superficie corporal, particularmente de 2 a 4 mg/m² por ciclo de tratamiento.

El agente antiestrogénico se administra ventajosamente en una dosificación de aproximadamente 1 a 100 mg diariamente dependiendo del agente particular y el estado que esté tratándose. El tamoxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de 5 a 50 mg, preferiblemente de 10 a 20 mg dos veces al día, continuando el tratamiento durante tiempo suficiente para lograr y mantener un efecto terapéutico. El toremifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 60 mg una vez al día, continuando el tratamiento durante tiempo suficiente para lograr y mantener un efecto terapéutico. El anastrozol se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 1 mg una vez al día. El droloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 20-100 mg una vez al día. El raloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 60 mg una vez al día. El exemestano se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 25 mg una vez al día.

- 20 Estas dosificaciones pueden administrarse por ejemplo una vez, dos veces o más por ciclo de tratamiento, que puede repetirse por ejemplo cada 7, 14, 21 ó 28 días.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los componentes de las combinaciones según la invención, es decir, el otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Los componentes pueden formularse por separado en composiciones farmacéuticas individuales o en una composición farmacéutica unitaria que contiene ambos componentes.

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

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

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

La presente invención se refiere además a un producto que contiene como primer principio activo un inhibidor de HDAC según la invención y como segundo principio activo un agente anticancerígeno, como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

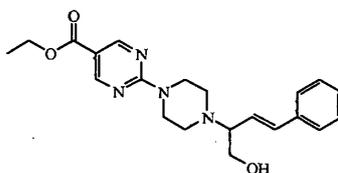
Parte experimental

A continuación en el presente documento, el término "K₂CO₃" significa carbonato de potasio, "Na₂CO₃" significa carbonato de sodio, "CH₂Cl₂" significa diclorometano, "MgSO₄" significa sulfato de magnesio, "DIPE" significa diisopropil éter, "DIAD" significa éster bis(1-metiletilico) del ácido diazenodicarboxílico, "THF" significa tetrahidrofurano, "HOBT" significa 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol, "EDC" significa monoclóhidrato de *N*-(etilcarbonimidoil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina, "EtOAc" significa acetato de etilo, "Et₃N" significa trietilamina, "NH₄OH" significa hidróxido de amonio.

A. Preparación de los productos intermedios

Ejemplo A1

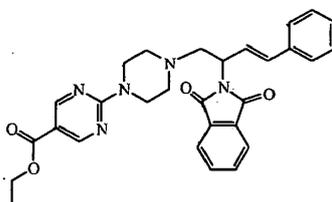
- 55 a) Preparación de producto intermedio 1



Se agitó una mezcla de ácido 2-(1-piperazinil)-5-pirimidincarboxílico, éster etílico (0,0169 mol), ácido (2-fenileténil)-borónico (0,0169 mol) y 1,4-dioxan-2,5-diol (0,0169 mol) en etanol (250 ml) durante 2 días a temperatura ambiente y luego se evaporó el disolvente (vacío). Se llevó el residuo a CH₂Cl₂ y H₂O y se separó la fase orgánica, se secó

(MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH 97/1). Se evaporaron las fracciones puras, produciendo 4 g (61%) de producto intermedio 1 (P.F.: 128°C; configuración E).

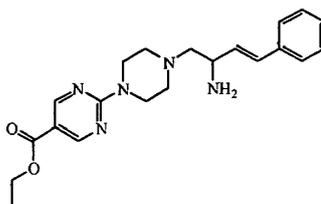
5 b) Preparación de producto intermedio 2



10 Se añadieron gota a gota tributilfosfina (0,0039 mol) luego DIAD (0,0039 mol) a 5°C a una disolución de producto intermedio 1 (0,0026 mol) y 1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (0,0039 mol) en CH₂Cl₂ (50 ml) bajo flujo de N₂. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadieron tributilfosfina (0,0039 mol) y DIAD (0,0039 mol) a 5°C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas, se vertió sobre hielo y se extrajo con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH 99/1; 15-40 μm). Se recogieron las

15 fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo: 0,84 g (52%) de producto intermedio 2 (P.F.: 50°C; configuración E).

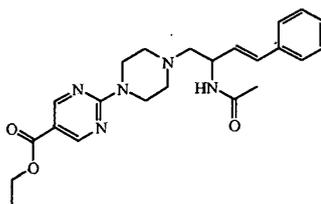
c) Preparación de producto intermedio 3



20 Se agitó una mezcla de producto intermedio 2 (0,0072 mol) y bromuro de hidrazina monohidratada (0,0021 mol) en etanol (10 ml) a 65°C durante 3 horas, luego se llevó hasta temperatura ambiente y se filtró. Se evaporó el filtrado. Se llevó el residuo a CH₂Cl₂. Se lavó la fase orgánica con H₂O, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente, produciendo: 2,7 g de producto intermedio 3 (configuración E).

25

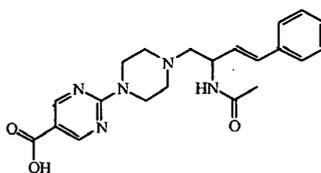
d) Preparación de producto intermedio 4



30 Se añadió gota a gota una disolución de cloruro de acetilo (0,0023 mol) en CH₂Cl₂ (1 ml) a 5°C a una disolución de producto intermedio 3 (0,0015 mol) y *N,N*-dietiletanamina (0,0031 mol) en CH₂Cl₂ (13 ml) bajo flujo de N₂. Se agitó la mezcla a 5°C durante 30 minutos, luego se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos. Se lavó la fase orgánica con H₂O, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 99/1/0,1; 10 μm). Se recogieron las

35 fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo 0,33 g (40%) de producto intermedio 4 (configuración E).

e) Preparación de producto intermedio 5

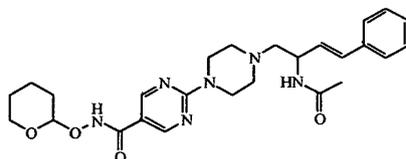


40

Se agitó una mezcla de producto intermedio 4 (0,0007 mol) e hidróxido de litio (0,0015 mol) en THF (25 ml) y H₂O (8 ml) a temperatura ambiente durante 15 horas y se acidificó mediante HCl 1 N. Se evaporó el THF. Se filtró el precipitado, se lavó con H₂O, luego con DIPE y se secó, produciendo 0,32 g (83%) de producto intermedio 5 como una sal de ácido clorhídrico (.HCl) (configuración E).

5

f) Preparación de producto intermedio 6



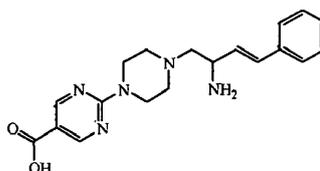
10 Se añadieron EDC (0,0011 mol) y HOBt (0,0011 mol) a temperatura ambiente a una disolución de producto intermedio 5 (0,0007 mol), O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)hidroxilamina (0,0011 mol) y *N,N*-dietiletanamina (0,0022 mol) en CH₂Cl₂/THF (50/50) (40 ml) bajo flujo de N₂. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 36 horas, se vertió en H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se cristalizó el residuo en dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,34 g (92%) de producto intermedio 6 (P.F.: 198°C; configuración E).

15

Ejemplo A2

a) Preparación de producto intermedio 7

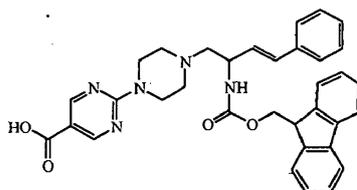
20



25 Se agitó una mezcla de producto intermedio 3 (0,0026 mol) e hidróxido de litio (0,0039 mol) en THF (30 ml) y H₂O (15 ml) a temperatura ambiente durante 15 horas, se añadió HCl 1 N hasta neutralización. Se evaporó el THF. Se filtró el precipitado, se lavó con H₂O, luego con dietil éter y se secó, produciendo: 0,9 g de producto intermedio 7 (configuración E).

25

b) Preparación de producto intermedio 8

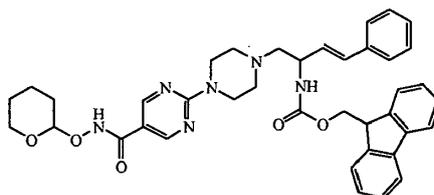


30

35 Se añadió Na₂CO₃ (0,0076 mol) a una mezcla de producto intermedio 7 (0,0025 mol) en THF (30 ml) y H₂O (30 ml). Se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se añadió en porciones 1-[[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]oxi]-2,5-pirrolidindiona (0,0025 mol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas, luego se enfrió hasta 5°C. Se añadió HCl 1 N hasta neutralización. Se evaporó el THF. Se filtró el precipitado, se lavó con H₂O, luego con dietil éter y se secó, produciendo 1,2 g (82%) de producto intermedio 8 (configuración E).

35

c) Preparación de producto intermedio 9



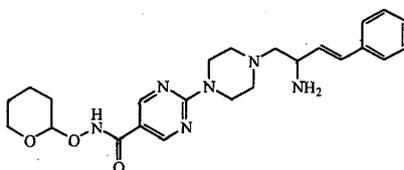
40

Se añadieron HOBt (0,0031 mol) luego EDC (0,0031 mol) a temperatura ambiente a una disolución de producto intermedio 8 (0,002 mol), O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)hidroxilamina (0,0031 mol) y *N,N*-dietiletanamina (0,0062 mol) en CH₂Cl₂/THF (50/50) (130 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas, se vertió en H₂O y se

extrajo con CH_2Cl_2 . Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 98/2; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo: 1,07 g (76%) de producto intermedio 9 (configuración E).

5

d) Preparación de producto intermedio 10

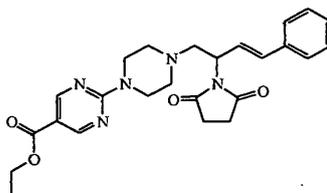


10 Se añadió piperidina (0,0039 mol) a una disolución de producto intermedio 9 (0,0012 mol) en CH_2Cl_2 (25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Se lavó la fase orgánica con H_2O , se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 96/4/0,2; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente, produciendo 0,32 g (56%) de producto intermedio 10 (configuración E).

15

Ejemplo A3

a) Preparación de producto intermedio 11

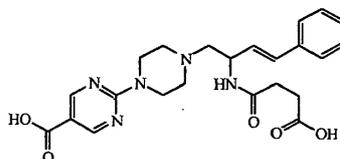


20

Se añadieron tributilfosfina (0,0047 mol) luego DIAD (0,0047 mol) a 5°C a una disolución de producto intermedio 2 (0,0015 mol) y 2,5-pirrolidindiona (0,0047 mol) en CH_2Cl_2 (30 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añadieron pirrolidindiona, tributilfosfina y DIAD. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas, se vertió sobre hielo y se extrajo con CH_2Cl_2 . Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 99/1; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 80/20; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo: 0,55 g (76%) de producto intermedio 11 (P.F.: 158°C ; configuración E).

30

b) Preparación de producto intermedio 12

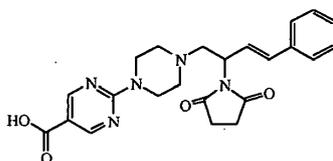


35

Se agitó una mezcla de producto intermedio 11 (0,0008 mol) e hidróxido de litio (0,0022 mol) en THF (40 ml) y H_2O (20 ml) a temperatura ambiente durante 15 horas, luego se neutralizó con HCl 3 N. Se filtró el precipitado, se lavó con H_2O , luego con dietil éter y se secó, produciendo: 0,26 g (65%) de producto intermedio 12 (configuración E).

40

c) Preparación de producto intermedio 13

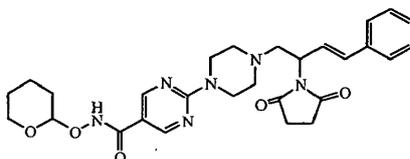


45

Se agitó una mezcla de producto intermedio 12 (0,0005 mol) en ácido acético (4 ml) a 100°C durante 7 horas. Se añadieron H_2O y hielo. Se filtró el precipitado, se lavó con H_2O , luego con dietil éter y se secó, produciendo: 0,22 g

(77%) de producto intermedio 13 (configuración E) como una sal de ácido acético (CH_3COOH).

d) Preparación de producto intermedio 14



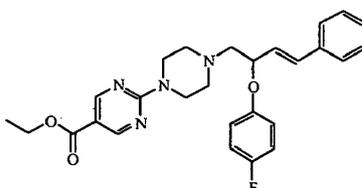
5

Se añadieron HOBt (0,0006 mol) luego EDC (0,0006 mol) a temperatura ambiente a una disolución de producto intermedio 13 (0,0004 mol), O-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)hidroxilamina (0,0006 mol) y *N,N*-dietil-etanamina (0,0017 mol) en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ (50/50) (30 ml) bajo flujo de N_2 . Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas, se vertió en H_2O y se extrajo con CH_2Cl_2 . Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ de 99/1/0,1 a 90/10/0,5; 3-5 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo: 0,19 g (83%) de producto intermedio 14 (configuración E).

10

15 Ejemplo A4

a) Preparación de producto intermedio 15



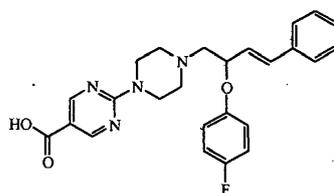
20

Se añadieron gota a gota tributilfosfina (0,0031 mol), luego DIAD (0,0031 mol) a 5°C a una disolución de producto intermedio 1 (0,0015 mol) y 4-fluorofenol (0,0031 mol) en CH_2Cl_2 (30 ml) bajo flujo de N_2 . Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadieron de nuevo 4-fluorofenol (0,0031 mol), tributilfosfina (0,0031 mol) y DIAD (0,0031 mol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas, se vertió en agua helada y se extrajo con CH_2Cl_2 . Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 99/1; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/ EtOAc 75/25; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo 0,54 g (72%) de producto intermedio 15 (aceite; configuración E).

25

30

b) Preparación de producto intermedio 16

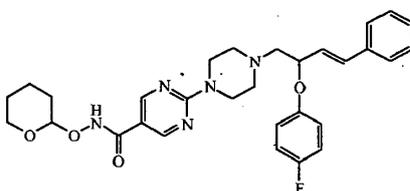


35

Se agitó una mezcla de producto intermedio 15 (0,001 mol) e hidróxido de litio (0,0026 mol) en THF (50 ml) y H_2O (25 ml) a temperatura ambiente durante 15 horas y se acidificó con HCl 3 N. Se evaporó el THF. Se filtró el precipitado, se lavó con H_2O , luego con dietil éter y se secó, produciendo 0,47 g (92%) de producto intermedio 16 (configuración E) como una sal de ácido clorhídrico (HCl).

40

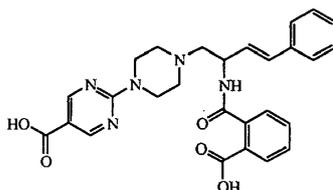
c) Preparación de producto intermedio 17



- Se añadieron HOBt (0,0014 mol) luego EDC (0,0014 mol) a temperatura ambiente a una disolución de producto intermedio 16 (0,0009 mol), O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)hidroxilamina (0,0014 mol) y *N,N*-dietiletanamina (0,0038 mol) en CH₂Cl₂/THF (50/50) (60 ml) bajo flujo de N₂. Se agitó la mezcla durante 15 horas, se vertió en H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH de 99/1/0,1 a 90/10/0,5; 3-5 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo: 0,2 g (38%) de producto intermedio 17 (configuración E).

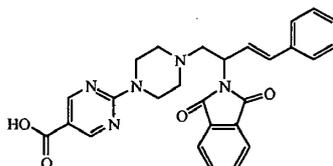
10 Ejemplo A5

- a) Preparación de producto intermedio 18



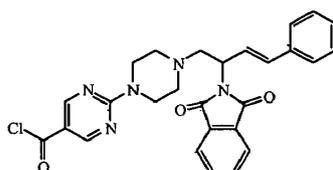
- 15 Se agitó una mezcla de producto intermedio 2 (0,0011 mol) e hidróxido de litio (0,0023 mol) en THF (30 ml) y H₂O (15 ml) a temperatura ambiente durante 15 horas y se neutralizó con HCl 3 N. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,51 g de producto intermedio 18 (configuración E).

- 20 b) Preparación de producto intermedio 19



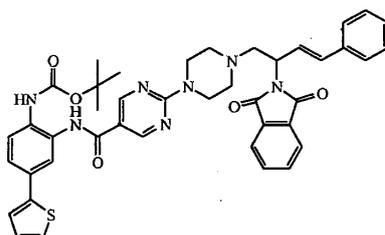
- 25 Se agitó una mezcla de producto intermedio 18 (0,0019 mol) en ácido acético (15 ml) a 100°C durante 5 horas, luego se evaporó hasta sequedad. Se llevó el residuo a H₂O, luego se neutralizó con K₂CO₃. Se separó por filtración el precipitado, se lavó con H₂O, luego con dietil éter y se secó, produciendo 0,8 g (86%) de producto intermedio 19 (configuración E).

- 30 c) Preparación de producto intermedio 20



- 35 Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (0,0021 mol) a temperatura ambiente a una disolución de producto intermedio 19 (0,0002 mol) en CH₂Cl₂ (4 ml). Se agitó la mezcla y se sometió a reflujo durante 15 horas, luego se evaporó hasta sequedad, produciendo producto intermedio 20 como una sal de ácido clorhídrico (.HCl) (configuración E).

- d) Preparación de producto intermedio 21

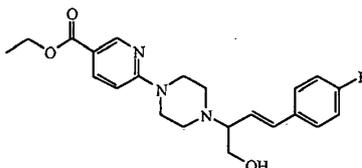


- 40 Se añadió gota a gota una disolución de producto intermedio 20 (0,0002 mol) en CH₂Cl₂ (2 ml) a 5°C a una

disolución de éster [2-amino-4-(2-tienil)fenil]-1,1-dimetiletílico del ácido carbámico (0,0003 mol) en piridina (6 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas. Se evaporó la piridina. Se llevó el residuo a CH₂Cl₂. Se lavó la fase orgánica con H₂O, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo obtenido (0,2 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH 98/2; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente, produciendo: 0,12 g de producto intermedio 21 (configuración E).

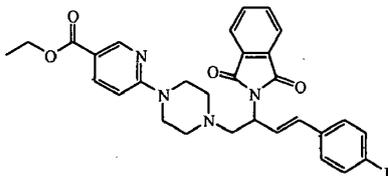
Ejemplo A6

10 a) Preparación de producto intermedio 22



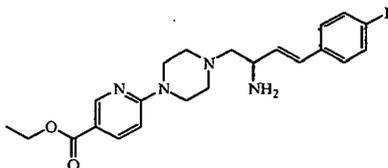
15 Se añadió 1,4-dioxan-2,5-diol (0,0093 mol) a una disolución de ácido [2-(4-fluorofenil)etenil]borónico (0,0093 mol) en etanol (200 ml). Se añadió éster etílico del ácido 6-(1-piperazinil)-3-piridincarboxílico (0,0085 mol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas, luego se filtró. Se evaporó el filtrado. Se llevó el residuo a EtOAc. Se lavó la fase orgánica con cloruro de sodio saturado, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se disolvió esta fracción (3,3 g) en dietil éter. Se añadió gota a gota HCl 5-6 N (2 ml) a 5°C. Se filtró el precipitado, se lavó con dietil éter y se secó. Se llevó esta fracción (3 g) a H₂O y se añadió K₂CO₃. Se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente, produciendo: 2,7 g (79%) de producto intermedio 22 (configuración E).

b) Preparación de producto intermedio 23



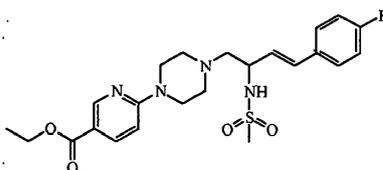
25 Se añadieron gota a gota trifetilfosfina (0,006 mol) luego DIAD (0,006 mol) a 5°C a una disolución de producto intermedio 22 (0,004 mol) y 1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (0,006 mol) en CH₂Cl₂ (80 ml) bajo flujo de N₂. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadieron 1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (0,006 mol), trifetilfosfina (1,5 eq.) luego DIAD (1,5 eq.) a 5°C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas, se vertió en hielo y se extrajo con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó esta fracción (11,4 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/EtOAc 70/30; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. Se llevó esta fracción (3,7 g) a tolueno/2-propanol (96/4). Se separó por filtración el precipitado y se secó. Se cristalizó esta fracción (1,2 g, 57%) en DIPE/dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,93 g (P.F.: 132°C; configuración E) de producto intermedio 23.

c) Preparación de producto intermedio 24



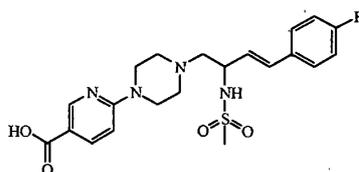
40 Se agitó una mezcla de producto intermedio 23 (0,0018 mol) y monohidrobromuro de hidrazina (0,0056 mol) en etanol (100 ml) a 65°C durante 4 horas. Se evaporó el etanol. Se llevó el residuo a CH₂Cl₂. Se lavó la fase orgánica con H₂O, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó esta fracción (0,95 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 96/4/0,1; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo 0,54 g (72%) de producto intermedio 24 (configuración E).

50 d) Preparación de producto intermedio 25



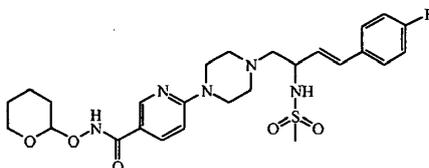
Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (0,0006 mol) a 5°C a una disolución de producto intermedio 24 (0,0004 mol) y Et₃N (0,0013 mol) en CH₂Cl₂ (10 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas.
 5 Se lavó la fase orgánica con H₂O, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó esta fracción (0,25 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH 99/1; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo 0,2 g de producto intermedio 25 (configuración E).

10 e) Preparación de producto intermedio 26



Se agitó una mezcla de producto intermedio 25 (0,0003 mol) e hidróxido de litio (0,0018 mol) en THF (18 ml) y H₂O (9 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas y se acidificó con HCl 3 N. Se evaporó el THF. Se filtró el precipitado, se lavó con H₂O, luego con dietil éter y se secó, produciendo 0,11 g de producto intermedio 26 como una sal de ácido clorhídrico (.HCl) (configuración E).
 15

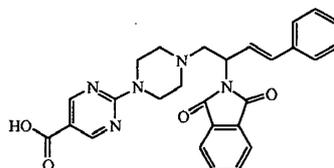
20 f) Preparación de producto intermedio 27



Se añadieron HOBT (0,0003 mol) luego EDC (0,0003 mol) a temperatura ambiente a una disolución de producto intermedio 26 (0,0002 mol), O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)hidroxilamina (0,0003 mol) y Et₃N (0,0009 mol) en CH₂Cl₂/THF (15 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 horas, se vertió en H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó esta fracción (0,15 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH 98/2; 10 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente, produciendo 0,07 g (56%) de producto intermedio 27 (configuración E).
 25
 30

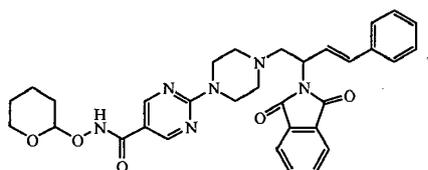
Ejemplo A7

a) Preparación de producto intermedio 28



Se agitó una mezcla de producto intermedio 18 (0,0007 mol) en ácido acético (5 ml) a 100°C durante 7 horas, luego se evaporó. Se llevó el residuo a H₂O. Se filtró el precipitado, se lavó con H₂O, luego con dietil éter y se secó, produciendo 0,25 g (64%) de producto intermedio 28 como una sal de ácido acético (.CH₃COOH) (configuración E).
 35
 40

b) Preparación de producto intermedio 29

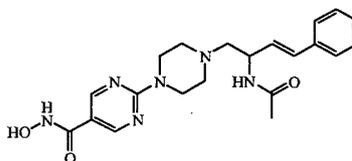


Se añadieron HOBt (0,0006 mol) luego EDC (0,0006 mol) a temperatura ambiente a una disolución de producto intermedio 28 (0,0004 mol), O-(tetrahydro-2H-pirán-2-il)hidroxilamina (0,0006 mol) y Et₃N (0,0018 mol) en CH₂Cl₂/THF (40 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas, luego se vertió en H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó esta fracción (0,4 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH 98/2; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. Se cristalizó esta fracción (0,24 g) en DIPE/dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,23 g (92%) de producto intermedio 29 (configuración E).

B. Preparación de los compuestos

Ejemplo B 1

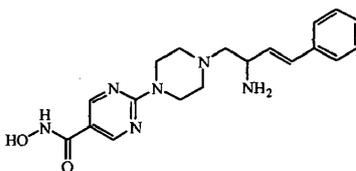
Preparación de compuesto 1



Se añadió ácido trifluoroacético (1,4 ml) a 5°C a una disolución de producto intermedio 6 (0,0005 mol) en CH₃OH (28 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas, luego se evaporó hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en acetonitrilo/dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,27 g (92%) de compuesto 1 (P.F.: 166°C; configuración E) como una sal de ácido trifluoroacético (.0.83CF₃COOH .0.62H₂O).

Ejemplo B2

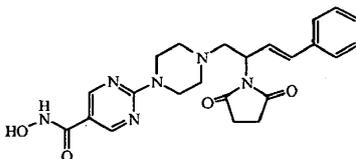
Preparación de compuesto 2



Se agitó una mezcla de producto intermedio 10 (0,0007 mol) en ácido trifluoroacético (1,6 ml) y CH₃OH (32 ml) a temperatura ambiente durante 72 horas, luego se evaporó hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,375 g (87%) de compuesto 2 (P.F.: 124°C; configuración E) como una sal de ácido trifluoroacético (.2.11CF₃COOH).

Ejemplo B3

Preparación de compuesto 3

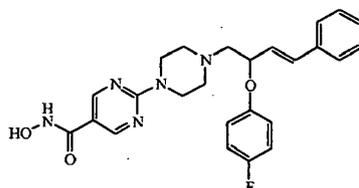


Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (0,85 ml) a 5°C a una disolución de producto intermedio 14 (0,0003 mol) en CH₃OH (17 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas, luego se evaporó hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en dietil éter/acetonitrilo. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo: 0,15 g (82%) de compuesto 3 (P.F.: 148°C; configuración E) como una sal de ácido trifluoroacético (.0.8CF₃COOH

.0.84H₂O).

Ejemplo B4

5 Preparación de compuesto 4

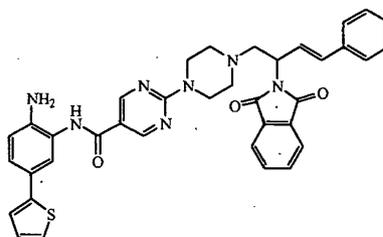


- 10 Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (0,85 ml) a 5°C a una disolución de producto intermedio 17 (0,0003 mol) en CH₃OH (17 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas, luego se evaporó hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,145 g (79%) de compuesto 4 (P.F.: 115°C; configuración E) como una sal de ácido trifluoroacético (0.87CF₃COOH .0.79H₂O).

Ejemplo B5

15

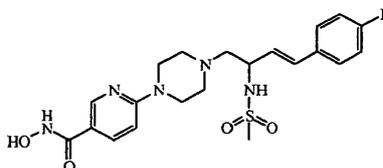
Preparación de compuesto 5



- 20 Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (0,5 ml) a 5°C a una disolución de producto intermedio 21 (0,0001 mol) en CH₂Cl₂ (3 ml). Se agitó la mezcla a 5°C durante 2 horas. Se añadieron hielo y agua. Se añadió K₂CO₃. Se extrajo la mezcla dos veces con CH₂Cl₂. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo obtenido (0,15 g) mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH 98/2; 15-40 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. Se cristalizó esta fracción (0,082 g) en DIPE/2-propanona. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,072 g (59%) (P.F.: 120°C; configuración E) de compuesto 5.
- 25

Ejemplo B6

30 Preparación de compuesto 6

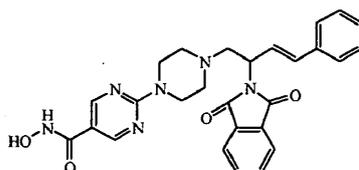


- 35 Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (0,33 ml) a 5°C a una disolución de producto intermedio 27 (0,0001 mol) en CH₃OH (7 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas, luego se evaporó hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en dietil éter. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,062 g (88%) (P.F.: 131°C; configuración E) de compuesto 6 como una sal de ácido trifluoroacético (.98CF₃COOH).

Ejemplo B7

40

Preparación de compuesto 7



- 5 Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (1 ml) a 5°C a una disolución de producto intermedio 29 (0,0003 mol) en CH₃OH (21 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas, luego se evaporó hasta sequedad. Se cristalizó el residuo en dietil éter/acetonitrilo. Se separó por filtración el precipitado y se secó, produciendo 0,19 g (86%) (P.F.: 140°C; configuración E) de compuesto 7 como una sal de ácido trifluoroacético (0.9CF₃COOH .84H₂O).

La tabla F-1 enumera los compuestos que se prepararon según uno de los ejemplos anteriores.

10 Tabla F-1

Co. n.º 1 0.83CF ₃ COOH .0.62H ₂ O	Co. n.º 2 0.2.11CF ₃ COOH
Co. n.º 3 0.8CF ₃ COOH .0.84H ₂ O	Co. n.º 4 0.87CF ₃ COOH .0.79H ₂ O
Co. n.º 5	Co. n.º 6 0.98CF ₃ COOH
Co. n.º 7 0.9CF ₃ COOH 0.84H ₂ O	

C. Ejemplos farmacológicos:

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

Se determinó la actividad celular de los compuestos de fórmula (I) en células tumorales A2780 usando un ensayo

colorimétrico para toxicidad o supervivencia celular (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983) (véase el ejemplo C.2).

5 La solubilidad de un compuesto mide la capacidad de un compuesto para permanecer en disolución. En el primer método, se mide la capacidad de un compuesto para permanecer en disolución acuosa tras la dilución (véase el ejemplo C.3.a). Se diluyen disoluciones madre de DMSO con un único disolvente tampón acuoso en diferentes etapas consecutivas. En este método (C.3.a), entonces se analizan las mezclas en el analizador de solubilidad BD Gentest para determinar la aparición de la precipitación. En el segundo método, puede medirse la solubilidad de un compuesto a diferentes pH con el uso de un detector de nitrógeno quimioluminiscente (véase el ejemplo C.3.b).
10 La permeabilidad de un fármaco expresa su capacidad para moverse desde un medio al interior o a través de otro. Específicamente su capacidad de moverse a través de la membrana intestinal al interior del torrente circulatorio y/o desde el torrente circulatorio al interior de la diana. Puede medirse la permeabilidad (véase el ejemplo C.4) a través de la formación de una bicapa fosfolipídica de membrana artificial inmovilizada en filtro. En el ensayo de membrana artificial inmovilizada en filtro, se forma un "sándwich" con una placa de microtitulación de 96 pocillos y una placa filtrante de 96 pocillos, de manera que cada pocillo compuesto se divide en dos cámaras con una disolución donadora en la parte inferior y una disolución aceptora en la parte superior, separadas por un disco de microfiltro de 125 μm (poros de 0,45 μm), recubiertas con disolución de dodecano al 2% (p/v) de dioleoilfosfatidil-colina, en condiciones que forman bicapas multilaminares dentro de los canales de filtro cuando el sistema entra en contacto con una disolución tampón acuosa. La permeabilidad de los compuestos a través de esta membrana artificial se mide en cm/s. El fin es buscar la penetración de los fármacos a través de una membrana artificial paralela a 2 pH diferentes: 4,0 y 7,4. La detección del compuesto se realiza con espectrometría UV a una longitud de onda óptima de entre 250 y 500 nm.

25 Metabolismo de fármacos significa que un compuesto xenobiótico o endobiótico soluble en lípidos se transforma enzimáticamente en un(os) metabolito(s) que puede(n) excretarse, soluble(s) en agua y polar(es). El órgano principal para el metabolismo de fármacos es el hígado. A menudo los productos metabólicos son menos activos que el fármaco original, o inactivos. Sin embargo, algunos metabolitos pueden tener actividad potenciada o efectos tóxicos. Por tanto, el metabolismo de fármacos puede incluir procesos tanto de "desintoxicación" como de "intoxicación". Uno de los sistemas enzimáticos principales que determina la capacidad del organismo para lidiar con fármacos y productos químicos está representado por las citocromo P450 monooxigenasas, que son enzimas dependientes de NADPH. La estabilidad metabólica de compuestos puede determinarse *in vitro* con el uso de tejido humano subcelular (véase el ejemplo C.5.). En el presente documento la estabilidad metabólica de los compuestos se expresa como el % de fármaco metabolizado tras 15 minutos de incubación de estos compuestos con microsomas.

35 Se ha mostrado que, una amplia variedad de agentes antitumorales activan la proteína p21, incluyendo agentes que dañan el ADN e inhibidores de histona desacetilasas. Los agentes que dañan el ADN activan el gen p21 a través del supresor tumoral p53, mientras que los inhibidores de histona desacetilasas activan de manera transcripcional el gen p21 mediante el factor de transcripción Sp1. Por tanto, los agentes que dañan el ADN activan el promotor p21 a través del elemento sensible a p53, mientras que los inhibidores de histona desacetilasas activan el promotor p21 a través de sitios sp1 (ubicados en la región de -60 pb a +40 pb con respecto a la caja TATA) conduciendo ambos a aumentar la expresión de la proteína p21. Cuando el promotor p21 en una célula consiste en un fragmento promotor p21 de 1300 pb que no comprende los elementos sensibles a p53, por consiguiente éste no es sensible a agentes que dañan el ADN.

45 La capacidad de los compuestos para inducir p21 puede evaluarse sometiendo a prueba la capacidad de los compuestos para inducir p21 como consecuencia de la inhibición de HDAC a nivel celular. Las células pueden transfectarse de manera estable con un vector expresión que contiene un fragmento de promotor p21 de 1300 pb que no comprende los elementos sensibles a p53 y en el que un aumento de una expresión del gen indicador, en comparación con los niveles de control, identifica el compuesto como que tiene capacidad de inducción de p21. El gen indicador es una proteína fluorescente y la expresión del gen indicador se mide como la cantidad de luz fluorescente emitida (véase el ejemplo C.6.a.). El segundo método es un método *in vivo* en el que se usan ratones para examinar la actividad farmacéutica de un compuesto. Las células tumorales transformadas de manera estable descritas anteriormente pueden administrarse a ratones en una cantidad suficiente para hacer que se produzca un tumor. Después de que las células tumorales tuvieron un tiempo suficiente para formar un tumor, puede administrarse a los animales un compuesto potencialmente activo y se evalúa el efecto de dicho compuesto sobre las células tumorales midiendo la expresión del gen indicador. La incubación con compuestos activos farmacéuticos dará como resultado un aumento de la expresión del gen indicador en comparación con los niveles de control (véase el ejemplo C.6.b.)

60 Los inhibidores de HDAC específicos no deberían inhibir otras enzimas como las abundantes proteínas CYP P450. Las proteínas CYP P450 (expresadas en *E. coli*) 3A4, 2D6 y 2C9 convierten sus sustratos específicos en una molécula fluorescente. La proteína CYP3A4 convierte 7-benciloxi-trifluorometilcumarina (BFC) en 7-hidroxi-trifluorometilcumarina. La proteína CYP2D6 convierte 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil]-7-metoxi-4-metilcumarina (AMMC) en clorhidrato de 3-[2-(N,N-dietilamino)etil]-7-hidroxi-4-metilcumarina y la proteína CYP2C9 convierte 7-metoxi-4-trifluorometilcumarina (MFC) en 7-hidroxi-trifluorometilcumarina. Los compuestos que inhiben la reacción enzimática darán como resultado una disminución de la señal fluorescente (véase el ejemplo C.7).

Ejemplo C.1.: Ensayo *in vitro* para la inhibición de histona desacetilasa con sustrato marcado de manera fluorescente:

5 Se usó el kit de ensayo de actividad fluorescente de HDAC/descubrimiento de fármaco de Biomol (n.º de cat.: AK-500-0001). El ensayo de actividad fluorescente de HDAC se basa en el sustrato Fluor de Lys (histona desacetilasa lisil fluorogénica) y combinación de revelado. El sustrato Fluor de Lys, comprende una cadena lateral de lisina acetilada. La desacetilación del sustrato sensibiliza el sustrato de modo que, en la segunda etapa, el tratamiento con el revelador de Fluor de Lys produce un fluoróforo. Se incubaron extractos nucleares de HeLa (proveedor: Biomol) a
 10 60 µg/ml con 75 µM de sustrato. Se añadió el sustrato Fluor de Lys en un tampón que contenía Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y MgCl₂.6H₂O 1 mM a pH 7,4. Tras 30 min., se añadió 1 volumen del revelador. Se excitó el fluoróforo con 355 nm de luz y la luz emitida (450 nm) se detectó en un lector de placas fluorométrico. Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que contenían extracto nuclear de HeLa y tampón), una incubación blanco (que contenía tampón pero sin extracto nuclear de HeLa) y muestras (que contenían compuesto disuelto en
 15 DMSO y diluido además en tampón y extracto nuclear de HeLa). En primer lugar, se sometieron a prueba los compuestos a una concentración de 10⁻⁵ M. Cuando los compuestos mostraron actividad a 10⁻⁵ M, se realizó una curva concentración-respuesta en la que los compuestos se sometieron a prueba a concentraciones de entre 10⁻⁵ M y 10⁻⁹ M. Todas las muestras se sometieron a prueba 4 veces. En cada prueba se restó el valor blanco de los valores tanto control como de muestra. La muestra control representaba el 100% de desacetilación de sustrato. Para
 20 cada muestra la fluorescencia se expresó como porcentaje del valor medio de los controles. Cuando era apropiado, se calcularon los valores de CI₅₀ (concentración del fármaco necesaria para reducir la cantidad de metabolitos hasta el 50% del control) usando análisis de probit para datos corregidos. En el presente documento los efectos de los compuestos de prueba se expresan como pCI₅₀ (el valor log negativo del valor CI₅₀) (véase la tabla F-2).

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

Se disolvieron todos los compuestos sometidos a prueba en DMSO y se realizaron diluciones adicionales de medio de cultivo. Las concentraciones finales de DMSO nunca superaron el 0,1% (v/v) en los ensayos de proliferación celular. Los controles contenían células A2780 y DMSO sin compuesto y los blancos contenían DMSO pero no
 30 células. Se disolvió MTT a 5 mg/ml en PBS. Se preparó un tampón glicina compuesto de glicina 0,1 M y NaCl 0,1 M tamponado hasta pH 10,5 con NaOH (1 N) (todos los reactivos fueron de Merck). Se cultivaron las células de carcinoma de ovario A2780 humanas (un amable obsequio del Dr. T.C. Hamilton [Fox Chase Cancer Centre, Pensilvania, EE.UU.]) en medio RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 µg/ml y suero bovino fetal al 10%. Se mantuvieron rutinariamente las células como cultivos monocapa a 37°C en una atmósfera de
 35 CO₂ al 5% humidificada. Se procedió al paso de células una vez a la semana usando una disolución de tripsina/EDTA a una relación de separación de 1:40. Todos los medios y complementos se obtuvieron de Life Technologies. Las células estuvieron libres de contaminación por micoplasma tal como se determinó usando el kit de cultivo tisular de micoplasma Gen-Probe (proveedor: BioMérieux). Se sembraron células en placa en placas de cultivo de 96 pocillos NUNC™ (proveedor: Life Technologies) y se permitió que se adhirieran al plástico durante la
 40 noche. Las densidades usadas para el sembrado en placa fueron 1500 células por pocillo en un volumen total de 200 µl de medio. Tras la adhesión de las células a las placas, se cambió el medio y se añadieron fármacos y/o disolventes hasta un volumen final de 200 µl. Tras cuatro días de incubación, se reemplazó el medio por 200 µl de medio nuevo y se evaluaron la viabilidad y densidad celular usando un ensayo basado en MTT. A cada pocillo se le añadieron 25 µl de solución de MTT y se incubaron adicionalmente las células durante 2 horas a 37°C. Luego se aspiró cuidadosamente el medio y se solubilizó el producto MTT-formazán azul mediante la adición de 25 µl de
 45 tampón glicina seguido por 100 µl de DMSO. Se agitaron las microplacas de prueba durante 10 min. en un agitador de microplacas y se midió la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro de 96 pocillos Emax (proveedor: Sopachem). Dentro de un experimento, los resultados para cada condición experimental son la media de 3 pocillos de réplica. Para fines de examen inicial, se sometieron a prueba compuestos a una única concentración fijada de
 50 10⁻⁶ M. Para compuestos activos, se repitieron los experimentos para establecer curvas concentración-respuesta completas. Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que no contenían fármaco) y una incubación blanco (que no contenía ni células ni fármacos). Se restó el valor blanco de todos los valores control y de muestra. Para cada muestra, el valor medio para el crecimiento celular (en unidades de absorbancia) se expresó como porcentaje del valor medio para el crecimiento celular del control. Cuando era apropiado, se calcularon los valores
 55 de CI₅₀ (concentración del fármaco necesaria para reducir el crecimiento celular hasta el 50% del control) usando análisis de probit para datos corregidos (Finney, D.J., Probit Analyses, 2º Ed. capítulo 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962). En el presente documento los efectos de los compuestos de prueba se expresan como pCI₅₀ (el valor log negativo del valor CI₅₀)(véase la tabla F-2).

60 Ejemplo C.3: Solubilidad/estabilidadC.3.a. Solubilidad cinética en medios acuosos

65 Se preparan disoluciones madre de DMSO de 5000-9,8 µM (1/2 diluciones) en DMSO en una placa de disolución madre de 96 pocillos (200 µl por pocillo). Tras cada dilución, se mezclan las muestras. Luego se transfieren alícuotas

de estas disoluciones de DMSO (2 µl) a otras 2 placas de tampón de 96 pocillos, que contienen 200 µl por pocillo de tampón acuoso. Cada una de las placas de tampón contiene o bien tampón acuoso de pH 7,4 o bien tampón acuoso de pH 4,0. Tras la última dilución, se mezclan las placas de tampón y se estabilizan las muestras a temperatura ambiente durante ½ hora. Se realiza la dilución por duplicado para cada compuesto para excluir errores ocasionales. Entonces se analizan las mezclas en el analizador de solubilidad BD Gentest para determinar la aparición de la precipitación. Basándose en la ausencia/presencia de precipitado en las mezclas se calcula la solubilidad cinética mediante interpolación. Se realiza una clasificación en las tres clases. Los compuestos con solubilidad alta obtuvieron una puntuación de 3 y tienen una solubilidad superior a o igual a 50 µM. Los compuestos con solubilidad media obtuvieron una puntuación de 2 y tienen solubilidad superior a 10 µM e inferior a 50 µM. Los compuestos con solubilidad baja obtuvieron una puntuación de 1 y para estos compuestos la solubilidad es inferior a o igual a 10 µM.

Se sometieron a prueba cuatro compuestos: dos tuvieron una puntuación de 1 a ambos valores de pH en el ensayo y dos tuvieron una puntuación de 2 a un valor de pH de 4,0.

15 C.3.b. Solubilidad/estabilidad a pH 2,3.

La solubilidad de un compuesto, a pH 2,3, también puede medirse con el uso de un detector de nitrógeno quimioluminiscente (véase la tabla F-2).

20 Ejemplo C.4: Análisis de permeabilidad de membrana artificial paralela

Se diluyeron las muestras de reserva (alícuotas de 10 µl de una disolución madre de 5 mM en DMSO al 100%) en una placa de pocillos profundos o de mezcla previa que contienen 2 ml de sistema de tampón acuoso de pH 4 o pH 7,4 (PSR4 System Solution Concentrate (pION)). Antes de añadirse muestras a la placa de referencia, se añadieron 150 µl de tampón a los pocillos y se realizó una medición por UV blanco. Después de eso, se desechó el tampón y se usó la placa como placa de referencia. Todas las mediciones se realizaron en placas resistentes a UV (proveedor: Costar o Greiner). Tras la medición blanco de la placa de referencia, se añadieron 150 µl de las muestras diluidas a la placa de referencia y se añadieron 200 µl de las muestras diluidas a la placa donadora 1. Se recubrió una placa de filtro aceptora 1 (proveedor: Millipore, tipo: MAIP N45) con 4 µl de la disolución que forma membrana artificial (1,2-dioleoil-sn-glicer-3-fosfolina en dodecano que contiene 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol al 0,1% y se colocó en la parte superior de la placa donadora 1 para formar un "sándwich". Se dispensó tampón (200 µl) en los pocillos aceptores en la parte superior. Se recubrió el sándwich con una tapa y se almacenó durante 18 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizó una medición blanco de la placa aceptora 2 a través de la adición de 150 µl de tampón a los pocillos, seguida por una medición UV. Tras la medición blanco de la placa aceptora 2 se desechó el tampón y se transfirieron 150 µl de disolución aceptora desde la placa de filtro aceptora 1 hasta la placa aceptora 2. Luego se retiró la placa de filtro aceptora 1 del sándwich. Tras la medición blanco de la placa donadora 2 (véase anteriormente), se transfirieron 150 µl de la disolución donadora desde la placa donadora 1 hasta la placa donadora 2. Se exploraron los espectros UV de la placa donadora 2, la placa aceptora 2 y los pocillos de la placa de referencia (con un SpectraMAX 190). Se procesaron todos los espectros para calcular la permeabilidad con el software PSR4p Command. Todos los compuestos se midieron por triplicado. Se usaron como patrones carbamazepina, griseofulvina, acicloguanisina, atenolol, furosemida y clorotiazida en cada experimento. Se clasificaron los compuestos en 3 categorías, según tengan una permeabilidad baja (efecto medio < 0,5 x 10⁻⁶ cm/s; puntuación 1), una permeabilidad media (1 x 10⁻⁶ cm/s > efecto medio ≥ 0,5 x 10⁻⁶ cm/s; puntuación 2) o una permeabilidad alta (≥ 1 x 10⁻⁶ cm/s; puntuación 3).

45 Ejemplo C.5: Estabilidad metabólica

Se hicieron preparaciones de tejido subcelular según Gorrod *et al.* (Xenobiotica 5: 453-462, 1975) mediante separación centrífuga tras homogeneización mecánica de tejido. Se aclaró tejido de hígado en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) enfriado con hielo para lavar el exceso de sangre. Luego se secó con papel, se pesó y se trituró de manera gruesa usando tijeras quirúrgicas. Se homogeneizaron los trozos de tejido en 3 volúmenes de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) enfriado en hielo usando o bien un Potter-S (Braun, Italia) equipado con una mano de mortero de Teflón o bien un homogeneizador Sorvall Omni-Mix, durante 7 x 10 s. En ambos casos, se mantuvo el recipiente en/sobre hielo durante el proceso de homogeneización. Se centrifugaron los homogeneizados de tejido a 9000 x g durante 20 minutos a 4°C usando una centrífuga Sorvall o una ultracentrífuga Beckman. Se almacenó el sobrenadante resultante a -80°C y se le denominó "S9". Puede centrifugarse adicionalmente la fracción S9 a 100.000 x g durante 60 minutos (4°C) usando una ultracentrífuga Beckman. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante resultante, se tomaron alícuotas y se denominó "citósol". Se volvió a suspender el sedimento en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) en un volumen final de 1 ml por 0,5 g de tejido original, se pesó y se denominó "microsomos". Se tomaron alícuotas de todas las fracciones subcelulares, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para someter a prueba las muestras, la mezcla de incubación contenía PBS (0,1 M), compuesto (5 µM), microsomos (1 mg/ml) y un sistema que genera NADPH (glucosa-6-fosfato 0,8 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM y 0,8 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Se reemplazaron las muestras control que contenían el mismo material

excepto los microsomas por microsomas activados por calor (10 min. a 95 grados Celsius). La recuperación de los compuestos en las muestras control siempre fue del 100%. Se incubaron previamente las mezclas durante 5 min. a 37 grados Celsius. La reacción se inició en el punto de tiempo cero ($t = 0$) mediante la adición de NADP 0,8 mM y se incubaron las muestras durante 15 min. ($t = 15$). Se terminó la reacción mediante la adición de 2 volúmenes de DMSO. Luego se centrifugaron las muestras durante 10 min. a 900 x g y se almacenaron los sobrenadantes a temperatura ambiente durante no más de 24 h antes del análisis. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado. Se realizó el análisis de los sobrenadantes con análisis CL-EM. Se realizó la elución de las muestras en una Xterra MS C18 (50 x 4,6 mm, 5 μ m, Waters, EE.UU.). Se usó un sistema de HPLC Alliance 2790 (proveedor: Waters, EE.UU.). La elución fue con tampón A (acetato de amonio 25 mM (pH 5,2) en H₂O/acetonitrilo (95/5)), siendo el disolvente B acetonitrilo y el disolvente C metanol a una velocidad de flujo de 2,4 ml/min. El gradiente empleado aumentaba la concentración de la fase orgánica desde el 0% pasando por el 50% de B y el 50% C en 5 min. hasta el 100% de B en 1 min. de manera lineal y se mantuvo estacionaria la concentración de la fase orgánica durante unos 1,5 min. adicionales. El volumen de inyección total de la muestra fue de 25 μ l. Se usó un espectrómetro de masas triple cuádruplo Quattro (proveedor: Micromass, Manchester, RU) equipado con una fuente de ESI como detector. Se fijaron las temperaturas de la fuente y la de desolvatación a 120 y 350°C respectivamente y se usó nitrógeno como nebulizador y gas de secado. Se adquirieron datos en modo de lectura positivo (reacción de iones individuales). Se fijó el voltaje cónico a 10 V y el tiempo de espera fue de 1 s. Se expresó la estabilidad metabólica como % de metabolismo del compuesto tras 15 min. de incubación en presencia de microsomas activos

$$(E(\text{act})) (\% \text{ de metabolismo}) = 100\% - \left(\left(\frac{\text{corriente iónica total (CIT) de } E(\text{act}) \text{ a } t = 15}{\text{CIT de } E(\text{act}) \text{ a } t = 0} \right) \times 100 \right). \text{ Los}$$

compuestos que tuvieron un porcentaje de metabolismo inferior al 20% se definieron como altamente estables desde el punto de vista metabólico. Se definieron los compuestos que tuvieron un metabolismo de entre el 20 y el 70% como estables de manera intermedia y se definieron los compuestos que mostraron un porcentaje de metabolismo superior a 70 como poco estables desde el punto de vista metabólico. Siempre se incluyeron tres compuestos de referencia cada vez que se realizaba una evaluación de la estabilidad metabólica. Se incluyó verapamilo como compuesto con estabilidad metabólica baja (% de metabolismo = al 73%). Se incluyó cisaprida como compuesto con estabilidad metabólica media (% de metabolismo del 45%) y se incluyó propanol como compuesto con estabilidad metabólica de intermedia a alta (25% de metabolismo). Se usaron estos compuestos de referencia para validar el ensayo de estabilidad metabólica.

30 Ejemplo C.6: Capacidad de inducción de p21

Ejemplo C.6.a: Método celular

Se cultivaron células A2780 (ATCC) en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y gentamicina a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5%. Todas las disoluciones de cultivo celular se proporcionaron por Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). Otros materiales se proporcionaron por Nunc. Se extrajo ADN genómico de células A2780 en proliferación y se usó como molde para aislamiento de PCR anidada del promotor de p21. Se realizó la primera amplificación durante 20 ciclos a una temperatura de hibridación de 55°C usando el par de oligonucleótidos GAGGGCGCGGTGCTTGG y TGCCGCCGCTCTCTCACC con el ADN genómico como molde. Se volvió a amplificar el fragmento de 4,5 kb resultante que contenía el fragmento de -4551 a +88 con respecto a la caja TATA con los oligonucleótidos TCGGGTACCGAGGGCGCGGTGCTTGG y ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACC durante 20 ciclos con hibridación a 88°C dando como resultado un fragmento de 4,5 kb y posteriormente con el par de oligonucleótidos TCGGGTACCGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATC y ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACC durante 20 ciclos con hibridación a 88°C dando como resultado un fragmento de 1,3 kb que contenía el fragmento de -1300 a +88 con respecto a la caja TATA. Se usaron los sitios de restricción XhoI y KpnI presentes en los oligonucleótidos (secuencia subrayada) para subclonación. Se eliminó el indicador luciferasa del pGL3-basic y se reemplazó por el indicador ZsGreen (del plásmido pZsGreen1-N1) en los sitios de restricción KpnI y XbaI. Se construyó pGL3-basic-ZsGreen-1300 mediante la inserción del fragmento de 1,3 kb mencionado anteriormente de la región del promotor de p21 humano en pGL3-basic-ZsGreen en los sitios XhoI y KpnI. Todas las enzimas de restricción se proporcionan por Boehringer Mannheim (Alemania). Se sembraron en placa células A2780 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 2×10^5 células, se incubaron durante 24 horas y se transfectaron con 2 μ g de pGL3-basic-ZsGreen-1300 y 0,2 μ g de vector pSV2neo usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Bruselas, Bélgica) tal como se describe por el fabricante. Se seleccionaron las células transfectadas durante 10 días con G418 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y se hicieron crecer suspensiones unicelulares. Tras tres semanas, se obtuvieron clones individuales. Se expandieron los clones seleccionados de A2780 y se sembraron a 10000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. 24 horas tras el sembrado, se trataron las células durante 24 horas más con compuestos (que afectan a sitios sp1 en la región del promotor de p21 proximal). Posteriormente, se fijaron las células con PFA al 4% durante 30' y se contratiñeron con colorante Hoechst. Se monitorizó la activación del promotor de p21 que conduce a la producción de ZsGreen y por tanto a la fluorescencia, mediante el Ascent Fluoroskan (Thermo LabSystems, Bruselas, Bélgica). Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que no contenían fármaco) y una incubación blanco (que no contenía ni células ni fármacos). Se restó el valor blanco de todos los valores control y de muestra. Para cada muestra, el valor para inducción de p21 se expresó como el porcentaje del valor para p21 presente en el control. Se

definió un porcentaje de inducción superior al 130% como inducción significativa.

Ejemplo C.6.b.: Método *in vivo*

5 Se inyectó por vía subcutánea un clon seleccionado (10^7 células/200 μ l) en la ijada de ratón desnudo y se obtuvo un tumor medible con calibrador tras 12 días. A partir del día 12, se les dosificó a animales, por vía oral o intravenosa, diariamente durante 6 días disolvente y 20-40 mpk de compuesto (4-10 animales cada uno). Se evaluaron los tumores para determinar la fluorescencia mediante el sistema de generación de imágenes de todo el cuerpo automatizado desarrollado internamente (estereomicroscopio fluorescente tipo Olympus® SZX12 equipado con un
10 filtro GFP y acoplado a una cámara CCD tipo JAI® CV-M90 controlado mediante un paquete de software basado en el software IMAQ Vision de National Instruments®). Como referencia, se usó compuesto R306465 (documento WO 03/76422). Se clasificaron los compuestos como inactivos (sin fluorescencia medible), más débiles, idénticos o mejores que R306465.

15 Ejemplo C.7: Capacidad de inhibición de P450

Se disolvieron todos los compuestos sometidos a prueba en DMSO (5 mM) y se realizó una dilución adicional hasta 5×10^{-4} M en acetonitrilo. Se realizaron diluciones adicionales en tampón de ensayo (tampón fosfato de NaK 0,1 M de pH 7,4) y la concentración de disolvente final nunca fue superior al 2%. El ensayo para la proteína CYP3A4 comprende por pocillo 15 pmol de P450/mg de proteína (en tampón fosfato de NaK 0,01 M + KCl al 1,15%), un sistema que genera NADPH (glucosa-6-fosfato 3,3 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,4 U/ml, NADP 1,3 mM y $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3,3 mM en tampón de ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 μ l. Tras una incubación previa de 5 min. a 37°C se inició la reacción enzimática con la adición de 150 μ M del sustrato de sonda fluorescente BFC en tampón de ensayo. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se terminó la reacción tras la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Se llevaron a cabo determinaciones fluorescentes a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Se incluyó ketoconazol (valor de $Cl_{50} = 3 \times 10^{-8}$ M) como compuesto de referencia en este experimento. El ensayo para la proteína CYP2D6 comprende por pocillo 6 pmol de P450/mg de proteína (en tampón fosfato de NaK 0,01 M + KCl al 1,15%), un sistema que genera NADPH (glucosa-6-fosfato 0,41 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,4 U/ml, NADP 0,0082 mM y $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,41 mM en tampón de ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 μ l. Tras una incubación previa de 5 min. a 37°C se inició la reacción enzimática con la adición de 3 μ M del sustrato de sonda fluorescente AMMC en tampón de ensayo. Tras una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente se terminó la reacción tras la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Se llevaron a cabo determinaciones fluorescentes a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Se incluyó quinidina (valor de $Cl_{50} < 5 \times 10^{-8}$ M) como compuesto de referencia en este experimento. El ensayo para la proteína CYP2C9 comprende por pocillo 15 pmol de P450/mg de proteína (en tampón fosfato de NaK 0,01 M + KCl al 1,15%); un sistema que genera NADPH (glucosa-6-fosfato 3,3 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,4 U/ml, NADP 1,3 mM y $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3,3 mM en tampón de ensayo) y compuesto en un volumen de ensayo total de 100 μ l. Tras una incubación previa de 5 min. a 37°C se inició la reacción enzimática con la adición de 200 μ M del sustrato de sonda fluorescente MFC en tampón de ensayo. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se terminó la reacción tras la adición de 2 volúmenes de acetonitrilo. Se llevaron a cabo determinaciones fluorescentes a una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Se incluyó sulfafenazol (valor de $Cl_{50} = 6,8 \times 10^{-7}$ M) como compuesto de referencia en este experimento. Para fines de evaluación inicial, se sometieron a prueba compuestos a una única concentración fija de 1×10^{-5} M. Para compuestos activos, se repitieron los experimentos para establecer curvas de concentración-respuesta completas. Para cada experimento, se realizaron en paralelo controles (que no contenían fármaco) y una incubación blanco (que no contenía enzima ni fármacos). Todos los compuestos se sometieron a prueba por cuadruplicado. Se restó el valor blanco de todos los valores control y de muestra. Para cada muestra, se expresó el valor medio de la actividad P450 de la muestra (en unidades fluorescentes relativas) como porcentaje del valor medio de la actividad P450 del control. Se expresó el porcentaje de inhibición como el 100% menos el valor medio de la actividad P450 de la muestra. Cuando era apropiado, se calcularon valores de Cl_{50} (concentración del fármaco necesaria para reducir la actividad P450 hasta el 50% del control).

55 Tabla F-2: enumera los resultados de los compuestos que se sometieron a prueba según los ejemplos C.1, C.2 y C.3.b (un espacio en blanco indica que no hay valor disponible para el compuesto relevante)

Tabla F-2

Compuesto n.º	Actividad enzimática pCl ₅₀ C.1	Actividad celular pCl ₅₀ C.2	Solubilidad C.3.b. pH = 2,3 (mg/ml)
6	7,0	5,3	
4	7,3	5,8	

3	7,5	5,1	
1	8,2	6,4	2,4
2	8,2	7,1	3,1

D. Ejemplo de composición: Comprimidos recubiertos con película

Preparación de núcleo de comprimido

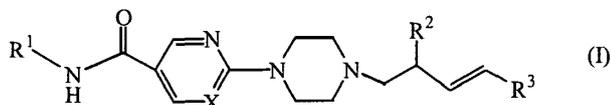
- 5 Se mezcla bien una mezcla de 100 g de un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón y después se humidifica con una disolución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinilpirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. Se tamiza la mezcla de polvo húmeda, se seca y se tamiza de nuevo. Luego se añaden 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. Se mezcla bien todo y se comprime para dar comprimidos, proporcionando 10.000 comprimidos, comprendiendo cada uno 10 mg de un compuesto de fórmula (I).

Recubrimiento

- 15 A una disolución de 10 g de metilcelulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se le añade una disolución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. Luego se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanodiol, se funden 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. Se añade la última disolución a la primera y luego se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión de color concentrada y se homogeneiza todo. Se recubren los núcleos de comprimido con la mezcla así obtenida en un aparato de recubrimiento.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)

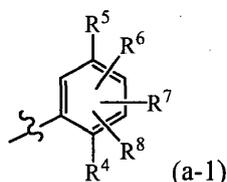


5

las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo, en la que

10 X es N o CH;

R¹ es hidroxilo o un radical de fórmula (a-1)



15

en la que

R⁴ es hidroxilo o amino;

20 R⁵ es hidrógeno, tienilo, furanilo o fenilo y cada tienilo, furanilo o fenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos halógeno, amino, nitro, ciano, hidroxilo, fenil, alquilo C₁₋₆, (dialquil C₁₋₆)amino, alquioxilo C₁₋₆, fenilalquioxilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, hidroxicarbonilo, alquilcarbonilo C₁₋₆, polihaloalquioxilo C₁₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, alquilsulfonilo C₁₋₆, hidroxicarbonilalquilo C₁₋₆, alquilcarbonilamino C₁₋₆, aminosulfonilo, aminosulfonilalquilo C₁₋₆, isoxazolilo, aminocarbonilo, fenilalquenilo C₂₋₆, fenilalquinilo C₃₋₆ o piridinilalquinilo C₃₋₆;

25

R⁶, R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente hidrógeno, amino, nitro, furanilo, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, trifluorometilo, tienilo, fenilo, alquilcarbonilamino C₁₋₆, aminocarbonilalquilo C₁₋₆ o -C≡C-CH₂-R⁹;

30

en el que R⁹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, hidroxilo, amino o alquioxilo C₁₋₆;

R² es amino, alquilamino C₁₋₆, arilalquilamino C₁₋₆, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, cicloalquilamino C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilamino C₁₋₆, glutarimidilo, maleimidilo, ftalimidilo, succinimidilo, hidroxilo, alquioxilo C₁₋₆, feniloxilo, estando el resto fenilo en dicho grupo feniloxilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, ciano, alquiloxicarbonilo C₁₋₆ y trifluorometilo;

35

R³ es fenilo, naftalenilo o heterociclilo; en el que

40

cada uno de dichos grupos fenilo o naftalenilo está opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, polihaloalquilo C₁₋₆, arilo, hidroxilo, ciano, amino, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, hidroxicarbonilo, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alquioximetilo C₁₋₆, aminometilo, alquilaminometilo C₁₋₆, alquilcarbonilaminometilo C₁₋₆, alquilsulfonilaminometilo C₁₋₆, aminosulfonilo, alquilaminosulfonilo C₁₋₆ y heterociclilo;

45

arilo es fenilo o naftalenilo; estando cada uno de dichos grupos fenilo o naftalenilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, trifluorometilo, ciano e hidroxicarbonilo; y

50

heterociclilo es furanilo, tienilo, pirrolilo, pirrolinilo, piperidino, dioxolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, imidazolilino, imidazolidinilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, piranilo, piridinilo, piperidinilo, dioxanilo, morfolinilo, ditianilo, tiomorfolinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piperazinilo, triazinilo, tritiano, indolizínilo, indolilo, indolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indazolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, quinolizínilo, quinolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalínilo o naftiridinilo; estando

55

cada uno de dicho grupos heterociclilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆, ciano, amino y mono- o di(alquilo C₁₋₄)amino.

5 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

a) X es N;

b) R¹ es hidroxilo;

10 c) R² es amino, alquilcarbonilamino C₁₋₆, alquilsulfonilamino C₁₋₆, ftalimidilo, succinimidilo o feniloxilo, estando el resto fenilo en dicho grupo feniloxilo opcionalmente sustituido con un sustituyente halógeno; y

15 d) R³ es fenilo opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halógeno, alquilo C₁₋₆, alquioxilo C₁₋₆ y polihaloalquilo C₁₋₆.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

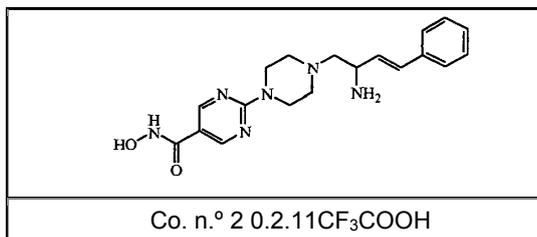
a) X es N;

20 b) R¹ es hidroxilo;

c) R² es amino; y

25 d) R³ es fenilo opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado de halógeno y alquioxilo C₁₋₆.

4. Compuesto según la reivindicación 1, siendo el compuesto el compuesto n.º 2 al que se hace referencia a continuación:



30 5. Composición farmacéutica que comprende vehículos farmacéuticamente aceptables y como principio activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

35 6. Proceso de preparación de una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en el que los vehículos farmacéuticamente aceptables y un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se mezclan íntimamente.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicamento.

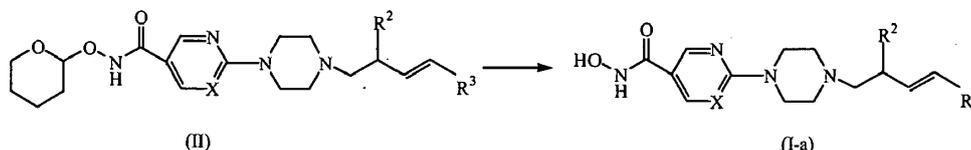
40 8. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

9. Combinación de un agente anticancerígeno y un inhibidor de HDAC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

45 10. Proceso para preparar un compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por

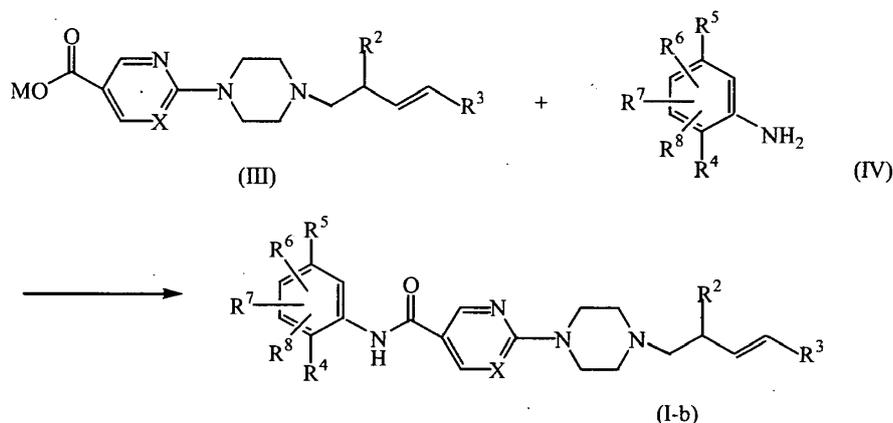
a) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (II) con un ácido apropiado para formar un compuesto de fórmula (I-a)

50

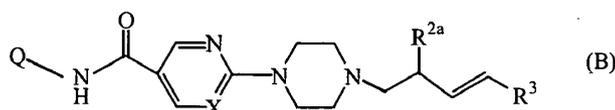


b) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (III), en la que M representa hidrógeno o un metal alcalino,

con un producto intermedio de fórmula (IV) para formar un compuesto de fórmula (I-b)



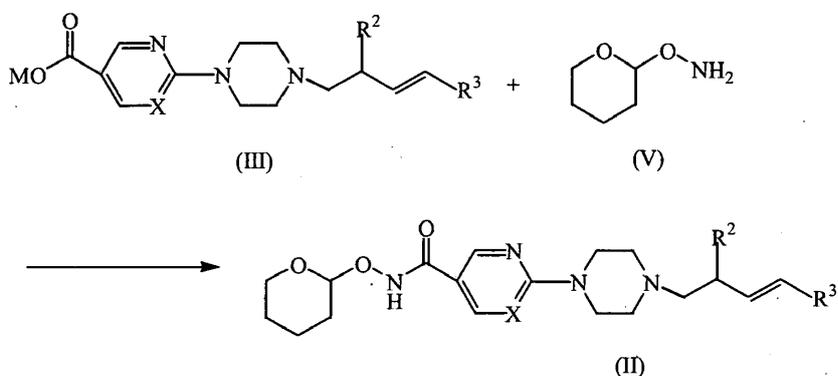
- 5 11. Compuesto de fórmula (B) en la que Q es alquiloxicarbonilo C₁₋₂, MO₂C (en el que M es hidrógeno o un metal alcalino) o tetrahidropiranioloxiaminocarbonilo, R^{2a} es tal como se definió para R² o alternativamente es hidroximetilo y X y R³ son tal como se definieron para la fórmula (I), y las formas de N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo.



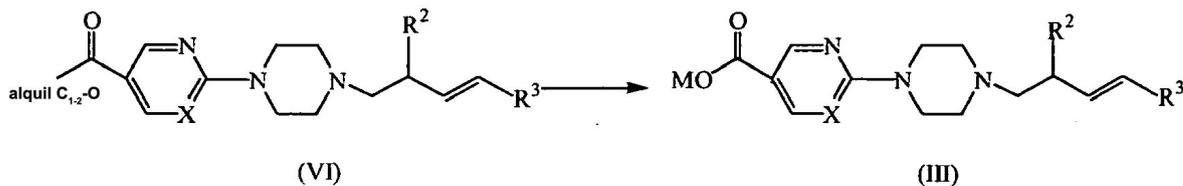
10

12. Proceso para preparar un compuesto según la reivindicación 11, caracterizado por

- 15 a) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (III) con un producto intermedio de fórmula (V) para formar un producto intermedio de fórmula (B) en la que Q es tetrahidropiranioloxiaminocarbonilo, representado por la fórmula (II) a continuación

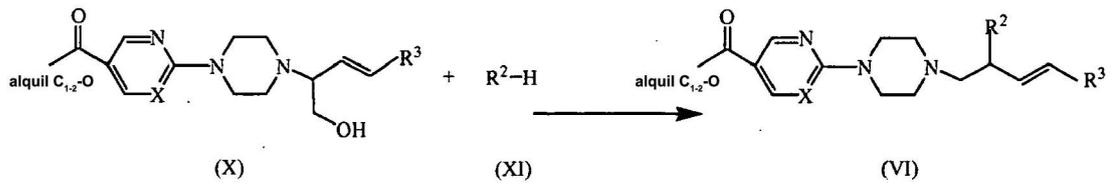


- 20 b) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (VI) con una disolución ácida apropiada o una base de metal alcalino apropiada, para formar un producto intermedio de fórmula (B) en la que Q es MO₂C, representado por la fórmula (III) a continuación



25

- c) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (X) con azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD), tri-*n*-butilfosfina (PBu₃) y un nucleófilo apropiado R²H (XI) para formar un producto intermedio de fórmula (B) en la que Q es alquiloxicarbonilo C₁₋₂, representado por la fórmula (VI) a continuación



5 d) hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (XII) con 1,4-dioxan-2,5-diol y un ácido borónico apropiado de fórmula (XV), en la que R³ es tal como se definió anteriormente, para formar un producto intermedio de fórmula (B) en la que Q es alquiloxycarbonilo C₁₋₂ y R^{2a} es hidroximetilo representado por la fórmula (X) a continuación

