

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 899**

51 Int. Cl.:

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2008 E 08786899 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2185541**

54 Título: **Fenilendiaminas sustituidas como inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53**

30 Prioridad:

06.08.2007 EP 07113878

21.09.2007 US 974207 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PONCELET, ALAIN PHILIPPE;
SCHOENTJES, BRUNO;
STORCK, PIERRE-HENRI;
PONCELET, VIRGINIE SOPHIE y
LEYS, CARINA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 899 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

Fenilendiaminas sustituidas como inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones que contienen dichos compuestos que actúan de inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53, en particular moduladores de la interacción MDM2-proteasoma. Además, la presente invención proporciona procesos para la preparación de los inhibidores desvelados, composiciones que los comprenden y métodos de uso de los mismos, por ejemplo como medicina.

p53 es una proteína supresora de tumores que desempeña una función fundamental en la regulación del equilibrio entre la proliferación celular y la detención del crecimiento celular/apoptosis. Bajo condiciones normales, la semivida de p53 es muy corta y, por consiguiente, el nivel de p53 en células es bajo. Sin embargo, en respuesta a daño de ADN celular o estrés celular (por ejemplo, activación de oncogenes, erosión de telómeros, hipoxia), aumentan los niveles de p53. Este aumento en los niveles de p53 conduce a la activación de la transcripción de varios genes que conducen la célula a tanto la detención del crecimiento como a los procesos de apoptosis. Así, una función importante de p53 es prevenir la proliferación incontrolada de células dañadas y así proteger al organismo del desarrollo de cáncer.

MDM2 es un regulador negativo clave de la función de p53. Forma un bucle autorregulador negativo uniéndose al dominio de transactivación del extremo amino de p53 y así MDM2 tanto inhibe la capacidad de p53 para activar la transcripción como elige p53 como diana para la degradación proteolítica. Bajo condiciones normales, este bucle regulador es responsable de mantener los bajos niveles de p53. Sin embargo, en tumores con p53 no mutada, la concentración en equilibrio de p53 activo puede aumentarse antagonizando la interacción entre MDM2 y p53. También se requieren otras actividades de MDM2 para la degradación de p53, como se demuestra por la acumulación de p53 ubiquitinada cuando se suprime la fosforilación en el dominio central de HDM2 (Blattner y col., Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. (2002) Mol. Cell. Biol., 22, 6170-6182). La asociación de HDM2 con diferentes subunidades del proteasoma 26S tales como S4, S5a, S6a y S6b (3rd Mdm2 workshop, Sept. 2005 en Constanza, Alemania) podría desempeñar una función clave en este proceso. Así, también pueden aumentarse las concentraciones de p53, modulando la interacción MDM2-proteasoma. Esto producirá la restauración de los efectos pro-apoptóticos y antiproliferativos mediados por p53 en tales células tumorales. Los antagonistas de MDM2 podrían incluso presentar efectos antiproliferativos en células tumorales que carecen de p53 funcional.

Esto posiciona la proteína HDM2 como una atractiva diana para el desarrollo de terapia contra el cáncer.

MDM2 es un proto-oncogén celular. Se ha observado la expresión en exceso de MDM2 en una gama de cánceres. MDM2 se expresa en exceso en una variedad de tumores debido a amplificación génica o elevada transcripción o traducción. El mecanismo por el que la amplificación de MDM2 promueve la tumorigénesis está al menos en parte relacionado con su interacción con p53. En células que expresan en exceso MDM2, la función protectora de p53 se bloquea y así las células son incapaces de responder al daño del ADN o estrés celular, aumentando los niveles de p53, conduciendo a la detención del crecimiento celular y/o apoptosis. Así, después del daño del ADN y/o estrés celular, las células que expresan en exceso MDM2 están libres para continuar proliferando y asumiendo un fenotipo tumorigénico. Bajo estas condiciones, la rotura de la interacción de p53 y MDM2 liberaría p53 y así permitiría que funcionaran señales normales de detención del crecimiento y/o apoptosis.

MDM2 también puede tener funciones separadas, además de la inhibición de p53. El número de sustratos MDM2 está ampliándose rápidamente. Por ejemplo, se ha mostrado que MDM2 interacciona directamente con el factor de transcripción regulado por pRb E2F1/DP1. Esta interacción podría ser crucial para las actividades oncogénicas independientes de p53 de MDM2. Un dominio de E2F1 muestra una notable similitud con el dominio de unión a MDM2 de p53. Como las interacciones de MDM2 con tanto p53 como E2F1 se localizan en el mismo sitio de unión sobre MDM2, puede esperarse que los antagonistas de MDM2/p53 no solo activen p53 celular, sino que también modulen actividades de E2F1, que se desregulan comúnmente en células tumorales. Otros ejemplos clave de sustratos MDM2 incluyen p63, p73, p21^{waf1/cip1}.

La eficacia terapéutica de agentes que dañan el ADN actualmente usados (quimioterapia y radioterapia) también puede limitarse mediante la regulación negativa de p53 por MDM2. Así, si se interrumpe la inhibición de la retroalimentación por MDM2 de p53, un aumento en los niveles de p53 funcional aumentará la eficacia terapéutica de tales agentes, restaurando la función de p53 no mutada que conduce a apoptosis y/o invirtiendo la resistencia a fármacos asociada a p53. Se demostró que la combinación de la inhibición de MDM2 y los tratamientos que dañan el ADN *in vivo* condujeron a efectos antitumorales sinérgicos (Vousden K.H., Cell, Vol. 103, 691-694, 2000).

Así, la rotura de la interacción de MDM2 y p53 ofrece un enfoque para la intervención terapéutica en tumores con p53 no mutada o mutante, podría incluso presentar efectos antiproliferativos en las células tumorales que carecen de p53 funcional y además pueden sensibilizar células tumorigénicas para quimioterapia y radioterapia.

Antecedentes de la invención

El documento JP 11130750, publicado el 18 de mayo de 1999, describe entre otras cosas, derivados de fenilaminocarbonilindolilo sustituidos como antagonistas de receptores de 5-HT.

El documento EP1129074, publicado el 18 de mayo de 2000, describe amidas de ácido antranílico como inhibidores de receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y útiles en el tratamiento de trastornos angiogénicos.

El documento WO01/42224, publicado el 14 de junio de 2001, proporciona derivados de carboxiamido para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

El documento EP1317443, publicado el 21 de marzo de 2002, desvela derivados de terc-amina tricíclicos, útiles como moduladores de los receptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 para tratar virus de la inmunodeficiencia humana y virus de la inmunodeficiencia felina.

El documento EP1379239, publicado el 10 de octubre de 2002, desvela N-(2-ariletil)bencilaminas como antagonistas del receptor de 5-HT₆.

El documento WO00/15357, publicado el 23 de marzo de 2000, proporciona derivados de piperazin-4-fenilo como inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53. El documento EP1137418, publicado el 8 de junio de 2000, proporciona compuestos tricíclicos para restaurar la estabilidad conformacional de una proteína de la familia p53.

El documento WO03/040402, publicado el 15 de mayo de 2003, proporciona compuestos que inhiben las interacciones entre proteínas, tales como la interacción entre MDM2 y p53. El documento EP1443937, publicado el 22 de mayo de 2003, describe 1,4-benzodiazepinas sustituidas y los usos de las mismas como inhibidores de las interacciones MDM2-p53.

El documento EP1458380, publicado el 26 de junio de 2003, proporciona cis-2,4,5-trifenil-imidazolonas que inhiben la interacción de la proteína MDM2 con péptidos similares a p53 y tienen actividad antiproliferativa.

El documento EP1519932, publicado el 15 de enero de 2004, desvela compuestos de bisarilsulfonamida que se unen a MDM2 y pueden usarse en la terapia contra el cáncer.

El documento EP1809622, publicado el 30 de marzo de 2006, desvela inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53.

Existe la necesidad de moléculas pequeñas eficaces que inhiban las interacciones entre MDM2 y p53, tengan potente efecto inhibidor contra el crecimiento de células tumorales, tengan un amplio perfil de seguridad y menos efectos secundarios no deseados.

Los compuestos de la presente invención muestran excelente actividad *in vitro*. Tienen baja afinidad por las enzimas P450 que reducen el riesgo de interacción adversa fármaco-fármaco, permitiendo un margen de seguridad más amplio. Además, los compuestos de la presente invención muestran excelentes efectos antitumorales *in vivo* mientras que tienen menos efectos neurológicos inducidos por fármacos *in vivo*.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación del espectro de infrarrojos (IR) de la forma I

La Figura 2 es una representación del patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD) de la forma I

La Figura 3 es una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la forma I

La Figura 4 es una representación del espectro de IR de la forma II

La Figura 5 es una representación del patrón de XRPD de la forma II

La Figura 6 es una curva de DSC de la forma II

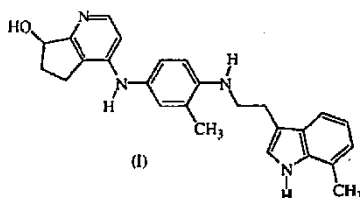
La Figura 7 es el efecto antitumoral del compuesto nº 1 en tumores de xenoinjerto de glioblastoma U87 en ratones sin pelo NMRI:

En el día 0, ratones sin pelo NMRI macho se inocularon con una única inyección subcutánea en la región inguinal con células tumorales de glioblastoma U87 humano (10^6 células/ratón). En el día 8, los ratones se trataron p.o. con vehículo (grupo de control; 10 % de hidroxipropil-β-ciclodextrina (□)) o vehículo que contiene C. nº 1 a tanto 2,5 mg/kg (▲), 5 mg/kg (▼), 10 mg/kg (€) como 20 mg/kg (●) durante 21 días (QD x 21). Se midieron los volúmenes tumorales subcutáneos y los pesos corporales dos veces a la semana, hasta el final del estudio, y los resultados se representaron como volúmenes tumorales relativos (mm³). Periodo de dosificación indicado bajo el eje x.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona compuestos y composiciones para inhibir las interacciones entre MDM2 y p53 para tratar cáncer. Además, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles en potenciar la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia.

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I)



una forma de *N*-óxido, una sal de adición, una forma estereoquímicamente isomérica, un solvato de los mismos, o una forma polimórfica de los mismos.

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

Varios términos usados en las definiciones anteriores y en el presente documento después se explican en lo sucesivo. Estos términos se usan algunas veces como tales o en términos compuestos.

El término "sal de adición" comprende las sales que los compuestos de fórmula (I) pueden formar con bases orgánicas o inorgánicas tales como aminas, bases de metales alcalinos y bases de metales alcalinotérreos, o bases de amonio cuaternario, o con ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como ácidos minerales, ácidos sulfónicos, ácidos carboxílicos o ácidos que contienen fósforo.

El término "sal de adición" comprende además sales farmacéuticamente aceptables y complejos metálicos, que los compuestos de fórmula (I) pueden formar. Preferentemente, el término sal de adición significa las sales farmacéuticamente aceptables, en particular las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" significa sales de adición de ácido o de base farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido o de base farmacéuticamente aceptables como se han mencionado anteriormente en este documento pretenden comprender las formas de sales de adición de ácido no tóxicas y de base no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos de fórmula (I) pueden formar. Los compuestos de fórmula (I) pueden convertirse en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables tratando el compuesto con un ácido apropiado. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico; ácidos sulfúrico; nítrico; fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiaacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y similares.

Los compuestos de fórmula (I) pueden convertirse en sus sales de adición de base farmacéuticamente aceptables tratando el compuesto con una base orgánica o inorgánica adecuada. Formas de sales de base apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales metálicas alcalinas y alcalinotérreas, por ejemplo, las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, por ejemplo, las sales de benzatrina, *N*-metil-D-glucamina, hidrabamina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término solvato comprende los hidratos y formas de adición de disolvente que los compuestos de fórmula (I) pueden formar, además de las sales de los mismos. Ejemplos de tales formas son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

El término "complejos metálicos" significa un complejo formado entre un compuesto de fórmula (I) y una o más sales metálicas orgánicas o inorgánicas o sales. Ejemplos de dichas sales orgánicas o inorgánicas comprenden los halogenuros, nitratos, sulfatos, fosfatos, acetatos, trifluoroacetatos, tricloroacetatos, propionatos, tartratos, sulfonatos, por ejemplo, metilsulfonatos, 4-metilfenilsulfonatos, salicilatos, benzoatos y similares de los metales del segundo grupo principal del sistema periódico, por ejemplo, las sales de magnesio o calcio, del tercer o cuarto grupo principal, por ejemplo, aluminio, estaño, plomo, además del primer al octavo grupos de transición del sistema periódico tales como, por ejemplo, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, cinc y similares.

El término "formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de fórmula (I)", como se usa anteriormente en este documento, define todos los posibles compuestos constituidos de los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces, pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes que no son intercambiables, que

pueden poseer los compuestos de fórmula (I) y sus *N*-óxidos, sales farmacéuticamente aceptables o derivados fisiológicamente funcionales. A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación química de los compuestos indica la mezcla de todas las posibles formas estereoquímicamente isoméricas.

En particular, los centros estereogénicos pueden tener la configuración R o S. Más adelante, enantiómeros particulares pueden indicarse como enantiómero A o enantiómero B. Si el enantiómero se indica como A o B depende de si se aísla primero (es decir, A) o segundo (es decir, B) en el protocolo de síntesis. A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación química de un compuesto engloba la mezcla de todas las posibles formas estereoquímicamente isoméricas que dicho compuesto puede poseer.

Son de especial interés aquellos compuestos de fórmula (I) que son estereoquímicamente puros.

Formas estereoisoméricas puras de los compuestos y productos intermedios como se menciona en el presente documento se definen como isómeros sustancialmente libres de otras formas enantioméricas o diaestereoméricas de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o productos intermedios. En particular, el término "estereoisoméricamente puro" se refiere a compuestos o productos intermedios que tienen un exceso estereoisomérico de al menos el 80 % (es decir, mínimo el 90 % de un isómero y máximo el 10 % de los otros isómeros posibles) hasta un exceso estereoisomérico del 100 % (es decir, 100 % de un isómero y ninguno de los otros), más en particular, compuestos o productos intermedios que tienen un exceso estereoisomérico del 90 % hasta el 100 %, incluso más en particular que tienen un exceso estereoisomérico del 94 % hasta 100 % y lo más en particular que tienen un exceso estereoisomérico del 97 % hasta el 100 %. Los términos "enantioméricamente puro" y "diaestereoméricamente puro" deben entenderse de un modo similar, pero entonces teniendo en cuenta el exceso enantiomérico, respectivamente, el exceso diaestereomérico de la mezcla en cuestión.

Las formas de *N*-óxido de los compuestos de fórmula (I) pretenden comprender aquellos compuestos de fórmula (I) en los que uno o varios átomos de nitrógeno terciarios se oxidan al llamado *N*-óxido.

Los compuestos de fórmula (I) pueden convertirse en las formas de *N*-óxido correspondientes, siendo procedimientos conocidos en la técnica para convertir un nitrógeno trivalente en su forma de *N*-óxido. Dicha reacción de *N*-oxidación puede llevarse a cabo generalmente haciendo reaccionar el material de partida de fórmula (I) con un peróxido orgánico o inorgánico apropiado. Peróxidos inorgánicos apropiados comprenden, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, peróxidos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, por ejemplo, peróxido de sodio, peróxido de potasio; peróxidos orgánicos apropiados pueden comprender peroxiácidos tales como, por ejemplo, ácido bencenocarboperoxoico o ácido bencenocarboperoxoico sustituido con halógeno, por ejemplo, ácido 3-clorobencenocarboperoxoico, ácidos peroxoalcanoicos, por ejemplo, ácido peroxoacético, alquilhidroperóxidos, por ejemplo, hidropéroxido de *t*-butilo. Disolventes adecuados son, por ejemplo, agua, alcoholes inferiores, por ejemplo etanol y similares, hidrocarburos, por ejemplo tolueno, cetonas, por ejemplo 2-butanona, hidrocarburos halogenados, por ejemplo diclorometano, y mezclas de tales disolventes.

La presente invención también pretende incluir cualquier isótopo de átomos presentes en los compuestos de la invención. Por ejemplo, isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio e isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

Siempre que se use más adelante, el término "compuestos de fórmula (I)" o "compuestos de la presente invención" pretende también incluir las formas de *N*-óxido, las sales de adición de ácido o de base, en particular las sales de adición de ácido, todas las formas estereoisoméricas, los solvatos y todas las formas cristalinas polimórficas o formas amorfas.

Así, los compuestos de la presente invención pueden tener una o más formas cristalinas polimórficas o amorfas y como tales pretenden incluirse en el alcance de la invención.

Una forma amorfa es una forma en la que no existe un orden de largo intervalo tridimensional. En la forma amorfa, la posición de las moléculas las unas con respecto a las otras es esencialmente aleatoria, es decir, sin disposición regular de las moléculas sobre una estructura reticular. Materiales amorfos y desordenados tienen frecuentemente propiedades mejoradas, pero el generar y estabilizar este estado puede ser un gran reto.

Un cristal o forma cristalina es la forma en la que la posición de las moléculas las unas con respecto a las otras está organizada según una estructura reticular tridimensional. Las formas cristalinas normalmente incluyen polimorfos y pseudopolimorfos. Los polimorfos son formas cristalinas diferentes del mismo compuesto resultantes de disposición diferente de las moléculas en el estado sólido. Diferentes polimorfos tienen diferentes estructuras cristalinas debido a un empaquetamiento diferente de las moléculas en la red cristalina. Esto produce una simetría cristalina diferente y/o parámetros de la celda unidad. Los polimorfos se diferencian entre sí en sus parámetros fisicoquímicos, pero no en su composición química. El polimorfismo es normalmente difícil de controlar y plantea retos a los galénicos. Los pseudopolimorfos, también denominados solvatos, son un caso particular de formas cristalinas en estado sólido en las que cualquier cantidad estequiométrica o no estequiométrica de moléculas de disolvente está presente o se incorpora en la estructura reticular del compuesto. Un solvato de agua también se denomina un hidrato.

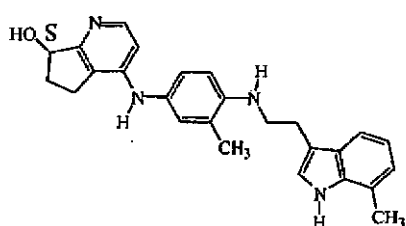
La química en estado sólido es de interés para la industria farmacéutica y especialmente para aquellos que participan en el desarrollo de formas de dosificación adecuadas. Por ejemplo, las transformaciones en estado sólido pueden afectar gravemente la estabilidad de fármacos farmacéuticos (estabilidad en almacén). Una forma sólida farmacéutica metaestable puede cambiar a una estructura cristalina (por ejemplo, de amorfa a cristalina) o solvato/desolvato en respuesta a cambios en las condiciones medioambientales, procesamiento, o con el tiempo.

Diferentes formas cristalinas o formas amorfas del mismo fármaco pueden tener diferencias sustanciales en tales propiedades farmacéuticamente importantes como velocidades de disolución, solubilidad termodinámica y biodisponibilidad. La velocidad de disolución de un principio activo en el líquido del estómago de un paciente puede tener consecuencias terapéuticas, ya que impone un límite superior a la velocidad a la que un principio activo administrado por vía oral puede alcanzar la circulación sanguínea del paciente. La velocidad de disolución es así una consideración en la formulación de formas de dosificación sólidas y medicamentos líquidos tales como jarabes y elixires.

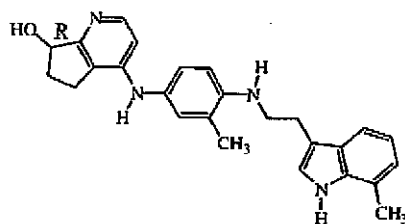
Asimismo, diferentes cristales o forma amorfa pueden tener diferentes propiedades de procesamiento, tales como higroscopicidad, fluidez, compactación y similares, que podrían afectar su idoneidad como productos farmacéuticos activos para la producción comercial.

Durante el desarrollo clínico de fármacos farmacéuticos, si la forma polimórfica no se mantiene constante, la forma de dosificación exacta usada o estudiada puede no ser comparable de un lote a otro. También se desea tener procesos para producir un compuesto con la forma polimórfica seleccionada en alta pureza cuando el compuesto se usa en estudios clínicos o productos comerciales, ya que las impurezas presentes pueden producir efectos toxicológicos no deseados. Ciertas formas polimórficas pueden presentar estabilidad termodinámica potenciada o pueden fabricarse más fácilmente en alta pureza en grandes cantidades, y así son más adecuadas para inclusión en formulaciones farmacéuticas.

Los compuestos preferidos de fórmula (I) son el compuesto nº 1 o el compuesto nº 2.

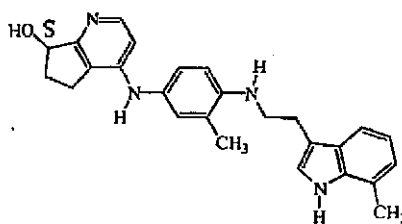


Compuesto nº 1 (enantiómero S)



Compuesto nº 2 (enantiómero R)

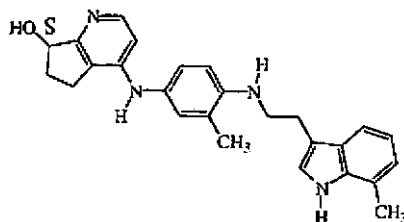
Otros compuestos preferidos de fórmula (I) son el compuesto nº 1 o el compuesto nº 3.



Compuesto nº 1 (enantiómero S)

Compuesto nº 3 (enantiómero S; sal de HCl)

El compuesto preferido de fórmula (I) es el compuesto nº 1.

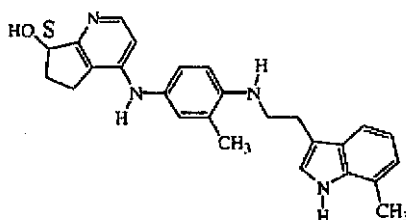


Compuesto nº 1 (enantiómero S)

Compuesto nº 1 (enantiómero S)

5 o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto más preferido de fórmula (I) es el compuesto nº 1.



Compuesto nº 1 (enantiómero S)

- 10 Caracterización de las formas cristalinas
- En una realización, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I) en estado sólido adicionalmente caracterizados porque están en forma cristalina.
- 15 En otra realización, la invención proporciona las formas cristalinas del compuesto nº 1 seleccionadas de la forma I y la forma II. Estas formas están sustancialmente libres de impurezas. Adecuadamente, estas formas no contienen más del 10 % de impurezas, más adecuadamente no contienen más del 5 % de impurezas, incluso más adecuadamente no contienen más del 1 % de impurezas. La pureza polimórfica puede probarse por XRPD, usándose el área bajo los picos para calcular la pureza polimórfica. Estas formas son preferentemente esencialmente puras. Con el término "esencialmente puro" se indica más del 90 % de pureza, adecuadamente más del 95 % de pureza, más adecuadamente más del 97 % de pureza, lo más adecuadamente más del 99 % de pureza.
- 20 La presente invención proporciona además una mezcla de dos o más formas cristalinas del compuesto nº 1, en las que al menos una forma cristalina está seleccionada de la forma I o la forma II.
- 25 La presente invención proporciona además una mezcla de una o más formas cristalinas de un compuesto de fórmula (I), preferentemente el compuesto nº 1, y una forma amorfa del compuesto de fórmula (I).
- 30 Las posiciones de los picos de intensidad de XRPD caracterizadoras de la forma I y la forma II se facilitan en grados dos-theta.
- La forma I del compuesto nº 1 se caracteriza por picos de difracción típicos en las posiciones dos-theta $6,4^\circ \pm 0,2^\circ$, $12,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $15,2^\circ \pm 0,2^\circ$ y $17,3^\circ \pm 0,2^\circ$.
- 35 La forma II del compuesto nº 1 se caracteriza por picos de difracción típicos en las posiciones dos-theta $8,0^\circ \pm 0,2^\circ$, $12,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $18,2^\circ \pm 0,2^\circ$, $21,9^\circ \pm 0,2^\circ$ y $27,5^\circ \pm 0,2^\circ$.
- 40 El patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD) de la forma I es como se ha representado sustancialmente en la Figura 2. El patrón de difracción de rayos X de polvo de la forma II es como se ha representado sustancialmente en la Figura 5.

Las representaciones de datos y patrones de XRPD de todas las formas se obtuvieron usando un difractómetro Philips X'PertPRO MPD PW3050/60 con un generador PW3040. El instrumento se equipó con un tubo de rayos X de Cu LFF X PW3373/10. El compuesto que va a analizarse se propagó sobre un soporte de muestra de fondo cero. Los parámetros del instrumento fueron los siguientes:

- Voltaje del generador: 45 kV
- Amperaje del generador: 40 mA
- Geometría: Bragg-Brentano
- Etapa: etapa de centrífuga.

Los parámetros de barrido para las formas I y II fueron los siguientes: el intervalo fue 3° a 50° 2-theta con un barrido continuo a una tasa de $0,0167^\circ$ / etapa, a 30 s / etapa. El tiempo de revoluciones de la centrífuga fue 1 s, el tipo de radiación $\text{CuK}\alpha$ y la longitud de onda de radiación fue $1,5406 \text{ \AA}$.

Los parámetros de la trayectoria del haz incidente para las formas I y II fueron los siguientes:

- Ranura de divergencia del programa: 15 mm
- Ranura Soller: $0,04 \text{ rad}$
- Máscara del haz: 15 mm
- Ranura anti-dispersión: 1°
- Cuchilla del haz: +

Los parámetros de la trayectoria del haz difractado para las formas I y II fueron los siguientes:

- Protección anti-dispersión larga: +
- Ranura Soller: $0,04 \text{ rad}$
- Filtro de Ni: +
- Detector: X'Celerator

La exactitud de las posiciones de los picos de XRPD proporcionada para las formas I y II se define como $0,2^\circ$ debido a diferencias experimentales, tales como instrumentaciones, preparaciones de muestras y similares.

Las posiciones de los picos de absorbancia de IR caracterizadoras de las formas I y II se facilitan en números de onda cm^{-1} .

La forma I del compuesto nº 1 se caracteriza por un espectro de reflectancia microatenuado de espectrometría de infrarrojos (IR) con bandas de absorción típicas a $3403 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $3150 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1595 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1517 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1320 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1165 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1071 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $882 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $819 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $781 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ y $733 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

La forma II del compuesto nº 1 se caracteriza por un espectro de reflectancia microatenuado de espectrometría de infrarrojos con bandas de absorción típicas a $3411 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $3352 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, 1600, 1508, 1480, 1327, 1171, 1079, 810, 770 y $743 \text{ cm}^{-1} \pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

El espectro de IR de la forma I es como se ha representado sustancialmente en la Figura 1. El espectro de IR de la forma II es como se ha representado sustancialmente en la Figura 4.

Las representaciones de datos y espectros de IR se obtuvieron usando reflectancia total microatenuada con espectrometría de infrarrojos (microATR) con un espectrómetro. El accesorio de micro-ATR fue un Harrick SplitPea con cristal de Si. El detector usado fue un DTGS con ventana de KBr. Los parámetros de barrido para las formas I y II fueron los siguientes:

- Número de barridos: 32
- Resolución: 1 cm^{-1}
- Intervalo de longitud de onda: 4000 a 400 cm^{-1}
- Corrección del nivel inicial: sí
- Divisor del haz: Ge sobre KBr.

La exactitud de los picos de absorbancia de IR proporcionada para las formas I y II se define como 1 cm^{-1} debido a diferencias experimentales, tales como instrumentaciones, preparaciones de muestras y similares.

Las posiciones o intervalos de los picos endotérmicos de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) caracterizados de las formas I y II se facilitan en $^\circ\text{C}$

La forma I del compuesto nº 1 funde a aproximadamente $191,9 \text{ }^\circ\text{C}$. El calor de fusión es 113 J/g .

La forma II del compuesto nº 1 funde a aproximadamente 185,6 °C, el calor de fusión es 82 J/g. Se observa una señal endotérmica adicional en la curva de DSC a aproximadamente 158,5 °C (2 J/g) probablemente debido a una impureza presente en la muestra.

- 5 La curva de DSC de la forma I es como se representa sustancialmente en la Figura 3. La curva de DSC de la forma II es como se representa sustancialmente en la Figura 6.

10 Las representaciones de datos y curvas de DSC se obtuvieron usando un Q1000 MTDSC de TA-Instruments equipado con una unidad de refrigeración RCS. El peso de las muestras fue aproximadamente 3 mg, que se transfirieron a un platillo de muestra de TA-Instrument de aluminio estándar. Las muestras se barrieron a una tasa de 10°C / min desde 25 °C hasta una temperatura final de 300 °C. La estufa se purgó constantemente con gas nitrógeno a una velocidad de flujo de 50 ml / min.

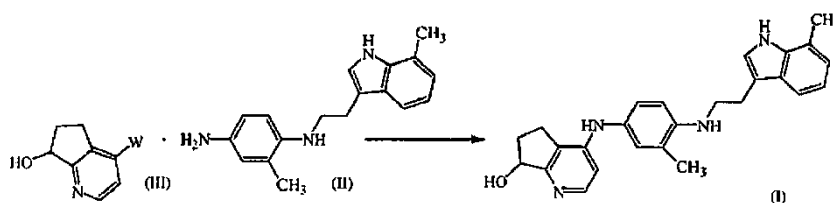
15 La tolerancia de las curvas de DSC proporcionada para las formas I y II se define como 3 °C debido a diferencias experimentales, tales como instrumentaciones, preparaciones de muestras y similares.

20 Los compuestos de fórmula (1), sus sales y *N*-óxidos farmacéuticamente aceptables y formas esterequímicamente isoméricas de los mismos pueden prepararse de manera convencional. Los materiales de partida y algunos de los productos intermedios son compuestos conocidos y están comercialmente disponibles o pueden prepararse según procedimientos de reacción convencionales como generalmente se conoce en la técnica, más específicamente como se desvela en el documento EP1809622.

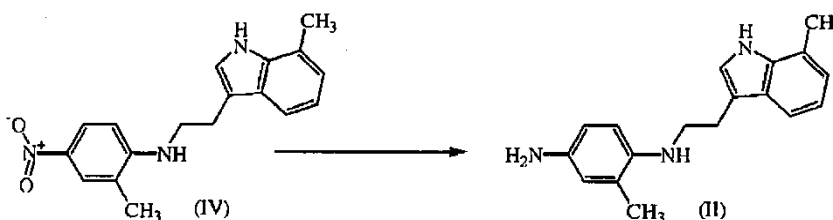
25 Varios de tales métodos de preparación se describirán más adelante en más detalle. Métodos análogos para obtener compuestos de fórmula (I) se describen en los ejemplos.

30 Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (II) con un producto intermedio de fórmula (III) en la que W es un grupo saliente apropiado tal como, por ejemplo, halógeno, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo, o un radical sulfonyloxi tal como metilsulfonyloxi, 4-metilfenilsulfonyloxi y similares. La reacción puede realizarse en un disolvente inerte de reacción tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol, etanol, 2-metoxi-etanol, propanol, butanol y similares; un éter, por ejemplo 1,4-dioxano, 1,1'-oxibispropano y similares; una cetona, por ejemplo, 4-metil-2-pentanona; o *N,N*-dimetilformamida, nitrobenzono, acetonitrilo, ácido acético y similares. La adición de una base apropiada tal como, por ejemplo, un carbonato o hidrogenocarbonato de metal alcalino o alcalinotérreo, por ejemplo trietilamina o carbonato sódico, puede utilizarse para recoger el ácido que se libera durante el transcurso de la reacción. Puede añadirse una cantidad pequeña de un yoduro de metal apropiado, por ejemplo, yoduro de sodio o de potasio para promover la reacción. La agitación puede potenciar la velocidad de la reacción. La reacción puede llevarse a cabo convenientemente a una temperatura que oscila entre temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción y, si se desea, la reacción puede llevarse a cabo a una presión elevada.

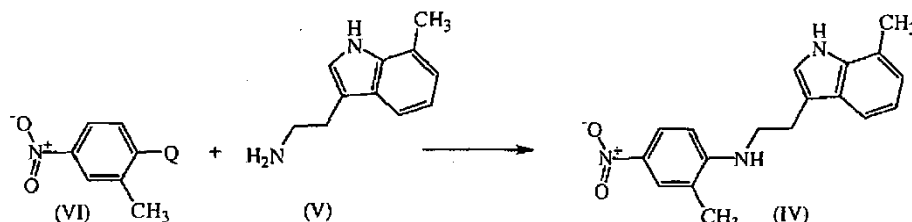
40 Alternativamente, pueden prepararse compuestos de fórmula (I) haciendo reaccionar la anilina de fórmula (II) con el producto intermedio de fórmula (III) en presencia de un catalizador apropiado tal como, por ejemplo, tris[μ-(1,2-η:4,5-η)-(1E,4E)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-one]]dipaladio (Pd₂(dba)₃) y un ligando apropiado tal como, por ejemplo, (9,9-dimetil-9H-xanteno-4,5-diil)bis[difenilfosfina] (Xantphos). La reacción puede realizarse en un disolvente inerte de reacción tal como, por ejemplo, dioxano y bases apropiadas tales como, por ejemplo, terc-butóxido de sodio y puede añadirse K₃PO₄.



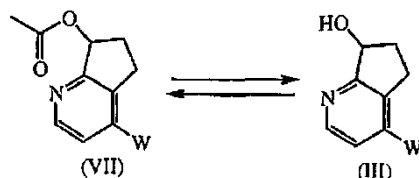
50 Los productos intermedios de fórmula (II) pueden prepararse hidrogenando un producto intermedio de fórmula (IV) en presencia de paladio sobre carbono, platino sobre carbono o níquel Raney bajo presión y en un disolvente adecuado tal como tolueno, con formación del producto intermedio de fórmula (II).



Los productos intermedios de fórmula (IV) pueden prepararse haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (V) con un producto intermedio de fórmula (VI), en la que Q es un grupo saliente apropiado tal como, por ejemplo, halógeno, por ejemplo flúor, cloro, bromo o yodo, o alquiloxi C₁₋₆, por ejemplo metiloxi, en diisopropiletilamina. Alquilo C₁₋₆ representa un radical de hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono tal como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, 2-metil-etilo, pentilo, hexilo y similares.



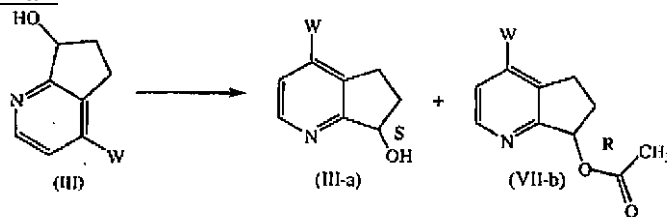
Los productos intermedios de fórmula (III) pueden prepararse agitando el producto intermedio de fórmula (VII) en una mezcla de metanol/NH₃. Si se desea, el producto intermedio de fórmula (III) puede convertirse en el producto intermedio de fórmula (VII) agitando en una mezcla de anhídrido acético y piridina.



El enantiómero S del producto intermedio (III), denominado en el presente documento el producto intermedio de fórmula (III-a), y el enantiómero R del producto intermedio de fórmula (VII), denominado en el presente documento el producto intermedio de fórmula (VII-b), pueden prepararse añadiendo lipasa B de *Candida antarctica* a una mezcla racémica del producto intermedio de fórmula (III) en un disolvente adecuado tal como éster etenílico de ácido acético (véase el Esquema 1). Si se desea, el producto intermedio de fórmula (VII-b) puede convertirse en el enantiómero R del producto intermedio (III), denominado en el presente documento el producto intermedio de fórmula (III-b), mediante reacción en MeOH/NH₃.

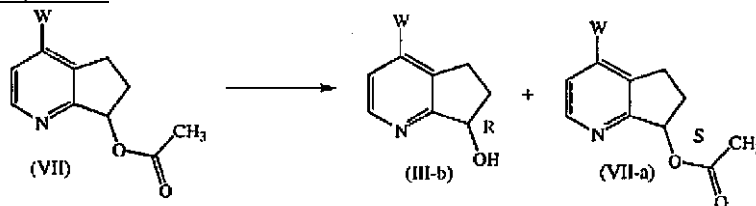
A partir de la mezcla racémica, este método proporciona la conversión de uno de los enantiómeros en su acetato con e.e.>99 % y rendimiento del 58 % y el segundo enantiómero se aísla con e.e.>99 % con un rendimiento del 42 %.

Esquema 1



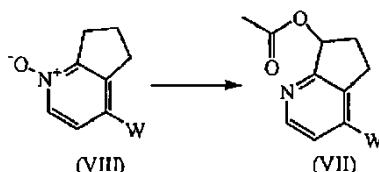
Alternativamente, el enantiómero R del producto intermedio (III), denominado en el presente documento el producto intermedio de fórmula (III-b), y el enantiómero S del producto intermedio de fórmula (VII), denominado en el presente documento el producto intermedio de fórmula (VII-a), puede prepararse añadiendo lipasa B de *Candida antarctica* a una mezcla racémica del producto intermedio de fórmula (VII) en agua (véase el Esquema 2). Si se desea, el producto intermedio (VII-a) puede convertirse en el producto intermedio (III-a) mediante reacción en MeOH/NH₃.

Esquema 2

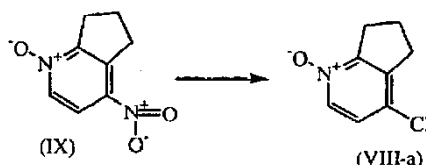


Alternativamente, el producto intermedio de fórmula (III) también puede separarse en sus enantiómeros por cromatografía en columna quiral.

Los productos intermedios de fórmula (VII) pueden prepararse agitando el producto intermedio de fórmula (VIII) en anhídrido acético.



Los productos intermedios de fórmula (VIII) en la que W es cloro, denominados en el presente documento el producto intermedio de fórmula (VIII-a), pueden prepararse añadiendo cloruro de benciltriethylamonio y cloruro sódico a una disolución del producto intermedio de fórmula (IX) en acetonitrilo, seguido de la adición de ácido clorhídrico concentrado.



Los productos intermedios de fórmula (IX) pueden prepararse añadiendo ácido nítrico fumante a ácido sulfúrico, seguido de la adición en porciones de 1-óxido de 6,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]piridina.

Los compuestos de fórmula (I) y algunos de los productos intermedios en la presente invención contienen un átomo de carbono asimétrico. Pueden obtenerse formas estereoquímicamente isoméricas puras de dichos compuestos y dichos productos intermedios por la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden separarse diaestereoisómeros por métodos físicos tales como cristalización selectiva o técnicas cromatográficas, por ejemplo, distribución en contracorriente, cromatografía de líquidos y métodos similares. Pueden obtenerse enantiómeros de mezclas racémicas convirtiendo primero dichas mezclas racémicas con agentes de resolución adecuados tales como, por ejemplo, ácidos quirales, en mezclas de sales diaestereoméricas o compuestos; a continuación separando físicamente dichas mezclas de sales diaestereoméricas o compuestos por, por ejemplo, cristalización selectiva, cromatografía en fluido supercrítico o técnicas cromatográficas, por ejemplo, cromatografía de líquidos y métodos similares; y finalmente convirtiendo dichas sales diaestereoméricas separadas o compuestos en los enantiómeros correspondientes. Las formas estereoquímicamente isoméricas puras también pueden obtenerse a partir de las formas estereoquímicamente isoméricas puras de los productos intermedios y materiales de partida apropiados, a condición de que las reacciones que intervienen se produzcan estereoespecíficamente.

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, las formas estereoisoméricas y las formas polimórficas de los mismos tienen valiosas propiedades farmacológicas porque inhiben la interacción entre p53 y MDM2.

El término "MDM2" (doble minuto murino 2) se usa en el presente documento para indicar una proteína obtenida como resultado de la expresión del gen mdm2. Dentro del significado de este término, MDM2 engloba todas las proteínas codificadas por mdm2, mutantes de las mismas, proteínas de corte y empalme alternativas de las mismas, y proteínas fosforiladas de las mismas. Adicionalmente, como se usa en el presente documento, el término "MDM2" incluye análogos de MDM2, por ejemplo MDMX, también conocido como MDM4, y homólogos de MDM2 y análogos de otros animales, por ejemplo, el homólogo humano HDM2 o el análogo humano HDMX.

El término "que inhibe la interacción" o "inhibidor de la interacción" se usa en el presente documento para indicar la prevención o reducción de la asociación directa o indirecta de una o más moléculas, péptidos, proteínas, enzimas o receptores; o prevención o reducción de la actividad normal de una o más moléculas, péptidos, proteínas, enzimas o receptores.

El término "inhibidor de la interacción de p53 con MDM2" o "inhibidor de p53-MDM2" se usa en el presente documento para describir un agente que aumenta la expresión de p53 en el ensayo descrito en C. 1. Este aumento puede producirse por uno o más de los siguientes mecanismos de acción:

- inhibición de la interacción entre p53 y MDM2,
- asociación directa con tanto la proteína MDM2 como p53,
- interacciones con dianas aguas arriba o aguas abajo, por ejemplo cinasas, o actividades enzimáticas que participan en la ubiquitinación o modificación de SUMO,
- secuestro o transporte de MDM2 y p53 en diferentes compartimentos celulares,
- modulación de proteínas que se asocian a MDM2, por ejemplo, p63, p73, E2F-1, Rb, p21waf1 o cip1, HIF1alfa, Foxo3A, p14ARF,

- regulación por disminución o interferencia con la expresión de MDM2 y/o actividad de MDM2, por ejemplo, afectando sobre su localización celular, modificación postraducciona, exportación nuclear, actividad de ubiquitina ligasa o interferencia con unión de MDM2 con el proteasoma, modulando la interacción MDM2-proteasoma,
- estabilización directa o indirecta de la proteína p53, por ejemplo, manteniéndola en su forma estructural funcional, o previniendo el plegamiento erróneo,
- potenciamiento de la expresión de p53 o expresión de miembros de la familia de p53, por ejemplo, p63 y p73,
- aumento de la actividad de p53, por ejemplo, potenciando su actividad transcripcional, y/o
- aumento de la expresión de genes y proteínas de la ruta de señalización de p53, por ejemplo, p21waf1, cip1, MIC-1 (GDF-15), PIG-3, Bax, Puma, Noxa y ATF-3.

Por tanto, la presente invención desvela los compuestos de fórmula (I) para su uso como una medicina, en particular para el tratamiento de cáncer o enfermedades relacionadas, para inhibir el crecimiento tumoral, para inhibir la interacción entre MDM2 y p53, para modular la interacción MDM2-proteasoma.

Además, la invención también se refiere al uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado mediante una interacción p53-MDM2, en el que dicho compuesto es un compuesto de fórmula (I)

El término "tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad y/o afección en un animal, particularmente un ser humano, e incluye: (i) prevenir que una enfermedad y/o afección se produzca en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad y/o afección, pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (ii) inhibir la enfermedad y/o afección, es decir, detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad y/o afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad y/o afección.

Con el término "un trastorno mediado mediante una interacción p53-MDM2" se indica cualquier afección no deseada o perjudicial que resulte de la interacción entre la proteína MDM2 y p53 u otras proteínas celulares que inducen apoptosis, inducen celular muerte, o regulan el ciclo celular.

También se desvela un método para tratar un trastorno mediado mediante una interacción p53-MDM2 administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) en necesidad de tal tratamiento.

Los compuestos de la invención pueden tener efectos antiproliferativos en células tumorales, aunque tales células carecen de p53 funcional. Más en particular, los compuestos de la invención pueden tener efectos antiproliferativos en tumores con p53 no mutada o mutante y/o en tumores que expresan en exceso MDM2.

Así, la presente divulgación también proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) en necesidad de tal tratamiento.

Ejemplos de tumores que incluyen tumores malignos adultos y pediátricos, que pueden inhibirse por los compuestos de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón no microcítico (por ejemplo, adenocarcinoma), cánceres pancreáticos, cánceres de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer esofágico, carcinoma bucal escamoso, carcinoma de lengua, carcinoma gástrico, cáncer de hígado, cáncer nasofaríngeo, tumores hematopoyéticos de linaje linfóide (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de Burkitt), linfoma no Hodgkin (por ejemplo, linfoma de células del manto), enfermedad de Hodgkin, leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielógena aguda (LMA) o leucemia mielógena crónica (LMC)), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica (LCC), cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (SMD), tumores de origen mesenquimatosos, sarcomas de tejido blando, liposarcomas, sarcomas del estroma gastrointestinal, tumores malignos de la vaina nerviosa periférica (TMVNP), sarcomas de Ewing, leiomiomas, condrosarcomas mesenquimatosos, linfosarcomas, fibrosarcomas, rhabdomyosarcomas, melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, tumores cerebrales, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo, queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama avanzado), carcinoma de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, carcinoma endometrial, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata que incluye la enfermedad avanzada y cáncer de próstata resistente a hormonas, cánceres testiculares, osteosarcoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma epidérmico, mieloma múltiple (por ejemplo, mieloma múltiple resistente), mesotelioma. Cánceres particulares que pueden tratarse con los compuestos de la presente invención son cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, leucemia mielógena aguda (LMA).

Los compuestos de la presente invención también pueden usarse para el tratamiento y la prevención de afecciones inflamatorias.

Así, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento y prevención de afecciones inflamatorias administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) en necesidad de tal tratamiento.

Los compuestos de la presente invención también pueden usarse para el tratamiento de enfermedades y afecciones autoinmunitarias. Con el término "enfermedades autoinmunitarias" se indica cualquier enfermedad en la que el sistema inmunitario de un animal reacciona adversamente a un auto-antígeno. Con el término "auto-antígeno" se indica cualquier antígeno que normalmente se encuentra en el cuerpo del animal. Enfermedades autoinmunitarias representativas incluyen, pero no se limitan a: tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES o lupus), dermatomiositis, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener, enfermedad antimembrana basal glomerular, síndrome antifosfolípidos, dermatitis herpetiforme, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis, glomerulonefritis membranosa, síndrome de Goodpasture, Lambert-Eaton, síndrome miasténico, miastenia grave, penfigoide bulloso, poliendocrinopatías, enfermedad de Reiter y síndrome del hombre rígido.

Así, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento de enfermedades y condiciones autoinmunitarias administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) en necesidad de tal tratamiento.

Los compuestos de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas a proteínas inestables conformacionales o erróneamente plegadas.

Ejemplos de enfermedades asociadas a proteínas inestables conformacionales o erróneamente plegadas incluyen, pero no se limitan a: fibrosis quística (CFTR), síndrome de Marfan (fibrilina), esclerosis lateral amiotrófica (superóxido dismutasa), hipovitaminosis (colágeno), enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (complejo de alfa-cetoácido deshidrogenasa), osteogénesis imperfecta (procolágeno pro-alfa tipo I), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (prión), enfermedad de Alzheimer (beta-amiloide), amiloidosis familiar (lisozima), cataratas (cristalinas), hipercolesterolemia familiar (receptor de LDL), deficiencia de α 1-antitripsina, enfermedad de Tay-Sachs (beta-hexosaminidasa), retinitis pigmentosa (rodopsina) y leprechaunismo (receptor de insulina).

Así, la presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento de enfermedades asociadas a proteínas inestables conformacionales o erróneamente plegadas administrando una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) en necesidad de tal tratamiento.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los compuestos objeto pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención, como principio activo, se combina en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo que puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración. Estas composiciones farmacéuticas están deseablemente en forma de dosificación unitaria adecuada, preferentemente, para administración por vía oral, rectalmente, percutáneamente, o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y disoluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo normalmente comprenderá agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros componentes, por ejemplo, para ayudar en la solubilidad. Pueden prepararse disoluciones inyectables, por ejemplo, en las que el vehículo comprende solución salina, disolución de glucosa o una mezcla de solución salina y disolución de glucosa. También pueden prepararse suspensiones inyectables en cuyo caso pueden emplearse vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado opcionalmente combinados con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no producen un efecto perjudicial significativo a la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse de diversas formas, por ejemplo, como un parche transdérmico, como una aplicación transcutánea, como una pomada. Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación, como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son comprimidos (que incluyen comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, sobres de polvo, obleas,

disoluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas al ras, cucharadas grandes y similares, y múltiples segregados de los mismos.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son comprimidos (que incluyen comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, sobres de polvo, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas al ras, cucharadas grandes y similares, y múltiples segregados de los mismos.

El compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para inhibir la interacción entre MDM2 y p53 u otras proteínas celulares que inducen la apoptosis, inducen celular muerte, o regulan el ciclo celular, en particular una cantidad suficiente para modular la interacción MDM2-proteasoma.

El potencial oncogénico de MDM2 no solo se determina por su capacidad para suprimir p53, sino también por su capacidad para regular otras proteínas supresoras de tumores, por ejemplo, la proteína de retinoblastoma pRb y el factor de transcripción E2F1 estrechamente asociado, p63, p73.

Así, el compuesto de la invención se administra en una cantidad suficiente para modular la interacción entre MDM2 y los factores de transcripción E2F1.

Aquellos expertos en la materia podrían determinar fácilmente la cantidad eficaz de los resultados de prueba presentados más adelante. En general, se contempla que una cantidad terapéuticamente eficaz sería de 0,005 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, y en particular de 0,005 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como sub-dosis individuales, dos, tres, cuatro o más sub-dosis a intervalos apropiados durante el día. Dichas sub-dosis pueden formularse como formas de dosificación unitaria, por ejemplo, que contienen 0,5 a 500 mg, en particular 1 mg a 500 mg, más en particular 10 mg a 500 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria.

Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica comprenderá preferentemente del 0,05 al 99 % en peso, más preferentemente del 0,1 al 70 % en peso, incluso más preferentemente del 0,1 al 50 % en peso del compuesto de la presente invención, y, del 1 al 99,95 % en peso, más preferentemente del 30 al 99,9 % en peso, incluso más preferentemente del 50 al 99,9 % en peso de un vehículo farmacéuticamente aceptable, basándose todos los porcentajes en el peso total de la composición.

Como otro aspecto de la presente invención, se prevé una combinación de un inhibidor de p53-MDM2 con otro agente antineoplásico, especialmente para su uso como una medicina, más específicamente en el tratamiento de cáncer o enfermedades relacionadas.

Para el tratamiento de las afecciones anteriores, los compuestos de la invención pueden emplearse ventajosamente en combinación con uno o varios de otros agentes medicinales, más particularmente, con otros agentes antineoplásicos o adyuvantes en la terapia contra el cáncer. Ejemplos de agentes antineoplásicos o adyuvantes (agentes complementarios en la terapia) incluyen:

- compuestos de coordinación de platino, por ejemplo, cisplatino opcionalmente combinado con amifostina, carboplatino u oxaliplatino;
- compuestos de taxano, por ejemplo, paclitaxel, partículas de paclitaxel unidas a proteína (Abraxane™) o docetaxel;
- inhibidores de la topoisomerasa I tales como compuestos de camptotecina, por ejemplo, irinotecan, SN-38, topotecan, HCl de topotecan;
- inhibidores de la topoisomerasa II tales como epipodofilotoxinas antitumorales o derivados de podofilotoxina, por ejemplo, etopósido, fosfato de etopósido o tenipósido;
- alcaloides de la vinca antitumorales, por ejemplo, vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- derivados de nucleósidos antitumorales, por ejemplo, 5-fluorouracilo, leucovorina, gemcitabina, HCl de gemcitabina, capecitabina, cladribina, fludarabina, nelarabina;
- agentes alquilantes tales como mostaza de nitrógeno o nitrosourea, por ejemplo, ciclofosfamida, clorambucilo, carmustina, tiotepa, mefalan (melfalan), lomustina, altretamina, busulfano, dacarbazina, estramustina, ifosfamida opcionalmente en combinación con mesna, pipobromano, procarbazona, estreptozocina, telozolomida, uracilo;
- derivados de antraciclinas antitumorales, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina opcionalmente en combinación con dexrazoxana, doxilo, idarubicina, mitoxantrona, epirubicina, HCl de epirubicina, valrubicina;
- moléculas que eligen como diana el receptor de IGF-1, por ejemplo, picropodofilina;
- derivados de tetracarcina, por ejemplo, tetrocarcina A;

- glucocorticoides, por ejemplo, prednisona;
- anticuerpos, por ejemplo, trastuzumab (anticuerpo HER2), rituximab (anticuerpo CD20), gemtuzumab, gemtuzumab ozogamicina, cetuximab, pertuzumab, bevacizumab, alemtuzumab, eculizumab, ibritumomab tiuxetano, nofetumomab, panitumumab, tositumomab, CNTO 328;
- 5 - antagonistas de receptores de estrógenos o moduladores selectivos de receptores de estrógenos o inhibidores de la síntesis de estrógenos, por ejemplo, tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, droloxifeno, faslodex, raloxifeno o letrozol;
- inhibidores de la aromatasas tales como exemestano, anastrozol, letrozol, testolactona y vorozol;
- 10 - agentes de diferenciación tales como retinoides, vitamina D o ácido retinoico y agentes bloqueantes del metabolismo del ácido retinoico (RAMBA), por ejemplo, accutane;
- inhibidores de la ADN metil transferasa, por ejemplo, azacitidina o decitabina;
- antifolatos, por ejemplo, premetrexed disódico;
- antibióticos, por ejemplo, antinomina D, bleomicina, mitomicina C, dactinomina, carminomicina, daunomicina, levamisol, plicamicina, mitramicina;
- 15 - antimetabolitos, por ejemplo, clofarabina, aminopterina, citosina arabinósido o metotrexato, azacitidina, citarabina, floxuridina, pentostatina, tioguanina;
- agentes inductores de la apoptosis y agentes antiangiogénicos tales como inhibidores de Bcl-2, por ejemplo, YC 137, BH 312, ABT 737, gossypol, HA 14-1, TW 37 o ácido decanoico;
- aglutinantes de tubulina, por ejemplo, combrestatina, colchicinas o nocodazol;
- 20 - inhibidores de cinasas (por ejemplo, inhibidores de EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial), MTKI (inhibidores de cinasas multi-diana), inhibidores de mTOR), por ejemplo, flavoperidol, mesilato de imatinib, erlotinib, gefitinib, dasatinib, lapatinib, lapatinib ditosilato, sorafenib, sunitinib, maleato de sunitinib, temsirolimus;
- inhibidores de la farnesiltransferasa, por ejemplo, tipifarnib;
- 25 - inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), por ejemplo, butirato sódico, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), depsipéptido (FR 901228), NVP-LAQ824, R306465, JNJ-26481585, trichostatina A, vorinostat;
- inhibidores de la ruta de ubiquitina-proteasoma, por ejemplo, PS-341, MLN41 o bortezomib;
- yondelis;
- 30 - inhibidores de la telomerasa, por ejemplo, telomestatina;
- inhibidores de la metaloproteínasa de matriz, por ejemplo, batimastat, marimastat, prinostat o metastat;
- interleucinas recombinantes, por ejemplo, aldesleucina, denileucina diftotox, interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, peginterferón alfa 2b
- inhibidores de MAPK
- 35 - retinoides, por ejemplo, alitretinoína, bexaroteno, tretinoína
- trióxido arsénico
- asparaginasa
- esteroides, por ejemplo, propionato de dromostanolona, acetato de megestrol, nandrolona (decanoato, fenpropionato), dexametasona
- 40 - agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, por ejemplo, abarelix, acetato de goserelina, acetato de histrelin, acetato de leuprolida
- talidomida, lenalidomida
- mercaptopurina, mitotano, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, rasburicasa
- miméticos de BH3, por ejemplo, ABT-737
- 45 - inhibidores de MEK, por ejemplo, PD98059, AZD6244, CI-1040
- análogos de factores estimulantes de colonias, por ejemplo, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim; eritropoyetina o análogos de la misma (por ejemplo, darbepoetina alfa); interleucina 11; oprelvekin; zoledronato, ácido zoledrónico; fentanilo; bisfosfonato; palifermin.

50 Como se ha establecido anteriormente, los compuestos de la presente invención también tienen aplicaciones terapéuticas en sensibilizar células tumorales para radioterapia y quimioterapia.

Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse como "radiosensibilizador" y/o "quimiosensibilizador" o pueden administrarse en combinación con otro "radiosensibilizador" y/o

55 "quimiosensibilizador".

El término "radiosensibilizador", como se usa en el presente documento, se define como una molécula, preferentemente una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente eficaces para aumentar la sensibilidad de las células a radiación ionizante y/o para promover el tratamiento de

60 enfermedades que son tratables con radiación ionizante.

El término "quimiosensibilizador", como se usa en el presente documento, se define como una molécula, preferentemente una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente eficaces para aumentar la sensibilidad de las células a quimioterapia y/o promover el tratamiento de enfermedades

65 que son tratables con quimioterapéuticos.

Se han sugerido varios mecanismos para el modo de acción de radiosensibilizadores en la bibliografía que incluyen: radiosensibilizadores de células hipóxicas (por ejemplo, compuestos de 2-nitroimidazol y compuestos de dióxido de benzotriazina) que imitan al oxígeno o alternatively se comportan como agentes biorreductores bajo hipoxia; los radiosensibilizadores de células no hipóxicas (por ejemplo, pirimidinas halogenadas) pueden ser análogos de bases de ADN y se incorporan preferencialmente en el ADN de células cancerosas y así promueven la rotura inducida por la radiación de moléculas de ADN y/o previenen los mecanismos de reparación normales del ADN; y se han supuesto diversos otros posibles mecanismos de acción para radiosensibilizadores en el tratamiento de enfermedad.

Muchos protocolos de tratamiento para el cáncer actualmente emplean radiosensibilizadores conjuntamente con radiación de rayos X. Ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FudR), hidroxurea, cisplatino, y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.

La terapia fotodinámica (PDT) de cánceres emplea luz visible como activador de la radiación del agente sensibilizante. Ejemplos de radiosensibilizantes fotodinámicos incluyen los siguientes: derivados de hematoporfirina, Photofrin, derivados de benzoporfirina, etioporfirina de estaño, feoborbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc, y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.

Los radiosensibilizadores pueden administrarse conjuntamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios de otros compuestos, que incluyen: compuestos que promueven la incorporación de radiosensibilizadores en las células diana; compuestos que controlan el flujo de terapéuticos, nutrientes y/u oxígeno para las células diana; agentes quimioterapéuticos que actúan sobre el tumor con o sin radiación adicional; u otros compuestos terapéuticamente eficaces para tratar cáncer u otras enfermedades.

Los quimiosensibilizadores pueden administrarse conjuntamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios de otros compuestos, que incluyen: compuestos que promueven la incorporación de quimiosensibilizadores a las células diana; compuestos que controlan el flujo de terapéuticos, nutrientes y/u oxígeno para las células diana; agentes quimioterapéuticos que actúan sobre el tumor u otros compuestos terapéuticamente eficaces para tratar cáncer u otra enfermedad. Los antagonistas del calcio, por ejemplo, verapamilo, se encuentran útiles en combinación con agentes antineoplásicos para establecer quimiosensibilidad en células tumorales resistentes a agentes quimioterapéuticos aceptados y para potenciar la eficacia de tales compuestos en tumores malignos sensibles a los fármacos.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los componentes de las combinaciones según la invención, es decir, el uno o varios de otro agente medicinal y el inhibidor de p53-MDM2 según la presente invención, pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Los componentes pueden formularse por separado en composiciones farmacéuticas individuales o en una composición farmacéutica unitaria que contiene todos los componentes.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el uno o varios de otro agente medicinal y el inhibidor de p53-MDM2 según la presente invención junto con un vehículo farmacéutico.

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

La presente invención se refiere además a un producto que contiene como primer principio activo un inhibidor de p53-MDM2 según la invención y como principio activo adicional uno o más agentes antineoplásicos, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

El uno o varios de otros agentes medicinales e inhibidor de p53-MDM2 pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, en composiciones separadas o unitarias) o secuencialmente en cualquier orden. En el último caso, los dos o más compuestos se administrarán dentro de un periodo y en una cantidad y modo que es suficiente para garantizar que se logre un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el método preferido y orden de administración y las cantidades y pautas de dosificación respectivas para cada componente de la combinación dependerán del agente particular distinto del medicinal y del inhibidor de p53-MDM2 que se administra, su vía de administración, el tumor particular que está tratándose y el huésped particular que está tratándose. El método óptimo y el orden de administración y las cantidades y pauta de dosificación pueden determinarse fácilmente por aquellos expertos en la materia usando métodos convencionales y en vista de la información expuesta en el presente documento.

La relación de peso del compuesto según la presente invención y el uno o varios de otros agentes antineoplásicos, cuando se administran como una combinación, pueden determinarse por el experto en la materia. Dicha relación y la dosificación y frecuencia exacta de la administración dependen del compuesto particular según la invención y el (los)

- otro(s) agente(s) antineoplásico(s) usado(s), la afección particular que está tratándose, la gravedad de la afección que está tratándose, la edad, peso, sexo, dieta, tiempo de administración y condición física general del paciente particular, el modo de administración, además de otra medicación que el individuo pueda estar tomando, como es muy conocido para aquellos expertos en la materia. Además, es evidente que la cantidad diaria eficaz puede reducirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que receta los compuestos de la presente invención. Una relación de peso particular para el presente compuesto de fórmula (I) y otro agente antineoplásico puede oscilar de 1/10 a 10/1, más en particular de 1/5 a 5/1, incluso más en particular de 1/3 a 3/1.
- 5 El compuesto de coordinación de platino se administra ventajosamente en una dosificación de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, por ejemplo, 50 a 400 mg/m^2 , particularmente para cisplatino en una dosificación de aproximadamente 75 mg/m^2 y para carboplatino en aproximadamente 300 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 10 El compuesto de taxano se administra ventajosamente en una dosificación de 50 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, por ejemplo, 75 a 250 mg/m^2 , particularmente para paclitaxel en una dosificación de aproximadamente 175 a 250 mg/m^2 y para docetaxel en aproximadamente 75 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 15 El compuesto de camptotecina se administra ventajosamente en una dosificación de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, por ejemplo, 1 a 300 mg/m^2 , particularmente para irinotecan en una dosificación de aproximadamente 100 a 350 mg/m^2 y para topotecan en aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 20 El derivado de podofilotoxina antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, por ejemplo, 50 a 250 mg/m^2 , particularmente para etopósido en una dosificación de aproximadamente 35 a 100 mg/m^2 y para tenipósido en aproximadamente 50 a 250 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 25 El alcaloide de la vinca antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 2 a 30 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, particularmente para vinblastina en una dosificación de aproximadamente 3 a 12 mg/m^2 , para vincristina en una dosificación de aproximadamente 1 a 2 mg/m^2 y para vinorelbina en dosificación de aproximadamente 10 a 30 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 30 El derivado de nucleósidos antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 200 a 2500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, por ejemplo, 700 a 1500 mg/m^2 , particularmente para 5-FU en una dosificación de 200 a 500 mg/m^2 , para gemcitabina en una dosificación de aproximadamente 800 a 1200 mg/m^2 y para capecitabina en aproximadamente 1000 a 2500 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 35 Los agentes alquilantes tales como mostaza de nitrógeno o nitrosourea se administran ventajosamente en una dosificación de 100 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, por ejemplo, 120 a 200 mg/m^2 , particularmente para ciclofosfamida en una dosificación de aproximadamente 100 a 500 mg/m^2 , para clorambucilo en una dosificación de aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg , para carmustina en una dosificación de aproximadamente 150 a 200 mg/m^2 y para lomustina en una dosificación de aproximadamente 100 a 150 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 40 El derivado de antraciclina antitumoral se administra ventajosamente en una dosificación de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, por ejemplo, 15 a 60 mg/m^2 , particularmente para doxorubicina en una dosificación de aproximadamente 40 a 75 mg/m^2 , para daunorubicina en una dosificación de aproximadamente 25 a 45 mg/m^2 y para idarubicina en una dosificación de aproximadamente 10 a 15 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.
- 45 El agente antiestrógeno se administra ventajosamente en una dosificación de aproximadamente 1 a 100 mg diariamente dependiendo del agente particular y la afección que está tratándose. El tamoxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de 5 a 50 mg, preferentemente 10 a 20 mg, dos veces al día, continuando la terapia durante tiempo suficiente para lograr y mantener un efecto terapéutico. El toremifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 60 mg una vez al día, continuando la terapia durante tiempo suficiente para lograr y mantener un efecto terapéutico. El anastrozol se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 1 mg una vez al día. El droloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 20-100 mg una vez al día. El raloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 60 mg una vez al día. El exemestano se administra ventajosamente por vía oral en una dosificación de aproximadamente 25 mg una vez al día.
- 50 Los anticuerpos se administran ventajosamente en una dosificación de aproximadamente 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, o como se conoce en la técnica, si es diferente. Trastuzumab se
- 55
- 60
- 65

administra ventajosamente en una dosificación de 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial del cuerpo, particularmente 2 a 4 mg/m^2 por ciclo de tratamiento.

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

Los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y formas estereoisoméricas de las mismas pueden tener valiosas propiedades de diagnóstico porque pueden usarse para detectar o identificar una interacción p53-MDM2 en una muestra biológica que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto marcado y/o p53 y/o MDM2 y u otras moléculas, péptidos, proteínas, enzimas o receptores.

Los métodos de detección o identificación pueden usar compuestos que se marcan con agentes de marcado tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc. Ejemplos de los radioisótopos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C . Las enzimas se hacen normalmente detectables por conjugación de un sustrato apropiado que, a su vez, cataliza una reacción detectable. Ejemplos de las mismas incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa, preferentemente peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aequorina y luciferasa.

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

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

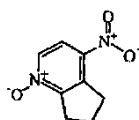
Parte experimental

Más adelante, "DMF" se define como *N,N*-dimetilformamida, "DCM" se define como diclorometano, "EtOAc" se define como acetato de etilo, "EtOH" se define como etanol, "MeOH" se define como metanol, "DIPEA" se define como *N*-etil-*N*-(1-metiletil)-2-propanamina, " Et_3N " se define como trietilamina y "DMAP" se define como 4-(dimetilamino)piridina.

A. Preparación de compuestos intermedios

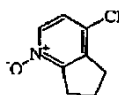
Ejemplo A1

a) Preparación del producto intermedio 1



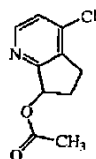
Se añadió lentamente ácido nítrico fumante (50 ml) a ácido sulfúrico (50 ml) a temperatura ambiente. Entonces, la mezcla se agitó a 50 °C. Se añadió 1-óxido de 6,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]piridina (0,146 moles) en porciones. La mezcla se agitó a 70 °C durante 15 minutos y a continuación se vertió en una mezcla de H_2O /hielo. El producto se extrajo con DCM. La fase orgánica separada se lavó 3 veces con H_2O (200 ml), se secó (MgSO_4), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH 98/2; 20-45 μm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. Rendimiento: 12 g de producto intermedio 1 (45 %).

b) Preparación del producto intermedio 2



Se añadieron cloruro de benciltriethylamonio (0,013 moles) y NaCl (0,266 moles) a una disolución del producto intermedio 1 (0,067 moles) en CH_3CN (23 ml). A continuación se añadió HCl concentrado (23 ml) y la mezcla se agitó y se sometió a reflujo durante 18 horas. Se añadió H_2O . La disolución se filtró sobre Celite. El filtrado se extrajo 4 veces con DCM. La fase orgánica separada se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH/ NH_4OH 98/2/0 a 95/5/0,1; 20-45 μm). Se recogió la fracción deseada y se evaporó el disolvente. Rendimiento: 11 g del producto intermedio 2.

c) Preparación del producto intermedio 3

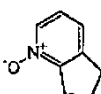


- 5 Se agitó una mezcla del producto intermedio 2 (0,065 moles) en anhídrido acético (110 ml) durante 30 minutos a 100 °C. A continuación, la mezcla se concentró y el aceite en bruto se disolvió en DCM. La fase orgánica se lavó con K_2CO_3 (10 %), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó el disolvente. Rendimiento: 12,5 g del producto intermedio 3.

El producto intermedio 3 también puede prepararse del siguiente modo:

10

a-1) Preparación del producto intermedio a



- 15 Se añadieron 174 g de ácido 3-cloroperoxibenzoico (mCPBA) (1,6 eq) a 1 l de acetato de etilo (EtOAc) (6 ml/g de mCPBA). La mezcla de reacción (mezcla A) se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se disolvieron 76



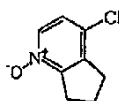
- g (0,641 moles) de en 375 ml de EtOAc (5 ml/g). Esta disolución se añadió gota a gota a la mezcla de reacción A durante 20 minutos manteniendo la temperatura constante a 10 °C. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó dos veces con una disolución de 27 g de $NaHSO_3$ (0,25 moles/moles de mCPBA) en 300 ml de H_2O (11 ml/g de $NaHSO_3$) y se combinaron las fases acuosas. La fase orgánica (+ fase intermedia) se extrajo con 300 ml de H_2O (4 ml/g). Se separaron las dos fases. Las 2 fases acuosas se reunieron (pH: +/- 5) y se neutralizaron con Na_2CO_3 hasta pH: 8. El producto se extrajo de la fase acuosa por extracción continua con diclorometano durante una noche. Se separaron las dos fases. La fase orgánica se secó con $MgSO_4$. El $MgSO_4$ se separó por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. Rendimiento: 49,5 g (57 %) del producto intermedio a (producto blanquecino).

b-1) Preparación del producto intermedio b



- 30 Se preparó una disolución de 49,5 g de producto intermedio a (0,366mol), 15,5 g cloruro de litio (LiCl) (1 eq) y 495 ml de acetonitrilo (10 ml/g) y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron gota a gota 102 ml de fosforoxiclورو ($POCl_3$) (3 eq) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a 45 °C y se añadieron gota a gota 750 ml de H_2O (15 ml/g), mientras que se mantenía la temperatura entre 40 °C y 50 °C, durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 213 g de Na_2CO_3 (5,5 eq) y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió Na_2CO_3 adicional y agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 750 ml de éter diisopropílico (DIPE) (15 ml/g) y 500 ml de H_2O (10 ml/g). La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre dicalita. Se separaron las fases. La fase orgánica se secó con $MgSO_4$. Se separó $MgSO_4$ por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida. Rendimiento: 51 g (91 %) (aceite marrón) del producto intermedio b.

c-1) Preparación del producto intermedio c

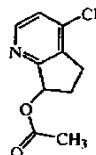


- 45 Se añadieron 108 g de mCPBA (1,2 eq) a 750 ml de DCM (7 ml/g de mCPBA). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se disolvieron 60 g del producto intermedio b (0,391 moles) en 600 ml de DCM (10 ml/g). Esta disolución se añadió gota a gota a la mezcla de reacción de mCPBA durante 20 minutos manteniendo la temperatura constante a 10 °C. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se añadió una disolución de 33 g de $NaHSO_3$ (0,5 moles/mol de mCPBA) en 330 ml de H_2O (10 ml/g de

50

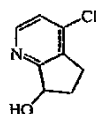
NaHSO₃). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 1 l de H₂O (17 ml/g). Se añadieron 203 g de Na₂CO₃ (5 eq). Se añadió 1 l de H₂O (17 ml/g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se separaron las dos fases. La fase acuosa se extrajo tres veces con 500 ml de DCM. Las fases orgánicas se combinaron y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La fase orgánica se secó con MgSO₄. El MgSO₄ se separó por filtración. El filtrado se redujo a 500 ml. Se añadió una disolución de 65 g de NaHSO₃ (1 mol/mol de mCPBA) en 260 ml de H₂O (4 ml/g de NaHSO₃). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 2 horas. Se separaron las dos fases. La fase acuosa se extrajo dos veces con 200 ml de DCM. Se combinaron las 3 fases orgánicas y se secaron con MgSO₄. El MgSO₄ se separó por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida. Rendimiento: 56,3 g (85 %) (producto gris) de producto intermedio c.

d-1) Preparación del producto intermedio 3



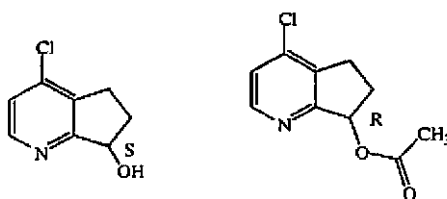
Se añadieron 56 g del producto intermedio c (0,330 moles) a 170 ml de anhídrido acético (Ac₂O) (3 ml/g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C y se mantuvo a 100 °C y se agitó a 100 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se añadió gota a gota durante 20 minutos a 560 ml de H₂O (10 ml/g) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron 90 g de K₂CO₃ (2 eq). La mezcla de reacción se filtró sobre dicálita. Se añadieron 800 ml de DCM (14 ml/g) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separaron las dos fases. La fase orgánica se secó con MgSO₄. El MgSO₄ se separó por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida. Rendimiento: 21,6 g (31 %) (aceite marrón oscuro) de producto intermedio 3.

d) Preparación del producto intermedio 4



Se agitó una mezcla del producto intermedio 3 (0,04 moles) en CH₃OH/NH₃ (90 ml) a temperatura ambiente durante 48 horas. Entonces, la mezcla se concentró. El aceite en bruto se disolvió en DCM y se añadió K₂CO₃. La disolución se filtró sobre Celite. El filtrado se extrajo con DCM. La fase orgánica separada se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. Rendimiento: 6,7 g del producto intermedio 4.

e) Preparación del producto intermedio 7 y producto intermedio 8



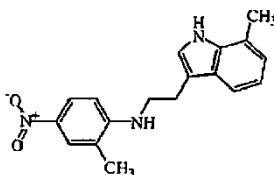
Producto intermedio 7 (S)

Producto intermedio 8 (R)

Se agitó una mezcla del producto intermedio 4 (5 g, 0,029 moles) y lipasa B de *Candida antarctica* (2,5 g) en éster etenílico de ácido acético (50 ml) a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite. El Celite se lavó con DCM. Se evaporó el disolvente del filtrado. El residuo (6,3 g) se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH de 100/0 a 98/2; 15-40 µm). Se recogieron dos fracciones de producto diferentes y se evaporó el disolvente de cada fracción de producto. Rendimiento: 2,1 g del producto intermedio 7 (42 %; enantiómero S), y 3,6 g del producto intermedio 8 (58 %; enantiómero R). Si se desea, el producto intermedio 8 puede convertirse en el enantiómero R del producto intermedio 7 mediante reacción en MeOH/NH₃.

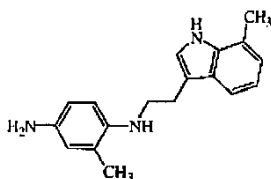
Ejemplo A2

a) Preparación del producto intermedio 5



Se agitó una mezcla de 1-fluoro-2-metil-4-nitro-benceno (0,0103 moles), 7-metil-1H-indol-3-etanamina (0,0103 moles) y DIPEA (9 ml, 0,0515 moles) a 120 °C durante 18 horas. A continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con una pequeña cantidad de DCM/MeOH y se lavó con K₂CO₃ (10 %). La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente a sequedad. El residuo (4,1 g) se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/ciclohexano 70/30; 15-35 µm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. Rendimiento: 1,45 g del producto intermedio 5 (45 %).

b) Preparación del producto intermedio 6

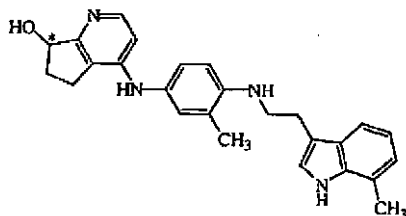


Se hidrogenó una mezcla del producto intermedio 5 (0,0045 moles) y Pt/C 5 % (0,15 g) en tolueno (40 ml) a temperatura ambiente durante 18 horas bajo una presión de 3 bar. Entonces, la mezcla de reacción se filtró. El filtrado se evaporó a sequedad. Rendimiento: 1,25 g del producto intermedio 6 (100 %).

B. Preparación de los compuestos finales

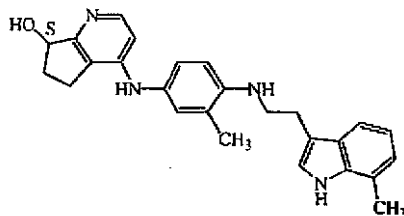
Ejemplo B1

Preparación de los compuestos 1 y 2



Compuesto 1 (enantiómero A; S) (centro quiral indicado por *)
Compuesto 2 (enantiómero B; R)

Se agitó una mezcla del producto intermedio 6 (0,0039 moles), producto intermedio 4 (0,0042 moles) y HCl/2-propanol (3 gotas) en CH₃CN (20 ml) durante la noche a 65 °C. A continuación se añadió K₂CO₃ (10 %). La mezcla se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. El residuo (1,8 g) se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 92/8/0,5; 15-40 µm). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (0,55 g) se purificó por cromatografía en columna sobre Chiralpack AD (eluyente: EtOH/MeOH/2-propanol 50/50/0,3). Se recogieron dos fracciones y se evaporó el disolvente, dando 0,24 g de la fracción 1 y 0,26 g de la fracción 2. La fracción 1 se cristalizó en éter dietílico. El precipitado se separó por filtración y se secó. Rendimiento: 0,17 g del compuesto 1 (enantiómero A; enantiómero S) (11 %). La fracción 2 se cristalizó en éter dietílico. El precipitado se separó por filtración y se secó. Rendimiento: 0,12 g del compuesto 2 (enantiómero B; enantiómero R) (8 %).

Ejemplo B2Preparación de los compuestos 1 y 3

Compuesto 1 (enantiómero S)
Compuesto 3 (enantiómero S; sal de HCl)

5

El compuesto 1 también puede obtenerse siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo B2. Se agitó una disolución del producto intermedio 6 (11,3 g, 0,04 moles), producto intermedio 7 (7,5 g, 0,044 moles) y HCl (4 M en dioxano) en CH₃CN/EtOH (150 ml) durante el fin de semana a 65 °C. A continuación se añadieron K₂CO₃ (10 %) y EtOAc y la mezcla resultante se extrajo con EtOAc. La fase orgánica separada se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el disolvente. El residuo (23 g) se purificó por cromatografía en columna (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 92/7/1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente. El residuo (14,2 g, 85 %) se cristalizó en CH₃CN. El precipitado se separó por filtración y se secó. Rendimiento: 10,4 g del compuesto 1 (63 %). Parte de este producto (1,3 g) se disolvió en MeOH. Se añadió gota a gota HCl en 2-propanol (5 N; 2 equivalentes, 2,6 ml) a 5 °C. La mezcla se agitó a 5 °C durante la noche. A continuación se añadió CH₃CN y el producto se cristalizó en esta mezcla (MeOH/CH₃CN) (la disolución se raspó hasta que apareció un precipitado). El precipitado se separó por filtración y se secó. Rendimiento: 1,3 g del compuesto 3 (punto de fusión: 180 °C).

Identificación de compuestos

20

CL-EM

Para la caracterización por CL-EM de los compuestos de la presente invención se usó el siguiente procedimiento.

Procedimiento general A

Se realizó la medición de HPLC usando un sistema Alliance HT 2795 (Waters) que comprende una bomba cuaternaria con desgasificador, un inyector automático, un detector de matriz de diodos (DAD) y una columna como se especifica en los métodos respectivos más adelante. El flujo de la columna se dividió en un detector de EM. El detector de EM se configuró con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja capilar fue 3 kV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 100 °C sobre el LCT (espectrómetro de masas por pulverización Z con tiempo de vuelo). Se usó nitrógeno como gas nebulizador. La adquisición de datos se realizó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Procedimiento general B

Se realizó la medición de LC usando un sistema de UPLC (cromatografía de líquidos de ultra-resolución) Acquity (Waters) que comprende una bomba binaria con desgasificador, un inyector automático, un detector de matriz de diodos (DAD) y una columna como se especifica en los métodos respectivos más adelante. El flujo de la columna se llevó a un detector de EM. El detector de EM se configuró con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja capilar fue 3 kV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 130 °C sobre Quattro (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo de Waters). Se usó nitrógeno como gas nebulizador. La adquisición de datos se realizó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Procedimiento 1 de CL-EM

Además del procedimiento general A: se llevó a cabo HPLC de fase inversa sobre una columna Xterra-MS C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm) con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min a una temperatura de 30 °C. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: 100 % de acetato de amonio 7 mM; fase móvil B: 100 % de acetonitrilo) para ejecutar una condición en gradiente del 85 % de A, 15 % de B (mantenida durante 3 minutos) a 20 % de A, 80 % de B en 5 minutos, mantenida a 20 % de A y 80 % de B durante 6 minutos y reequilibrada con condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 20 µl. El voltaje del cono fue 20 V para el modo de ionización positiva y 20 V para el modo de ionización negativa. Se adquirieron espectros de masas barriendo de 100 a 900 en 0,8 segundos usando un retardo entre barridos de 0,08 segundos.

Procedimiento 2 de CL-EM

Además del procedimiento general B: se llevó a cabo UPLC de fase inversa sobre una columna C18 Waters Acquity BEH (híbrido de etilsiloxano/sílice unido por puentes) (1,7 μm , 2,1 x 100 mm) con una velocidad de flujo de 0,35 ml/min a una temperatura de 40 °C. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: 100 % de acetato de amonio 7 mM; fase móvil B: 100 % de acetonitrilo) para ejecutar una condición en gradiente del 75 % de A y 25 % de B (mantenida durante 0,5 minutos) a 8 % de A y 92 % de B en 3,5 minutos, mantenida durante 2 minutos y reequilibrada con condiciones iniciales durante 2 minutos. Se usó un volumen de inyección de 2 μl . El voltaje del cono fue 20 V para el modo de ionización positiva y negativa. Se adquirieron espectros de masas barriendo de 100 a 1000 en 0,2 segundos usando un retardo entre barridos de 0,1 segundos.

Procedimiento 3 de CL-EM

Además del procedimiento general B: se llevó a cabo UPLC de fase inversa sobre una columna C18 Waters Acquity BEH (híbrido de etilsiloxano/sílice unido por puentes) (1,7 μm , 2,1 x 100 mm) con una velocidad de flujo de 0,35 ml/min a una temperatura de 40 °C. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: 95 % de acetato de amonio 7 mM / 5 % de acetonitrilo; fase móvil B: 100 % de acetonitrilo) para ejecutar una condición en gradiente del 90 % de A y 10 % de B (mantenida durante 0,5 minutos) a 8 % de A y 92 % de B en 3,5 minutos, mantenida durante 2 min y de nuevo a las condiciones iniciales en 0,5 min, mantenida durante 1,5 minutos. Se usó un volumen de inyección de 2 μl . El voltaje del cono fue 20 V para el modo de ionización positiva y negativa. Se adquirieron espectros de masas barriendo de 100 a 1000 en 0,2 segundos usando un retardo entre barridos de 0,1 segundos.

HPLC en fase quiral

Se realizó medición de HPLC en fase quiral usando el sistema de HPLC de Waters que comprende dos bombas de alta presión (5115), una válvula de inyección Rheodyne, un detector de una sola longitud de onda (2487) y una columna.

Se llevó a cabo análisis de HPLC en fase quiral sobre una columna Chiralpak-AD (10 μm , 4,6 x 250 mm) con una velocidad de flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente. La fase móvil está compuesta por etanol/metanol 50/50 a la que se añadió 0,3 % de isopropilamina. El análisis se realizó usando condiciones isocráticas hasta la elución completa. La detección se monitorizó a 254 nm (detector de UV).

Comp. n°	CL-EM			Análisis de HPLC en fase quiral (e.e.)
	R_t	(MH) ⁺	Procedimiento	
1 (B1)	8,77	413	1	100 %
2	8,77	413	1	100 %
1 (B2)	3,17	413	2	99,7 %
3	3,49	413	3	99,2 %

En la tabla anterior, 'e.e.' significa 'exceso enantiomérico' y los tiempos de retención (R_t) se informan en minutos.

El Comp. n° 1 (B1) muestra los datos analíticos que se midieron cuando el compuesto 1 se preparó según el método descrito en el Ejemplo B1. El Comp. n° 1 (B2) muestra los datos analíticos que se midieron cuando el compuesto 1 se preparó según el método descrito en el Ejemplo B2.

Rotación óptica

La rotación óptica se midió usando un polarímetro. $[\alpha]_D^{20}$ indica la rotación óptica medida con luz a la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) a una temperatura de 20 °C. La longitud de paso de la celda es 1 dm. Además del valor actual se mencionan la concentración y disolvente de la disolución que se usó para medir la rotación óptica.

Comp. n°	$[\alpha]_D^{20}$	concentración	disolvente
1 (B1)	-44,44°	C = 10,17 mg/2 ml (0,5085 % en peso/volumen)	DMF
2	+ 41,88°	C = 10,65 mg/2 ml (0,5325 % en peso/volumen)	DMF
1 (B2)	- 47,41°	C = 5,40 mg/2 ml (0,2700 % en peso/volumen)	DMF
3	+ 10,14°	C = 9,27 mg/2 ml (0,4635 % en peso/volumen)	MeOH

El Comp. n° 1 (B1) muestra el resultado para la rotación óptica cuando el compuesto 1 se preparó según el método descrito en el Ejemplo B 1. El Comp. n° 1 (B2) muestra el resultado para la rotación óptica que se midió cuando el compuesto 1 se preparó según el método descrito en el Ejemplo B2.

C. Ejemplo farmacológico:

Se midió la capacidad de los compuestos para preservar p53 en células A2780 con el ensayo de inmunoenzimático de adsorción de p53. El ensayo de p53 es un ensayo de inmunoenzimático tipo "sándwich" que emplea dos anticuerpos policlonales. Un anticuerpo policlonal, específico para la proteína p53, se ha inmovilizado sobre la superficie de los pocillos de plástico. Cualquier p53 presente en la muestra que va a ensayarse se unirá al anticuerpo de captura. El anticuerpo policlonal detector biotinilado también reconoce la proteína p53, y se unirá a cualquier p53, que se ha retenido por el anticuerpo de captura. El anticuerpo detector, a su vez, está unido por estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. La peroxidasa de rábano picante cataliza la conversión del sustrato cromogénico o-fenilendiamina, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteína p53 unida a la placa. El producto de reacción coloreado se cuantifica usando un espectrofotómetro. La cuantificación se logra por la construcción de una curva patrón usando concentraciones conocidas de proteína p53 marcada con HIS recombinante purificada (véase el Ejemplo C.1.).

C.1. ELISA de p53

Se cultivaron células 2780 (ATCC) en RPMI 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF), L-glutamina 2 mM y gentamicina a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂.

Se sembraron células A2780 a 20.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, se cultivaron durante 24 horas y se trataron con compuesto durante 16 horas a 37 °C en una estufa de incubación humidificada. Después de la incubación, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato y se añadieron 30 µl, por pocillo, de tampón RIPA bajo en sales (Tris 20 mM, pH 7,0, EDTA 0,5 mM, 1 % de Nonidet P40, 0,5 % de DOC, 0,05 % de SDS, PMSF 1 mM, 1 µg/ml de aprotinina y 0,5 µg/ml de leupeptina). Las placas se colocaron sobre hielo durante 30 minutos para completar la lisis. Se detectó proteína p53 en los lisados usando el ELISA tipo sándwich, descrito más adelante.

Se recubrieron placas de 96 pocillos de EIA/RIA de poliestireno de alta unión (Costar 9018) con el anticuerpo de captura pAb1801 (Abcam ab28-100) a una concentración de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 0,1 M a pH 8,2), 50 µl por pocillo. Se dejó que el anticuerpo se adhiriera durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas recubiertas una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) / 0,05 % de Tween 20 y se añadieron 300 µl de tampón de bloqueo (PBS, 1 % de albúmina de suero bovino (BSA)), durante un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Se hicieron diluciones de proteína p53 marcada con HIS recombinante purificada, que oscila de 3-200 ng/ml, en tampón de bloqueo y se usaron como patrones.

Las placas se lavaron dos veces con PBS / 0,05 % de Tween 20 y se añadieron tampón de bloqueo o patrones a 80 µl / pocillo. A los patrones se añadieron 20 µl de tampón de lisis. Las muestras se añadieron a los otros pocillos a 20 µl de lisado / pocillo. Después de una incubación durante la noche a 4 °C, las placas se lavaron dos veces con PBS / 0,05 % de Tween 20. Se añadieron alícuotas de 100 µl de anticuerpo policlonal secundario p53 (FL-393) (Tebubio, sc-6243) a una concentración de 1 µg/ml en tampón de bloqueo a cada pocillo y se dejó que se adhirieran durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS / 0,05 % de Tween 20. Se añadió anticuerpo de detección anti-HRP de conejo (sc-2004, Tebubio) a 0,04 µg/ml en PBS / 1 % de BSA y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS / 0,05 % de Tween 20 y se añadieron 100 µl de tampón de sustrato (el tampón de sustrato se preparó poco antes de uso añadiendo 1 comprimido de 10 mg de o-fenilendiamina (OPD) de Sigma y 125 µl de 3 % de H₂O₂ a 25 ml de tampón OPD: ácido cítrico 35 mM, Na₂HPO₄ 66 mM, pH 5,6). Después de 5 a 10 minutos, se detuvo la reacción de color añadiendo 50 µl de tampón de parada (H₂SO₄ 1 M) por pocillo. La absorbancia a longitudes de onda duales de 490/655 nm se midió usando un lector de microplacas Biorad y a continuación se analizaron los resultados.

Para cada experimento se ejecutaron controles (que no contienen fármaco) y una incubación del blanco (que no contiene células o fármacos) en paralelo. El valor del blanco se restó de todos los valores de control y de muestra. Para cada muestra, el valor de p53 (en unidades de absorbancia) se expresó como el porcentaje del valor para p53 presente en el control. El porcentaje de preservación superior al 140 % se definió como significativo. En el presente documento, los efectos de compuestos de prueba se expresan como la menor dosis que da al menos el 140 % del valor para p53 presente en el control (LAD) (véase la Tabla F-2 bajo el Ejemplo C.4.). También se probó el compuesto nº 3 y mostró una LAD de 1,00E-07.

En algunos de los experimentos el ensayo se adaptó para y se usó en placas de cultivo de 384 pocillos.

C.2. Ensayo de P450

Las proteínas CYP P450 (expresadas en *E. coli*) (3A4, 2D6, 2C9, 1A2 y 2C19) convierten sus sustratos específicos en una molécula fluorescente^{1,2}. La molécula fluorescente se mide usando un lector de placas fluorescente. Los compuestos que inhiben la reacción enzimática producirán una disminución de la señal fluorescente (véase el Ejemplo C.2.).

Conversiones mediadas por las isoenzimas de citocromo P450 expresadas por el ADNc respectivo.

Sustrato	enzima	molécula fluorescente
CEC	CYP1A2	CHC
MFC	CYP2C9	7-HFC
CEC	CYP2C19	CHC
AMMC	CYP2D6	AHMC
BFC	CYP3A4	7-HFC
DBF	CYP3A4	Fluoresceína
7-BQ	CYP3A4	Quinolinol

5 Abreviaturas:

CEC: 7-etoxi-3-cianocumarina; CHC: 3-ciano-7-hidroxycumarina,
MFC: 7-Metoxi-4-trifluorometil cumarina; 7-HFC: 7-Hidroxi-trifluorometilcumarina,
CEC: 7-etoxi-3-cianocumarina; CHC: 3-ciano-7-hidroxycumarina,
10 AMMC: 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil]-7-metoxi-4-metilcumarina;
AHMC: clorhidrato de 3-[2-(N,N-dietilamino)etil]-7-hidroxi-4-metilcumarina,
BFC: 7-Benciloxi-trifluorometilcumarina;
DBF: Dibencilfluoresceína, 7-BQ: Benciloxiquinolona.

15 Mezcla de cofactores: (para todas las enzimas CYP excepto para CYP 2D6)

	disolución de trabajo		concentración final
G-6-P	8,25 mM	25,10 mg	3,3 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14,29 µl	0,4 U/ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,5 M	8,25 mM	165,0 µl	3,3 mM
NADP	3,25 mM	25,59 mg	1,3 mM
disolver en un tampón fosfato de Na-K 0,1 M		10 ml	

Abreviaturas: G-6-P: glucosa-6-fosfato; G-6-P-DH: glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

20 Mezcla de cofactores: (para CYP2D6)

	disolución de trabajo		concentración final
G-6-P	1,025 mM	3,12 mg	0,41 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14,29 µl	0,4 U/ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,5 M	1,025 mM	20,5 µl	0,41 mM
NADP	20,5 µM	0,161 mg	8,2 µM
disolver en un tampón fosfato de Na-K 0,1 M		10 ml	

Disoluciones de enzimas CYP P450:

<u>CYP1A2:</u>	(CEC)	concentración final 5 pmoles de P450/ml
<u>CYP2C9:</u>	(MFC)	concentración final 60 pmoles de P450/ml
<u>CYP2C19:</u>	(CEC)	concentración final 2,5 pmoles de P450/ml
<u>CYP2D6:</u>	(AMMC)	concentración final 42 pmoles de P450/ml
<u>CYP3A4:</u>	(BFC)	concentración final 83 pmoles de P450/ml
	(DBF)	concentración final 5 pmoles de P450/ml
	(7-BQ)	concentración final 20 pmoles de P450/ml

25 Todas estas enzimas CYP se disolvieron en tampón fosfato de Na-K 0,01 M + 1,15 % de KCl, y se mantuvieron sobre hielo hasta uso. Las enzimas CYP P450 se almacenaron a -80 °C.

Dilución de compuestos y de inhibidores de referencia

30 Los compuestos e inhibidores de referencia se suministraron al departamento como una disolución 5 mM en DMSO. Se preparó una disolución de trabajo de $5 \cdot 10^{-4}$ M por dilución sucesiva usando acetonitrilo. La concentración de

compuesto final fue 10^{-5} M para el cribado primario, y la concentración de disolvente final del 2 %. Después de un cribado primario a una concentración de 10^{-5} M, los valores de CI_{50} de los potentes inhibidores seleccionados se probaron en un intervalo de concentración de $3 \cdot 10^{-9}$ - 10^{-5} M. En el cribado primario, todos los compuestos se probaron por triplicado.

5

Se probaron inhibidores de referencia a un intervalo de concentración de 10^{-9} - 10^{-4} M.

Inhibidores de referencia:

Furafilina:	(Ultra Fine Chemicals)	para CYP1A2
Sulfafenazol:	interno	para CYP2C9
Tranilcipromina:	interno	para CYP2C19
Quinidina:	interno	para CYP2D6
Ketoconazol:	interno	para CYP3A4

10

Disoluciones de sustrato:

CEC	(sustrato de CYP1A2)	6,25 µl de disolución de CEC 20 mM/5 ml de volumen total	5 µM
MFC	(sustrato de CYP2C9)	200 µl de disolución de MFC 25 mM/5 ml de volumen total	200 µM
CEC	(sustrato de CYP2C19)	31,25 µl de disolución de CEC 20 mM/5 ml de volumen total	25 µM
AMMC	(sustrato de CYP2D6)	150 µl de disolución de AMMC 0,5 mM/5 ml de volumen total	3 µM
BFC	(sustrato de CYP3A4)	750 µl de disolución de BFC 5 mM/5 ml de volumen total	150 µM
DBF	(sustrato de CYP3A4)	12,5 µl de disolución de DBF 2 mM/5 ml de volumen total	1 µM
7-BQ	(sustrato de CYP3A4)	60 µl de disolución de 7-BQ 25 mM/5 ml de volumen total	60 µM

15

Se disolvieron las disoluciones madre de sustrato en acetonitrilo, y se guardaron a -20 °C. La disolución de trabajo final se disolvió en tampón fosfato de Na-K 0,1 M a pH 7,4, y esta disolución siempre se preparó nueva antes de empezar el ensayo.

Análisis de datos

20

Se realizaron semi-automáticamente la preparación de placas, enlace de datos, análisis de datos, validación y aprobación de resultados y actualización de datos por el software Lexis-Laplace (Laplace-DLM-RVAM).

Las fórmulas usadas en los cálculos son:

25

% de actividad = $(100/(\text{control positivo promedio} - \text{control negativo promedio})) \times (\text{muestra promedio} - \text{control negativo promedio})$.

% de inhibición = $100 - \%$ de actividad

30

Cuando se calcula, el valor de CI_{50} se generó automáticamente por extrapolación gráfica en RVAM, basándose en la intersección con el 50 % del eje de control.

Método

35

El ensayo se realizó en una placa Costar de 96 pocillos negra. Por pocillo, el ensayo comprende: 40 µl de disolución de enzima CYP P450 (en las muestras de control negativo se añadieron 40 µl de tampón fosfato de Na-K 0,1 M a pH 7,4 sin enzima); 40 µl de mezcla de cofactores; 2 µl de compuesto o inhibidor de referencia para las muestras de control negativo o disolvente para las muestras de control positivo. Después de 5 min de preincubación a 37 °C en una estufa de incubación con agitación, se añadieron 20 µl de disolución de sustrato. Las placas se incubaron a 37 °C durante 10 min (CYP3A4/DBF), 15 min (CYP1A2), 30 min (CYP2C9, CYP3A4/BFC y CYP3A4/7-BQ y CYP2C19) y 45 min (CYP2D6). La reacción se detuvo mediante la adición de 200 µl de acetonitrilo. Para CYP3A4/DBF, la reacción se detuvo mediante la adición de 200 µl de NaOH 2M. Para CYP3A4/7-BQ, la reacción se detuvo mediante la adición de 40 µl de Tris/ acetonitrilo (1:5) (V:V), seguido de una centrifugación de 10 minutos a 2000 rpm. La señal fluorescente se detectó por un lector fluorescente Victor2 (Wallac) o Fluoroskan (Labsystems).

45

La longitud de onda de excitación y de emisión para las diferentes enzimas y su sustrato específico se mencionan en la Tabla 1, los resultados obtenidos con el compuesto nº 1 y el compuesto nº 2 pueden encontrarse en la Tabla F-2 bajo el Ejemplo C.4.

Tabla 1: Longitudes de onda de excitación y emisión

Enzima	Sustrato	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
CYP1A2	CEC	410 nm	460 nm
CYP3A4	BFC	405 nm	535 nm
CYP3A4	DBF	485 nm	538 nm
CYP3A4	7-BQ	405 nm	535 nm
CYP2C9	MFC	405 nm	535 nm
CYP2C19	CEC	410 nm	460 nm
CYP2D6	AMMC	390 nm	460 nm

Referencias

[1] Microtiter Plate Assays for Inhibition of Human, Drug-Metabolizing Cytochromes P450
Charles L. Crespi, Vaughn P. Miller, Bruce W. Penman (Gentest)
Analytical Biochemistry 248, 188-190 (1997) Article nº AB972145

[2] Novel High Throughput fluorescent P450 assays
V.P. Miller, J. Ackermann, D.M. Stresser, C.L. Crespi
Sitio de internet de Gentest.

C.3. Antagonismo de Ro-4-1284 en ratones^{3,4,5}

La prueba es una modificación de un procedimiento descrito por Colpaert y col. (1975)³. Ratones NMRI macho (22 ± 3 g) se alojaron en jaulas de observación de Macrolon (L x W x H: 11 x 12 x 17 cm; n = 3 por jaula). Al inicio de los experimentos inmediatamente antes de la administración del compuesto de prueba, se midió la temperatura corporal inicial de los ratones con una precisión de 0,1 °C insertando la sonda termosensible (1,0 mm de diámetro) de un termómetro eléctrico (Comark) a una profundidad constante de 3 cm en el esófago hasta que se obtuvo una lectura estable. Se midió el diámetro de la pupila del ojo derecho con un microscopio graduado y se expresó en unidades de 1/24 mm. Quince min después de la administración del compuesto de prueba, los ratones se expusieron a Ro-4-1284 (10 mg/kg, s.c.). Ro-4-1284 es un inhibidor del transporte de monoamina vesicular similar a reserpina (VMAT-2), que empobrece rápidamente las vesículas secretoras.^{3,4} Quince, 30 y 60 min después de la exposición, los ratones se puntuaron para la abertura palpebral (0, 1, 2, 3, 4, 5) y actividad locomotora (-1, 0, 1, 2, 3). En el intervalo de 60 min, inmediatamente después de la puntuación del comportamiento abierto, se midieron de nuevo el diámetro de la pupila del ojo derecho y la temperatura esofágica. Se anotaron fenómenos anormales tales como olfateo intensivo, masticado, posturas erguidas, hiperemia, piloerección, salivación, temblores, convulsiones y muerte (los últimos fenómenos también se anotaron cuando se produjeron antes de la administración de Ro-4-1284). Criterios para los efectos inducidos por fármacos: inversión de la ptosis: puntuación de la abertura palpebral > 1 a 15, 30 o 60 min (2,7, 0,5 y 0 % de controles positivos falsos, respectivamente; n > 350); inducción de la postración: puntuación - 1 para la locomoción a 15, 30 o 60 min (nunca se observó en controles); inversión de la hipomotilidad: puntuación > 0 para locomoción a 15, 30 y 60 min (2,2, 0,8 y 0 % de controles positivos falsos, respectivamente); inversión de la miosis: diámetro de la pupila > 5 unidades a 60 min (0,8 % de positivos falsos); potenciación de la hipotermia: disminución de la temperatura (durante el intervalo de tiempo de 1 h) > 9,0 °C (1,4 % de positivos falsos); inversión de la hipotermia: disminución de la temperatura < 3,0 °C (1,8 % de positivos falsos).

Según el procedimiento convencional, Ro-4-1284 se inyecta 15 min tras la administración subcutánea o por vía oral y las observaciones empiezan 15 min después. Las dosis se administran inicialmente a 3 animales. Si al menos 2 de los 3 animales muestran actividad durante al menos una de las observaciones, el compuesto se considera activo. En otros casos, el compuesto se considera inactivo en el régimen de tiempo-vía-dosis particular y se clasifica como terminado.

El compuesto nº 1 y el compuesto nº 2 se probaron cada uno en 3 animales a una concentración de 80 mg/kg tras la administración por vía oral y no mostraron actividad en ninguna observación en ningún animal.

Referencias

[3] Colpaert, F.C., Lenaerts, F.M., Niemegeers, C.J.E., Janssen, P.A.J.: "A critical study on Ro-4-1284 antagonism in mice", Arch. Int. Pharmacodyn. 215 40-90 (1975).

[4] Colzi, A., D'Agostini, R., Cesura, A.M., Borroni, E., Da Prada, M.: "Monoamine oxidase-A inhibitors and dopamine metabolism in rat caudatus: evidence that an increased cytosolic level of dopamine displaces reversible monoamine oxidase-A inhibitors in vivo", J. Pharmacol. Exp. Ther. 265 103-111 (1993).

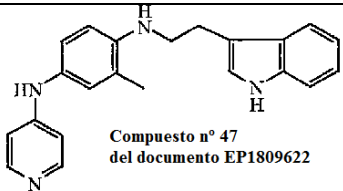
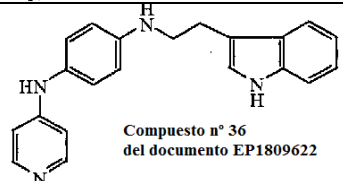
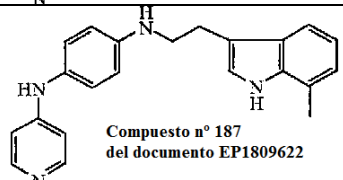
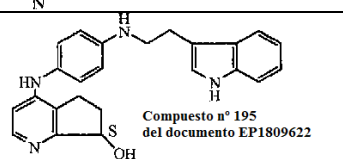
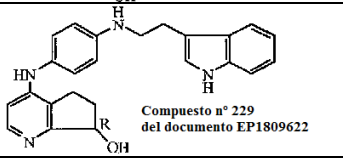
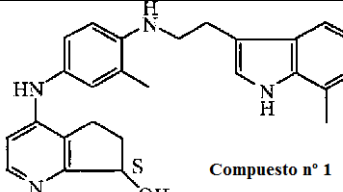
[5] Filinger, E.J.: "Effect of a reserpine-like agent on the release and metabolism of [3H]NA in cell bodies and terminals", Gen. Pharmacol. 25 1039-1043 (1994).

5 C.4. Datos comparativos con compuestos presentes en el documento EP1809622

10 Sorprendentemente, los presentes compuestos muestran excelente actividad *in vitro*, que se combina con menor afinidad por enzimas P450 y efectos neurológicos inducidos por fármacos no *in vivo*. Incluso más sorprendentemente, el enantiómero S de la invención (compuesto nº 1), cuando se probó en ELISA de p53 (véase el Ejemplo C.1.), tiene una actividad mayor que la actividad obtenida con los compuestos estructuralmente más próximos del estado de la técnica, de los cuales el más activo es un enantiómero R (Compuesto nº 229 del documento EP1809622) (véase la Tabla F-2).

15 La Tabla F-2 facilita datos para los compuestos de la presente invención cuando se comparan con compuestos del estado de la técnica. Como se ha descrito anteriormente, se probaron cinco enzimas P450, una de ellas sobre tres sustratos diferentes (así siete pruebas en total). En la tabla se indican en cuántas pruebas de P450 un compuesto mostró una actividad inhibidora con una $CI_{50} < 1,00E-06$.

Tabla F-2: Datos comparativos

Compuesto	LAD de ELISA de p53 de U87MG	LAD de ELISA de p53 de A2780	Efectos de P450 CI_{50}	Efectos secundarios neurológicos inducidos por el fármaco
 Compuesto nº 47 del documento EP1809622	1,00E-05	3,00E-06	7 veces < 1,00E-06	sí
 Compuesto nº 36 del documento EP1809622	3,00E-06	1,00E-06	3 veces < 1,00E-06	sí
 Compuesto nº 187 del documento EP1809622	1,00E-06	3,00E-07	7 veces < 1,00E-06	sí
 Compuesto nº 195 del documento EP1809622	1,00E-06	1,00E-07	0 veces < 1,00E-06	sí
 Compuesto nº 229 del documento EP1809622	1,00E-07	3,00E-07	0 veces < 1,00E-06	sí
 Compuesto nº 1		3,00E-08	0 veces < 1,00E-06	No

Compuesto n° 2		1,00E-07	0 veces < 1,00E-06	No
-----------------------	--	----------	--------------------	----

El ELISA de p53 de U87MG como se describe en el documento EP1809622 ya no se usó para la presente invención, ya que el ELISA de p53 de A2780 mostró mejor sensibilidad.

C.5. Efectos antitumorales *in vivo*

El C. n° 1 mostró una potente inhibición en el crecimiento de los tumores de xenoinjerto de glioblastoma U87 humano inyectados subcutáneamente (s.c.) en ratones sin pelo NMRI. En los tumores de xenoinjerto de glioblastoma U87 preestablecidos (~ 200-300 mm³ de volumen del tumor), la inhibición y regresión completa del crecimiento tumoral se observó después de la administración por vía oral durante 21 días a tanto 10 como 20 mg/kg (Figura 7). La dosis eficaz mínima (según el criterio del NCI) en este modelo fue 5 mg/kg. El compuesto n° 2 también mostró actividad antitumoral *in vivo*.

Referencia del criterio del NCI:

Bissery, M-C. y Chabot, G.G. History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro. Bull. Cancer. 1991, 78: 587-602.

Modelo animal:

Para estos estudios se usaron ratones sin pelo NMRI (Nu/Nu) macho inmunodeficientes (atímicos) (20-25 g obtenidos de Janvier, Francia). El peso inicial fue aproximadamente 23 a 34 g. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones de "barrera completa" SPF con acceso libre a comida y agua. Los ratones se alojaron en grupo bajo un ciclo de 12 h de luz:oscuridad (la luz se enciende a 06:00 h) a una temperatura de 19 a 22 °C y 35 al 40 % de humedad en jaulas IVC tipo-3 de Techniplast. Los ratones se alimentaron con pienso estándar de laboratorio. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las Directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/CEE) y fueron autorizados por el comité de ética local. Para un modelo de xenoinjerto de tumor establecido (volumen de tumor ~ 200 mm³), los ratones se aleatorizaron según volúmenes del tumor, con 10 a 14 ratones por grupo de tratamiento.

Sistema de prueba:

La línea celular de tumor de glioma U87 humano se derivó de una paciente caucásica de 44 años edad. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada (5 % de CO₂, 95 % de aire) en medio DMEM complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 2,0 mM, 25 unidades/ml de penicilina / 25 µg/ml de estreptomicina y 10 % de suero bovino fetal. Las células se mantuvieron como cultivos en monocapa de células, efectuándose pases dos veces a la semana a 3 × 10⁵ células por matraz T175 usando el siguiente procedimiento. Brevemente, las células se lavaron con PBS (sin Mg²⁺, Ca²⁺), antes de la adición de tripsina-EDTA a los matraces de cultivo. Después del desprendimiento de las células, la tripsina-EDTA se inactivó mediante la adición de medio completo. A continuación, la suspensión de células se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó durante 3 min a 1200 rpm. Se aspiró el medio, resuspendiéndose las células en un volumen apropiado de medio completo. Las células se contaron en un hemocitómetro y su viabilidad se evaluó por exclusión con 0,25 % de azul de tripano. A continuación se añadió un volumen apropiado de suspensión de células a tanto un nuevo(s) matraz (matraces) de cultivo T175 como botella rotatoria que contenía medio fresco. Para el crecimiento a gran escala de células tumorales U87, un número apropiado de botellas rotatorias se sembró con 0,5 a 1 × 10⁷ células 1 semana antes de la inoculación de los ratones. El medio se cambió dos veces durante este periodo, siendo el último cambio el día antes de la inyección de las células. Las células se recogieron como se ha descrito anteriormente, con la excepción de que después de la centrifugación, las células se resuspendieron en medio frío (4 °C) sin suero. Los ratones se inyectaron en la región inguinal con 1 × 10⁷ células totales en un volumen de 200 µl.

Diseño del estudio:

Se inyectaron células de glioma U87 humano directamente en la región inguinal de ratones sin pelo NMRI macho (1 × 10⁷ células/200 µl/animal) en el día 0 (D0). En el día 8 (D8), cuando el volumen del tumor había alcanzado un promedio aproximado de 200 mm³, los ratones se aleatorizaron según el volumen del tumor, con 10 a 14 ratones por grupo de tratamiento. A continuación, los ratones se trataron una vez al día (QD) con tanto vehículo (10 % de HP-β-CD) como vehículo que contenía el compuesto n° 1 por sonda nasogástrica (p.o.) administrado en un volumen de 10 ml/kg de peso corporal durante 21 días. Se midieron el tamaño del tumor y los pesos corporales dos veces a la semana, monitorizándose los ratones diariamente para signos clínicos de toxicidad durante la duración del

tratamiento. Los signos clínicos de toxicidad incluyeron (pero no se limitaron a), anorexia o deshidratación persistente, postura, moribundo, letargo, hipotermia y/o respiración fatigosa (según las pautas de UKCCCR para el bienestar de animales en neoplasia experimental (The UKCCCR (UK Coordinating Committee on Cancer Research) guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (Julio de 1997); y Workman, P. y col. UKCCCR guideline. Br. J. Cancer. 1998, 77: 1-10).

Análisis de datos:

Para cada animal individual se monitorizaron el peso corporal y el tamaño del tumor [usando la fórmula comúnmente aceptada: Volumen del tumor (mm^3) = $(a \times b^2/2)$; en la que 'a' representa la longitud y 'b' la anchura del tumor como se ha determinado por mediciones con compás calibrador] dos veces a la semana durante todo el estudio. Una pérdida de peso corporal sostenida superior al 15 % del peso corporal inicial se considera toxicidad clínica, sacándose el animal del estudio y sacrificándose. Se expresó el tiempo-curso del crecimiento tumoral como valores medios, o se normalizó al volumen inicial del tumor en el día en el que el tratamiento empezó y se expresa como media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Para tumores preestablecidos, se calcularon volúmenes del tumor relativos para cada ratón (volumen tratado del tumor/volumen del tumor en el día 0) y se expresó como media $\pm$ EEM para cada grupo de tratamiento. Veinticuatro horas después del último tratamiento, los animales se sacrificaron, los tumores se extirparon y se pesaron. La significancia estadística se indicó por valores de p unilaterales a partir del análisis de Wilcoxon-Mann-Whitney (prueba de Wilcoxon para datos independientes) y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se calcularon las relaciones de tratamiento/control (T/C) basándose en los volúmenes de tumor relativos finales, usando los criterios del NCI. Los resultados se facilitan en la Fig. 7.

D. Preparación de la forma cristalina I y II del compuesto nº 1

Se caracterizaron cuatro lotes del compuesto nº 1 preparados siguiendo el procedimiento bajo el Ejemplo B1 usando las siguientes técnicas fisicoquímicas: espectrometría de infrarrojos (IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X de polvo (XRPD) y se indicó que existen al menos 2 forma polimórficas (véase la Tabla 2).

Tabla 2: Propiedades físicas de lotes del compuesto nº 1

Lote	DSC		IR	XRPD
	Punto de fusión (°C)	Entalpía de fusión ΔH (J/g)		
1	186,5	83	Forma II	Forma II
2	185,6	82	Forma II	Forma II
3	191,9	113	Forma I	Forma I
4	192,1	122	Forma I	Forma I

La forma I se indicó como un sólido no higroscópico cristalino que funde a aproximadamente 192 °C. La forma II se describió como un sólido cristalino con un punto de fusión a aproximadamente 186 °C. Patrones de XRPD típicos, espectros de IR y barridos de DSC para las 2 formas en estado sólido (lote 2 y 4) del C. nº 1 se muestran en las Figuras 1 a 6.

La estabilidad cristalográfica de la forma I del compuesto nº 1 se estudió según el siguiente procedimiento:

después del almacenamiento del compuesto en condiciones abiertas durante un periodo de seis semanas a temperatura ambiente (TA) bajo <5 %, 56 % y 75 % de humedad relativa (HR), 50 °C y 40 °C/75 % de HR, las muestras se analizaron con termogravimetría (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X de polvo (XRPD) y espectroscopía infrarroja (IR).

Los resultados de la prueba se informan en la siguiente tabla. La forma I es cristalográficamente estable.

condición		TGA		XRD	IR	DSC		Aspecto
		< 175 °C	< 225 °C			Máx (°C)	ΔH (J/g)	
Forma I	0 días	0,05	0,19	Crist., Ref	Crist., Ref	192,1	122	marrón-gris
	TA/<5 % de HR	0,00	0,31	-Ref	-Ref	191,7	125	marrón-gris
	TA/56 % de HR	0,15	0,20	-Ref	-Ref	191,8	108	marrón-gris
	TA/75 % de HR	0,14	0,25	-Ref	-Ref	191,7	112	marrón-gris
	50 °C	0,00	0,20	-Ref	-Ref	191,6	122	marrón-gris
	40 °C/75 % de HR	0,06	0,19	-Ref	-Ref	191,7	123	marrón-gris

~Ref: idéntica a la referencia
Crist.: cristalina

La estabilidad química de la forma I del compuesto nº 1 se estudió según el siguiente procedimiento:

la forma I se almacenó en diferentes condiciones abiertas durante periodos de 1, 4 y 8 semanas. Estas condiciones son 40 °C/75 % de HR, 50 °C, TA/<5 % de HR, TA/56 % de HR, TA/75 % de HR y 0,3 da de luz ICH.

- 5 Los compuestos se analizaron después del almacenamiento por HPLC y por inspección visual.

Los resultados de las pruebas se informan en la siguiente tabla. La forma I es químicamente estable en todas las condiciones investigadas.

condición		HPLC Suma de impurezas			Aspecto		
		1 semana	4 semanas	8 semanas	1 semana	4 semanas	8 semanas
Forma I	Referencia	0,23	-	-	marrón-gris	-	-
	0,3 da de luz ICH	0,18	-	-	marrón-gris	-	-
	40 °C/75 % de HR	0,13	0,14	0,20	marrón-gris	marrón-gris	marrón-gris
	50 °C	0,28	0,14	0,24	marrón-gris	marrón-gris	marrón-gris
	TA/<5 % de HR	-	0,19	0,24	-	marrón-gris	marrón-gris
	TA/56 % de HR	-	0,22	0,24	-	marrón-gris	marrón-gris
	TA/75 % de HR	-	0,20	0,18	-	marrón-gris	marrón-gris

10 D.1. Cribado automatizado de polimorfos

Se prepararon disoluciones saturadas/concentradas del compuesto nº 1 (lote 4) a 50 °C en 13 disolventes (agua, metanol, etanol, 2-propanol, acetona, acetonitrilo, tolueno, tetrahidrofurano, diclorometano, 2-butanona, acetato de etilo, dimetilformamida, 1-metoxi-2-propanol). Para garantizar que se logró la saturación, se añadió principio activo a cada sistema de disolventes hasta que el sólido ya no se disolvió. Después de equilibrar las disoluciones durante la noche a 50 °C, se filtró una porción de cada disolución y los filtrados se apartaron para su uso en el cribado automatizado de polimorfos.

Usando un manipulador de líquidos Gilson 215, se prepararon muestras de cribado automatizado de polimorfos en una placa de pocillos que contenía viales de inserto de vidrio de 1,0 ml. Los filtrados de las 13 disoluciones concentradas / saturadas del compuesto nº 1 se dispensaron a 50 °C como una matriz de disolventes de 13 x 13 que consistía en 13 disolventes puros y 78 mezclas binarias de disolventes (50/50 % en v/v). El volumen de disolución total administrado a cada pocillo fue 950 µl. Después de la etapa de dispensación, la placa se selló usando una estera de placa recubierta con teflón y se dejó a temperatura ambiente durante la noche. Se quitó el sellado de la placa y se sustituyó con una estera de placa recubierta con teflón con ranura previa. A continuación se dejó que los disolventes se evaporaran lentamente. Tras la evaporación, la placa se colocó a vacío durante 1 semana. A continuación se analizaron los sólidos por XRD y IR.

De los 91 experimentos realizados para el compuesto nº 1 en el cribado automatizado de polimorfos, solo 26 combinaciones de disolvente produjeron sólidos cristalinos de morfología variable (véase la tabla). El análisis de estos sólidos por XRD y IR mostró que los sólidos estaban en la forma I.

Tabla 3: Morfología de sólidos cristalinos de la forma I

Mezcla de disolventes	Morfología
Agua / metanol	Agujas ultra-finas
Agua / etanol	Agujas ultra-finas
Agua / 2-propanol	Agujas ultra-finas
Agua / acetona	Agujas ultra-finas
Agua / acetonitrilo	Agujas ultra-finas
Agua / THF	Agujas ultra-finas
Agua / diclorometano	Agujas ultra-finas
Agua / 2-butanona	Agujas ultra-finas
Agua / acetato de etilo	Agujas ultra-finas
Agua / 1-metoxi-2-propanol	Agujas ultra-finas
Metanol	Agujas finas
Metanol / etanol	Agujas finas
Metanol / 2-propanol	Agujas finas
Metanol / 1-metoxi-2-propanol	Agujas finas
Etanol	Agujas finas
Etanol / 2-propanol	Agujas finas

Mezcla de disolventes	Morfología
Etanol / acetonitrilo	Agujas finas
2-Propanol	Agujas ultra-finas
Acetona / acetonitrilo	Agujas largas o varillas
Acetona / tolueno	Agujas finas
Acetona / acetato de etilo	Agujas largas
Acetonitrilo	Agujas largas o varillas
Acetonitrilo / 2-butanona	Varillas
2-Butanona	Agujas finas
2-Butanona / acetato de etilo	Agujas finas
Acetato de etilo	Agujas largas o varillas

D.2. Experimento de conversión de suspensión

Se prepararon disoluciones concentradas / saturadas del principio activo del compuesto nº 1 a 50 °C en 13 disolventes diferentes (agua, metanol, etanol, 2-propanol, acetona, acetonitrilo, tolueno, tetrahidrofurano, diclorometano, 2-butanona, acetato de etilo, dimetilformamida, 1-metoxi-2-propanol) para respaldar el cribado automatizado de polimorfos. Después de calentar las disoluciones a 50 °C durante la noche, se observó que estaba presente sólido en exceso en los siguientes disolventes: acetato de etilo, 2-propanol, acetonitrilo, tolueno, agua, etanol y metanol. Se recuperaron los sólidos en suspensión de sus sistemas de disolventes, se secaron bajo una corriente de aire, se pusieron a vacío a temperatura ambiente durante la noche y a continuación se analizaron para la conversión de la suspensión usando XRD.

No se observó conversión de la forma para el principio activo del compuesto nº 1 (forma I) cuando se suspendió en diversos disolventes a temperaturas moderadas (50 °C) durante cortos periodos de tiempo (24 horas).

E. Ejemplo de composición: Comprimidos recubiertos de película

Preparación de núcleo de comprimido

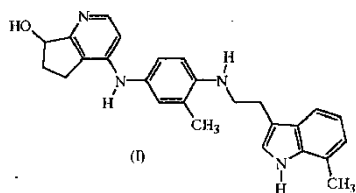
Se mezcla bien una mezcla de 100 g de un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón y después se humidifica con una disolución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinilpirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. La mezcla en polvo húmeda se tamiza, se seca y se tamiza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

Recubrimiento

A una disolución de 10 g de metilcelulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se añade una disolución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. A continuación se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol, se funden 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. La última disolución se añade a la primera y a continuación se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión de color concentrada y se homogeneiza el conjunto. Los núcleos de comprimido se recubren así con la mezcla obtenida en un aparato de recubrimiento.

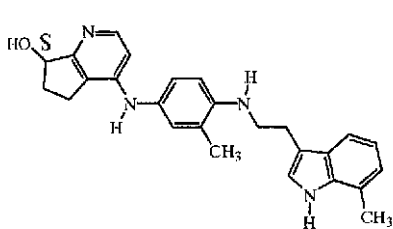
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)

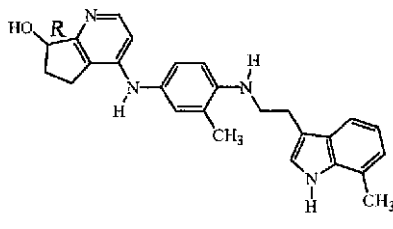


una forma de *N*-óxido, una sal de adición, una forma estereoquímicamente isomérica o un solvato de los mismos, o una forma polimórfica de los mismos.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es el compuesto nº 1 o el compuesto nº 2.

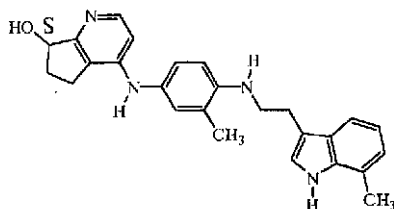


Compuesto nº 1 (enantiómero S)



Compuesto nº 2 (enantiómero R)

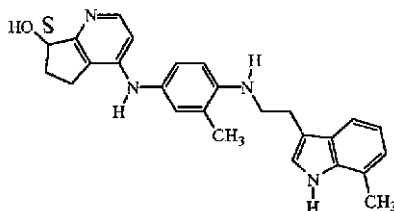
3. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es el compuesto nº 1 o el compuesto nº 3.



Compuesto nº 1 (enantiómero S)

Compuesto nº 3 (enantiómero S; sal de HCl)

4. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es el compuesto nº 1



Compuesto nº 1 (enantiómero S)

5. Una forma cristalina del compuesto nº 1 según la reivindicación 4.

6. La forma cristalina según la reivindicación 5, en la que la forma es esencialmente pura.

7. La forma cristalina según la reivindicación 5 o 6, en la que la forma cristalina tiene uno cualquiera o más de los siguientes:

- un patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD) que comprende picos de difracción en las posiciones dos-theta de $6,4^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $12,8^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $15,2^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$ y $17,3^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$;
- un patrón de XRPD que comprende picos de difracción en las posiciones dos-theta como se representa en la Figura 2;
- un espectro de reflectancia microatenuado de espectrometría de infrarrojos (IR) con bandas de absorción típicas a $3403 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $3150 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1595 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1517 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1320 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1165 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $1071 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $882 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $819 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $781 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ y $733 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$;
- un espectro de IR que comprende picos en las bandas de absorción (cm^{-1}) como se representa en la Figura 1;
- una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un pico endotérmico a aproximadamente $191,9^{\circ}\text{C}$.

8. La forma cristalina según la reivindicación 5 o 6, en la que la forma cristalina tiene uno cualquiera o más de los siguientes:

- un patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD) que comprende picos de difracción en las posiciones dos-theta de $8,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $12,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $18,2^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $21,9^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$ y $27,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$;
- un patrón de XRPD que comprende picos de difracción en las posiciones dos-theta como se representa en la Figura 5;
- un espectro de reflectancia microatenuado de espectrometría de infrarrojos (IR) con bandas de absorción típicas a $3411 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, $3352 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, 1600 , 1508 , 1480 , 1327 , 1171 , 1079 , 810 , 770 y $743 \text{ cm}^{-1} \pm 1 \text{ cm}^{-1}$;
- un espectro de IR que comprende picos en las bandas de absorción (cm^{-1}) como se representa en la Figura 4;
- una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un pico endotérmico a aproximadamente $185,6^{\circ}\text{C}$.

9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como una medicina.

10. Una composición farmacéutica que comprende vehículos farmacéuticamente aceptables y como principio activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

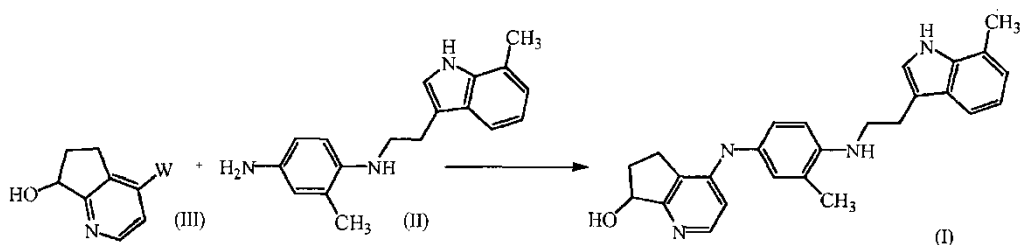
11. Un proceso de preparación de una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en el que los vehículos farmacéuticamente aceptables y un compuesto como reivindica en una cualquiera de la reivindicación 1 a 8 se mezclan íntimamente.

12. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

13. Uso según la reivindicación 12, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico o leucemia mielógena aguda.

14. Una combinación de uno o más agentes antineoplásicos y un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

15. Un proceso para preparar un compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por hacer reaccionar un producto intermedio de fórmula (II) con un producto intermedio de fórmula (III) en la que W es un grupo saliente apropiado, con formación del compuesto de fórmula (I)



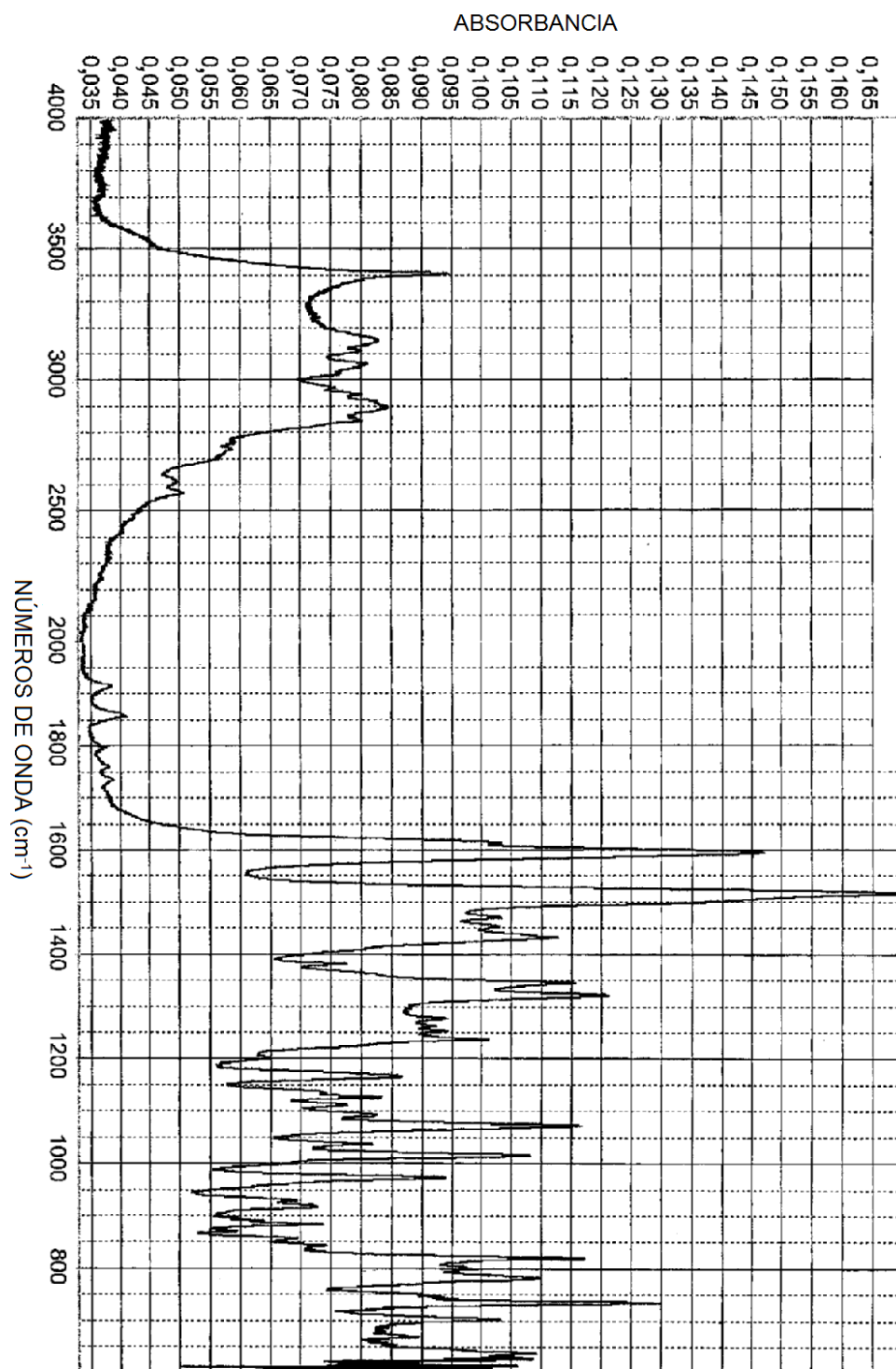


Figura 1: Espectrometría de infrarrojos: Forma I

Figura 2: XRD de polvo: Forma I

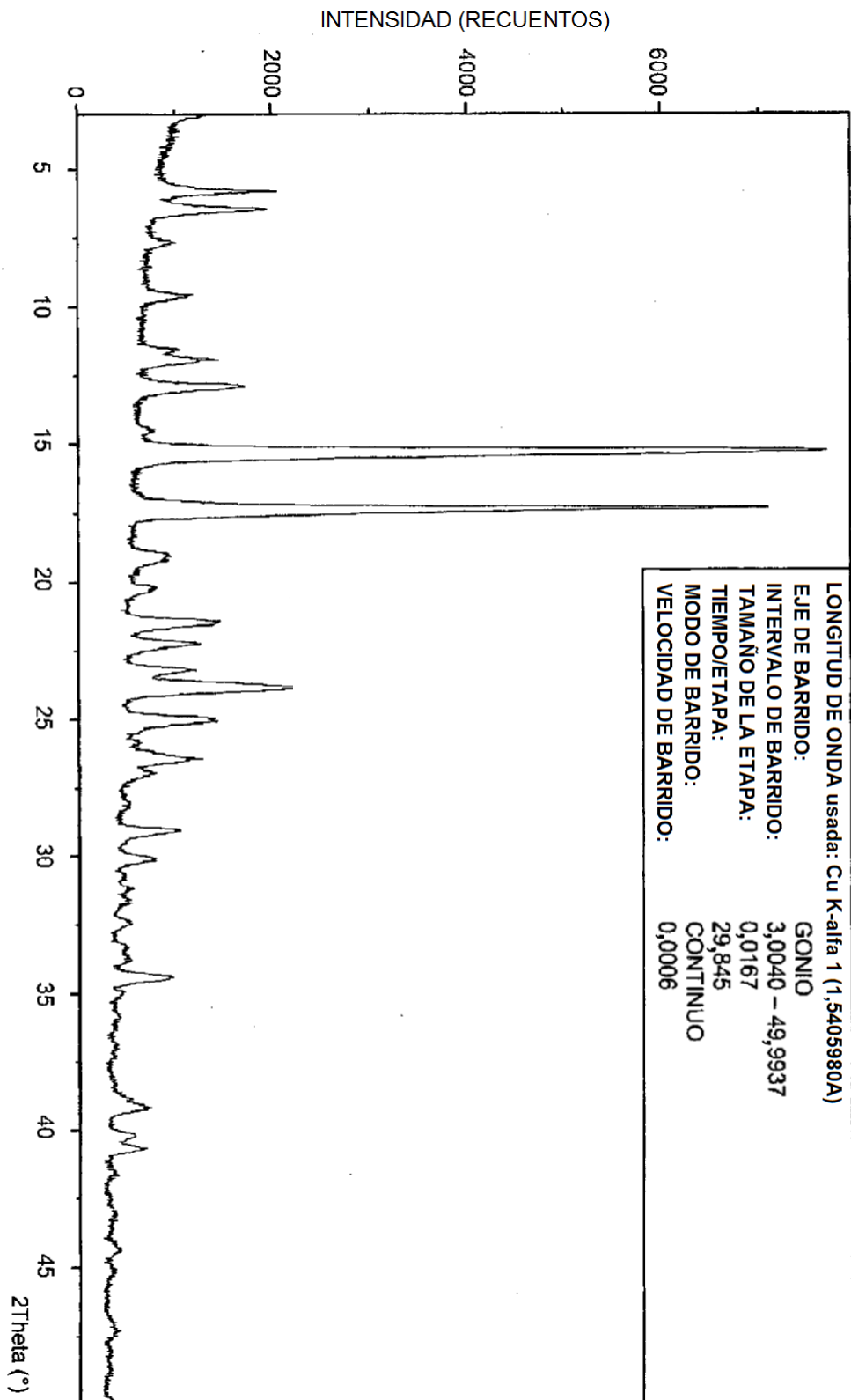


Figura 3: DSC: Forma I

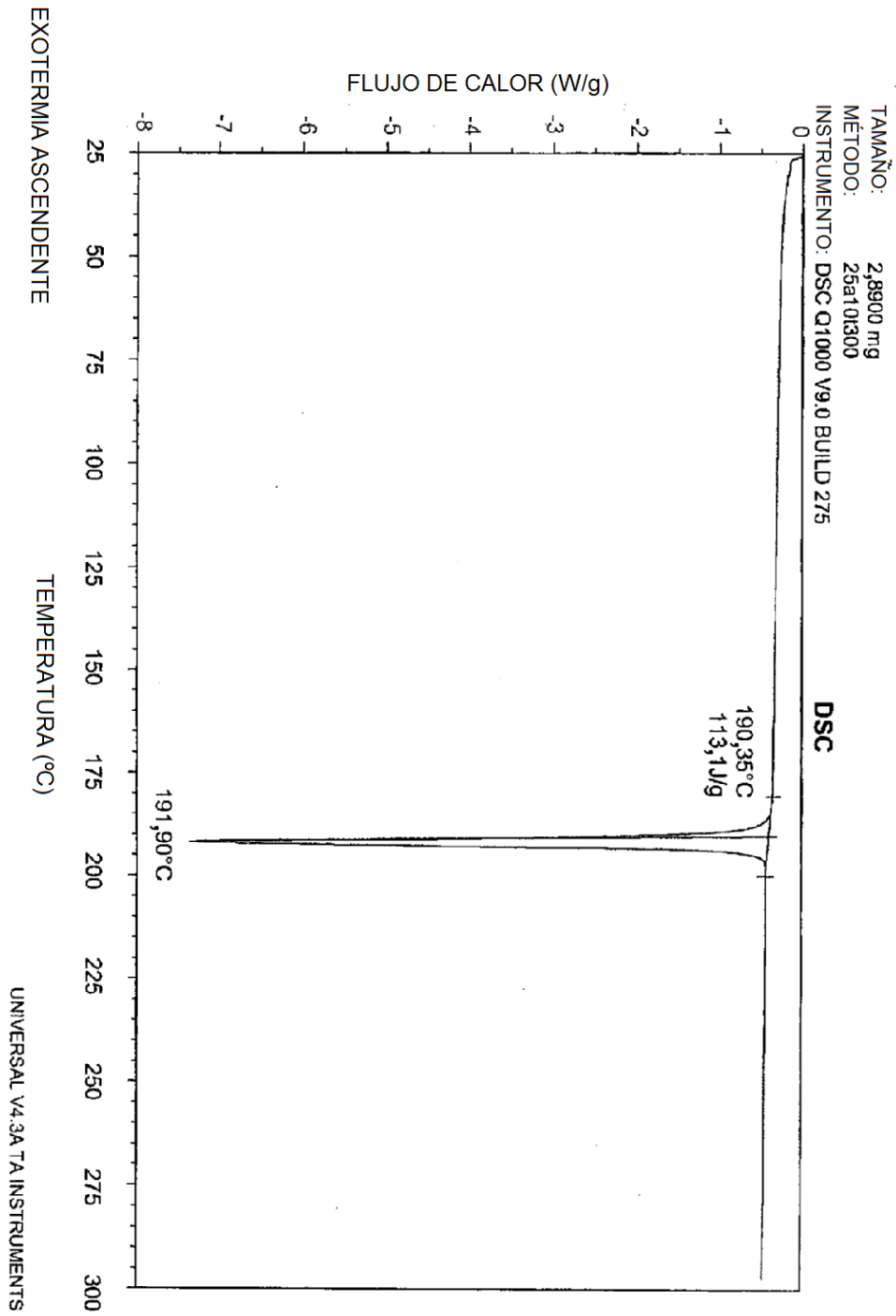


Figura 4: Espectrometría de infrarrojos: Forma II

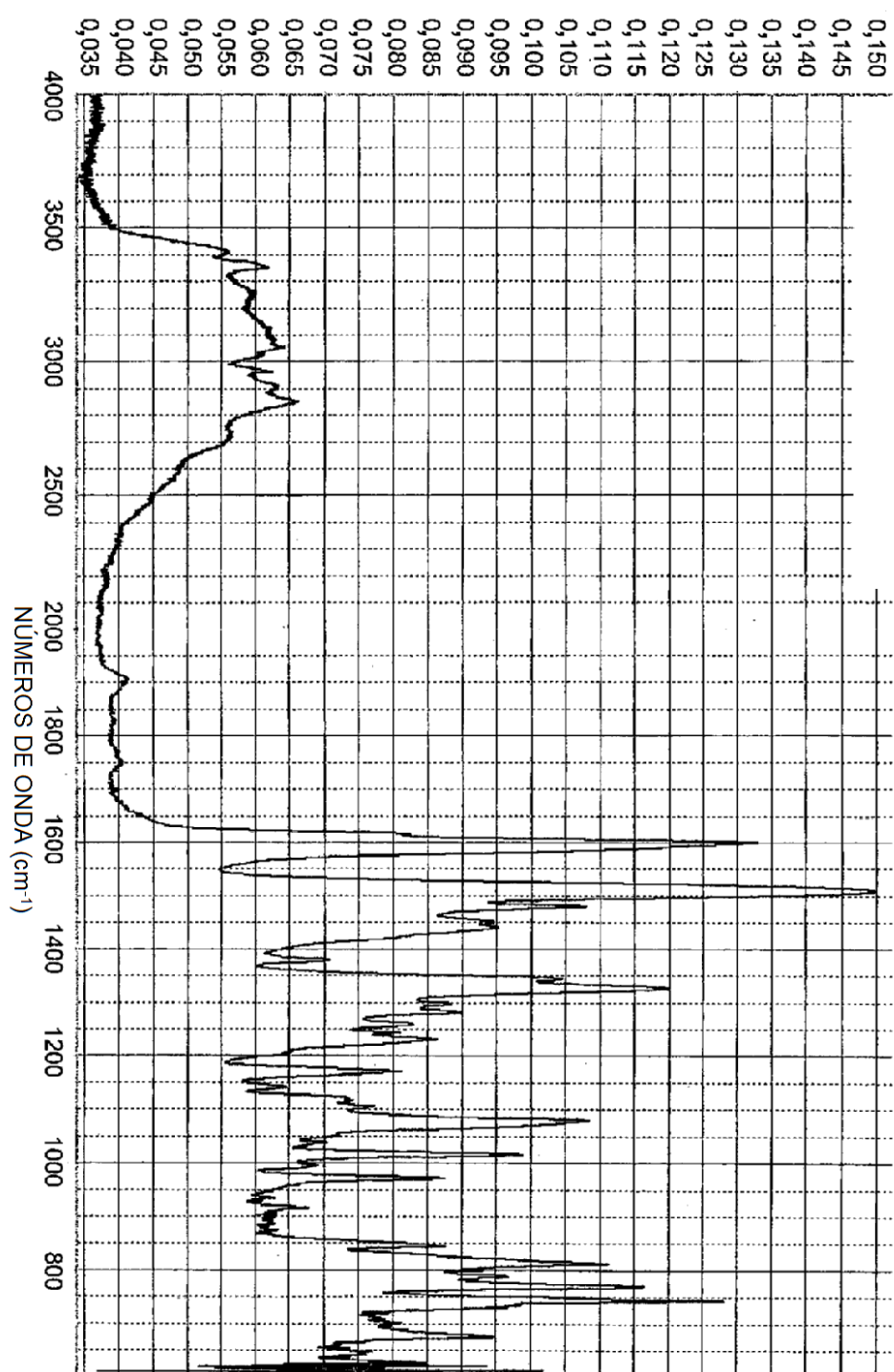


Figura 5: XRD de polvo: Forma II

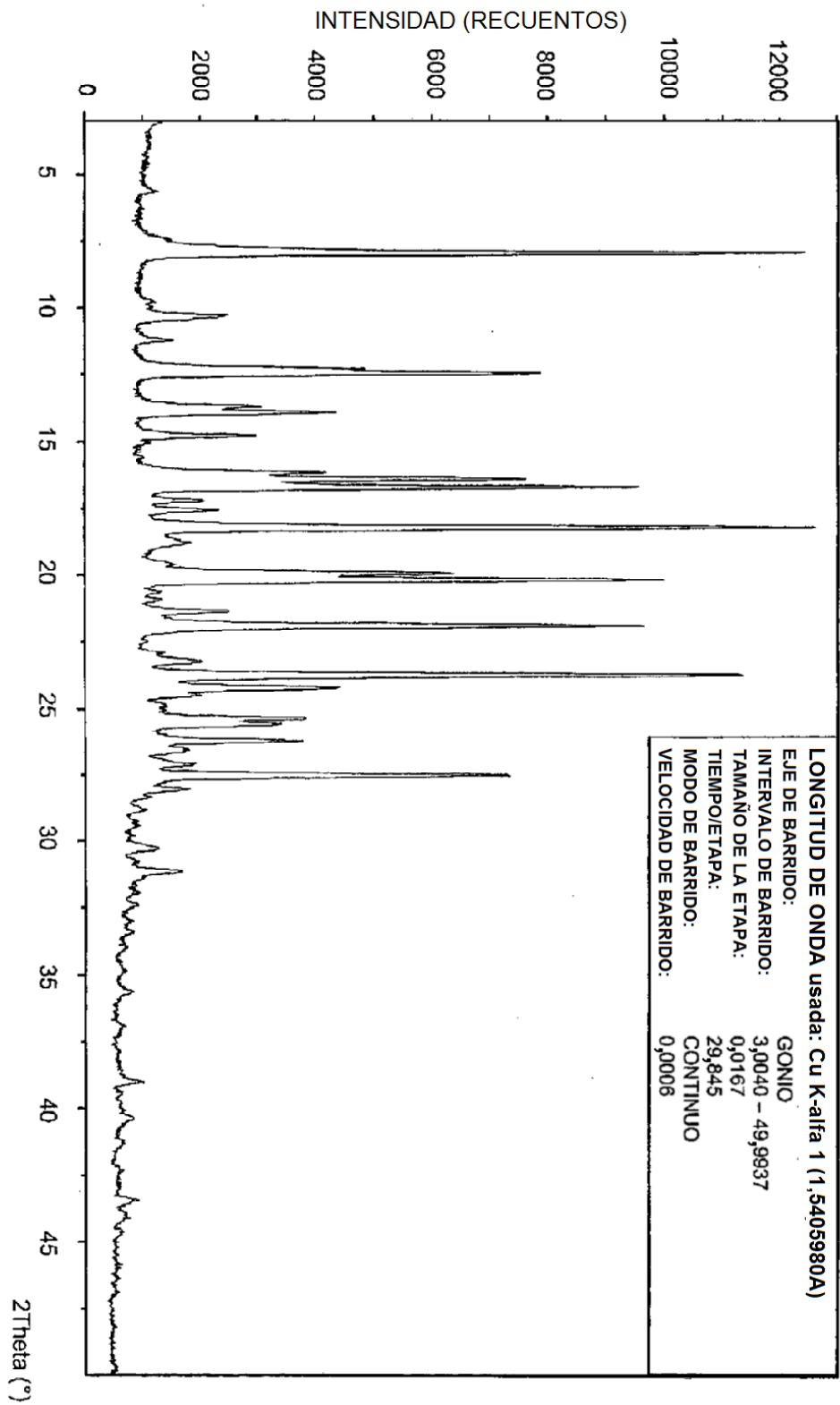


Figura 6: DSC: Forma II

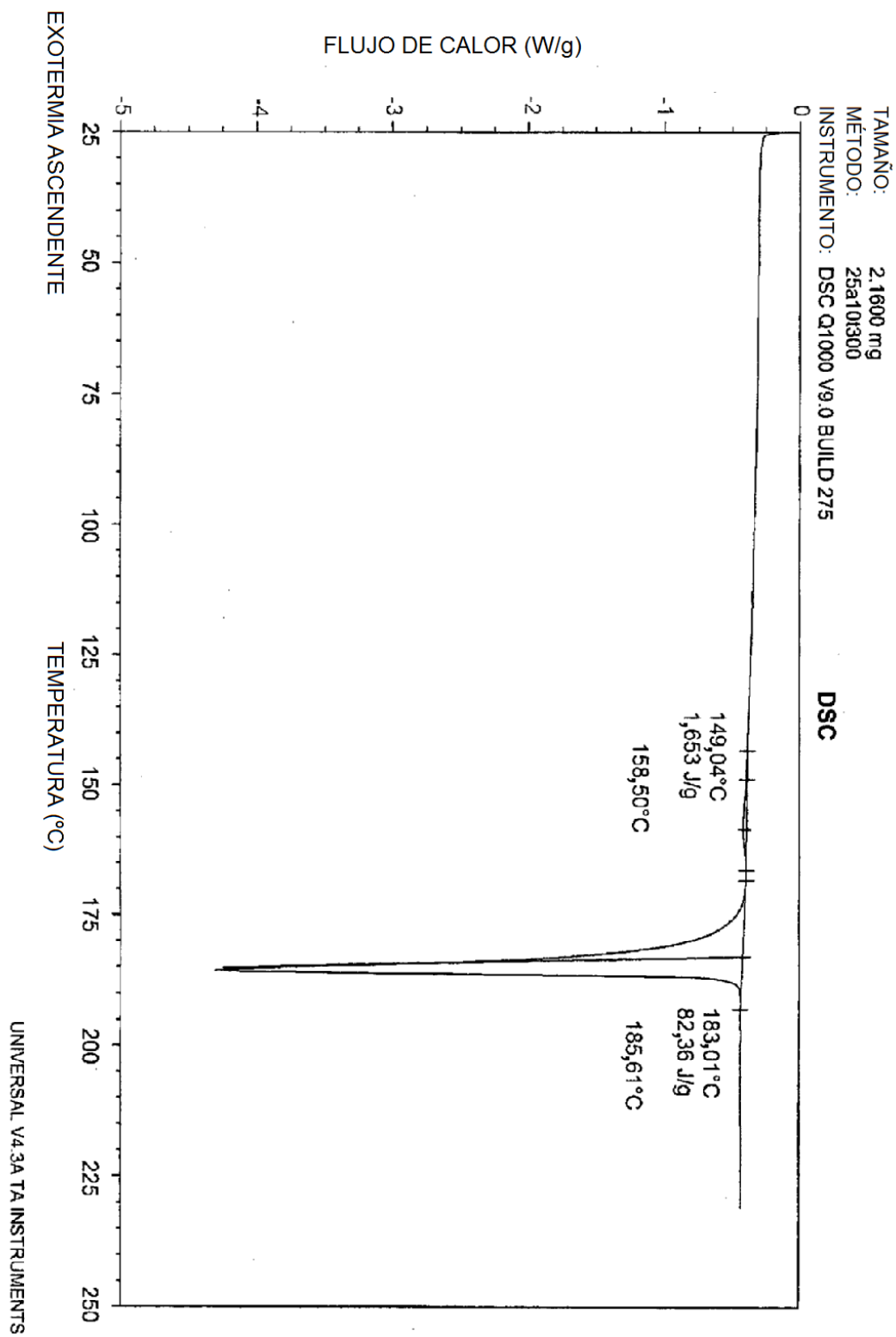


Figura 7: Efecto antitumoral del compuesto n° 1 en tumores de xenoinjerto de glioblastoma U87 en ratones desnudos NMRI

