

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 405**

51 Int. Cl.:

C07D 231/12 (2006.01)

C07D 403/04 (2006.01)

A61K 31/415 (2006.01)

C07D 321/10 (2006.01)

C07D 403/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2004 E 04816902 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1696907**

54 Título: **Inhibidores de la señalización de PDK-1/AKT**

30 Prioridad:

03.10.2003 US 508619 P

08.10.2003 US 509814 P

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

23.08.2013

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

CHEN, CHING-SHIH

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 420 405 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

Inhibidores de la señalización de PDK-1/AKT

5 Antecedentes de la invención

[0001] La cascada de señalización de fosfoinosítidos (PI) 3-cinasa/PDK-1/Akt representa un punto de convergencia para una diversidad de cinasas de tirosina y vías mediadas por citocinas que regulan la proliferación y la supervivencia celular, y ofrece un marco para explicar la capacidad de muchos factores tróficos extracelulares de mantener la supervivencia celular. La desregulación de esta cascada de señalización debido a la activación de receptores del factor de crecimiento constitutivos y/o a limitaciones de la PTEN, dan como resultado una regulación por incremento en la Akt, que subsiguientemente promueve la invasividad, la angiogénesis y la progresión tumoral. Por lo tanto, los inhibidores de la señalización de PDK-1/Akt tienen una relevancia traduccional para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos o quimiopreventivos útiles. Existe una necesidad de desarrollar nuevos compuestos que sean potentes inhibidores de la señalización de PDK-1/Akt. Existe finalmente una necesidad de desarrollar agentes quimioterapéuticos y agentes quimiopreventivos basados en la inhibición de la señalización de PDK-1/Akt.

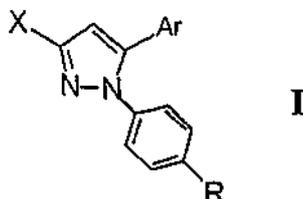
El documento EP-A-0.554.829 concierne a derivados de pirazol con una actividad antiinflamatoria, analgésica y antitrombótica. Los compuestos desvelados incluyen 1-(4-cianofenil)-3-(difluorometil)-5-[4-metilsulfonyl]fenil] pirazol.

Zhu y col., J. Nat. Cancer Inst., 94 (23), 1745 - 1757 concierne a compuestos inductores de la apoptosis. Desvelan compuestos que serían según la fórmula I, a continuación, excepto porque R es (por ejemplo) -CONH₂ o -SO₂NH₂. El documento WO03/086287 desvela compuestos inductores de la apoptosis similares en los que R es -CONH₂.

25

Resumen de la invención

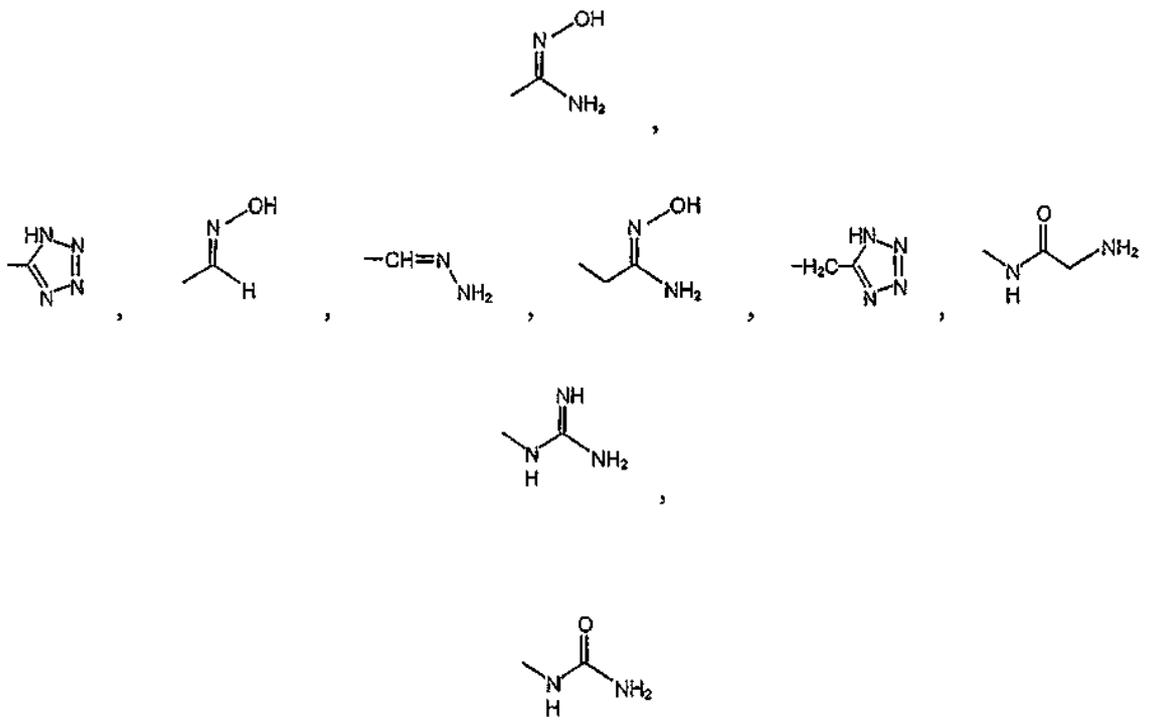
[0002] Se proporcionan compuestos de fórmula I:



30

en la que X se elige de entre alquilo y haloalquilo; Ar se elige del grupo que consiste en fenilo, bifenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y fluorenilo; R se elige del grupo que consiste en CN, -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN -CONH₂

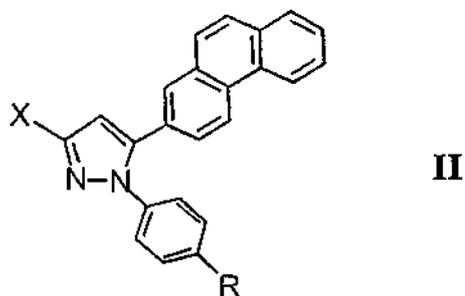
en la que X se elige de entre alquilo y haloalquilo; Ar se elige del grupo que consiste en fenilo, bifenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y fluorenilo; R se elige del grupo que consiste en -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN



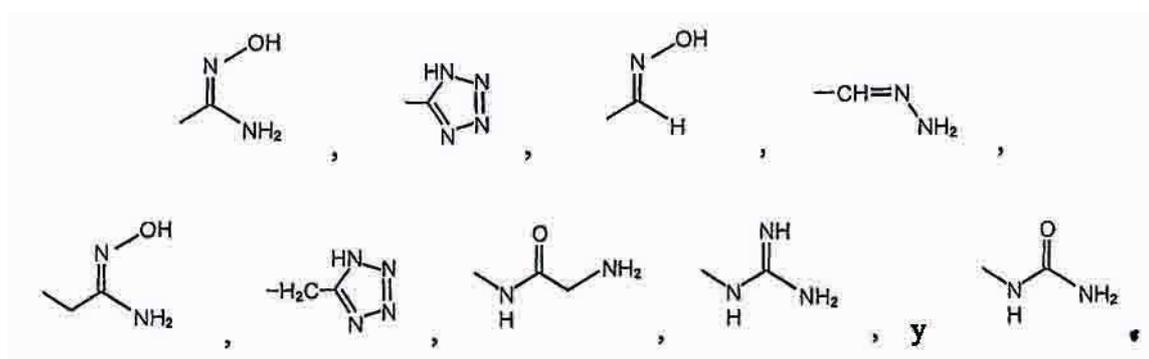
Dicho de otro modo, R se elige de entre grupos correspondientes a acetonitrilo, etilnitrilo, propilnitrilo, amidina, pirazol, oxima, hidrazona, acetamidina, acetamida, guanidina y urea. La Fórmula I también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Ar puede estar sustituido con uno o más radicales.

- 15 **[0007]** En algunas formas de realización, X es haloalquilo C₁ a C₄. En algunas formas de realización, X es CF₃. En algunas formas de realización, Ar está sustituido en cualquier posición sustituible con uno o más radicales, tales como, pero no limitados a, halo, alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, azido, azidoalquilo C₁-C₄, arilo, aquilarilo, haloarilo, haloalquilarilo y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, Ar se elige de entre 2-naftilo, 4-bifenilo, 9-antrilo, 2-fluorenilo, 4-azidofenilo, 4-azidometilfenilo, 4-(2-azidoetil) fenilo, 4-(3-azidopropil) fenilo, 20 4-(4-azidobutil) fenilo, 4-(4-azidofenil) fenilo, 4-(4-azidometilfenil) fenilo, 4-metilfenilo, 4-etilfenilo, 4-propilfenilo, 4-butilfenilo, 4-(2-bromoetil) fenilo, 4-(3-bromopropil) fenilo, 4-(4-bromoetil) fenilo, 4-(trifluorometil) fenilo, 4-(4-metilfenil) fenilo, 4-(4-bromometilfenil) fenilo, 4-(4-butilfenil) fenilo, 4-(4-terc-butilfenil) fenilo, 2-clorofenilo, 4-clorofenilo, 2,4-diclorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 2,5-diclorofenilo, 2,4-dimetilfenilo, 2,5-dimetilfenilo, 3,4-dimetilfenilo, 3,5-dimetilfenilo, 4-(4-clorofenil) fenilo, 4-(3,5-diclorofenil) fenilo, 4-(2,3-diclorofenil) fenilo, 4-(3,5-dimetilfenil)fenilo, 4-25 (2,4,5-triclorofenil) fenilo, 4-(4-trifluorometilfenil) fenilo, 2-fenantrenilo, 3-indolilo, 2-pirrolilo, 4-(bencil) fenilo, 4-t-butilfenilo y 9-fenantrenilo. En algunas formas de realización, Ar es 2-fenantrenilo. En algunas formas de realización, R es tal que RH es aminoacetamida o guanidina.

30 **[0008]** Otra forma de realización descrita en este documento es aquella de fórmula II:



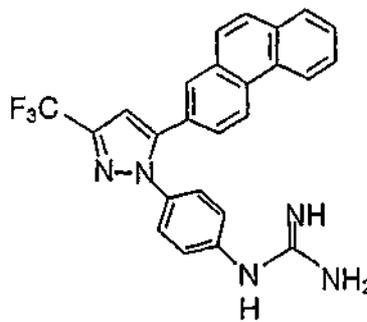
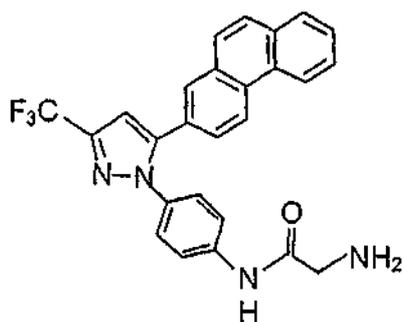
en la que X se elige de entre alquilo y haloalquilo; R se elige de entre -CN, -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN,



En algunas formas de realización, X es haloalquilo C₁ a C₄, y en algunas formas de realización, X es CF₃. En algunas formas de realización, R es tal que RH es aminoacetamida o guanidina. La fórmula II también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10

[0009] En otra forma de realización, los compuestos son aquellos de fórmula III o IV:



15 **[0010]** Los compuestos anteriores pueden usarse para inducir la apoptosis en células en proliferación no deseable en sujetos en necesidad de dicho tratamiento. El procedimiento implica tratar el sujeto en necesidad de dicho tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de las fórmulas I - IV o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 **[0011]** Los compuestos descritos en este documento son útiles para, pero no se limitan a, el tratamiento, la inhibición o el retraso de la aparición de los cánceres. Los compuestos y los procedimientos también son útiles en el tratamiento de precánceres y otros incidentes de proliferación celular no deseable. Los compuestos de fórmula I, II,

III ó IV, o combinaciones de los mismos, se administran a un sujeto que ha sido diagnosticado de, o está en riesgo de desarrollar, una alteración caracterizada por una proliferación celular no deseable. Los compuestos y los procedimientos son útiles para tratar cánceres que incluyen, pero no se limitan a, leucemia, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon, cánceres del sistema nervioso central, cáncer de ovario, cáncer de mama, 5 cáncer de riñón y cáncer de próstata. Adicionalmente, son útiles para ralentizar el crecimiento de estos cánceres en individuos con precánceres, así como en individuos con tendencia o con predisposición genética a estas alteraciones.

10 **[0012]** Los compuestos son útiles en procedimientos para inducir la apoptosis en células en proliferación rápida no deseada, comprendiendo el procedimiento la introducción de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto en las células en proliferación rápida no deseada. Según este procedimiento, las células en proliferación rápida no deseada pueden ser células cancerosas. Las células cancerosas pueden elegirse del grupo que consiste en leucemia, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon, cánceres del sistema nervioso central, 15 cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de riñón y cáncer de próstata.

15 **[0013]** Los compuestos son adicionalmente útiles para evitar la reestenosis en un sujeto que ha experimentado un procedimiento de angioplastia o de endoprótesis vascular, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, o combinaciones de los mismos, o sales farmacéuticamente 20 aceptables de los mismos, al sujeto que ha experimentado un procedimiento de angioplastia o de endoprótesis vascular.

[0014] Los siguientes términos, usados en este documento incluyen, pero no se limitan a, las siguientes definiciones.

25 **[0015]** El término "inhibidor de la señalización de PDK-1/Akt" significa que un compuesto específico o una combinación de compuestos es capaz de perturbar la vía de señalización de PDK-1/Akt, medido frente a un blanco, independientemente de si es *in vivo* o *in vitro*. Un procedimiento se establece en los ejemplos, a continuación, aunque también pueden usarse otros procedimientos conocidos ahora o desarrollados posteriormente.

30 **[0016]** El término "tratamiento", según se usa en este documento, engloba la administración y/o la aplicación de uno o más compuestos descritos en este documento, a un sujeto, con el propósito de proporcionar la prevención o el cuidado y/o el remedio de una dolencia. El "tratamiento" para el propósito de esta desvelación, puede, aunque no tiene por qué, proporcionar una cura; más bien, el "tratamiento" puede estar en forma del cuidado de la dolencia. Cuando los compuestos descritos en este documento se usan para tratar las células en proliferación no deseada, 35 incluyendo cánceres, el "tratamiento" incluye la destrucción parcial o total de las células en proliferación no deseable con unos efectos destructores mínimos sobre las células normales. Un mecanismo deseado de tratamiento de células en proliferación rápida no deseable, incluyendo células cancerosas, a nivel celular, es la apoptosis.

40 **[0017]** El término "prevención" según se usa en este documento incluye tanto la prevención como la ralentización de la aparición de una proliferación celular no deseada clínicamente evidente junto con la prevención o la ralentización de la aparición de una etapa preclínicamente evidente de una proliferación celular rápida no deseada en individuos en riesgo. También se pretende englobar con esta definición la prevención o la ralentización de la metástasis de células malignas o detener o revertir la progresión de las células malignas. Esto incluye el tratamiento profiláctico de aquellos en riesgo de desarrollar precánceres y cánceres. También están englobadas por esta 45 definición la prevención o la ralentización de la reestenosis en sujetos que han experimentado un procedimiento de angioplastia o de endoprótesis vascular.

[0018] Los términos "terapéuticamente eficaz" y "farmacológicamente eficaz" pretenden calificar la cantidad de cada agente que conseguirá el objetivo de la mejora en la gravedad de la enfermedad y la frecuencia de incidencia 50 con respecto al tratamiento con los compuestos descritos en este documento. Las cantidades terapéuticamente eficaces o farmacológicamente eficaces pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica.

[0019] El término "sujeto", con el propósito de tratamiento, incluye cualquier sujeto humano o animal que ha sido diagnosticado, tiene síntomas o muestra un riesgo de desarrollar una alteración caracterizada por una 55 proliferación celular rápida no deseada. Dichas alteraciones incluyen, pero no se limitan a, cánceres y precánceres. Para los procedimientos de prevención, el sujeto es cualquier sujeto humano o animal. Como ilustración, con el propósito de prevención, un sujeto puede ser un sujeto humano que está en riesgo de, o está genéticamente predispuesto a, obtener una alteración caracterizada por una proliferación celular rápida no deseada, tal como el cáncer. El sujeto puede estar en riesgo debido a la exposición a agentes carcinógenos, por estar genéticamente

predispuesto a alteraciones caracterizadas por una proliferación celular rápida no deseada, y similares. Aparte de ser útiles para el tratamiento de seres humanos, los compuestos descritos en este documento también son útiles para el tratamiento veterinario de mamíferos, incluyendo animales de compañía y animales de granja, tales como, pero no limitados a, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas y cerdos.

5

[0020] Dosis y administración

[0021] Los estudios preliminares con animales han demostrado que estos compuestos pueden absorberse por vía oral, pueden generar unas concentraciones séricas medias varias veces mayores que la TGI, y lo más importante, producen poca toxicidad a los animales tras la administración oral diaria durante un mes (datos no mostrados).

10

[0022] Los compuestos de la presente invención pueden formularse en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como comprimidos, cápsulas o elixires para su administración oral, o en disoluciones o suspensiones estériles para su administración parenteral. Los agentes terapéuticos descritos en este documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica.

15

[0023] El inhibidor de la señalización de PDK-1/Akt descrito en este documento se combina con un vehículo, portador, excipiente, ligante, conservante, estabilizante, sabor, etc., farmacéuticamente aceptable en una forma de dosificación unitaria así denominada por la práctica farmacéutica aceptada. La cantidad de sustancia activa en aquellas composiciones o preparaciones es tal que se obtiene una dosis adecuada en el intervalo indicado. En algunas formas de realización, la dosis puede ser de entre 0,1 y 1.000 mg del inhibidor de la señalización de PDK-1/Akt. En algunas formas de realización, las composiciones pueden formularse en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosis entre 1 y 500 mg. En otras formas de realización, la dosis puede ser desde 10 hasta 100 mg del principio activo. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente independientes adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. La dosis puede depender de muchos factores, tales como la edad y el tamaño del sujeto, la dolencia que se va a tratar, la gravedad de la dolencia y otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Teniendo en cuenta esos factores, las dosis pueden ser determinadas por los expertos en la técnica.

20

25

30

[0024] Para preparar las composiciones, se mezclan uno o más de los agentes terapéuticos de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable. Después de la mezcla o la adición del (los) agente(s) terapéuticos(s), la mezcla resultante puede ser una disolución, una suspensión o una emulsión. Estas pueden prepararse según procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. La forma de la mezcla resultante depende de diversos factores, incluyendo el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el portador o el vehículo seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para inducir una apoptosis en las células no deseadas, tales como las células cancerosas, y puede ser determinada empíricamente.

35

[0025] Los portadores o los vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los presentes agentes terapéuticos incluyen cualquiera de dichos portadores adecuados para el modo de administración en particular. Además, los materiales activos también pueden mezclarse con otros materiales activos que no deterioren la acción deseada, o con materiales que complementen la acción deseada, o que tengan otra acción. Los presentes agentes terapéuticos pueden formularse como el único principio farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros principios activos. También pueden usarse las sales de los presentes agentes terapéuticos para formular composiciones farmacéuticas eficaces.

40

45

[0026] Los presentes agentes terapéuticos pueden prepararse con portadores que los protejan frente a una rápida eliminación del cuerpo, tales como en formulaciones de liberación retardada o con recubrimientos. Dichos portadores incluyen formulaciones de liberación controlada tales como, pero no limitadas a, sistemas de administración microencapsulados. El compuesto activo puede incluirse en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para que ejerza un efecto terapéutico útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado.

50

[0027] El principio activo puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis menores para ser administrado a intervalos temporales. Se entiende que la dosis y la duración precisa del tratamiento son función de la enfermedad que se va a tratar, y pueden ser determinadas empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos, o mediante la extrapolación a partir de datos de ensayos *in vivo* o *in vitro*. Debe mencionarse que los valores de las concentraciones y las dosis también pueden variar según la gravedad de la dolencia que se va a

55

aliviar. Adicionalmente, debe entenderse que para cualquier sujeto en particular, deberían ajustarse los regímenes de dosificación específicos con el tiempo según las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en este documento son únicamente ejemplares y no pretenden limitar el ámbito o la práctica de las composiciones reivindicadas.

[0028] Las composiciones orales incluirán generalmente un diluyente inerte o un portador comestible, y pueden comprimirse en comprimidos o introducirse en cápsulas de gelatina. Con el propósito de una administración terapéutica oral, el compuesto o los compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, cápsulas o pastillas. Pueden incluirse agentes ligantes y materiales coadyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición.

[0029] Las composiciones, por ejemplo en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas o pastillas, pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un ligante tal como, pero no limitado a, goma de tragatanto, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; un excipiente tal como celulosa microcristalina, almidón o lactosa; un agente disgregante tal como, pero no limitado a, ácido algínico y almidón de maíz; un lubricante tal como, pero no limitado a, estearato magnésico; un deslizante, tal como, pero no limitado a, dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; y un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de fruta.

[0030] Los compuestos de las fórmulas I - IV pueden desencadenar la muerte celular mediante diversos mecanismos diferentes, sin embargo, en la mayoría de las formas de realización, los compuestos son capaces de inducir una apoptosis en células en proliferación no deseada. El término "apoptosis" se refiere al proceso de la muerte celular programada. En todas las personas mueren cada día cientos de miles de células viejas o dañadas mediante el proceso de apoptosis, y son sustituidas en un movimiento fluctuante para mantener un número constante de células vivas en el cuerpo. Las células viejas y las dañadas mueren en respuesta a una señal desencadenada en la superficie celular de las células objetivo para que se autodestruyan. La apoptosis se distingue de otros mecanismos de muerte celular, tales como la necrosis, que da como resultado una inflamación que incluye hinchamiento, enrojecimiento, dolor y sensibilidad. La apoptosis no estimula dichas reacciones. En la apoptosis, las células se resecan, se rompen en trozos y su contenido es discretamente eliminado mediante procedimientos que no inducen inflamación. Por estas razones, es altamente deseable inducir la apoptosis, en lugar de la necrosis, en células en rápida proliferación, tales como las células cancerosas. Sin embargo, las mutaciones en algunas células cancerosas confieren resistencia a la apoptosis a estas células. Se ha averiguado que los compuestos de las fórmulas I - IV inducen la apoptosis incluso en células cancerosas que, debido las mutaciones, son de otro modo resistentes a la apoptosis. La apoptosis pueden distinguirse de otros mecanismos de tratamiento mediante procedimientos tales como la microscopía, que son conocidos en la técnica.

[0031] Los términos tales como "células proliferativas", "células en proliferación", "células en rápida proliferación", "células en proliferación no deseable", "células en proliferación rápida no deseable" y "células en proliferación rápida no deseada", se refieren a células cancerosas, a células precancerosas y a otras células en división rápida no deseada en un sujeto.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

[0032] **Materiales** Se extrajo 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] bencensulfonamida de las cápsulas obtenidas en Amerisource Health (Malvem, PA, EE.UU.) con acetato de etilo, seguido de una recristalización en una mezcla de acetato de etilo y hexano. El kit de detección de muerte celular mediante ELISA se adquirió en Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). Los anticuerpos policlonales de conejo frente a Akt y fosfo-473 Ser Akt se obtuvieron en Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, EE.UU.). El anticuerpo monoclonal de ratón antipolimerasa de poli(ADPribosa) (PARP) fue suministrado por Phanningen (Sari Diego, CA, EE.UU.). El kit de ensayo de la cinasa PDK-1 se adquirió en Upstate (Lake Placid, NY, EE.UU.). Otros productos químicos y bioquímicos se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) salvo que se indique de otro modo. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN-¹H) se midieron con un Bruker 250 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm) relativos al pico de TMS con CDCl₃ como disolvente, salvo que se mencione de otro modo. Los análisis por espectrometría de masas de ionización por electronebulización de alta resolución se realizaron con un espectrómetro de masas de Transformada de Fourier de 3 Tesla Finnigan FTMS-2000.

Síntesis de compuestos químicos

[0033] Los compuestos enumerados en la Tabla 1 se prepararon y se ensayaron según se indica a continuación. Los nombres químicos, los datos de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se resumen a continuación. Los procedimientos usados para sintetizar los compuestos 1 - 36 se describen en los ejemplos, a continuación. Nota: los compuestos 1 - 24 no son según la invención.

Tabla 1 Nomenclaturas, caracterizaciones mediante RMN-¹H (resonancia magnética nuclear de protón) y HRMS (espectrometría de masas de alta resolución) de los compuestos 1 - 36.

10

Compuesto	Descripción
1	4-[5-(4-(2-bromoetil)fenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida
	RMN- ¹ H δ 3,16 (t, <i>J</i> = 6,4, 2,0 Hz, 2H), 3,60 (t, <i>J</i> = 6,4, 2,0 Hz, 2H), 4,90 (s, 2H), 6,75 (s, 1H), 7,13 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,20 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,47 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,91 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H)
	C ₁₈ H ₁₅ BrF ₃ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 495,9913; masa real, 495,9943
2	4-[5-(4-(3-bromopropil)fenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida
	RMN- ¹ H δ 2,16 (m, 2H), 2,81 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 2H), 3,41 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H), 5,08 (s, 2H), 6,76 (s, 1H), 7,15 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H), 7,25 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H), 7,47 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,90 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H)
	C ₁₉ H ₁₇ BrF ₃ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 510,0069; masa real, 510,0042
3	4-[5-(4-(2-azidoetil)fenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida
	RMN- ¹ H δ 2,90 (t, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H), 3,51 (t, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H), 5,49 (s, 2H), 6,76 (s, 1H), 7,17 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,24 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,42 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,85 (d, <i>J</i> = 8,7, 2,0 Hz, 2H)
	C ₁₈ H ₁₅ F ₃ N ₆ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 459,0821; masa real, 459,0817
4	4-[5-(4-(3-azidopropil)fenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida
	RMN- ¹ H δ 1,83 (m, 2H), 2,64 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H), 3,20 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H), 5,3 (s, 2H), 6,67 (s, 1H), 7,07 (m, 4H), 7,35 (dd, <i>J</i> = 7,5, 2,0 Hz, 2H), 7,79 (d, <i>J</i> = 7,5, 2,0 Hz, 2H)
	C ₁₉ H ₁₇ F ₃ N ₆ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 473,0978; masa real, 473,0946
5	4-[5-(4-butilfenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida

	<p>RMN-¹H δ 0,93 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H), 1,36 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 2,63 (t, <i>J</i> = 7,6 Hz, 2H), 5,54 *sm 2H), 6,76 (s, 1H), 7,15 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,20 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,45 (dt, <i>J</i> = 8,8, 2,0 Hz, 2H), 7,88 (dt, <i>J</i> = 8,8, 2,0 Hz, 2H)</p> <p>C₂₀H₂₀F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 446,1120; masa real, 446,1149</p>
6	<p>4-[5-(4-<i>t</i>-butilfenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-pirazol-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 1,33 (s, 9H), 4,90 (s, 2H), 6,53 (s, 1H), 7,32 (dd, <i>J</i> = 9,7 Hz, 4H), 7,42 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 8,02 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)</p> <p>C₂₀H₂₀F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 446,1120; masa real, 446,1118</p>
7	<p>4-[5-(2-naftalenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-pirazol-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 5,47 (s, 2H), 6,89 (s, 1H), 7,18 (dd, <i>J</i> = 8,6, 1,6 Hz, 1H), 7,42 (d a, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H), 7,51 - 7,55 (m, 2H), 7,78 - 7,83 (m, 6H)</p> <p>C₂₀H₁₄F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 440,0651; masa real, 440,0657</p>
8	<p>4-[5-(3-indolil)-3(trifluorometil)-1<i>H</i>-pirazol-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ (acetona-<i>d</i>₆) 6,69 (s a, 1H), 7,03-7,08 (m, 2H), 7,19 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H), 7,40 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H), 7,50 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H), 7,67 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,92 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H)</p> <p>C₁₈H₁₃F₃N₄O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 429,0603; masa real, 429,0606</p>
9	<p>4-[5-4-bifenilil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-pirazol-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 4,81 (s, 2H), 6,75 (s, 1H), 7,23 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,34 - 7,56 (m, 5H), 7,56 (m, 4H), 7,86 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H)</p> <p>C₂₂H₁₆F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 466,0807; masa real, 466,0811</p>
10	<p>4-[5-(4'-cloro[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-pirazol-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 6,42 (s, 2H), 6,83 (s, 1H), 7,30 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H), 7,40 - 7,59 (m, 8H), 7,92 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H)</p> <p>C₂₂H₁₅ClF₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 500,0418; masa real, 500,0432</p>

11	4-[5-(3',5'-dicloro[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida RMN- ¹ H δ 4,85 (s, 2H), 6,82 (s, 1H), 7,30 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,36 (s, 1H), 7,37 - 7,57 (m, 6H), 7,93 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H) C ₂₂ H ₁₄ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 534,0028; masa real, 534,0016
12	4-[5-(2',3'-dicloro[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida RMN- ¹ H δ 4,85 (s, 2H), 6,76 (s, 1H), 7,18 - 7,25 (m, 3H), 7,35 - 7,49 (m, 6H), 7,88 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H) C ₂₂ H ₁₄ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 534,0028; masa real, 533,9999
13	4-[5-(2',4',5'-tricloro[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il] bencensulfonamida RMN- ¹ H δ 4,86 (s, 2H), 6,77 (s, 1H), 7,25 (dt, <i>J</i> = 8,6, 2,0 Hz, 2H), 7,37 (dt, <i>J</i> = 8,6, s,0 Hz, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,46 (dt, <i>J</i> = 8,8, 2,0 Hz, 2H), 7,54 (s, 1H), 7,88 (dt, <i>J</i> = 8,9, 1,2 Hz, 2H) C ₂₂ H ₁₃ Cl ₃ F ₃ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 567,9638; masa real, 567,9679
14	4-[5-(4'-metil[1,1'-bifenil]4-il)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-il] bencensulfonamida RMN- ¹ H δ 2,32 (s, 3H), 4,57 (s, 2H), 6,72 (s, 1H), 7,18 - 7,21 (m, 4H), 7,39 - 7,52 (m, 6H), 7,84 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H) C ₂₃ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 480,0964; masa real, 480,0961
15	4-[5-(4'-trifluorometil[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-il] bencensulfonamida RMN- ¹ H δ 5,19 (s, 2H), 6,86 (s, 1H), 7,36 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,53 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,65 (m, 6H), 7,92 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H) C ₂₃ H ₁₅ F ₆ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 534,0681; masa real, 534,0677
16	4-[5-(4'-bromometil(1,1'-bifenil)-4-il)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-il] bencensulfonamida RMN- ¹ H δ 3,92 (s, 2H), 4,93 (s, 2H), 6,66 (s, 1H), 7,03-7,26 (m, 8H), 7,38 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H), 7,82 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H) C ₂₃ H ₁₇ BrF ₃ N ₃ O ₂ S; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 558,0069; masa real, 558,0112
17	4-[5-(3',5'-dimetil[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-il] bencensulfonamida

	<p>RMN-¹H δ 2,40 (s, 6H), 5,38 (s a, 2H), 6,83 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 7,25 (m, 4H), 7,50 (dd, <i>J</i> = 6,7, 1,7 Hz, 2H), 7,59 (dd, <i>J</i> = 6,7, 1,7 Hz, 2H), 7,92 (dd, <i>J</i> = 6,7, 1,7 Hz, 2H)</p> <p>C₂₄H₂₀F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 494,1120; masa real, 494,1119</p>
18	<p>4-[5-(4'-butil[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 0,96 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 3H), 1,41 (m, 2H), 1,66 9m, wH), 2,68 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H), 5,20 (s a, 2H), 6,84 (s, 1H), 7,29 (dd, <i>J</i> = 8,2, 2,0 Hz, 4H), 7,53 (dt, <i>J</i> = 8,2, 2,0 Hz, 4H), 7,62 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,93 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H)</p> <p>C₂₆H₂₄F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 522,1433; masa real, 522,1466</p>
19	<p>4-[5-(4'-terc-buti[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 1,35 (s, 9H), 4,87 (s, 2H), 6,59 (s, 1H), 7,44 - 7,57 (m, 6H), 7,58 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H), 7,92 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 8,12 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H)</p> <p>C₂₆H₂₄F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 522,1433; masa real, 522,1401</p>
20	<p>4-[5-(4-(fenilmetil)fenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 3,71 (s, 2H), 4,74 (s, 2H), 6,52 (s, 1H), 6,91-7,11 (m, 9H), 7,27 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H), 7,69 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H)</p> <p>C₂₃H₁₈F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 480,0964; masa real, 580,0938</p>
21	<p>4-[5-(9H-fluoren-2-il)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 3,88 (s, 2H), 4,64 (s, 2H), 6,68 (s, 1H), 7,26 - 7,38 (m, 4H), 7,56 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,74 - 7,81 (m, 3H), 7,90 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H)</p> <p>C₂₃H₁₆F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 478,0807; masa real, 478,0771</p>
22	<p>4-[5-(9-antraceni)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 4,63 (s, 2H), 6,93 (s, 1H), 7,33 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H), 7,45 - 7,55 (m, 8H), 8,04 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H), 8,60 (s, 1H)</p> <p>C₂₄H₁₆F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 490,0807; masa real 490,0769</p>
23	<p>4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometilil)-1<i>H</i>-1-il] bencensulfonaniide</p>

	<p>RMN-¹H δ (600 MHz) 4,89 (s, 2H), 6,92 (s, 1H), 7,37 (d, <i>J</i> = 8,5, 1,4 Hz, 1H), 7,51 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H), 7,54 - 7,69 (m, 3H), 7,80 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H), 7,86 - 7,92 (m, 4H), 8,64 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H)</p> <p>C₂₄H₁₆F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 490,0807; masa real, 490,0805</p>
24	<p>4-[5-(9-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] bencensulfonamida</p> <p>RMN-¹H δ 4,76 (s, 2H), 6,90 (s, 1H), 7,43 - 7,84 (m, 11H), 8,72 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 2H)</p> <p>C₂₄H₁₆F₃N₃O₂S; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 490,0807; masa real, 490,0833</p>
25	<p>4-[5 (2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] bencencarboxamida</p> <p>RMN-¹H δ 5,75 - 6,05 (d a, 2H), 7,0 (s, 1H), 7,50 (dd, <i>J</i> = 8,5, 1,4 Hz, 1H), 7,55 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,77 (m, 3H), 7,88 (m, 3H), 7,90 (m, 2H), 8,72 (m, 2H)</p> <p>C₂₅H₁₆F₃N₃O; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 454,0038; masa real, 454,1142</p>
26	<p>4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il] benzonitrilo</p> <p>RMN-¹H δ 6,91 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,50 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2H), 7,63 - 7,79 (m, 5H), 7,83 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2H), 7,92 (m, 1H), 8,64 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H)</p> <p>C₂₅H₁₄F₃N₃; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 436,1032; masa real, 436,1032</p>
27	<p>4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-1-il]-N-hidroxi-benzamidina</p> <p>RMN-¹H δ 7,10 (s, 1H), 7,34 (dd, <i>J</i> = 4,0,0,9 Hz, 1H), 7,36 (d, <i>J</i> = 0,9 Hz, 1H), 7,37 (d, <i>J</i> = 0,9 Hz, 1H), 7,42 - 7,45 (m, 3H), 7,46 (d, <i>J</i> = 0,8 Hz, 1H), 7,51 - 7,52 (m, 2H), 7,53 (d, <i>J</i> = 0,9 Hz, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,91 (s, 1H)</p> <p>C₂₅H₁₇F₃N₃O; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 469,1220; masa real, 469,1247</p>
28	<p>5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-4-(1<i>H</i>-1-tetrazol-5-ilfenil)-1<i>H</i>-pirazol</p> <p>RMN-¹H δ 6,82 (s, 1H), 7,28 (d, <i>J</i> = 1,8 Hz, 1H), 7,38 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,48 - 7,74 (m, 5H), 7,74 (d, <i>J</i> = 2,5 Hz, 2H), 7,95 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 8,47 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H)</p> <p>C₂₅H₁₅F₃N₆; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 479,1202; masa real, 479,1225</p>

29	4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-pirazol-1-il]-benzaldehído oxima
	RMN- ¹ H δ 6,81 (s, 1H), 7,27 - 7,30 (m, 3H), 7,47 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,52 - 7,57 (m, 4H), 76,8 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,75-7,79 (m, 2H), 8,48 - 8,53 (m, 2H)
	C ₂₅ H ₁₆ F ₃ N ₃ O; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 454,1137; masa real, 454,1106
30	4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-pirazol-1-il]-benzaldehído hidrazona
	RMN- ¹ H δ 6,81 (s, 1H), 7,27 - 7,30 (m, 2H), 7,33 (d, <i>J</i> = 1,8 Hz, 1H), 7,42 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H), 7,53 - 7,55 (m, 2H), 7,57 - 7,60 (m, 2H), 7,68 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H), 7,75 (d, <i>J</i> = 1,7 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H), 8,48 - 8,55 (m, 2H)
	C ₂₅ H ₁₇ F ₃ N ₄ ; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 453,1297; masa real, 453,1302
31	4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-pirazol-1-il]-fienil}-acetoniitrilo
	RMN- ¹ H δ 3,77 (S, 2h), 6,93 (S, 1h), 7,29 - 7,43 (M, 4h), 7,66 - 7,86 (M, 6h), 8,65 (T, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H)
	C ₂₆ H ₁₆ F ₃ N ₃ ; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 450,1151; masa real, 450,1188
32	2-{4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -1-pirazol-1-il]-fenil}-N-hidroxi-acetamidina
	RMN- ¹ H δ 3,30 (s, 1H), 3,38 (s, 1H), 6,83 (s, 1H), 7,20 - 7,41 (m, 4H), 7,59 - 7,89 (m, 6H), 8,55 - 8,60 (m, 3H)
	C ₂₆ H ₁₉ F ₃ N ₄ O; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 461,1580; masa real, 461,1584
33	5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-4-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-ilmetilfenil)-1 <i>H</i> -pirazol
	RMN- ¹ H δ 4,45 (s, 2H), 7,15 (s, 1H), 7,42 (s, 4H), 7,53 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 1H), 7,66 - 7,76 (m, 3H), 7,89 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H), 8,01 (m, 2H), 8,78 (t, <i>J</i> = 6,9 Hz, 2H)
	C ₂₆ H ₁₇ F ₃ N ₆ ; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 493,1335; masa real, 493,1359
34	2-amino-N-{4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il]-fenil} acetamida
	RMN- ¹ H δ 3,48 (s, 2H), 6,92 (s, 1H), 7,35 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,42 (dd, <i>J</i> = 8,6, 1,7 Hz, 1H), 7,62 - 7,72 (m, 5H), 7,79 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H), 7,85 - 7,94 (m, 2H), 8,62 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 9,56 (br s 1H)
	C ₂₆ H ₁₉ F ₃ N ₄ O; HRMS (M + Na ⁺): masa teórica, 483,1403; masa real, 483,1389

35	<p>4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-pirazol-1-il]-fenil-guanidina</p> <p>RMN-¹H δ 6,90 (s, 1H), 7,19 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,34 (dd, <i>J</i> = 8,7, 2,0 Hz, 1H), 7,39 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,61 - 7,67 (m, 3H), 7,79 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 1H), 7,84 - 7,91 (m, 3H), 8,62 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 9,95 (s, 1H)</p> <p>C₂₅H₁₈F₃N₅; HRMS (M + H): masa teórica, 446,1587 (M + H); masa real, 446,1596 (M + H)</p>
36	<p>4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1<i>H</i>-pirazol-1-il]-fenil-urea</p> <p>RMN-¹H δ 6,98 (s, 1H), 7,19 (dt, <i>J</i> = 8,9, 2,1 Hz, 2H), 7,34 - 7,42 (m, 3H), 7,51 - 7,62 (m, 4H), 7,70 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 1H), 7,81 - 7,85 (m, 2H), 8,59 - 8,64 (m, 2H)</p> <p>C₂₅H₁₇F₃N₄O; HRMS (M + Na⁺): masa teórica, 469,1252; masa real, 469,1199</p>

[0034] Las células humanas PC-3 (p53^{-/-}) de cáncer de próstata no sensibles a andrógenos para el cultivo celular se adquirieron en la American Type Tissue Collection (Manassas, VA, EE.UU.). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.), complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS; Gibco) a 37°C en una estufa de incubación humidificada que contiene un 5% de CO₂.

[0035] **Análisis de la viabilidad celular** Se evaluó el efecto de la 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il] bencensulfonamida y sus derivados sobre la viabilidad de las células PC-3 mediante el uso de un ensayo con MTT {bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2*H*-tetrazolio]} en seis replicados. Las células se hicieron crecer en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10% en placas de fondo redondo de 96 pocillos durante 24 h, y se expusieron a varias concentraciones de los compuestos 1 - 36 disueltos en DMSO (concentración final ≤ 0,1%) en medio RPMI 1640 que contenía un 1% de suero durante diferentes intervalos de tiempo. Los controles recibieron vehículo de DMSO a una concentración igual a la de las células tratadas con el fármaco. El medio se eliminó y se sustituyó por 200 ml de MTT de 0,5 mg/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, y las células se incubaron en la estufa de incubación de CO₂ a 37°C durante 2 h. Los sobrenadantes se eliminaron de los pocillos, y el pigmento MTT reducido se solubilizó en 200 ml/pocillo de DMSO. La absorbencia a 570 nm se determinó con un lector de placas.

[0036] **Proliferación celular** Las células PC-3 se sembraron en placas de seis pocillos a 50.000 células/pocillo en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%. Después de un periodo de unión de 24 h, las células se trataron por triplicado con la concentración indicada de los compuestos 1 - 36 o con vehículo de DMSO en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%. Las células se recogieron en diferentes intervalos temporales mediante tripsinización, y se contaron usando un contador Coulter modelo Z1 D/T (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.).

[0037] **Análisis de la apoptosis** Se usaron dos procedimientos para evaluar la muerte celular apoptótica inducida por el fármaco: la detección de la fragmentación del ADN mediante el kit de detección de muerte celular mediante ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y mediante un análisis por inmunotransferencia Western de la escisión de polimerasa de poli-(ADP-ribosa) (PARP). El ELISA se realizó según las instrucciones del fabricante, y se basa en la determinación cuantitativa de los fragmentos de ADN citoplasmáticos asociados a histonas en forma de mononucleosomas u oligonucleosomas generados después de la muerte apoptótica inducida. En resumen, se cultivaron 4 x 10⁵ células PC-3 en un matraz T-25 durante 24 h antes del tratamiento. Las células se trataron con el vehículo de DMSO o con el agente de prueba a las concentraciones indicadas durante 6 - 24 h, se recogieron y se usaron los lisados equivalentes a 2 x 10³ células PC-3 en el ELISA. Para el ensayo de escisión de la PARP, las células tratadas con el fármaco se recogieron 4 - 8 h después del tratamiento, se lavaron con PBS enfriado en hielo y se resuspendieron en tampón de lisis que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 137 mM, CaCl₂ 1 mM, 10% de glicerol, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato, 0,1% de SDS, fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencensulfonilo 100 μM, leupeptina a 10 μg/ml y aprotinina a 10 μg/ml. Los lisados celulares solubles se recogieron después de una centrifugación a 10.000 g durante 5 min. Se resolvieron cantidades equivalentes de proteínas (60 - 100 μg) de cada

lisado en geles de SDS-poliacrilamida al 8%. Las bandas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron mediante inmunotransferencia con un anticuerpo anti-PARP.

5 **[0038] Inmunotransferencia.** El procedimiento general para el análisis mediante inmunotransferencia Western de la Akt y la fosfo-Akt se describe como sigue. Las células se lavaron en PBS, se resuspendieron en tampón de muestra de SDS sonicadas con un sonicador ultrasónico durante 5 s, y se hirvieron durante 5 min. Después de una breve centrifugación, se resolvieron las concentraciones equivalentes de proteínas procedentes de las fracciones solubles en geles de SDS-poliacrilamida al 10% en un aparato Minigel, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando una celda de transferencia semiseca. La membrana inmunotransferida se lavó
10 tres veces con TBS que contenía un 0,05% de Tween 20 (TBST). Después de bloquear con TBST que contenía un 5% de leche desnatada durante 60 min, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a una dilución de 1:1.000 en TBST-5% de leche semidesnatada a 4°C durante 12 h, y después se lavó tres veces con TBST. La membrana se sondeó con conjugados de IgG-HRP de cabra anti-conejo (1:1.000) durante 1 h a temperatura ambiente, y se lavó tres veces con TBST. Los inmunotransferidos se visualizaron mediante quimioluminiscencia mejorada.

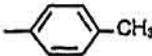
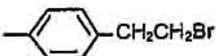
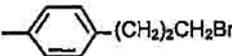
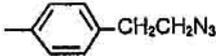
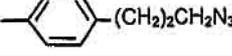
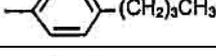
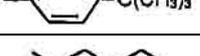
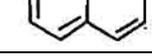
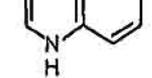
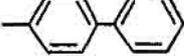
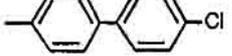
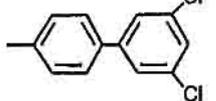
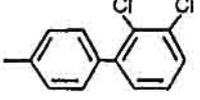
15 **[0039] Actividad de la cinasa PDK-1** Este ensayo *in vitro* se realizó usando un kit de ensayo de la cinasa PDK-1 (Upstate Lake Placid, NY, EE.UU.) según las instrucciones del vendedor. Este ensayo exento de células se basa en la capacidad de la PDK-1 recombinante de activar, en presencia de vehículo de DMSO o del agente de prueba, su cinasa regulada por suero y glucocorticoides cascada abajo (SGK), que a su vez, fosforila el sustrato peptídico específico de Akt/SGK RPRAATF con [γ -³²P]-ATP. El sustrato peptídico fosforilado con [³²P] se separa
20 entonces del [γ -³²P]-ATP residual usando papel de fosfocelulosa P81 y se cuantifica con un contador de centelleo después de tres lavados con ácido fosfórico al 0,75%. Los valores referidos representan las medias de dos determinaciones independientes.

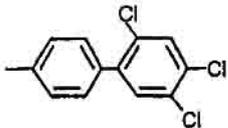
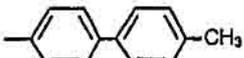
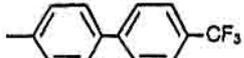
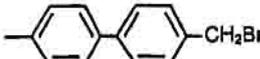
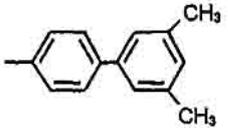
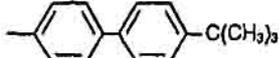
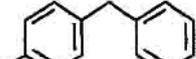
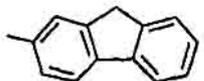
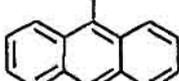
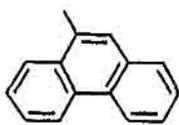
25 **[0040] Ensayo de la cinasa Akt inmunoprecipitada** La inmunoprecipitación de la Akt se realizó según un procedimiento publicado modificado. Las células PC-3 se trataron con vehículo de DMSO o con los agentes de prueba a las concentraciones indicadas durante 2 h y después se lisaron a 4°C durante 1 h en tampón A que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 1% de Triton X-100, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, fluoruro sódico 50 mM, β -
30 glicerofosfato sódico 10 mM, 0,1% de 2-mercaptoetanol, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM y 1 μ g/ml de cada una de aprotinina, pepstatina y leupeptina. Los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min, y el sobrenadante se trató con anti-Akt a 4°C durante 60 min, seguido de microesferas de proteína G-agarosa durante 60 min adicionales. El inmunoprecipitado se usó para analizar la actividad de la cinasa Akt mediante el uso del sustrato peptídico específico de Akt/SGK RPRAATF como se ha descrito anteriormente. Los valores representaban las medias de dos determinaciones independientes.

35 **[0041] Análisis estadístico** Cada experimento se realizó por triplicado, salvo que se indique de otro modo. Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces en diferentes ocasiones. Cuando sea apropiado, los datos se presentan como la media + un intervalo de confianza del 95%.

40 **[0042]** La estructura y la potencia en la inhibición de la actividad de la cinasa PDK-1 y del crecimiento de las células PC-3 de los compuestos 1 - 24 (que no son compuestos de la invención) se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2 Estructuras y potencia para inhibir la actividad de la cinasa PDK-1 recombinante y para inducir la muerte apoptótica en células PC-3 de la 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] bencensulfonamida y de los
45 compuestos 1 - 24

			
Número	Ar	CI ₅₀ (μM)	
		PDK-1	PC-3
Compuesto comparativo		48	30
1		42	18
2		38	17
3		32	17
4		34	18
5		20	9
6		34	18
7		24	11
8		65	31
9		21	11
10		22	9
11		18	10
12		23	10

13		9	5
14		15	8
15		18	8
16		20	11
17		17	9
18		32	15
19		32	15
20		15	8
21		16	9
22		12	7
23		9	5
24		42	23

[0043] Estos compuestos, excepto el derivado de indol 8, mostraron unas actividades inhibitoras de la PDK-1 y antiproliferativas mejoradas con respecto a la 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] bencensulfonamida. Adicionalmente, ninguno de estos compuestos mostró una actividad inhibitora de la COX-2 mensurable (datos no mostrados). Se apreció un incremento general en la actividad inhibitora de la PDK-1 según aumentaba el volumen del anillo aromático, es decir, anillos aromáticos tricíclicos (21 - 23) > bifenilo sustituido (9 - 19) > fenilo sustituido (1 - 6). Estos datos sugieren que el sistema aromático se une a una gran región hidrófoba del bolsillo de la enzima. De entre los 24 análogos examinados, el compuesto 23 representaba el derivado óptimo, con unos valores de CI_{50} de 9 μ M y 5 μ M para inhibir la actividad de la PDK-1 y la viabilidad de las células PC-3, respectivamente, según se refiere en la Tabla 2. Estos valores de CI_{50} se correspondían con una mejora de entre 5 y 6 veces con respecto a las actividades de la 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] bencensulfonamida

(48 μM y 30 μM , respectivamente). Sin embargo, el compuesto 24 mostró una disminución, en comparación con el compuesto 59, de la actividad inhibidora de la PDK-1, que podría ser atribuible a impedimentos estéricos impuestos por una orientación desfavorable del anillo aromático tricíclico.

5 **[0044]** Existía una correlación entre la PDK-1 y la inhibición del crecimiento de las PC-3 en todos los compuestos examinados, lo que sugiere la relevancia mecanística de la inhibición de la PDK-1 sobre el efecto antiproliferativo. Globalmente, el valor de la CI_{50} para la inhibición de la proliferación de las células PC-3 era aproximadamente la mitad del de la inhibición de la PDK-1. Esta discrepancia podría surgir de una sinergia mecanística entre la inhibición de la PDK-1 y la concomitante desfosforilación de la Akt por la fosfatasa de proteínas
10 2A (PP2A) en células tratadas con Aug, dando como resultado un aumento en la desactivación de la Akt. Para examinar esta premisa, se trataron células PC-3 con diferentes concentraciones del compuesto 23 durante 2 h, y se evaluó el consiguiente efecto sobre AM mediante dos ensayos independientes: la actividad de la cinasa Akt inmunoprecipitada y el estado de fosforilación de la Akt. Ambos ensayos dieron resultados coherentes.

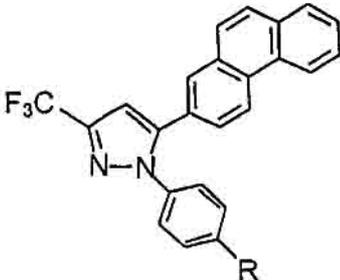
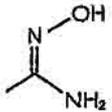
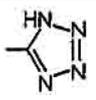
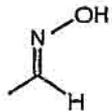
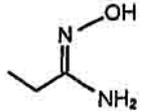
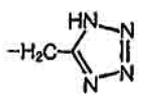
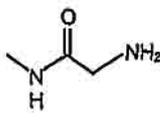
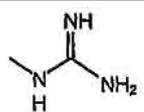
15 **[0045]** Según el ensayo de la cinasa, la CI_{50} del compuesto 23 para inhibir la activación intracelular de la kt era de 5 μM . Ni el compuesto 23 ni ningún otro de los compuestos mostraron un efecto inhibitor directo sobre la actividad de la Akt inmunoprecipitada. Mientras tanto, el análisis por inmunotransferencia Western muestra que el tratamiento de las células PC-3 con el compuesto 23 a 5 μM y superior condujo a una significativa desfosforilación de la Akt.

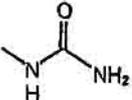
20 **[0046]** La inhibición de la señalización de PDK-1/Akt condujo a la muerte apoptótica en células PC-3 en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 1% de una forma dependiente de la dosis, según se evidenció por la fragmentación del ADN y la escisión de la PARP. La dosis del compuesto 23 que se requirió para la inducción de la muerte del 50% de las células PC-3 a las 24 h era de 5 μM . Los valores de la CI_{50} del compuesto 23 para inducir la muerte de las
25 células PC-3 eran coherentes con los de la inhibición de la activación de la Akt en células tratadas con el fármaco. Adicionalmente, se examinó el efecto del compuesto 23 sobre la proliferación de las células PC-3 en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10%. El compuesto 23 a 1 μM mostró una sustancial actividad antiproliferativa. En conjunto, estos datos indicaban claramente la eficacia *in vitro* del compuesto 23 en la inhibición del crecimiento de las PC-3.

30 **[0047]** El modelo mostró que el compuesto 23 se anclaba en el dominio de unión al ATP, que está ubicado en una profunda hendidura entre los dos lóbulos de la PDK-1. Aunque el compuesto 23 competía con el ATP por la unión, se encontró que el modo de unión del compuesto 23 era de algún modo diferente al del ATP. Mientras que la fracción de bencensulfonamida ocupaba el motivo de unión adenina, la fracción de pirazol planar era perpendicular
35 al anillo ribosa. Esta disposición posicionaba el anillo de fenantreno adyacente por detrás del bolsillo de unión al trifosfato. El anillo de fenantreno formaba interacciones hidrófobas con una región apolar formada por los residuos 88 - 96 que engloban parte de las dos láminas β adyacentes unidas por un bucle rico en glicina.

40 **[0048]** En la Tabla 3 se resumen las estructuras de doce derivados representativos, su potencia frente a la PDK-1 y su capacidad para provocar la muerte apoptótica en células PC-3 (el compuesto 25 no es un compuesto de la invención).

45 Tabla 3 Estructuras y potencia para la inhibición de la actividad de la cinasa PDK-1 recombinante y para inducir una muerte apoptótica células PC-3 para los compuestos 25 - 36. Las estructuras generales de estos compuestos se muestran en la parte superior.

Número	R	Cl ₅₀ (μM)	
		PDK-1	PC-3
			
25	-CONH ₂	12	7
26	-CN	45	30
27		40	25
28		52	32
29		25	14
30	-CH=N-NH ₂	16	10
31	-CH ₂ CN	42	25
32		15	8
33		45	27
34		5	5
35		2	3

36		40	24
----	---	----	----

- [0049]** De entre en estos derivados, los compuestos 34 y 35 mostraron unos valores de la CI_{50} para la inhibición de la PDK-1 de 5 μ M y 2 μ M, respectivamente, que representaban unos incrementos de 2 y 5 veces en la potencia con respecto al compuesto 23. Los compuestos 34 y 35 contenían cadenas laterales de 2-aminoacetamida (-NHC(O)CH₂NH₂) y guanidina (-NHC(=NM)NH₂), respectivamente. Al igual que el compuesto 23, no mostraron una inhibición directa apreciable sobre la actividad de la cinasa Akt inmunoprecipitada, ni había una actividad inhibidora de la COX-2 mensurable detectada a unas concentraciones de hasta 50 μ M. La exposición de las células PC-3 a cualquiera de los agentes, incluso a 1 μ M, dio como resultado una disminución sustancial en el nivel de fosfo-Akt. Esta mejora en la potencia reflejaba un fortalecimiento de los puentes de hidrógeno en las interacciones proteína-ligando para estos derivados. Esta premisa estaba apoyada por el anclaje modelado del compuesto 35 en el sitio de unión al ATP. El grupo guanidino del compuesto 35 se asemejaba a la estructura parcial del anillo de purina del ATP, lo que permitía la formación de los puentes de hidrógeno, con las Ser160 y Ala162 según se representa en el modelo de anclaje.
- 15 **[0050]** Efectos celulares de los inhibidores de la señalización de PDK-1/Akt Ambos compuestos 34 y 35 inducían una muerte apoptótica en células PC-3 en medio que contenía FBS al 1% de una forma dependiente de la dosis, como se demostró por la fragmentación del ADN y la escisión de la PARP. Estos agentes mostraron una potencia mayor que el compuesto 23 en la inducción de apoptosis a unas concentraciones mayores de 2,5 μ M. Además, estos derivados se remitieron al Developmental Therapeutic Program (DTP) del National Cancer Institute (NCI) para un cribado frente a 60 líneas celulares tumorales humanas, que representan leucemia, melanoma y cánceres de pulmón, de colon, de cerebro, de ovario, de mama, de próstata y de riñón. Los datos de respuesta frente a la dosis de una línea célula representativa de cada clase de células tumorales después de dos días de exposición en medio que contenía FBS al 5% se muestran en la Fig. 1C, que incluyen: 1, RPMI-células de leucemia 8226; 2, NCI-células de cáncer de pulmón no microcítico H322M; 3, células HT29 de cáncer de colon; 4, células U251 de cáncer del SNC; 5, células cancerosas SK-MEL-28 de melanoma; 6, células SK-OV-3 de cáncer de ovario; 7, células RXF 393 de cáncer de riñón; 8, células PC-3 de cáncer de próstata; 9, células MDA-MB-231 de cáncer de mama. Muchas de estas líneas celulares respondían al efecto inhibitor del crecimiento de ambos agentes a unas concentraciones tan bajas como 0,1 μ M.
- 30 **[0051]** En el ensayo con las 60 líneas celulares, se calcularon tres parámetros de respuesta frente a la dosis para cada línea celular basándose en las curvas de inhibición del crecimiento. Estos parámetros incluyen G150 (concentración que da como resultado una inhibición del crecimiento del 50%), TGI (concentración que da como resultado una herramienta de inhibición del crecimiento), y LC50 (concentración que da como resultado una reducción del 50% en el nivel de proteínas medido al final del tratamiento con el fármaco en comparación con el inicial). Las medias de estos parámetros de las 60 líneas celulares diferentes para los compuestos 34 y 35 después de un tratamiento de dos días fueron como sigue, respectivamente, G150: 1,1 y 1,2 μ M; TGI: 3,2 y 2,9 μ M; LC50: 24 y 8,5 μ M. Estos datos demuestran claramente la eficacia *in vitro* de los compuestos 34 y 35. Ambos agentes fueron capaces de suprimir completamente el crecimiento celular en un diverso abanico de líneas celulares tumorales en el intervalo terapéutico de 3 - 5 μ M.
- 40 **[0052]** A la luz del papel conservado de la señalización de PDK-1/Akt en la supervivencia y la proliferación de las células cancerosas, esta vía representa un objetivo terapéuticamente relevante para el desarrollo de pequeñas moléculas inhibitoras biodisponibles por vía oral.
- 45 **[0053]** El anclaje *in silico* del compuesto 23 en el bolsillo de unión al ATP mostró que la molécula se anclaba en el dominio de unión al ATP, en parte, a través de puentes de hidrógeno entre la sulfonamida y la amida de la Ala162. También se ha informado de que la Ala162 juega un papel clave en el anclaje de otros ligandos tales como ATP¹⁷ y UCN-01 a la PDK-1. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la fracción de sulfonamida del compuesto 23 podría ser susceptible de alteraciones para optimizar su potencia.
- 50 **[0054]** Consecuentemente, la sustitución de la función sulfonamida por 2-aminoacetamida (-NHC(O)CH₂NH₂) y guanidina (-NHC(=NM)NH₂) condujo a los compuestos 34 y 35, ambos de los cuales mostraron una inhibición mejorada de la PDK-1, con unos valores de CI_{50} de 5 y 2 mM, respectivamente. El anclaje del compuesto 35 en el sitio de unión al ATP reveló la existencia de un puente de hidrógeno adicional entre la fracción de guanidina y el

oxígeno del esqueleto de la Ser160, lo que sugiere que la mejora de la potencia podría ser atribuible a un aumento en los puentes de hidrógeno. El efecto de estas cadenas laterales sobre la unión con el ligando es, sin embargo, sutil, según se ilustra por la relación entre estructura y actividad resumida en la Tabla 3.

5 **[0055]** La elevada potencia de los compuestos 34 y 35 en la inhibición de la PDK-1 estaba reflejada en sus capacidades para bloquear eficazmente la activación de la Akt e inducir una muerte celular apoptótica en las células PC-3 a bajas concentraciones μM (Figs. 1A, B). Aun más importante, debido al papel conservado de la señalización de PDK-1/Akt en la proliferación y la supervivencia celulares, estos agentes eran potentes inhibidores del crecimiento celular en un medio que contenía suero en las 60 líneas celulares tumorales humanas examinadas, con unos valores medios de GI50 (inhibición del 50% del crecimiento celular) de 1,2 μM y 1,3 μM , respectivamente, unos valores áridos de la TGI (inhibición total del crecimiento) de 3,2 μM y 2,9 μM , respectivamente. Nuestros estudios preliminares con animales han mostrado que estos compuestos pueden absorberse por vía oral, pueden generar unas concentraciones séricas medias varias veces superiores a la TGI, y más importante, producir poca toxicidad a los animales tras su administración oral diaria durante un mes (datos no mostrados).

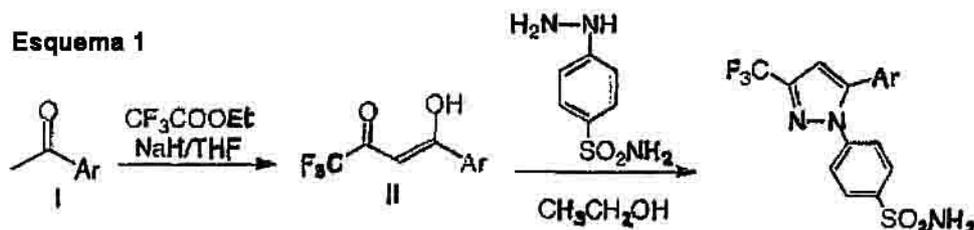
15

[0056] Las pruebas de eficacia *in vivo* frente a diferentes xenoinjertos tumorales en ratones no tratados está actualmente en marcha en este laboratorio. Además, las pruebas toxicológicas y farmacológicas de estos agentes serán llevadas a cabo dentro del programa Rapid Access to Intervention Development (RAID) del NCI.

20 Procedimientos sintéticos generales para los compuestos 1 - 24

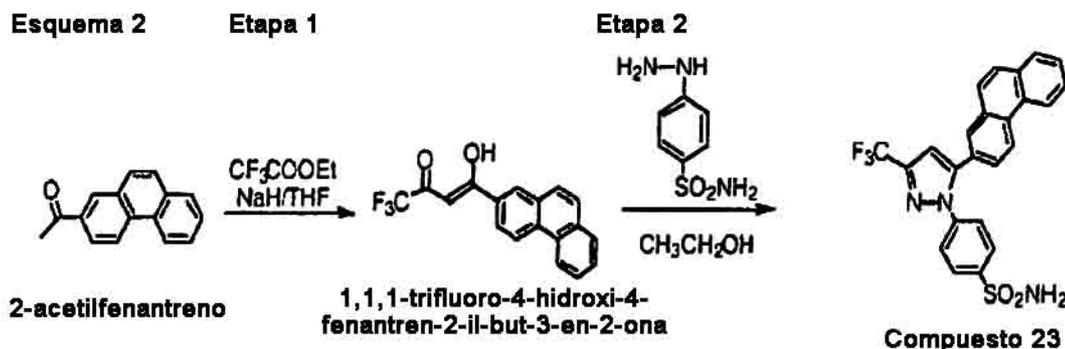
[0057] Todos los reactivos químicos y los disolventes orgánicos se adquirieron en Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) salvo que se indique de otro modo. Los compuestos 1 - 24 se sintetizaron según un procedimiento general en dos etapas descrito en el Esquema 1, en el que Ar representa las respectivas estructuras del anillo aromático.

25



El compuesto 23 se usa aquí como un ejemplo para ilustrar la síntesis del grupo de compuestos (Esquema 2). Otros compuestos siguieron los mismos procedimientos a través de precursores y los respectivos intermedios con diferentes estructuras del anillo aromático (compuestos I y II).

30



[0058] **EJEMPLO 1 Síntesis del precursor de la 1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-4-fenantren-2-il-but-3-en-2-ona** (etapa 1). A una suspensión de hidruro sódico (NaH; 0,13 g, 5,4 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano anhidro (THF) se añadió trifluoracetato de etilo (CF_3COOEt ; 0,64 g, 4,5 mmol) en una atmósfera de argón. Después de agitar a 25°C durante 10 minutos, se añadió gota a gota 2-acetil-fenantreno (1 g, 4,5 mmol) en 5 ml de THF a la disolución. La mezcla se volvió transparente, y de color naranja a los 30 minutos, y después de agitar durante 2 horas adicionales,

se concentró a vacío. El residuo se suspendió en agua, y se extrajo con acetato de etilo (15 ml) dos veces. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad a vacío para dar el producto (sólido de color amarillo; 1,29 g, rendimiento del 90%). El producto se usó directamente sin purificación adicional.

5 **[0059] EJEMPLO 2 Síntesis del Compuesto 23** (etapa 2). Se añadió clorhidrato de 4-hidracinbencen-1-sulfonamida (1,1 g; 4,9 mmol) a una disolución agitada de 1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-4-fenantren-2-il-but-3-en-2-ona (1,29 g, 4,1 mmol) en 40 ml de etanol. La mezcla se calentó a reflujo durante 12 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó
10 mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice para producir **59** (1,52 g, rendimiento del 80%).

[0060] EJEMPLOS 3 - 14 Síntesis of los Compuestos 25 - 36 Los compuestos 25 - 36 se sintetizaron usando 1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-4-fenantren-2-il-but-3-en-2-ona, producto de la anteriormente mencionada etapa 1, como precursor común, según se resume en la Fig. 2.

15

[0061] EJEMPLO 3 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-bencencarboxamida (25) (etapa 3). Se añadió clorhidrato de (4-carbamoilfenil)-hidracina (0,92 g, 4,9 mmol) a una disolución agitada de 1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-4-fenantren-2-il-but-3-en-2-ona (1,29 g, 4,1 mmol) en 40 ml de etanol a 25°C. La mezcla se calentó a reflujo durante 12 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se
20 disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (acetato de etilo - hexano, 1:1), - produciendo el compuesto 25 (1 g, rendimiento del 60%).

[0062] EJEMPLO 4 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-benzonitrilo (26) (etapa 4). A una disolución agitada de 1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-4-fenantren-2-il-but-3-en-2-ona (2,45 g, 7,7 mmol) en 60 ml de etanol se añadió clorhidrato de 4-cianofenilhidracina (2,53 g, 15 mmol) a 25°C. La mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante 12 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (acetato de etilo - hexano,
30 1:4) para proporcionar el compuesto 26 (2,7 g, rendimiento del 85%).

[0063] EJEMPLO 5 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-N-hidroxibenzamidina (27) (etapa 5). Se añadió clorhidrato de hidroxilamina (25 mg, 0,36 mmol a una suspensión de Na metálico (8,3 mg, 0,36 mmol) en metanol (3 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se añadió el compuesto
35 (26 (1224 mg, 0,3 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas, después se agitó a 25°C durante 16 horas adicionales y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (acetato de etilo - hexano, desde 1:4 hasta 1:1) para dar el compuesto 27 (120 mg, rendimiento del 76%).

[0064] EJEMPLO 6 5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-4-(1H-tetrazol-5-ilfenil)-1H-pirazol (28) (etapa 6). A una mezcla que contenía el compuesto 26 (125 mg, 0,3 mmol), se añadió NH₄Cl (123,7 mg), y NaN₃ (58,5 mg, 0,9 mmol) en 5 ml de HCl al 10%, y se extrajo con 20 ml de cloruro de metileno, dos veces. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (acetato de etilo - hexano 1:4) para dar el compuesto 28 (96 mg, rendimiento del 70%).

45 **[0065] EJEMPLO 7 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-benzaldehído oxima (29)** (etapa 7). Se añadió gota a gota DIBAL-H (3,1 ml, 3,1 mmol, 1,0 M en hexano) a una disolución del compuesto 26 (0,417 g, 1,1 mmol) en 5 ml de THF a -40°C. La mezcla se agitó durante 8 horas, se vertió en 5 ml de ácido acético al 10% y se agitó durante 30 minutos. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (acetato de etilo - hexano, 1:4) para
50 dar un aldehído intermedio (141 mg, 0,34 mmol) que fue inmediatamente añadido a una disolución que contenía clorhidrato de hidroxilamida (211 mg) y K₂CO₃ en 5 ml de etanol. La mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante 16 horas. Después de eliminar el disolvente, el residuo se extrajo con CH₂Cl₂ y se lavó con agua.

[0066] EJEMPLO 8 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-benzaldehído hidrazona (30) (etapa 8). El compuesto 30 (124 mg, rendimiento del 85%) se sintetizó de la misma forma que el compuesto 29, excepto porque se usó hidracina monohidratada (153 mg, 3,1 mmol) en lugar de clorhidrato de hidroxilamina.

[0067] EJEMPLO 9 {4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-fenil}-acetonitrilo (31) (etapa 9). (a) Preparación del clorhidrato de (4-hidracinofenil) acetonitrilo. Una disolución de nitrito sódico (3,15 g, 45,7 mmol)

- en agua (20 ml) se añadió gota a gota a una disolución enfriada (-15°C) y agitada de 4-aminobenzonitrilo (5 g, 42,3 mmol) en una disolución concentrada de cloruro de hidrógeno (55 ml) a una velocidad tal que se mantuviera la temperatura por debajo de -10°C. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se filtró rápidamente para eliminar los sólidos y el filtrado se añadió en porciones a una disolución enfriada (-20°C) y agitada de SnCl₂ • 2 H₂O (47,7 g, 0,21 mol) en una disolución concentrada de cloruro de hidrógeno (37 ml) a una velocidad tal que se mantuviera la temperatura por debajo de -10°C. Después de agitar la disolución durante 15 minutos adicionales, el sólido se recogió, se lavó con éter dietílico (4 x 25 ml) y se secó para dar clorhidrato de (4-hidracinofenil) acetonitrilo (5,6 g, 78%). (b) Compuesto 31. Una mezcla de clorhidrato de (4-hidracinofenil) acetonitrilo (0,32 g, 1 mmol) y 1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-4-fenantren-2-il-but-3-en-2-ona (0,18 g, 1,1 mmol) en etanol (20 ml) se agitó a la temperatura de reflujo durante 24 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente, se concentró a sequedad a vacío y se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a sequedad a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (hexano - acetato de etilo, 2:1) para dar el compuesto 31 (0,35 g, rendimiento del 81%).
- 15 **[0068] EJEMPLO 10 2-{4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-fenil}-N-hidroxiacetamidina (32)** (etapa 10). Una disolución del compuesto 31 (0,43 g, 1 mmol) y clorhidrato de hidroxiamina (0,075 g, 1,1 mmol) en etanol (10 ml) se agitó a la temperatura de reflujo durante 8 horas y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se disolvió en agua, se llevó a pH 8 - 9 mediante la adición de una disolución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a sequedad a vacío. El producto en bruto se recrystalizó en éter dietílico - hexano para dar el compuesto (0,32 g, rendimiento del 71%).
- 20 **[0069] EJEMPLO 11 5-(2-Fenautrenil)-3-(trifluorometil)-4-(1H-tetrazol-5-ilmetilfenil)-1H-pirazol (33)** (etapa 11). Se agitó una mezcla que contenía el compuesto 31 (0,43 g, 1 mmol), azida sódica (0,08 g, 1,2 mmol) y clorhidrato de trietilamina (0,12 g, 1,2 mmol) en tolueno (5 ml) a 100 C durante 5 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se extrajo con agua (10 ml). A la fase acuosa se añadió gota a gota una disolución de cloruro de hidrógeno al 36% para provocar la precipitación salina del tetrazol resultante 33. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío, produciendo el compuesto 33 (0,39 g, rendimiento del 84%).
- 25 **[0070] EJEMPLOS 12 - 14 1-(4-Nitrofenil)-5-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol (III)** (etapa 12). A una disolución de 1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-4-fenantren-2-il-but-3-en-2-ona (1,29 g, 4,1 mmol) en 40 ml de etanol se añadió clorhidrato de 4-nitrofenilhidracina (0,93 g, 4,9 mmol) con agitación, se puso a reflujo durante 1 hora, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró a sequedad a vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a sequedad a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice para proporcionar el compuesto III (0,88 g, rendimiento del 50%).
- 30 **[0071] 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] fenilamina (IV)** (etapa 13). A una disolución del compuesto III (0,88 g, 2 mmol) en 20 ml de etanol se añadió óxido de platino (27 mg, 0,12 mmol), se agitó en H₂ a 55 psi durante 12 horas, se filtró para eliminar el catalizador y se concentró a sequedad a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para producir el compuesto IV (0,57 g, rendimiento del 70%).
- 40 **[0072] EJEMPLO 12 2-Amino-N-{4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-fenil}-acetamida (34)** (etapas 14 y 15). A una disolución de t-butiloxicarbonil (tBOC)-glicina (0,25 g, 1,4 mmol) y el compuesto IV (0,57 g, 1,4 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano se añadió clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (0,41 g, 2,1 mmol), se agitó a 25°C durante 12 horas y se concentró a sequedad a vacío en un evaporador rotatorio. El residuo se suspendió en agua y el producto se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a sequedad a vacío para dar el compuesto V (0,67 g, rendimiento del 85%). El compuesto V (0,67 g, 1,2 mmol) se disolvió en 8 ml de acetato de etilo que contenían 0,7 ml de una disolución concentrada de HCl, se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró a sequedad a vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice para producir el compuesto 34 en forma de un polvo de color blanco (0,49 g, 90%).
- 50 **[0073] EJEMPLO 13 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-fenil-guanidina (35)** (etapa 16). A una disolución del compuesto IV (0,57 g, 1,4 mmol) en 7 ml de etanol se añadió cianamida (89 mg, 2,1 mmol) y 1,5 ml de HCl 1 N. La mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas y se concentró a sequedad a vacío. El producto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice para dar el compuesto 35 en forma de un sólido de color blanco (0,25 g, rendimiento del 40%).
- [0074] EJEMPLO 14 4-[5-(2-Fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] fenilurea (36)** (etapa 17). En un

matraz de fondo redondo de 250 ml que contenía ácido acético (50 ml), agua (12 ml) y etanol (20 ml) se añadió el compuesto IV (2,25 g, 5,6 mmol), seguido de isocianato sódico (0,74 g, 11,2 mmol). La reacción se agitó durante 1,5 horas y después se neutralizó con la adición de hidróxido sódico 1 N seguido de pellas de hidróxido sódico hasta que el pH había cambiado hasta 7,0. El producto se separó y después se lavó con 100 ml de agua, se secó con sulfato de magnesio y después se eliminó el disolvente para obtener el producto en bruto. La purificación se realizó mediante cromatografía en gel de sílice con (desde hexano - acetato de etilo, 3:2 hasta hexano - acetona, 1:3) para proporcionar el compuesto 36.

[0075] EJEMPLO 15 Cribado de los compuestos 34 y 35 frente a varias líneas celulares cancerosas Las líneas celulares tumorales humanas del grupo de cribado tumoral se hacen crecer en medio RPMI 1640 que contiene suero bovino fetal al 5% L-glutamina y 2 mM. Para un experimento típico de cribado, las células se inocularon en placas de microtitulación de 96 pocillos en 100 µl a una densidad por placa que varía entre 5.000 y 40.000 células/pocillo, dependiendo del tiempo de duplicación de las líneas celulares individuales. Después de inocular las células, las placas de microtitulación se incuban a 37°C, un 5% de CO₂, un 95% de aire y un 100% de humedad relativa durante 24 h antes de la adición de los fármacos experimentales.

[0076] Después de 24 h, se fijan *in situ* dos placas de cada línea celular con TCA, para representar una medición de la población celular de cada línea celular en el momento de la adición del fármaco (Tz). Los fármacos experimentales se solubilizan en dimetilsulfóxido a 400 veces la concentración de prueba máxima final deseada y se almacenan congelados antes de su uso. En el momento de la adición del fármaco, se descongela una alícuota del concentrado congelado y se diluye hasta dos veces la concentración de prueba máxima final deseada con medio completo que contiene 50 µg/ml de gentamicina. Se realizan diluciones en serie adicionales de cuatro, 10 veces o semilogarítmicas para proporcionar un total de cinco concentraciones de fármaco más el control. Las alícuotas de 100 µl de estas diferentes diluciones de fármacos se añaden a las placas de microtitulación apropiadas que ya contienen 100 µl de medio, dando como resultado las concentraciones finales de fármaco requeridas.

[0077] Tras la adición de los fármacos, las placas se incuban durante 48 h adicionales a 37°C, un 5% de CO₂, un 95% de aire y un 100% de humedad relativa. Para células adherentes, el ensayo se termina mediante la adición de TCA frío. Las células se fijan *in situ* mediante la adición suave de 50 µl de TCA al 50% (p/v) frío (concentración final de TCA, 10%) y se incuban durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha y las placas se lavan cinco veces con agua del grifo y se secan al aire. Se añade a cada pocillo una disolución de sulforrodamina B (SRB) (100 µl) al 0,4% (p/v) en ácido acético al 1%, y las placas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, se elimina el pigmento no unido lavando cinco veces con ácido acético al 1% y las placas se secan al aire. El pigmento unido se solubiliza subsiguientemente con trizma base 10 mM, y se lee la absorbencia en un lector de placas automático a una longitud de onda de 515 nm. Para las células en suspensión, la metodología es la misma excepto porque el ensayo se termina fijando las células sedimentadas en el fondo de los pocillos mediante la suave adición de 50 µl de TCA al 80% (concentración final de TCA, 16%). Usando las siete mediciones de absorbencia [tiempo cero, (Tz), crecimiento de control, (C), y crecimiento de prueba en presencia de fármaco a cinco niveles de concentración (Ti)], se calculó el porcentaje de crecimiento a cada uno de los niveles de concentración de fármaco. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como:

$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ para las concentraciones para las que } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ para las concentraciones para las que } Ti < Tz$$

[0078] Se calculan tres parámetros de respuesta frente a la dosis para cada agente experimental. Se calcula el crecimiento de inhibición al 50% (GI₅₀) a partir de $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$, que es la concentración del fármaco que da como resultado una reducción del 50% en el incremento neto en proteínas (medido mediante la tinción con SRB) en las células de control durante la incubación con el fármaco. La concentración del fármaco que da como resultado una inhibición total del crecimiento (TGI) se calcula a partir de $Ti = Tz$. La LC₅₀ (concentración de fármaco que da como resultado una reducción del 50% en la proteína medida al final del tratamiento con fármaco en comparación con la inicial), que indica una pérdida neta de células tras el tratamiento, se calcula a partir de $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = -50$. Se calculan los valores para cada uno de estos tres parámetros si se alcanza el nivel de actividad; sin embargo, si no se alcanza el efecto o si se supera, el valor para ese parámetro se expresa como mayor o menor que la concentración máxima o mínima ensayada.

[0079] Los procedimientos descritos se usaron para ensayar los compuestos 34 y 35 en un grupo de 60 líneas celulares en un servicio de cribado proporcionado por el Developmental Therapeutics Program del National Institutes of Health. En la Figura 1C se muestran 1, RPMI-células de leucemia 8226; 2, NCI-células de cáncer de pulmón no

microcítico H322M; 3, células HT29 de cáncer de colon; 4, células U251 de cáncer del SNC; 5, células cancerosas SK-MEL-28 de melanoma; 6, células SK-OV-3 de cáncer de ovario; 7, células RXF 393 de cáncer de riñón; 8, células PC-3 de cáncer de próstata; 9, células MDA-MB-231 de cáncer de mama.

- 5 **[0080]** Los resultados de los ensayos de los compuestos 34 y 35 frente a las 60 líneas celulares completas se muestran en las tablas, a continuación. Los ensayos se realizaron en el National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program. Los resultados mostrados son resultados de los ensayos *in vitro*.

Tabla 5. Resultados de los ensayos del Compuesto 34 frente a 60 líneas celulares cancerosas.

10

ES 2 420 405 T3

Log10 de la concentración															
Grupo/Línea celular	Tiempo cero	Con trol	Densidades ópticas medias					Porcentaje de crecimiento							
			-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,0	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,0	GI50	TGI	LC50
Leucemia															
CCRF-CEM	0,295	1,099	0,893	0,945	0,523	0,168	0,194	74	81	28	-43	-34	3,87E-07	2,49E-06	>1,00E-04
K-562	0,297	1,407	1,435	1,022	0,681	0,209	0,247	97	62	33	-30	-17	2,57E-07	3,34E-06	>1,00E-04
MOLT-4	0,313	1,048	0,964	0,951	0,614	0,180	0,295	89	87	41	-42	-6	6,36E-07	3,10E-06	>1,00E-04
RPMI-8226	0,332	0,845	0,766	0,701	0,547	0,164	0,229	85	72	42	-51	-31	5,37E-07	2,84E-06	
SR	0,364	0,902	0,816	0,706	0,605	0,265	0,363	84	80	45	-27		7,11E-07	4,17E-06	>1,00E-04
Cáncer de pulmón no microcítico															
A549 / ATCC	0,363	1,279	1,294	1,149	0,832	0,155	0,252	102	86	52	-57	-31	1,02E-06	2,968E-06	
EKVX	0,557	0,860	0,891	0,860	0,786	0,155	0,193	110	100	75	-72	-65	1,49E-06	3,25E-06	7,08E-06
HOP-62	0,510	1,395	1,310	1,330	1,075	0,155	0,217	90	93	64	-70	-57	1,27E-06	3,01E-06	7,13E-06
HOP-92	1,070	1,526	1,509	1,474	1,465	0,095	0,267	96	89	87	-51	-75	1,61E-06	3,07E-06	5,87E-06
NCI-H226	1,190	1,594	1,593	1,586	1,429	0,505	0,614	100	98	59	-58	-48	1,20E-06	3,21E-06	
NCI-H23	0,457	1,655	1,672	1,673	1,255	0,097	0,156	101	102	67	-79	-66	1,30E-06	2,87E-06	6,33E-06
NCI-H322H	0,626	2,465	1,363	1,562	1,420	0,100	0,269	40	51	43	-84	-57	2,18E-06	5,40E-06	
NCI-H460	0,319	1,843	1,799	1,499	0,830	0,173	0,213	97	77	34	-46	-33	4,21E-07	2,64E-06	>1,00E-04
NCI-H522	0,766	1,549	1,626	1,718	1,528	0,260	0,486	110	122	97	-66	-37	1,95E-06	3,94E-06	
Cáncer de colon															
COLO 205	0,221	1,412	1,286	1,252	0,916	0,104	0,239	89	87	58	-53	1	1,19E-06		
HCT-116	0,114	0,708	0,751	0,665	0,452	0,104	0,146	107	93	57	-9	5	1,27E-05		>1,00E-04
HCT-15	0,279	0,875	0,760	0,599	0,561	0,149	0,278	83	54	47	-47		3,65E-07	3,19E-06	>1,00E-04
HT29	0,215	1,453	1,355	1,299	0,801	0,075	0,159	92	88	47	-65	-26	8,58E-07	2,64E-06	
KH12	0,535	2,184	2,151	2,044	1,425	0,146	0,264	98	91	54	-73	-51	1,07E-06	2,67E-06	6,62E-06
SW-620	0,187	1,202	1,197	1,198	0,736	0,127	0,136	100	100	54	-32	-28	1,12E-06	4,23E-06	>1,00E-04
Cáncer del SNC															
SP-268	0,376	1,142	1,016	0,930	0,789	0,252	0,280	84	72	54	-33	-26	1,11E-06	4,16E-06	>1,00E-04
SF-299	0,421	1,224	1,173	1,190	0,515	0,225	0,287	94	96	62	-47	-32	1,28E-06	3,71E-06	>1,00E-04
SNB-19	0,532	1,721	1,562	1,655	1,230	0,219	0,324	87	94	59	-59	-39	1,18E-06	3,15E-06	
U251	0,391	1,301	1,298	1,139	0,810	0,144	0,320	100	82	46	-63	-18	7,75E-07	2,64E-06	
Melanoma															
LOX IMVI	0,353	1,166	1,204	0,974	0,742	0,176	0,352	105	76	48	-50		8,36E-07	3,07E-06	
MALME-3H	0,666	1,165	1,123	1,128	1,202	0,218	0,290	92	93	87	-67	-56	1,74E-06	3,67E-06	7,73E-04
M14	0,315	0,986	0,975	0,974	0,916	0,211	0,256	98	98	90	-33	-19	2,10E-06	5,37E-06	>1,00E-04
SK-MEL-2	0,456	0,883	0,943	0,956	0,885	0,289	0,330	114	117	100	-37	-28	2,33E-06	5,40E-06	>1,00E-04
SK-MEL-28	0,530	1,482	1,426	1,320	1,130	0,071	0,218	94	83	63	-87	-59	1,22E-06	2,64E-06	
SK-MEL-5	0,549	2,147	1,995	1,958	1,659	0,136	0,364	91	88	69	-75	-34	1,36E-06	3,02E-06	
UACC-62	0,675	1,600	1,649	1,546	1,407	0,137	0,364	105	94	79	-80	-46	1,53E-06	3,15E-06	
Cáncer de ovario															
IGROV1	0,462	1,060	1,044	1,103	0,902	0,235	0,302	97	107	74	-49	-35	1,56E-06	3,97E-06	>1,00E-04
OVCAR-3	0,460	0,529	0,879	0,849	0,816	0,140	0,301	89	83	76	-70	-35	1,51E-06	3,32E-06	
OVCAR-4	0,530	1,121	1,114	1,073	1,086	0,093	0,172	99	92	94	-82	-68	1,78E-06	3,41E-06	6,55E-06
OVCAR-5	0,512	1,507	1,480	1,540	1,412	0,087	0,149	97	103	90	-83	-71	1,71E-06	3,32E-06	6,45E-06
OVCAR-8	0,400	1,101	1,078	1,114	0,755	0,269	0,306	97	102	51	-33	-24	1,02E-06	4,05E-06	>1,00E-04
SK-OV-3	0,399	1,623	1,514	1,597	1,262	0,083	0,302	91	98	71	-79	-24	1,37E-06	2,96E-06	
Cáncer de riñón															
786-0	0,652	1,958	2,012	1,897	1,400	0,181	0,299	104	95	60	-72	-54	1,20E-06	2,85E-06	6,79E-06
A498	0,945	2,261	2,230	2,598	2,201	0,660	0,433	98	126	95	-30	-54	2,30E-06	5,75E-06	6,69E-05
ACHN	0,374	1,026	0,985	1,037	0,829	0,150	0,313	94	102	70	-60	-16	1,42E-06	3,45E-06	
CAKI-1	0,597	1,862	1,692	1,802	1,126	0,147	0,335	87	95	42	-75	-44	7,03E-07	2,27E-06	
RXP 393	0,403	0,801	0,766	0,700	0,625	0,177	0,441	91	75	56	-56	10	1,14E-06		
SN12C	0,584	1,233	1,209	1,194	1,093	0,203	0,308	96	94	78	-55	-47	1,58E-06	3,51E-06	
TK-10	0,672	1,496	1,512	1,492	1,304	0,138	0,200	102	100	77	-80	-70	1,48E-06	3,10E-06	6,7E-06
UO-31	0,443	1,782	1,572	1,563	1,356	0,161	0,289	84	84	68	-64	-36	1,37E-06	3,29E-06	
Cáncer de próstata															
PC-3	0,242	0,996	0,910	0,763	0,593	0,055	0,108	89	69	47	-77	-55	7,05E-07	2,38E-06	6,02E-06
DJ-145	0,327	0,961	0,993	1,018	0,895	0,078	0,132	105	109	90	-76	-60	1,73E-06	3,47E-06	6,95E-06
Cáncer de mama															
MCP7	0,452	1,672	1,566	1,541	0,982	0,196	0,255	91	89	43	-57	-44	7,18E-07	2,72E-06	
NCI / ADN-REG	0,556	1,904	1,883	1,878	1,217	0,229	0,212	98	98	49	-59	-62	9,54E-07	2,85E-06	8,28E-06
MDA-MB-231 / ATCC	0,642	0,988	0,988	0,889	0,843	0,173	0,306	100	71	58	-73	-52	1,15E-06	2,77E-06	6,67E-06
HS 57BT	0,534	1,186	1,221	1,179	1,110	0,351	0,333	105	99	88	-34	-38	2,05E-06	5,25E-06	>1,00E-04
MDA-MB-435	0,404	1,469	1,502	1,447	1,125	0,127	0,347	103	98	68	-69	-14	1,35E-06	3,14E-06	
BT-549	0,492	0,957	0,912	0,891	0,785	0,143	0,195	90	86	63	-71	-50	1,25E-06	2,05E-06	6,98E-06
T-47D	0,423	1,019	0,921	1,071	0,935	0,205	0,238	84	109	86	-52	-44	1,82E-06	4,21E-06	

Tabla 6. Resultados de los ensayos del Compuesto 35 frente a 60 líneas celulares cancerosas.

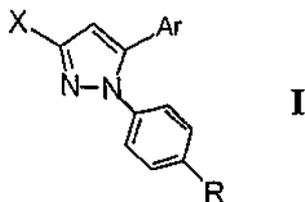
ES 2 420 405 T3

Log10 de la concentración															
Grupo/Línea celular	Tiempo cero	Con trol	Densidades ópticas medias					Porcentaje de crecimiento							
			-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,0	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,0	GI50	TGI	LC50
Leucemia															
CCRF-CEM	0,295	0,949	0,808	0,811	0,718	0,002	0,140	78	79	65	-99	-53	1,23E-06	2,48E-06	5,00E-06
K-562	0,297	1,401	1,338	1,283	0,438	0,126	0,119	94	89	13	-58	-60	3,26E-07	1,52E-06	7,77E-06
MDIT-4	0,313	0,957	0,833	0,736	0,461	0,103	0,143	81	66	23	-54	-54	2,33E-07	1,98E-06	8,75E-06
RPMI-8226	0,332	0,682	0,536	0,559	0,513	0,016	0,176	58	65	52	-95	-47	1,03E-06	2,25E-06	
SR	0,364	0,888	0,680	0,583	0,254	0,234	0,287	62	42	-30	-36	-21	3,86E-06	3,79E-07	>1,00E-04
Cáncer de pulmón no microcítico															
AS49 / ATCC	0,363	1,175	1,140	1,145	1,121	-0,032	0,135	96	96	93	-100	-63	1,68E-06	3,04E-06	5,51E-06
EKUX	0,557	0,841	0,713	0,737	0,711	-0,008	0,145	55	63	54	-100	-74	1,06E-06	2,24E-06	4,74E-06
HOP-62	0,510	1,288	1,285	1,267	1,255	0,011	0,329	100	97	96	-98	-36	1,72E-06	3,12E-06	
HOP-92	1,070	1,647	1,567	1,541	1,361	0,089	0,767	86	82	50	-92	-28	1,01E-06	2,26E-06	
NCI-H23	0,457	1,669	1,585	1,515	2,679	-0,041	0,151	93	87	101	-100	-67	1,79E-06	3,18E-06	5,64E-06
NCI-H322H	0,626	1,181	0,988	1,049	1,031	-0,052	0,257	65	76	73	-100	-59	1,36E-06	2,64E-06	5,14E-06
NCI-H460	0,319	1,792	1,654	1,658	1,650	0,011	0,257	91	91	90	-97	-20	1,64E-06	3,04E-06	
NCI-H522	0,766	1,671	1,509	1,558	1,471	0,037	0,439	82	87	79	-95	-43	1,45E-06	2,82E-06	
Cáncer de colon															
COLO 205	0,221	1,196	1,146	1,028	0,930	0,009	0,151	95	83	73	-96	-32	1,36E-06	2,69E-06	
HCT-116	0,114	0,714	0,607	0,633	0,525	-0,022	0,058	82	86	68	-100	-49	1,29E-06	2,55E-06	
HCT-15	0,279	0,893	0,669	0,779	0,797	-0,003	0,082	64	81	84	-100	-71	1,54E-06	2,87E-06	5,36E-06
HT29	0,215	1,333	1,276	1,238	1,135	-0,054	0,003	95	91	82	-100	-99	1,50E-06	2,83E-06	5,32E-06
KM12	0,535	1,957	1,867	1,832	2,777	0,013	0,307	94	91	87	-98	-43	1,59E-06	2,97E-06	
SW-620	0,187	1,073	1,073	0,993	1,060	-0,048	0,015	83	91	98	-100	-92	1,75E-06	3,13E-06	5,60E-06
Cáncer del SNC															
SP-268	0,376	1,016	0,893	0,939	0,886	0,148	0,278	81	88	80	-61	-25	1,63E-06	3,69E-06	
SF-285	0,421	1,107	1,033	0,981	0,997	-0,025	0,195	89	74	84	-100	-54	1,53E-06	2,86E-06	5,35E-06
SNB-19	0,532	1,483	1,385	1,385	1,351	0,063	0,317	90	90	85	-88	-40	1,61E-06	3,12E-06	
U251	0,391	1,156	1,125	1,059	1,123	0,026	0,484	96	87	96	-93	12	1,74E-06		
Melanoma															
LOX IMVI	0,353	1,164	0,948	1,033	0,935	0,008	0,169	73	84	72	-98	-53	1,34E-06	2,65E-06	5,22E-06
MALME-3H	0,666	0,984	0,832	0,838	0,826	0,089	0,333	52	54	50	-87	-50	1,01E-06	2,33E-06	1,00E-04
M14	0,315	0,935	0,772	0,823	0,816	-0,004	0,210	74	82	81	-100	-33	1,48E-06	2,80E-06	
SK-MEL-2	0,456	0,830	0,775	0,819	0,780	-0,010	0,324	85	97	87	-100	-29	1,57E-06	2,91E-06	
SK-MEL-28	0,530	1,508	1,439	1,408	1,367	-0,002	0,240	93	90	86	-100	-53	1,56E-06	2,89E-06	5,38E-06
SK-MEL-5	0,549	1,640	1,611	1,762	1,812	0,143	0,363	97	111	116	-74	-34	2,22E-06	4,07E-06	
UACC-62	0,575	1,477	2,323	1,338	1,301	-0,001	0,272	81	83	78	-100	-60	1,44E-06	2,74E-06	5,24E-06
Cáncer de ovario															
IGROV1	0,462	1,091	0,997	0,983	0,806	-0,039	0,216	85	83	55	-100	-53	1,07E-06	2,26E-06	4,75E-06
OVCAR-3	0,460	0,868	0,833	0,792	0,770	-0,043	0,131	91	81	76	-100	-72	1,40E-06	2,70E-06	5,20E-06
OVCAR-4	0,530	1,123	1,011	0,999	0,945	-0,001	0,179	81	79	70	-100	-65	1,31E-06	2,58E-06	5,08E-06
OVCAR-5	0,512	1,592	1,538	1,437	1,559	-0,033	0,474	95	86	97	-100	-8	1,73E-06	3,11E-06	
OVCAR-8	0,400	0,968	0,923	0,946	0,934	-0,001	0,126	92	96	94	-100	-69	1,69E-06	3,05E-06	5,52E-06
SK-OV-3	0,399	1,327	1,261	1,245	1,093	0,062	0,278	93	91	75	-85	-30	1,43E-06	2,94E-06	
Cáncer de riñón															
786-0	0,652	1,912	1,862	1,860	1,663	0,046	0,458	96	96	80	-93	-30	1,49E-06	2,91E-06	
A498	0,945	2,207	2,413	2,087	1,869	1,903	0,540	116	91	73	76	-43	1,65E-06	4,35E-05	>1,00E-04
ACHN	0,374	1,026	0,898	0,902	0,964	0,034	0,291	80	81	90	-91	-22	1,67E-06	3,15E-06	
CAKI-1	0,597	1,767	1,735	1,642	1,804	-0,067	0,315	97	89	103	-100	-47	1,83E-06	3,22E-06	
RXF 393	0,403	0,829	0,582	0,629	0,629	0,156	0,385	42	53	53	-61	-4		2,91E-06	
SN12C	0,584	1,115	1,050	0,998	1,045	-0,014	0,224	88	78	87	-100	-42	1,57E-06	2,91E-06	5,40E-06
TK-10	0,672	1,134	1,032	1,087	0,998	-0,021	0,245	78	90	71	-100	-64	1,32E-06	2,59E-06	5,09E-06
UD-33	0,443	1,467	1,375	1,407	1,332	-0,030	0,288	91	94	87	-100	-35	1,57E-06	2,92E-06	
Cáncer de próstata															
PC-3	0,202	1,068	0,862	0,846	0,857	-0,022	0,179	75	73	75	-100	-26	1,38E-06	2,67E-06	
DU-145	0,327	0,835	0,694	0,767	0,760	-0,074	-0,019	72	87	85	-100	-100	1,55E-06	2,89E-06	5,37E-06
Cáncer de mama															
MCP7	0,452	1,540	1,467	1,340	1,507	0,073	0,229	93	82	97	-84	-49	1,82E-06	3,44E-06	
MCI / ADE-RES	0,556	1,942	1,920	1,982	1,874	0,490	0,294	98	96	95	-12	-47	2,64E-06	7,73E-06	>1,00E-04
MDA-MB-231 / ATCC	0,642	0,884	0,756	0,830	0,709	0,015	0,389	47	78	27	-98	-39		1,66E-06	
HS 57BT	0,534	1,167	1,099	1,165	1,127	0,160	0,333	89	100	94	-69	-38	1,86E-06	3,78E-06	
MDA-MB-435	0,404	1,498	1,376	1,382	1,444	-0,073	0,395	89	89	95	-100	-27	1,70E-06	3,07E-06	
T-470	0,423	0,750	0,541	0,570	0,529	0,100	0,198	36	47	32	-76	-53	<1,00E-08	1,98E-06	5,72E-06

[0081] Los ejemplos descritos en este documento pretenden ser ilustrativos de la síntesis en las aplicaciones de los compuestos descritos. Los ejemplos no pretenden limitar el ámbito de la invención descrita en este 5 documento.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



5

en la que

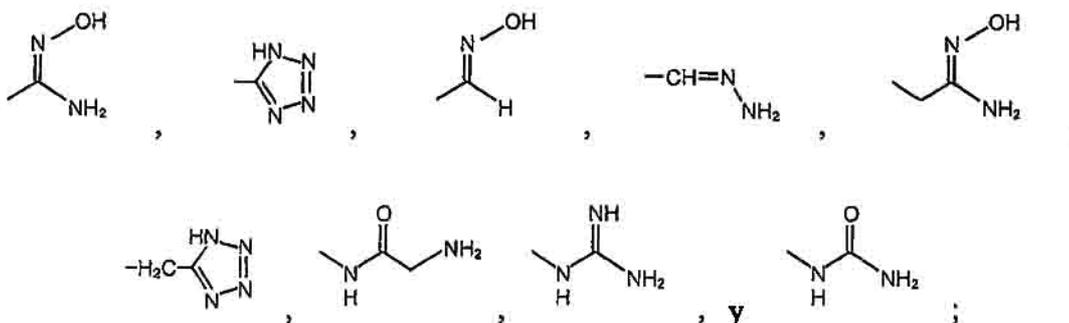
X se elige de entre alquilo y haloalquilo;

10

Ar se elige del grupo que consiste en fenilo, bifenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y fluorenilo; opcionalmente sustituido en cualquier posición sustituible con uno o más radicales;

R se elige del grupo que consiste en -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN

15



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20

2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que X es haloalquilo C₁ a C₄.

3.

El compuesto de la reivindicación 2 en el que X es CF₃.

4.

El compuesto de la reivindicación 1, en el que Ar está sustituido en cualquier posición sustituible con uno o más radicales elegidos del grupo que consiste en halo, alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, azido, azidoalquilo C₁-C₄, arilo, alquilarilo, haloarilo, haloalquilarilo y combinaciones de los mismos.

5.

El compuesto de la reivindicación 1 en el que Ar se elige del grupo que consiste en 2-naftilo, 4-bifenilo, 9-antrilo, 2-fluorenilo, 4-azidofenilo, 4-azidometilfenilo, 4-(2-azidoetil) fenilo, 4-(3-azidopropil) fenilo, 4-(4-azidobutil) fenilo, 4-(4-azidofenil) fenilo, 4-(4-azidometilfenil) fenilo, 4-metilfenilo, 4-etilfenilo, 4-propilfenilo, 4-butilfenilo, 4-(2-bromoetil) fenilo, 4-(3-bromopropil) fenilo, 4-(4-bromoetil) fenilo, 4-(trifluorometil) fenilo, 4-(4-metilfenil) fenilo, 4-(4-bromometilfenil) fenilo, 4-(4-butilfenil) fenilo, 4-(4-terc-butilfenil) fenilo, 2-clorofenilo, 4-clorofenilo, 2,4-diclorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 2,5-diclorofenilo, 2,4-dimetilfenilo, 2,5-dimetilfenilo, 3,4-dimetilfenilo, 3,5-dimetilfenilo, 4-(4-clorofenil) fenilo, 4-(3,5-diclorofenil) fenilo, 4-(2,3-diclorofenil) fenilo, 4-(3,5-dimetilfenil)fenilo, 4-(2,4,5-triclorofenil) fenilo, 4-(4-trifluorometilfenil) fenilo, 2-fenantrenilo, 3-indolilo, 2-pirrolilo, 4-(bencil) fenilo, 4-t-butilfenilo y 9-fenantrenilo.

6.

El compuesto de la reivindicación 5 en el que Ar es 2-fenantrenilo.

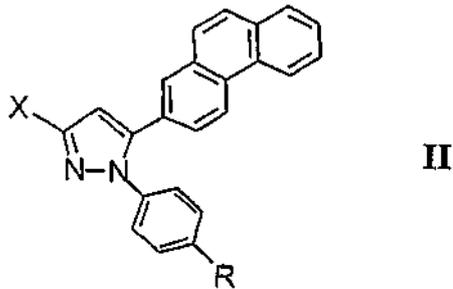
7.

El compuesto de la reivindicación 1 en el que R se elige de forma que RH es aminoacetamida o guanidina.

40

8. El compuesto de la reivindicación 1 en el que X es CF₃, Ar es 2-fenantrenilo y R se elige de forma que RH es aminoacetamida o guanidina.

5 9. Un compuesto de fórmula II

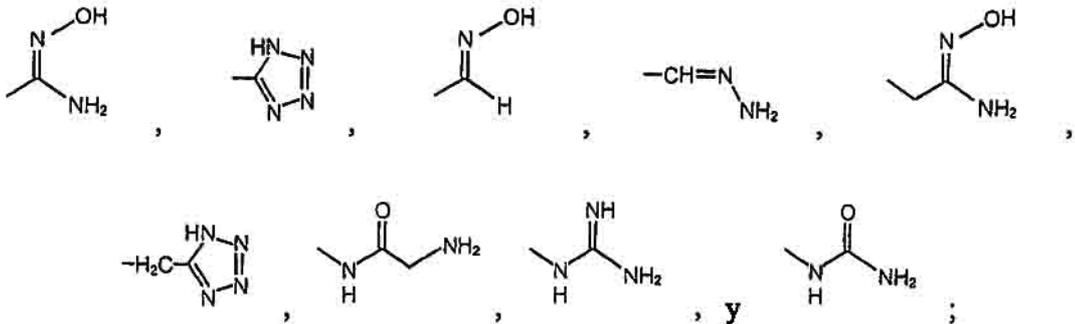


en la que:

10

X se elige del grupo que consiste en alquilo y haloalquilo;

R se elige del grupo que consiste en -CN, -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN



15

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20

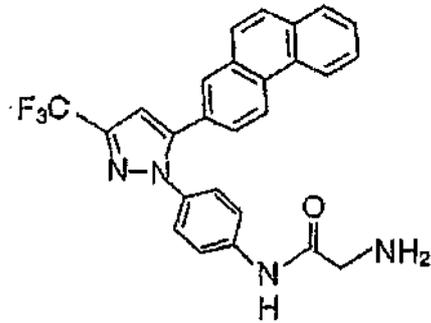
10. El compuesto de la reivindicación 9 en el que X es haloalquilo C₁ a C₄.

11. El compuesto de la reivindicación 10 en el que X es CF₃.

25

12. El compuesto de la reivindicación 9 en el que R se elige de forma que RH es aminoacetamida o guanidina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

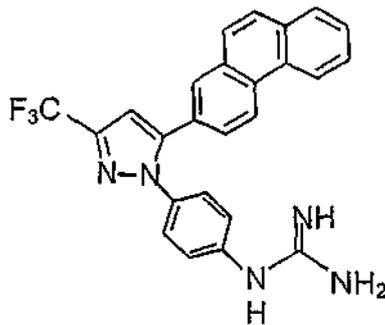
13. Un compuesto de fórmula III:



III

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 14. Un compuesto de fórmula IV:



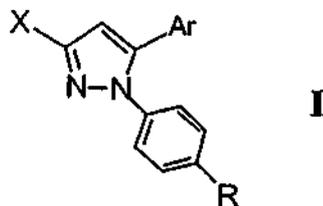
IV

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

15. Un compuesto de fórmula (I) para su uso en un procedimiento de tratamiento *in vivo* que implica la inducción de la apoptosis en células cancerosas en proliferación rápida no deseada, mediante un procedimiento que comprende la etapa de poner en contacto dichas células con una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto,

15



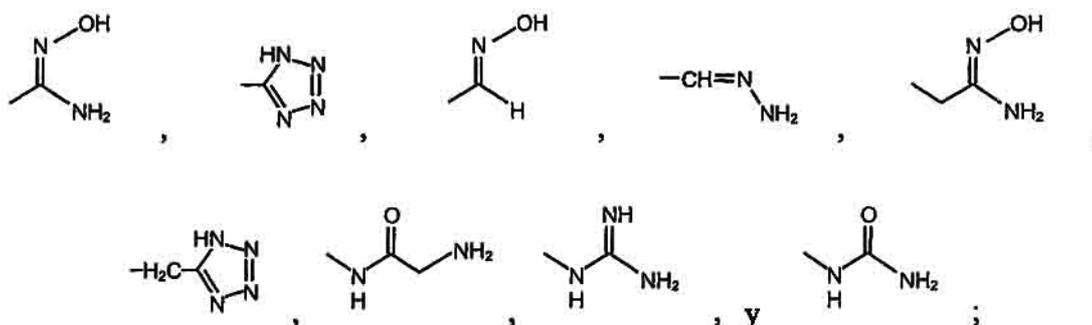
I

en el que

20 X se elige del grupo que consiste en alquilo y haloalquilo;

Ar se elige del grupo que consiste en fenilo, bifenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y fluorenilo, opcionalmente sustituidos en cualquiera de las posiciones sustituibles con uno o más radicales;

R se elige del grupo que consiste en -CN, -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN

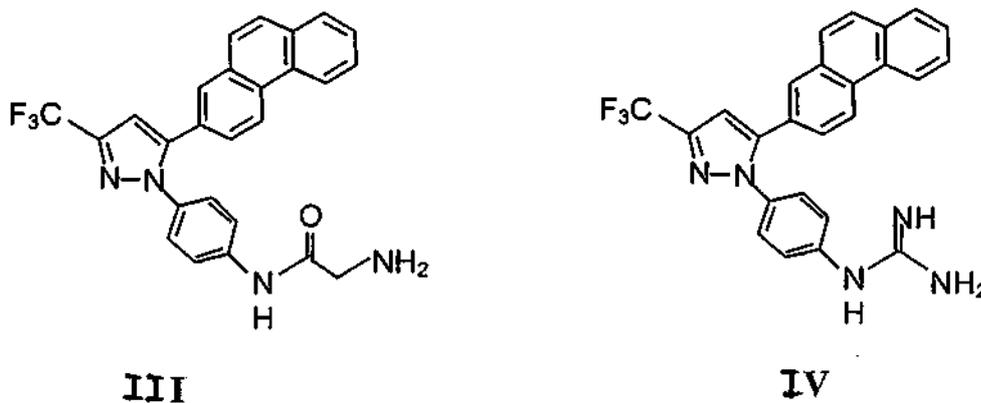


5

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en el que las células cancerosas se eligen del grupo que consiste en células de leucemia, de cáncer de pulmón no microcítico, de cáncer de colon, de cáncer del sistema nervioso central, de melanoma, de cáncer de ovario, de cáncer de riñón, de cáncer de próstata y de cáncer de mama.

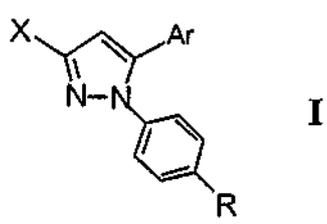
10

16. El compuesto de la reivindicación 15 en el que el compuesto se elige de entre los compuestos III y IV:



15 o una combinación de los mismos, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

17. Un compuesto para su uso en un procedimiento de tratamiento que implica a tratar, inhibir o retrasar la aparición del cáncer, en el que el cáncer se elige del grupo que consiste en leucemia, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer de próstata y cáncer de mama, en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, y dicho compuesto es un compuesto de fórmula I:

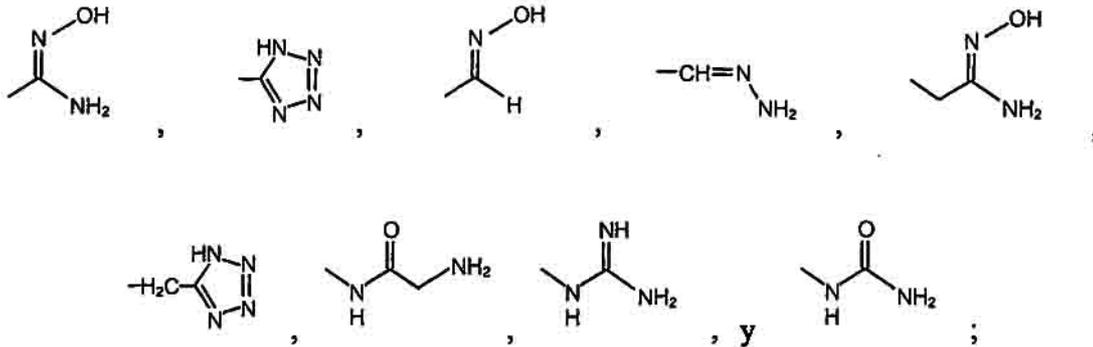


25 en la que

X se elige del grupo que consiste en alquilo y haloalquilo;

Ar se elige del grupo que consiste en fenilo, bifenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y fluorenilo, opcionalmente 5 sustituidos en cualquiera de las posiciones sustituibles con uno o más radicales;

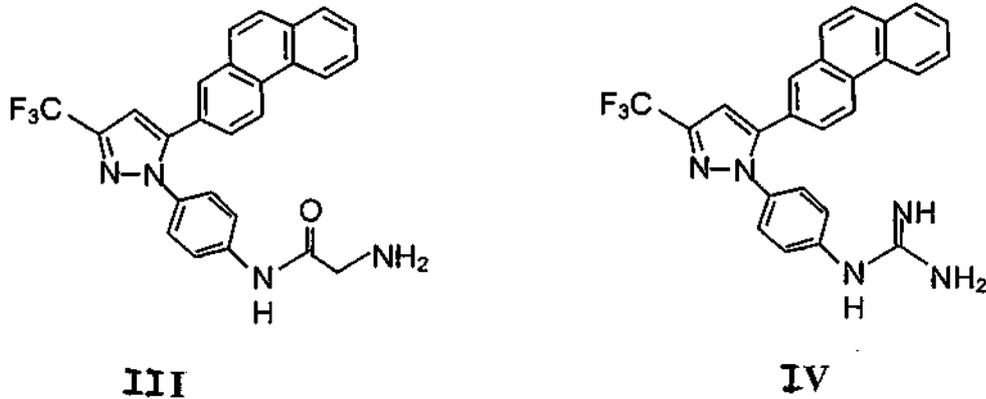
R se elige del grupo que consiste en -CN, -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN



10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

18. El compuesto de la reivindicación 17 que se elige de entre los compuestos III y IV

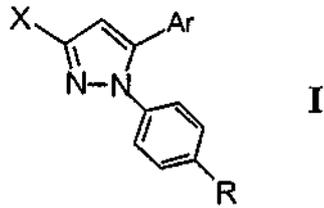
15



o una combinación de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 19. El compuesto de la reivindicación 17 en el que el sujeto es un ser humano.

20. Un compuesto para prevenir la reestenosis en un sujeto que ha experimentado un procedimiento de angioplastia o de endoprótesis vascular, en el que dicho compuesto es un compuesto de fórmula I:

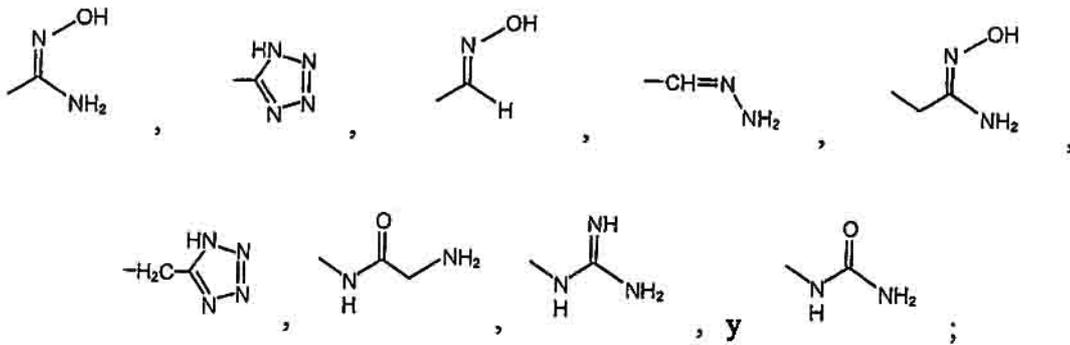


en la que

5 X se elige de entre alquilo y haloalquilo;

Ar se elige del grupo que consiste en fenilo, bifenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y fluorenilo; opcionalmente sustituidos en cualquiera de las posiciones sustituibles con uno o más radicales;

10 R se elige del grupo que consiste en CN, -CH₂CN, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH₂CH₂CN -CONH₂



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15

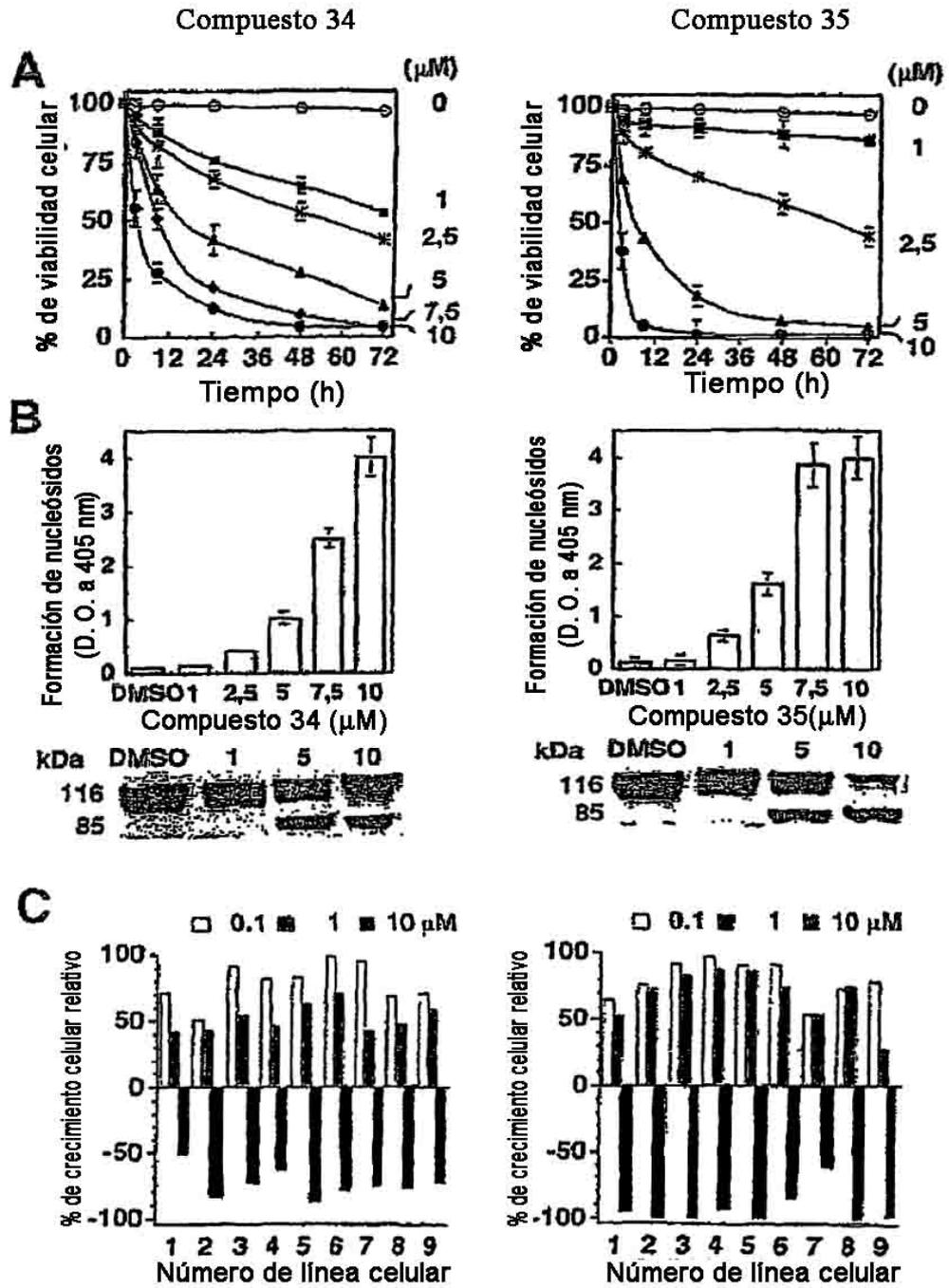


FIG. 1

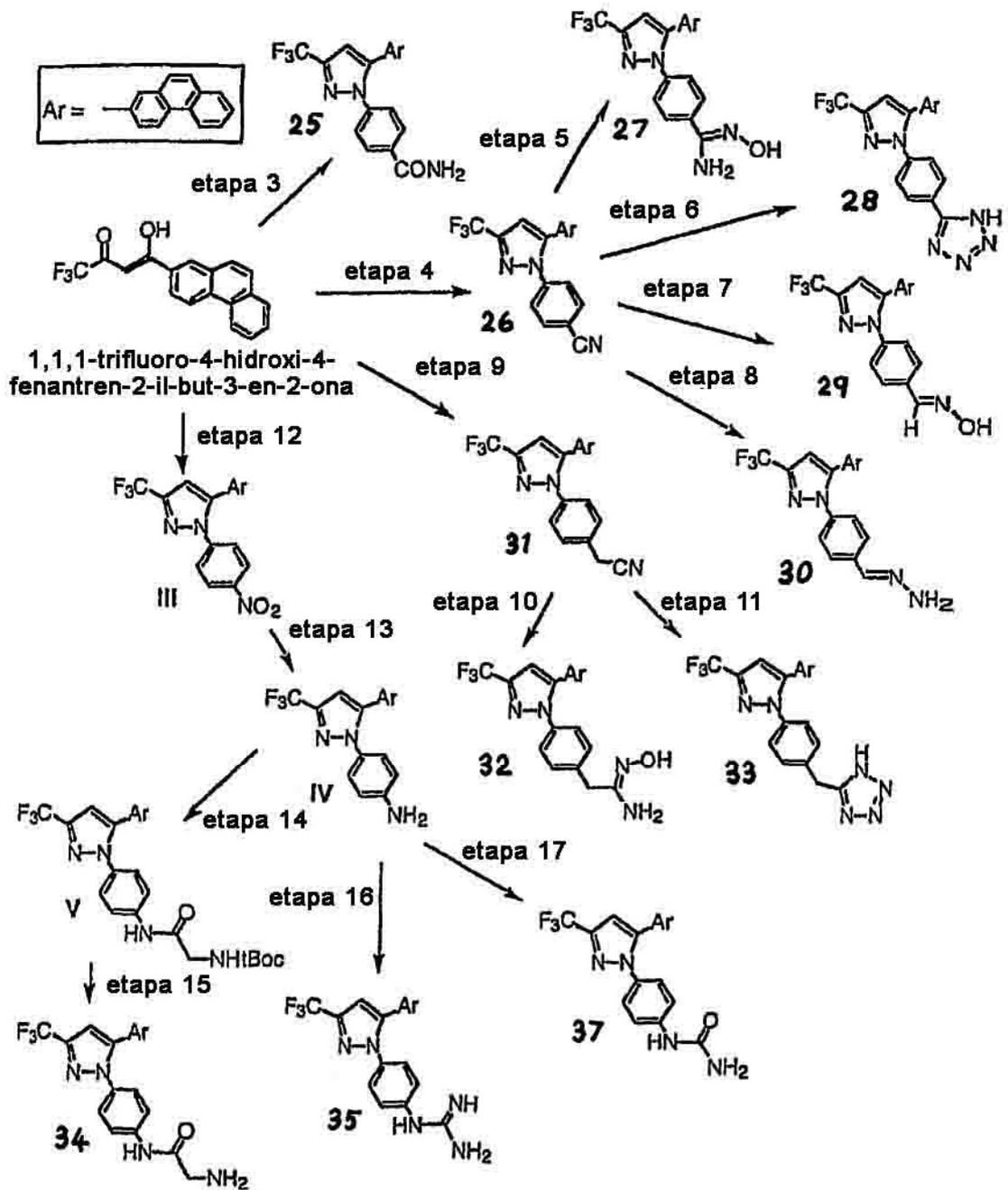


FIG. 2