

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 662**

51 Int. Cl.:

A01N 55/02 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08835342 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2214491**

54 Título: **Análogos de quinolona y procedimientos relacionados con los mismos**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 978042 P

21.03.2008 US 38681 P

17.04.2008 US 45933 P

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

14.09.2016

73 Titular/es:

SENHWA BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
9F, No. 205-1, Peishin Road, Section 3, Hsintien District
New Taipei City, TW

72 Inventor/es:

NAGASAWA, JOHNNY YASUO;
PIERRE, FABRICE;
HADDACH, MUSTAPHA;
SCHWAEBE, MICHAEL;
DARJANIA, LEVAN y
WHITTEN, JEFFREY P.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 582 662 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

Análogos de quinolona y procedimientos relacionados con los mismos

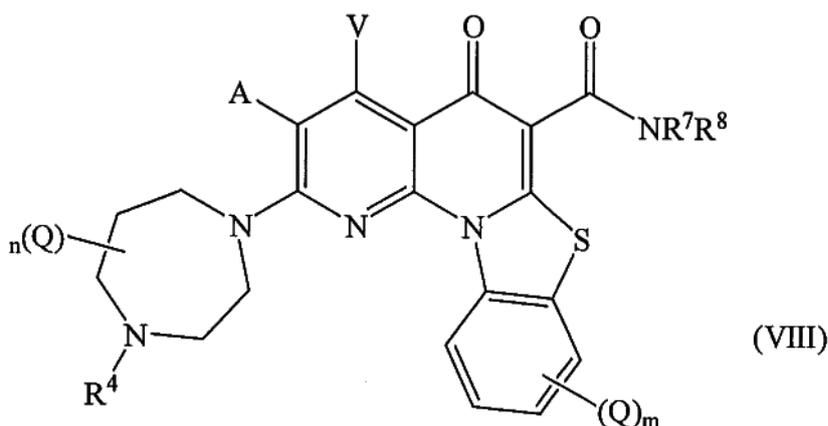
5 Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos compuestos de quinolona y composiciones farmacéuticas de los mismos. La invención se refiere también a dichos compuestos y composiciones para uso en la inhibición de proliferación celular y/o en la inducción de apoptosis celular. El documento WO2006/034113 divulga análogos de quinolona que pueden inhibir la proliferación celular y/o inducir la apoptosis celular. También divulga procedimientos de preparación de análogos de quinolona, y procedimientos de uso de los mismos.

Resumen de la invención

15 La presente invención proporciona nuevos compuestos de quinolona y composiciones farmacéuticas de los mismos que pueden inhibir la proliferación celular y/o inducir la apoptosis celular. En la presente memoria descriptiva se divulgan también procedimientos de preparación de dichos compuestos y composiciones de quinolona, y métodos de tratamiento de trastornos de proliferación celular mediante la administración de los mismos.

20 La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (VIII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25

donde:

A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

30

cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo;

35

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, u =O;

R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alquenilo C2-C10 o heteroalquenilo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido;

40

R³ es un alquilo C1-C10, alquenilo C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más

halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido;

cada R^4 es independientemente H, o alquilo C1-C6; o R^4 puede ser -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰;

5 cada R es independientemente H o alquilo C1-C6; R^7 es H y R^8 es alquilo C1-C4 sustituido por un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido;

m es 0, 1, 2, 3 ó 4;

10 n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

p es 0, 1, 2 ó 3;

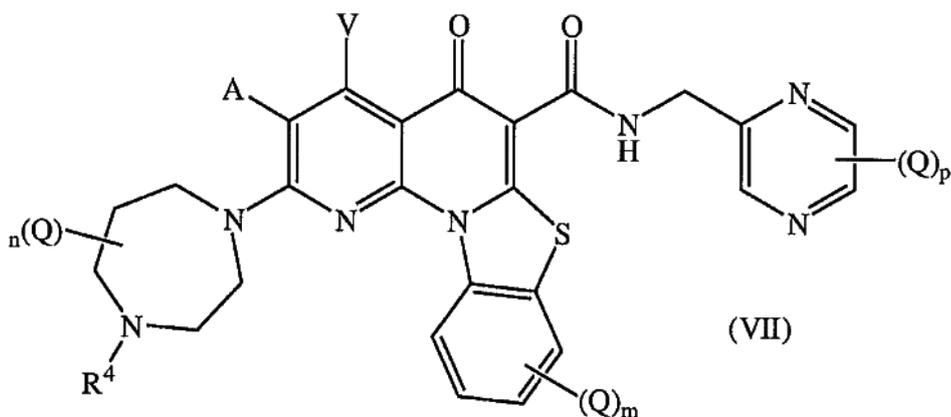
L es un conector de alquileno C1-C10, heteroalquileno C1-C10, alquenileno C2-C10 o heteroalquenileno C2-C10,
15 cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en halógeno, oxo (=O) o alquilo C1-C6;

W es un anillo azacíclico de 4 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo
20 adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo; y

W⁰ es un anillo carbocíclico de 3 a 4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de
1 a 4 átomos de flúor.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de Fórmula (VII),

25



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30 donde:

A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

35 cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene
40 opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo;

40

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, u =O;

R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alquenilo C2-C10 o heteroalquenilo C2-C10, cada uno de los
cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico

de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido;

R^3 es un alquilo C1-C10, alqueno C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido;

cada R^4 es independientemente H, o alquilo C1-C6; o R^4 puede ser -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰;

cada R es independientemente H o alquilo C1-C6;

10 m es 0, 1, 2, 3 ó 4;

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

15 p es 0, 1, 2 ó 3;

L es un conector de alqueno C1-C10, heteroalqueno C1-C10, alqueno C2-C10 o heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en halógeno, oxo (=O) o alquilo C1-C6;

20 W es un anillo azacíclico de 4 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo; y

25 W⁰ es un anillo carbocíclico de 3 a 4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de 1 a 4 átomos de flúor.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII), tal como se describe adicionalmente en la presente memoria descriptiva. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para administración oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (VII) o (VIII) para uso en un método para el tratamiento o la mejoría de un trastorno de proliferación celular en un sujeto, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, el trastorno de proliferación celular es un tumor o cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano o animal.

40 En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para la reducción o inhibición de la proliferación celular, que comprende la puesta en contacto de un sistema o un sujeto necesitado del mismo con una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo, reduciendo o inhibiendo con ello la proliferación celular.

45 En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para la reducción de las valoraciones microbianas y/o la mejoría de una infección microbiana, que comprende la puesta en contacto de un sistema o un sujeto necesitado del mismo con una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente antimicrobiano, reduciendo así las valoraciones microbianas y/o mejorando dicha infección microbiana.

50 El sistema puede ser una célula o un tejido, y el sujeto puede ser un sujeto humano o animal. Las valoraciones microbianas y/o la infección microbiana pueden ser valoraciones víricas, bacterianas o fúngicas.

55 En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para la inducción de muerte celular y/o la inducción de apoptosis, que comprende la administración a un sistema o un sujeto necesitado del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo, y opcionalmente con un procedimiento y/o un agente quimioterapéutico, induciendo así la muerte celular y/o induciendo la apoptosis.

El sistema puede ser una célula o un tejido, y dicho sujeto puede ser un sujeto humano o animal.

En los compuestos de Fórmula (VII) o (VIII) en cada $-NR^1R^2$, R^1 y R^2 junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo.

5

En los compuestos de Fórmula (VII) o (VIII) R^1 es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, u =O. A menudo, R^1 es H o metilo.

R^2 en los compuestos de Fórmula (VII) o (VIII) es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alquenilo C2-C10 o heteroalquenilo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido.

10

En los compuestos de Fórmula (I) R^3 es un alquilo C1-C10, alquenilo C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido; y donde las fracciones alquilo y alquenilo, y sus heteroformas correspondientes, pueden estar sustituidas opcionalmente por =O.

15

En los compuestos de Fórmula (VII) o (VIII) cada R^4 es independientemente H, o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido; o R^4 puede ser -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰;

20

L en los compuestos de Fórmula (VII) o (VIII) es un conector de alquileo C1-C10, heteroalquileo C1-C10, alquenileo C2-C10 o heteroalquenileo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en halógeno, oxo (=O) o alquilo C1-C6.

25

En los compuestos de Fórmula (VII) o (VIII), W es un anillo azacíclico saturado, parcialmente insaturado o aromático de 4 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo, donde el anillo W puede estar conectado a través del enlace marcado como R^4 , o a través del grupo de enlace -L- o -L-N(R)- a través de cualquier posición en el anillo azacíclico. En los compuestos de Fórmula (VII) o (VIII), W⁰ es un anillo carbocíclico de 3 a 4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de 1 a 4 átomos de flúor.

30

En determinadas realizaciones, W contiene al menos un doble enlace. Por ejemplo, W puede ser un anillo de imidazol, imidazolina, pirrol, pirrolina, piridina, dihidropiridina, tetrahidropiridina, pirimidina, pirazina o piridazina opcionalmente sustituido.

35

En otras realizaciones, W es un anillo azacíclico saturado opcionalmente sustituido. Por ejemplo, W puede ser un anillo de azetidina, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, tiomorfolina, homopiperazina, homomorfolina o homotiomorfolina opcionalmente sustituido.

40

En algunas realizaciones de Fórmula (VII), A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰, donde R^1 , R^2 , -R³, -W, -L, -W⁰ y R se definen como anteriormente.

En determinadas realizaciones de Fórmula (VII), A y V son independientemente H y halo, preferentemente fluoro. En algunas realizaciones preferidas, A y V son cada uno H. En otras realizaciones preferidas, A es fluoro y V es H.

45

En algunas realizaciones de Fórmula (VII), cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰. Debe entenderse que cada posición sustituida opcionalmente por un grupo Q es sustituida por hidrógeno cuando m, n o p es 0.

50

En una realización preferida, m y n son 0 ó 1.

En otra realización preferida de Fórmula (VII), m y n son 0.

55

En otras realizaciones preferidas de Fórmula (VII), p es 0 ó 1.

En una realización preferida en particular, m y n son 0, p es 1, y Q es alquilo C1-C4, preferentemente metilo.

En una realización preferida de Fórmula (VII), R^4 es H, o alquilo C1-C4 o cicloalquilo C3-C7. En una realización preferida particularmente, R^4 es metilo. En otra realización preferida, R^4 es H.

En algunas realizaciones preferidas en particular, el compuesto de Fórmula (VII) comprende dos o más características preferidas, a veces tres o más características preferidas.

En algunas realizaciones de Fórmula (VIII), A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰, donde R¹, R², -R³, -W, -L, -W⁰, y R se definen como anteriormente.

10

En determinadas realizaciones, A y V son independientemente H y halo, preferiblemente fluoro. En algunas realizaciones preferidas, A y V son cada uno H. En otras realizaciones preferidas, A es fluoro y V es H.

En algunas realizaciones de Fórmula (VIII), cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰. Debe entenderse que cada posición sustituida opcionalmente por un grupo Q es sustituida por hidrógeno cuando m, n o p es 0.

15

En una realización preferida, m y n son 0 ó 1.

20 En otra realización preferida de Fórmula (VIII), m y n son 0.

En una realización preferida, m y n son 0.

En una realización preferida de Fórmula (VIII), R^4 es alquilo C1-C4 o cicloalquilo C3-C7. En una realización preferida en particular, R^4 es metilo. En otra realización preferida, R^4 es H.

25

En algunas realizaciones de fórmula (VIII), R^7 es H y R^8 es alquilo C₁₋₄ sustituido por un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido. En determinadas realizaciones preferidas, R^8 es un alquilo C₁₋₄ sustituido con un anillo de imidazol, piridina, pirimidina, piridazina o pirazina opcionalmente sustituido.

30

En algunas realizaciones, R^7 es H y R^8 es un alquilo C₁₋₄ sustituido por un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido. En algunas de dichas realizaciones, el anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido se selecciona de entre piridina, pirimidina, pirazina, imidazol, pirrolidina y tiazol.

En determinadas realizaciones preferidas de Fórmula (VIII), R^7 es H y R^8 se selecciona de entre -CH₂-(piridina), -CH₂-(metilpiridina), -CH₂-(metilpirimidina), -CH₂-(metilpirimidina), -CH₂-(pirazina), -CH₂-(metilpirazina), -CH₂-(imidazol); -CH₂-(N-metilimidazol); -CH₂-(pirrolidina); -CH₂-(N-metilpirrolidina); -CH₂-(tiazol); y CH₂-(N-metiltiazol).

35

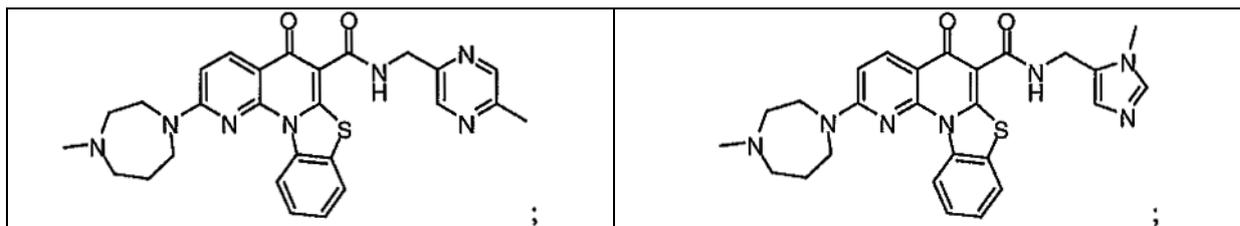
En algunas realizaciones preferidas de Fórmula (VIII), R^7 y R^8 junto con N en -NR⁷R⁸ forman un anillo de morfolina o piperazina opcionalmente sustituido.

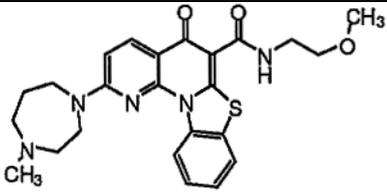
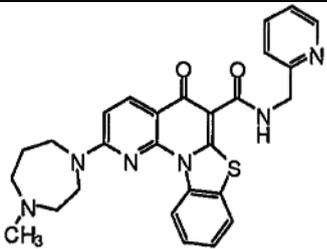
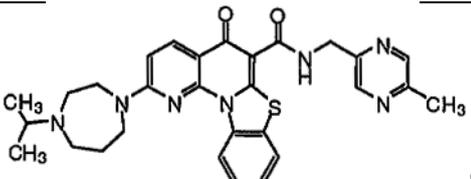
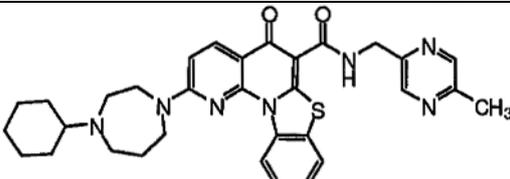
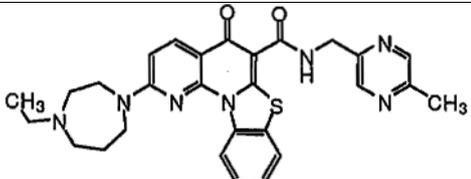
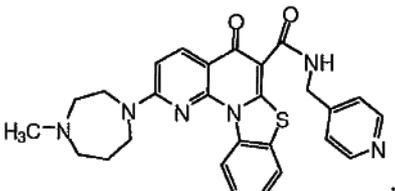
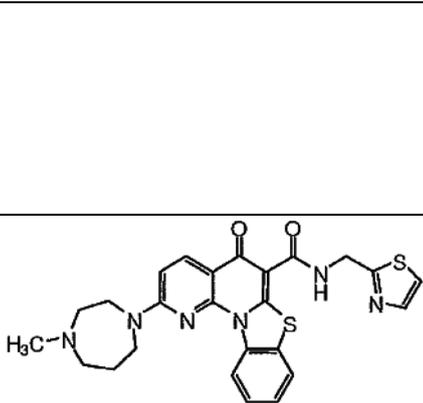
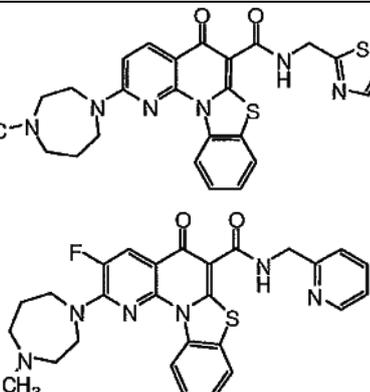
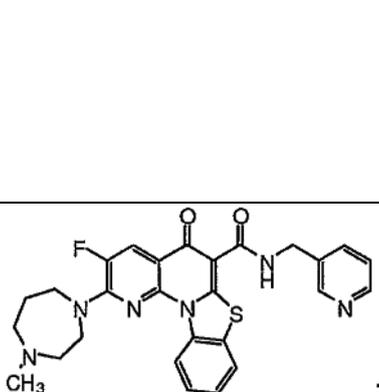
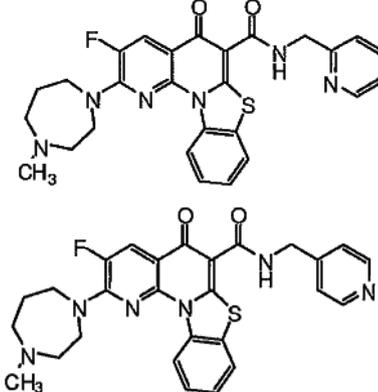
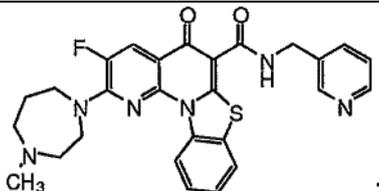
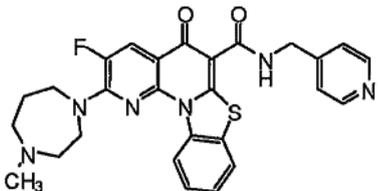
40

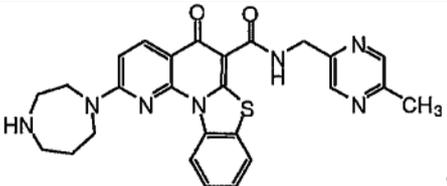
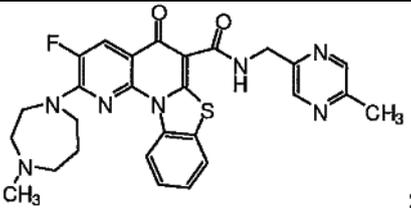
En algunas realizaciones preferidas en particular, el compuesto de Fórmula (VIII) comprende dos o más características preferidas, a veces tres o más características preferidas.

45 Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen los compuestos mostrados en las Tablas 1 a 8 y en los Ejemplos.

En algunas realizaciones preferidas en particular, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:



 <p>;</p>	 <p>;</p>
 <p>;</p>	 <p>;</p>
 <p>;</p>	 <p>;</p>
 <p>;</p>	 <p>;</p>
 <p>;</p>	 <p>;</p>
 <p>;</p>	 <p>;</p>
 <p>;</p>	 <p>;</p>

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto que tiene una cualquiera de la Fórmula (VII) o (VIII) anterior, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, la composición comprende un compuesto que tiene una cualquiera de las fórmulas anteriores, polietilenglicol, y propilenglicol en una solución tampón.
- 10 Los compuestos de la invención ejercen actividad biológica en ensayos descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden inhibir la biogénesis de ARN y pueden suprimir el crecimiento tumoral. Aunque sin limitar la invención por ninguna teoría de su funcionamiento, se cree que los compuestos pueden funcionar en parte por la interacción con regiones de formación de estructuras cuádruples de ácidos nucleicos y modulación de transcripción de ARN ribosómico. Los compuestos de la invención también
- 15 pueden modular la interacción de ácidos nucleicos de formación de estructuras cuádruples con nucleolina, una proteína que se asocia con la apoptosis; así, la modulación de la actividad, la localización o la estabilidad de la nucleolina también pueden contribuir a la capacidad de estos compuestos de inducir la apoptosis. En la presente invención se divulgan también procedimientos de preparación de estos compuestos, y procedimientos de uso de los mismos.
- 20 En consecuencia, en la presente memoria descriptiva se divulgan métodos para la reducción de la proliferación celular y/o la inducción de muerte celular, que comprenden la puesta en contacto de un sistema con una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una cualquiera de las fórmulas anteriores, o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente en combinación con un agente quimioterapéutico, reduciendo así la proliferación celular y/o
- 25 induciendo la muerte celular, tal como apoptosis o muerte celular apoptótica, en dicho sistema. El sistema puede ser una célula o un tejido. El sistema puede incluir una célula pancreática, tal como una célula de un sujeto o una célula en cultivo (por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*). El sistema puede incluir una célula cancerosa pancreática. El sistema puede ser una línea celular tal como PC3, HCT116, HT29, MIA Paca-2, HPAC, Hs700T, Panc10.05, Panc02.13, PL45, SW 190, Hs 766T, CFPAC-1, PANC-1, MV-4-11, THP-1 y K-562.
- 30 En la presente memoria descriptiva se divulgan también métodos para el tratamiento o la mejoría de un trastorno de

proliferación celular, que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente en combinación con un agente quimioterapéutico, tratando o mejorando de este modo dicho trastorno de proliferación celular. Por ejemplo, la proliferación celular puede reducirse, y/o inducirse la muerte celular, tal como apoptosis o muerte celular apoptótica. El trastorno de proliferación celular puede ser un tumor o un cáncer en un sujeto humano o animal. El cáncer puede ser cáncer de páncreas, lo que incluye tumores no endocrinos y endocrinos. Los ejemplos ilustrativos de tumores no endocrinos incluyen pero no se limitan a adenocarcinomas, carcinomas de células acinosas, carcinomas adenoescamosos, tumores de células gigantes, neoplasias mucinosas papilares intraductales, cistoadenocarcinomas mucinosos, pancreatoblastomas, cistadenomas serosos, tumores sólidos pseudopapilares.

10 Un tumor endocrino puede ser un tumor de las células de los islotes.

Los métodos anteriores para la reducción de la proliferación celular y/o la inducción de muerte celular también pueden realizarse en combinación con un procedimiento y/o un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de procedimientos que pueden usarse en combinación con los procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva incluyen pero no se limitan a radioterapia y cirugía. En determinadas realizaciones, los compuestos de la presente invención son para su administración en combinación con un agente quimioterapéutico, y se usan para reducir la proliferación celular, inducir la muerte celular y/o mejorar un trastorno de proliferación celular.

15

En la presente memoria descriptiva se divulgan también procedimientos para la reducción o inhibición de proliferación celular, que comprenden la puesta en contacto de un sistema o un sujeto necesitado del mismo con una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo, reduciendo o inhibiendo con ello la proliferación celular.

20

En la presente memoria descriptiva se divulgan también procedimientos para la reducción de valoraciones microbianas, que comprenden la puesta en contacto de un sistema con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VI'), (VII) o (VIII), o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente antimicrobiano, reduciendo así las valoraciones microbianas. El sistema puede ser una célula o un tejido. En la presente invención se proporcionan también procedimientos para mejorar una infección microbiana, que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una cualquiera de las fórmulas anteriores, o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente antimicrobiano, mejorando así dicha infección microbiana. El sujeto puede ser un ser humano o un animal. Las valoraciones microbianas pueden ser valoraciones víricas, bacterianas o fúngicas.

25

30

En la presente memoria descriptiva se divulgan también procedimientos para determinar la selectividad de interacción entre un compuesto que tiene una cualquiera de las fórmulas anteriores, y ácidos nucleicos capaces de formar una estructura cuádruple, que comprenden: a) la puesta en contacto de un compuesto en ausencia de una molécula competidora con tres o más ácidos nucleicos capaces de formar una estructura cuádruple, donde cada ácido nucleico no es un ácido nucleico telomérico; b) la medida de una interacción directa entre el compuesto y dichos tres o más ácidos nucleicos; y c) la determinación de la selectividad de interacción a partir de una comparación de las medidas de interacción. En un ejemplo, tres o más ácidos nucleicos comprenden una secuencia de nucleótidos situada en posición 5' de una secuencia de nucleótidos de oncogén. El oncogén puede ser MYC, HIF, VEGF, ABL, TGF, PDGF α , MYB, SPARC, HER, VAV, RET, H-RAS, EGF, SRC, BCL-1, BCL-2, DHFR o HMGA. En la determinación de la selectividad de interacción, el compuesto puede ponerse en contacto por separado con cada uno de dichos tres o más ácidos nucleicos en un recipiente diferente. Además, la selectividad de interacción puede determinarse a partir de una comparación de valores Cl_{50} .

35

40

45

Los compuestos de la presente invención pueden interactuar o no con regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples. En determinadas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden unirse a y/o estabilizar una estructura cuádruple propulsora. Los ejemplos de estructuras cuádruples propulsoras incluyen pero no se limitan a H-RAS, RET, BCL-1, DHFR, TGF- β , HIF-1 α , VEGF, c-Myc, o PDGF α . En otra realización, el compuesto puede unirse a y/o estabilizar una estructura cuádruple en silla o en cesta. Por ejemplo, el compuesto puede unirse a y/o estabilizar BCL-2.

50

En la presente memoria descriptiva se divulgan también procedimientos para la inducción de muerte celular, tal como muerte celular apoptótica (apoptosis), que comprenden la administración a un sistema o un sujeto necesitado del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una cualquiera de las Fórmulas (VII) o (VIII) anteriores, o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente quimioterapéutico. En la presente memoria descriptiva se divulgan también métodos para el tratamiento o la mejoría de un trastorno mediado por la sobreexpresión de un oncogén, tal como sobreexpresión de c-Myc, que comprenden la administración a un sistema

55

o un sujeto necesitado del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto que tiene cualquiera de las fórmulas, o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente quimioterapéutico. El sujeto puede ser un ser humano o un animal, y el sistema puede ser una célula o un tejido.

5 Los compuestos de las fórmulas anteriores también pueden ser capaces de modular las actividades de diversas proteín-quinasas, ya que contienen características estructurales que según se conoce se unen a proteín-quinasas, y en consecuencia son útiles para la identificación de moduladores de proteín-quinasas usando procedimientos de cribado conocidos en la técnica. En la presente memoria descriptiva se divulgan procedimientos de cribado representativos para ciertas quinasas. En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para
10 la identificación de un modulador de una proteína-cinasa, modulador que a veces es un potente modulador de una o más proteín-quinasas en particular. Este procedimiento comprende el cribado de una biblioteca de compuestos descritos en la presente memoria descriptiva, biblioteca que contiene al menos 10 compuestos diferentes, cada uno de los cuales tiene Fórmula (VII) o (VIII), y a menudo al menos 100 de dichos compuestos, por su capacidad para modular la actividad de una proteína-cinasa.

15

Alternativamente, el procedimiento comprende el cribado de un conjunto de proteín-quinasas, tal como al menos tres o al menos diez proteín-quinasas, con un compuesto de Fórmula (VII) o (VIII), para determinar un perfil de actividad diferencial. Estos procedimientos permiten al usuario identificar un compuesto que tiene un nivel deseado de actividad y/o selectividad como un modulador de la actividad de proteína-cinasa, compuesto que puede usarse para
20 iniciar un programa de desarrollo farmacológico. Así, en la presente memoria descriptiva se divulga también una composición que comprende una proteína-cinasa aislada que forma complejo con un compuesto de Fórmula (VII) o (VIII). Dichos complejos son útiles por la información que proporcionan acerca del sitio de unión de un compuesto modulador en la cinasa en particular, y como una herramienta de investigación para analizar la estructura de la cinasa. Dichos complejos son útiles también porque pueden cristalizar más fácilmente que la cinasa sin formación de
25 complejo, al permitir la cristalización y la determinación de la estructura cristalina en casos en que no sería posible sin el compuesto modulador unido.

En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para la identificación de una molécula que modula una interacción entre un ácido nucleico ribosómico y una proteína que interacciona con el ácido nucleico,
30 que comprende: (a) la puesta en contacto de un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos y la proteína con una molécula de prueba que tiene cualquiera de las estructuras divulgadas anteriormente, donde el ácido nucleico es capaz de unirse a la proteína, y (b) la detección de la cantidad del ácido nucleico ligado o no ligado a la proteína, con lo que la molécula de prueba se identifica como una molécula que modula la interacción cuando una cantidad diferente del ácido nucleico se une a la proteína en presencia de la
35 molécula de prueba que en ausencia de la molécula de prueba. La proteína puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en nucleolina, fibrilarina, RecQ, QPN1 y fragmentos funcionales de los anteriores.

En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para la identificación de una molécula que provoca desplazamiento de nucleolina, que comprende (a) la puesta en contacto de un ácido nucleico que contiene
40 una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos y una proteína nucleolina con una molécula de prueba de Fórmula (VII) o (VIII), donde el ácido nucleico es capaz de unirse a la proteína nucleolina, y (b) la detección de la cantidad del ácido nucleico ligado o no ligado a la proteína nucleolina, con lo que la molécula de prueba se identifica como una molécula que provoca desplazamiento de nucleolina cuando se une menos ácido nucleico a la proteína nucleolina en presencia de la molécula de prueba que en ausencia de la molécula de prueba. La proteína nucleolina
45 puede estar en asociación con una etiqueta detectable, y la proteína nucleolina a veces está en asociación con una fase sólida. El ácido nucleico a veces está en asociación con una etiqueta detectable, y en determinadas realizaciones el ácido nucleico puede estar en asociación con una fase sólida. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o un análogo de los mismos, y en realizaciones específicas puede comprender una secuencia de nucleótidos descrita anteriormente. En la presente memoria descriptiva se divulga también una composición que comprende un
50 ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos proporcionada en la presente memoria descriptiva, o una secuencia sustancialmente idéntica de la misma, y/o una proteína que se une a la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, nucleolina, fibrilarina, RecQ, QPN1 y fragmentos funcionales de los anteriores), y un compuesto de Fórmula (VII) o (VIII).

55 También se divulga un procedimiento para la identificación de una molécula que se une a un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos, que comprende: (a) la puesta en contacto de un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos descrita en la presente memoria descriptiva, un compuesto que se une al ácido nucleico y una molécula de prueba de Fórmula (VII) o (VIII), y (b) la detección de la cantidad del compuesto ligado o no ligado al ácido nucleico, con lo que la molécula de prueba se

identifica como una molécula que se une al ácido nucleico cuando menos compuesto se une al ácido nucleico en presencia de la molécula de prueba que en ausencia de la molécula de prueba. El compuesto a veces está en asociación con una etiqueta detectable, y a veces es radiomarcado. En determinadas realizaciones el ácido nucleico puede estar en asociación con una fase sólida. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o un análogo de los mismos, y puede comprender una secuencia de nucleótidos descrita anteriormente en realizaciones específicas. El ácido nucleico puede formar una estructura cuádruple, tal como una estructura cuádruple intramolecular, en determinadas realizaciones.

También se divulga en la presente memoria descriptiva un procedimiento para la identificación de un modulador de síntesis de ácidos nucleicos, que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico de plantilla, un oligonucleótido cebador que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de ácidos nucleicos de plantilla, nucleótidos de extensión, una polimerasa y una molécula de prueba de Fórmula (VII) o (VIII), en condiciones que permiten que el oligonucleótido cebador se hibride con el ácido nucleico de plantilla, donde el ácido nucleico de plantilla comprende una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos, y la detección de la presencia, ausencia o la cantidad de un producto cebador alargado sintetizado por extensión del ácido nucleico cebador, con lo que la molécula de prueba se identifica como un modulador de síntesis de ácidos nucleicos cuando se sintetiza menos producto cebador alargado en presencia de la molécula de prueba que en ausencia de la molécula de prueba.

El procedimiento puede incluir la identificación de un modulador de síntesis de ARN, y en puede incluir también, la identificación de un modulador de síntesis de ARN nucleolar. El ácido nucleico de plantilla a veces es ADN y a veces es ARN, y la plantilla puede incluir a modo de ejemplo uno cualquiera o más de las secuencias de nucleótidos ribosómicos descritas en la presente memoria descriptiva. La polimerasa a veces es una polimerasa de ADN y a veces es una polimerasa de ARN. Las células pueden ponerse en contacto con un compuesto de prueba de Fórmula (VII) o (VIII) y los niveles de ARN se detectan en las células, con lo que un compuesto de prueba que reduce la cantidad de ARN en comparación con las células no tratadas con el compuesto de prueba se identifica como una molécula que modula la síntesis de ARN. En el último caso, pueden evaluarse los niveles de ARN totales, y en algunos casos, puede la cantidad total del ARN recién sintetizado, por ejemplo, por incorporación y detección de un nucleótido detectable en el ARN (por ejemplo, marcado radiactivamente como nucleótido (tal como nucleótido tritiado)), por ejemplo.

En un ensayo específico, en la presente memoria descriptiva se divulga un procedimiento para la identificación de una molécula que modula la síntesis de ARN ribosómico (ARNr), que comprende: la puesta en contacto de células con una molécula de prueba de Fórmula (VII) o (VIII), la puesta en contacto de una secuencia de nucleótidos ribosómicos con uno o más cebadores que amplifican una porción de los mismos y una sonda marcada que se hibrida en el producto de amplificación, y la detección de la cantidad del producto de amplificación por hibridación de la sonda marcada, con lo que una molécula de prueba que reduce o aumenta la cantidad de producto de amplificación se identifica como una molécula que modula la síntesis de ARNr. La sonda marcada puede añadirse después de añadir los cebadores y el ARNr se amplifica, y en determinados casos, la sonda marcada y los cebadores se añaden al mismo tiempo. La porción de secuencia de nucleótidos ribosómica amplificada está a veces en el extremo 5' de ADN.

En la presente memoria descriptiva se divulga también una biblioteca de compuestos, que biblioteca que comprende al menos 10 compuestos de Fórmula (VII) o (VIII). La biblioteca contiene preferentemente al menos 100 de dichos compuestos. Esta biblioteca puede usarse para identificar compuestos que tienen una o más de las actividades descritas en la presente memoria descriptiva, o una combinación específica de dichas actividades usando procedimientos conocidos en la técnica. El procedimiento es útil especialmente para la identificación de moléculas que tienen un nivel umbral de actividad biológica, lo que incluye pero no se limita a (a) la unión al ácido nucleico cuádruple o la inhibición de la formación de ácido nucleico cuádruple (ADNr o ARNr), (b) la actividad frente a una proteína-cinasa específica o un conjunto de proteínas-quinasas y (c) la actividad como modulador de unión de un ácido nucleico a una proteína, tal como, por ejemplo nucleolina.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una comparación de casete y valores ABC individuales para la administración oral de compuestos RBI.

Definiciones

La presente invención puede entenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y a los Ejemplos incluidos en la presente memoria descriptiva. Debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria descriptiva tiene como objetivo sólo describir realizaciones específicas y no pretende ser limitativa.

5

A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que se dirige la invención.

10 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "uno" o "una" significan "al menos uno" o "uno o más". Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "aproximadamente" significa que el valor numérico es aproximado y que pequeñas variaciones no influirían significativamente en la práctica de la invención. Cuando se usa una limitación numérica, a no ser que se indique lo contrario por el contexto, "aproximadamente" significa que el valor numérico puede variar en $\pm 10\%$ y permanecer dentro del alcance de la invención.

15

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "alquilo" se refiere a un compuesto que contiene carbono. Los grupos "alquilo" pueden ser lineales o ramificados. Los grupos alquilo cíclicos se refieren en la presente memoria descriptiva como "cicloalquilo". "Heteroalquilo" se refiere a un compuesto en el que al menos un átomo de carbono de la estructura alquilo ha sido sustituido por un heteroátomo, normalmente N, O o S. Grupos

20 "alquenilo" y "alquinilo" se refieren a fracciones alquilo que contienen al menos un doble enlace o un triple enlace, respectivamente.

Los sustituyentes opcionales cuando están presentes en un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo, o una heteroforma de uno de los mismos, incluyen pero no se limitan a OH, alcoxi C₁₋₆, amino opcionalmente sustituido, amido, CN, carboxi, halo, =O, arilo, anillos heterocíclicos o carbocíclicos opcionalmente sustituidos o sustituyentes inorgánicos.

25

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "carbociclo" se refiere a un compuesto cíclico que contiene sólo átomos de carbono en el anillo, mientras que un "heterociclo" se refiere a un compuesto cíclico que comprende un heteroátomo como miembro del anillo. Las estructuras carbocíclicas y heterocíclicas comprenden compuestos que tienen sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos o múltiples, y pueden ser saturadas, parcialmente insaturadas o aromáticas. Los anillos carbocíclicos y heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituido por grupos sustituyentes adecuados para su estructura.

30

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "azacíclico" o "anillo azacíclico" se refiere a un anillo monocíclico saturado, parcialmente insaturado o aromático de 3 a 7 miembros o un sistema de anillo bicíclico fusionado de 8 a 12 miembros que contiene al menos un átomo de nitrógeno. Dichos anillos azacíclicos pueden contener opcionalmente de 1 a 2 heteroátomos adicionales seleccionados de entre N, O, y S como miembros del anillo, y pueden estar opcionalmente sustituidos en la medida en que dicha sustitución tenga sentido químico.

35

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "arilo" se refiere a un sustituyente de hidrocarburo poliinsaturado, normalmente aromático, mientras que "heteroarilo" o "heteroaromático" se refieren a un anillo aromático que contiene un heteroátomo como miembro del anillo. Las estructuras arilo y heteroarilo comprenden compuestos que tienen sistemas monocíclicos, bicíclicos o múltiples, y pueden estar opcionalmente sustituidas.

40

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "heteroátomo" se refiere a cualquier átomo que no es carbono o hidrógeno, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre.

45

"Heteroforma" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un grupo donde uno o más átomos de carbono de una fracción de hidrocarbilo han sido sustituidos por un heteroátomo, normalmente N, O o S. Por ejemplo, el heteroarilo es la heteroforma de arilo, y el heteroalquilo es la heteroforma de alquilo. Los ejemplos ilustrativos de heterociclos incluyen pero no se limitan a tetrahydrofurano, 1,3-dioxolano, 2,3-dihydrofurano, pirano, tetrahydropirano, benzofurano, isobenzofurano, 1,3-dihidro-isobenzofurano, isoxazol, 4,5-dihidroisoxazol, piperidina, pirrolidina, pirrolidin-2-ona, pirrol, piridina, pirimidina, octahidro-pirrol[3,4-*b*]piridina, piperazina, pirazina, morfolina, tiomorfolina, imidazol, imidazolidina-2,4-diona, 1,3-dihidrobencimidazol-2-ona, indol, tiazol, benzotiazol, tiadiazol, tiofeno, tetrahydro-tiofeno 1,1-dióxido, diazepina, triazol, guanidina, diazabicyclo[2.2.1]heptano, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, 2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H- β -carbolina, oxirano, oxetano, tetrahydropirano, dioxano, lactonas, aziridina, azetidina, piperidina, lactamas, y pueden comprender también heteroarilos. Otros ejemplos ilustrativos de heteroarilos incluyen pero no se limitan a furano, pirrol, piridina, pirimidina, imidazol, bencimidazol y triazol.

50

55

Los ejemplos ilustrativos de anillos azacíclicos incluyen pero no se limitan a anillos opcionalmente sustituidos de aziridina, azetidina, imidazol, imidazolina, pirrol, pirrolina, pirrolidina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, piridina, dihidropiridina, tetrahidropiridina, piperidina, piperazina, pirimidina, piridazina, pirazina, morfolina, tiomorfolina, homopiperazina, homomorfolina, homotiomorfolina, bencimidazol e indol.

Los sustituyentes preferidos cuando están presentes en un anillo azacíclico o heterocíclico incluyen halo, =O, acilo, aroilo, carbamoilo, o un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido; o alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ opcionalmente sustituidos o heteroformas de los mismos; u -OR⁵, -NR⁵R⁶, -COOR⁵, o -C(O)NR⁵R⁶, donde cada uno de R⁵ y R⁶ es independientemente H, o alquilo, arilo o arilalquilo C1-C6, o una heteroforma de uno de los mismos; y donde en cada -NR⁵R⁶, R⁵ y R⁶ junto con N pueden formar un anillo de 5 a 6 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo.

15 Los sustituyentes preferidos en particular cuando están presentes en un anillo azacíclico aromático incluyen uno o más halo o grupos alquilo C¹⁻⁶ opcionalmente sustituidos, donde dichos sustituyentes opcionales se seleccionan de entre el grupo que consiste en halo, hidroxí y oxo (=O).

Los sustituyentes preferidos cuando están presentes en un anillo arilo o heteroarilo incluyen opcionalmente sustituido alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ opcionalmente sustituidos; halo, -CN, -CF₃, -OCF₃, NO₂; u -OR⁵, -NR⁵R⁶, -COOR⁵, o -C(O)NR⁵R⁶, -SO₂NR⁵R⁶, -NC(O)R⁵, o -NSO₂R⁵, donde cada uno de R⁵ y R⁶ es independientemente H, o alquilo arilo C1-C6, o arilalquilo, o una heteroforma de uno de los mismos; y donde en cada -NR⁵R⁶, R⁵ y R⁶ junto con N pueden formar un anillo de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo.

25 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "sustituyente inorgánico" se refiere a sustituyentes que no contienen carbono o contienen carbono unido a elementos distintos de hidrógeno (por ejemplo, carbono elemental, monóxido de carbono, dióxido de carbono y carbonato). Los ejemplos de sustituyentes inorgánicos incluyen pero no se limitan a nitro, halógeno, sulfonilos, sulfinilos, fosfatos, etc.

30 Los términos "tratar", "tratamiento" y "efecto terapéutico" tal como se usan en la presente memoria descriptiva se refieren a la reducción o interrupción de la tasa de proliferación celular (por ejemplo, ralentizando o deteniendo el crecimiento tumoral) o la reducción del número de células cancerosas en proliferación (por ejemplo, eliminación de parte o la totalidad de un tumor). Estos términos también son aplicables a la reducción de la valoración de un microorganismo en un sistema (es decir, célula, tejido o sujeto) infectados con un microorganismo, la reducción de la tasa de propagación microbiana, la reducción del número de síntomas o del efecto de un síntoma asociado con la infección microbiana y/o la eliminación de cantidades detectables del microbio en el sistema. Los ejemplos de microorganismo incluyen pero no se limitan a virus, bacteria y hongo.

40 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "agente quimioterapéutico" se refiere a un agente terapéutico que puede usarse para el tratamiento o la mejoría de un trastorno de proliferación celular tal como tumores o cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen pero no se limitan a un agente antineoplásico, un agente de alquilación, un alcaloide vegetal, un agente antimicrobiano, una sulfonamida, un agente antiviral, un agente de platino y otros agentes anticancerosos conocidos en la técnica. Los ejemplos particulares de agentes quimioterapéuticos incluyen pero no se limitan a cisplatino, carboplatino, busulfano, metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, ciclofosfamida, mefalano, vincristina, vinblastina, clorambucilo, paclitaxel, gemcitabina y otros conocidos en la técnica. (Véase por ejemplo, Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics (9^a ed) (Goodman, y col., eds.) (McGraw-Hill) (1996); y 1999 Physician's Desk Reference (1998)).

50 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "apoptosis" se refiere a un programa suicida o de autodestrucción celular intrínseca. En respuesta a un estímulo desencadenante, las células experimentan una cascada de acontecimientos que incluyen contracción celular, formación de vesículas de membranas celulares y condensación cromática y fragmentación. Estos acontecimientos culminan en la conversión celular en grupos de partículas ligadas a membrana (cuerpos apoptóticos), que posteriormente son engullidos por macrófagos.

55 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "sujeto" se refiere a un sujeto humano o animal. En determinadas realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

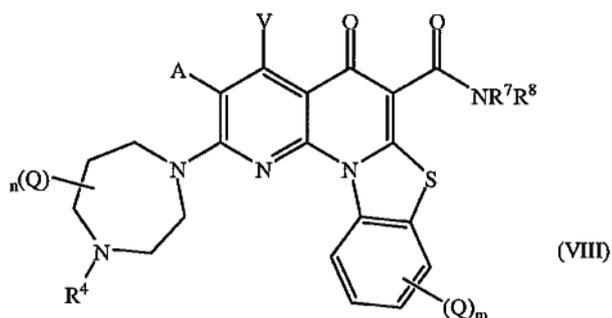
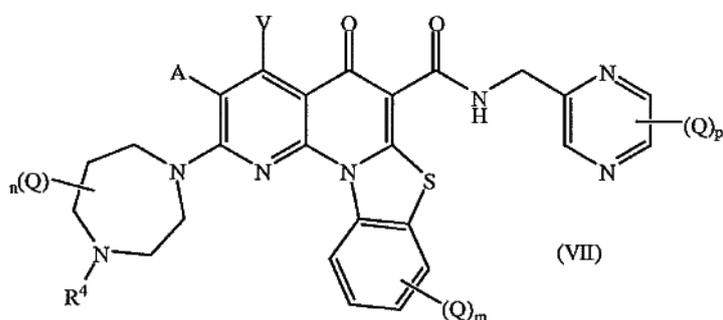
Descripción de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que tienen Fórmula (VII) y (VIII), y sales, ésteres y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. La invención proporciona análogos de quinolona activos oralmente que pueden inhibir la proliferación celular y/o inducir la apoptosis celular. La presente invención proporciona también procedimientos de preparación de dichos análogos de quinolona activos oralmente, y procedimientos de tratamiento de trastornos de proliferación celular mediante la administración de los mismos.

Los compuestos de la presente invención pueden interactuar o no con regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples.

10

A continuación se reproducen los compuestos de la presente invención que tienen las Fórmulas (VII) y (VIII):



15 donde A, V, Y, Z, U¹, U², X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, R⁴, R⁷, R⁸, Q, m, n y p se definen tal como se describe adicionalmente en la presente memoria descriptiva.

Los compuestos de la presente invención pueden ser quirales. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un compuesto quiral es un compuesto que es diferente de su imagen especular, y tiene un enantiómero. Además, los compuestos pueden ser racémicos, o un enantiómero o estereoisómero aislado. Los procedimientos o síntesis de compuestos quirales y de resolución de una mezcla racémica de enantiómeros son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, March, "Advanced Organic Chemistry", John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, (1985).

25 Los compuestos de la presente invención pueden probarse usando ensayos de cribado como los descritos en la presente memoria descriptiva.

Los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden interactuar con regiones de ácidos nucleicos que pueden formar estructuras cuádruples. Dado que las regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples son reguladores de procesos biológicos tales como transcripción de oncogenes, pueden usarse moduladores de la actividad biológica de las estructuras cuádruples como productos terapéuticos contra el cáncer. Las moléculas que interactúan con regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples pueden ejercer un efecto terapéutico en determinados trastornos de proliferación celular y dolencias relacionadas. En particular, la

30

expresión de oncogenes aumentada de forma anómala puede causar trastornos de proliferación celular, y las estructuras cuádruples normalmente regulan por disminución la expresión de oncogenes. Los ejemplos de oncogenes incluyen pero no se limitan a MYC, HIF, VEGF, ABL, TGF, PDGFA, MYB, SPARC, HUMTEL, HER, VAV, RET, H-RAS, EGF, SRC, BCL1, BCL2, DHFR, HMGA y otros oncogenes conocidos para el experto en la materia.

- 5 Además, los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden inducir muerte celular (por ejemplo, apoptosis) y no interactúan con regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples.

- Las moléculas que se unen a regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples pueden ejercer un efecto biológico de acuerdo con diferentes mecanismos, que incluyen por ejemplo, la estabilización de una estructura cuádruple nativa, la inhibición de la conversión de una estructura cuádruple nativa en ADN bicatenario bloqueando la escisión de cadena y la estabilización de una estructura cuádruple nativa que tiene una sustitución de nucleótidos de desestabilización de la estructura cuádruple y otras interacciones específicas de secuencia. Así, los compuestos que se unen a regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples descritas en la presente memoria descriptiva pueden administrarse a células, tejidos u organismos con el fin de proporcionar regulación por disminución de la transcripción de oncogenes y con ello el tratamiento de trastornos de proliferación celular.

- La determinación de si la actividad biológica de ADN nativo que puede formar estructuras cuádruples se modula en una célula, tejido u organismo puede conseguirse mediante la vigilancia de la actividad biológica de las estructuras cuádruples. La estructura cuádruple que forma regiones de actividad biológica de ADN puede vigilarse en células, tejidos u organismos, por ejemplo, mediante la detección de una disminución o un aumento en la transcripción génica en respuesta a la puesta en contacto de la estructura cuádruple que forma el ADN con una molécula. La transcripción puede detectarse directamente observando los transcritos de ARN u observando polipéptidos traducidos por transcritos, que son procedimientos bien conocidos en la técnica.

- Las moléculas que interactúan con ADN de formación de estructura cuádruple y ácidos nucleicos de formación de estructura cuádruple pueden usarse para tratar numerosos trastornos de proliferación celular. Los trastornos de proliferación celular incluyen, por ejemplo, cánceres colorrectales y trastornos neoplásicos hematopoyéticos (es decir, enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético tales como las que proceden de linajes mielóide, linfóide o eritroide, o células precursoras de los mismos). Las enfermedades pueden proceder de leucemias agudas insuficientemente diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides adicionales incluyen, pero no se limitan a, leucemia promielóide aguda (LPMA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC) (Vaickus, Crit. Rev. in *Oncol./Hematol.* 11:267-297 (1991)). Las malignidades linfoides incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (LLA), que incluye LLA de linaje B y LLA de linaje T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), leucemia de las células pilosas (LCP) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Las formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a linfoma no hodgkiniano y variantes del mismo, linfomas de linfocitos T periféricos, célula leucemia/linfoma de estirpe T del adulto (LTA), linfoma de linfocitos T cutáneo (LLTC), leucemia linfocítica granular grande (LGG), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg. Los trastornos de proliferación celular incluyen también cánceres colorrectal, de mama, de pulmón, de hígado, de páncreas, de los ganglios linfáticos, de colon, de próstata, de encéfalo, de cabeza y cuello, de piel, de hígado, de riñón y de corazón. Los compuestos que interactúan con regiones de ADN que pueden formar estructuras cuádruples también pueden usarse para dirigirse a procesos y dolencias relacionados con cáncer, tales como angiogénesis incrementada, mediante la inhibición de la angiogénesis en un sujeto.

- También se divulga en la presente memoria descriptiva un procedimiento para la reducción de la proliferación celular o para el tratamiento o el alivio de trastornos de proliferación celular, que comprende la puesta en contacto de un sistema que tiene un ADN nativo capaz de formar una región cuádruple con un compuesto que tiene una cualquiera de las fórmulas anteriores. El sistema puede ser un grupo de células o uno o más tejidos. El sistema es un sujeto necesitado de un tratamiento de un trastorno de proliferación celular (por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, una rata, un mono o un ser humano). En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para el tratamiento de cáncer colorrectal mediante la administración de un compuesto que interactúa con una región de formación de estructuras cuádruples c-MYC a un sujeto necesitado del mismo, reduciendo así la proliferación celular del cáncer colorrectal. Además, en la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para inhibir la angiogénesis y opcionalmente tratar un cáncer asociado con la angiogénesis, que comprende la administración de un compuesto que interactúa con una región de formación de estructuras cuádruples del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a un sujeto necesitado del mismo, reduciendo así la angiogénesis y opcionalmente tratando un cáncer asociado con la angiogénesis.

Los compuestos que interactúan con regiones de formación de estructuras cuádruples de ADN pueden usarse

también para reducir una infección microbiana, tal como una infección vírica. Los retrovirus ofrecen numerosas dianas potenciales para para la terapéutica dirigida a un G-cuádruple. Los G-cuádruples se han relacionado como elementos funcionales en al menos dos estructuras secundarias formadas por ARN o ADN vírico en VIH, la estructura de conector de dímero (DLS) y el flap de ADN central (CDF). Además, los aptámeros de ADN que son capaces de adoptar estructuras cuádruples intermoleculares o intramoleculares son capaces de inhibir la replicación vírica. En un ejemplo, los aptámeros de ADN son capaces de inhibir la replicación vírica por direccionamiento de la glucoproteína de envoltura (supuestamente). En otro ejemplo, los aptámeros de ADN inhiben la replicación vírica mediante direccionamiento de la VIH-integrasa respectivamente, lo que sugiere la implicación de estructuras cuádruples nativas en interacción con la enzima integrasa.

10

Las estructuras de conectores de dímeros, que son comunes para todos los retrovirus, sirven para unir dos copias del genoma viral junto por una interacción no covalente entre los dos extremos 5' de las dos secuencias de ARN víricas. El dímero genómico se asocia de forma estable con la proteína gag en la partícula de virus maduro. En el caso de VIH, el origen de esta unión no covalente puede trazarse hasta una secuencia de 98 pares de bases que contienen varias series de al menos dos guaninas consecutivas (por ejemplo, la 3' para la formación de dímeros de ARN *in vitro*). La observación de la dependencia de un catión (potasio) para la formación y estabilidad del dímero *in vitro*, además de la incapacidad de una secuencia de sentido contrario de lograr una dimerización eficaz, ha revelado que la estructura de unión más probable es un G-cuádruple intermolecular.

20 Antes de la integración en el genoma del hospedador, el ADN vírico de transcripción inversa forma un complejo de preintegración (PIC) con al menos dos importantes proteínas víricas, la integrasa y la transcriptasa inversa, que posteriormente es transportada en el núcleo. El flap de ADN central (CDF) se refiere una cola monocatenaria de 99 bases de longitud de la cadena +, que se produce cerca del centro del ADN bicatenario vírico, del que se conoce que tiene un papel en la importación nuclear del PIC. Se ha demostrado que la emulación por el oligonucleótido del CDF forma G-cuádruples intermoleculares en sistemas sin células.

Así, los compuestos que reconocen las regiones de formación de estructuras cuádruples pueden usarse para estabilizar la estructura de conector de dímero y prevenir así el desacoplamiento de las dos cadenas de ARN. Además, al unirse a la estructura cuádruple formada por el CDF, pueden desorganizarse los episodios de reconocimiento y/o unión para el transporte nuclear del PIC. En cualquier caso, puede existir una ventaja sustancial con respecto a otras terapias antivirales. Los actuales regímenes de terapias antirretrovirales de alta actividad (HAART) se basan en el uso de combinaciones de fármacos dirigidos hacia la VIH proteasa y la VIH integrasa. El requisito de regímenes de múltiples fármacos es reducir al mínimo la aparición de resistencias, que en general se desarrollarán muy rápidamente cuando se usan agentes de forma aislada. La fuente de esta resistencia tan rápida es la ausencia de fidelidad de la enzima transcriptasa inversa que produce una mutación aproximadamente una vez en cada 10.000 pares de bases. Una ventaja del direccionamiento de estructuras cuádruples víricas con respecto a las dianas de proteína es que el desarrollo de resistencia es lento o es imposible. Una mutación puntual de la estructura cuádruple diana puede poner en riesgo la integridad de la estructura cuádruple y conducir a una copia no funcional del virus. Un único agente terapéutico basado en este concepto puede sustituir a los múltiples regímenes farmacológicos empleados en la actualidad, con los beneficios al mismo tiempo de reducción del coste y eliminación de interacciones perniciosas entre fármacos.

En la presente memoria descriptiva se divulga un procedimiento para la reducción de una valoración microbiana en un sistema, que comprende la puesta en contacto de un sistema que tiene una región de formación de cuádruple de ADN nativo con un compuesto que tiene una cualquiera de las fórmulas anteriores. El sistema puede ser uno o más células o tejidos. Los ejemplos de valoraciones microbianas incluyen pero no se limitan a valoraciones víricas, bacterianas o fúngicas. El sistema puede ser un sujeto necesitado de un tratamiento para una infección vírica (por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, una rata, un mono o un ser humano). Los ejemplos de infecciones víricas incluyen infecciones debidas a virus de la hepatitis (por ejemplo, hepatitis B o C), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), rinovirus, virus de herpes zóster (VHZ), virus del herpes simple (por ejemplo, VHS-1 o VHS-2), citomegalovirus (CMV), virus de vacuna, virus de la gripe, virus de la encefalitis, hantavirus, arbovirus, virus del Nilo Occidental, virus del papiloma humano (VPH), virus de Epstein-Barr y virus sincitial respiratorio. En la presente memoria descriptiva se divulga también un método para el tratamiento de infección por VIH mediante la administración de un compuesto que tiene una cualquiera de las fórmulas anteriores a un sujeto necesitado del mismo, reduciendo así la infección por VIH.

Identificación de compuestos que pueden unirse a regiones de formación de estructuras cuádruples de ADN

Los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden unirse a regiones de formación de estructuras

cuádruples de ADN donde la actividad biológica de esta región, a menudo expresada como "señal", producida en un sistema que contiene el compuesto es diferente que la señal producida en un sistema que no contiene el compuesto. Mientras las señales de fondo pueden evaluarse cada vez que se sondea una nueva molécula mediante el ensayo, la detección de la señal de fondo no es necesaria cada vez que se somete a ensayo una nueva molécula.

5

Además de determinar si una molécula de prueba o un ácido nucleico de prueba dan lugar a una señal diferente, puede cuantificarse la afinidad de la interacción entre el ácido nucleico y el compuesto. Los valores umbral de CI_{50} , K_d o K_i pueden compararse con los valores medidos de CI_{50} o K_d para cada interacción, e identificar de este modo una molécula de prueba como una molécula de interacción de estructura cuádruple o un ácido nucleico de prueba como un ácido nucleico de formación de estructura cuádruple. Por ejemplo, a menudo se usan valores umbral de CI_{50} o K_d de 10 μM o menos, 1 μM o menos y 100 nM o menos. En otro ejemplo, pueden usarse valores umbral de 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos y 10 pM o menos para identificar moléculas de interacción de estructura cuádruple y ácidos nucleicos de formación de estructura cuádruple.

10

15 Existen numerosos ensayos para la identificación de compuestos que tienen afinidad por regiones de formación de estructuras cuádruples de ADN. En algunos de estos ensayos, la actividad biológica es la unión del ácido nucleico cuádruple a un compuesto y la unión se mide como una señal. En otros ensayos, la actividad biológica es una función de detención de la polimerasa de una estructura cuádruple y el grado de detención se mide como una disminución en una señal. En determinados ensayos, la actividad biológica es la transcripción y los niveles de transcripción pueden cuantificarse como una señal. En otro ensayo, la actividad biológica es la muerte celular y se cuantifica el número de células que sufren muerte celular. Otro ensayo vigila las tasas de proliferación de células cancerosas. Los ejemplos de ensayos son ensayos de unión de fluorescencia, ensayos de desplazamiento de movilidad en gel (véase, por ejemplo, Jin & Pike, *Mol. Endocrinol.* (1996) 10:196-205), ensayos de detención de la polimerasa, ensayos de indicador de transcripción, ensayos de proliferación de células cancerosas y ensayos de apoptosis (véase, por ejemplo, Amersham Biosciences (Piscataway, Nueva Jersey)), y se describen realizaciones de dichos ensayos posteriormente en el Ejemplo 8. Además, pueden usarse ensayos de la topoisomerasa para determinar si las moléculas de interacción de estructuras cuádruples tienen actividad en la vía de la topoisomerasa (véase, por ejemplo, TopoGEN, Inc. (Columbus, Ohio)).

30 Formulación de compuestos

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "sal farmacéuticamente aceptable del mismo" incluye pero no se limita a sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos y ésteres de los compuestos, así como formas de iones bipolares de los mismos, que son conocidas para los expertos en la materia como adecuadas para su uso con seres humanos y animales. (Véase, por ejemplo, Gerge, S. M., y col., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* (1977) 66:1-19).

35

Puede prepararse cualquier formulación adecuada de los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva. En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas no tóxicas estables, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológico aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de clorhidrato, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Se obtienen sales farmacéuticamente aceptables usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden obtenerse sales farmacéuticamente aceptables haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado para producir un anión fisiológicamente aceptable. También se preparan sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

45

50 Un compuesto puede formularse como una composición farmacéutica y administrarse a un mamífero hospedador necesitado de dicho tratamiento. En una realización, el mamífero hospedador es un ser humano. Puede usarse cualquier vía de administración adecuada, lo que incluye pero no se limita a vías oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica y subcutánea.

55

En una realización, un compuesto es para administración sistémica (por ejemplo, oral) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden estar confinados en cápsulas de gelatina dura o blanda, introducidos en comprimidos o incorporados directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas,

elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente de desintegración tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria, o saborizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un soporte líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Pueden estar presentes otros materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertos con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como sabor de cereza o naranja. Cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria es farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo puede administrarse también por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales pueden prepararse en una solución de tampón, a menudo solución salina con tampón de fosfato, mezclada opcionalmente con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar la proliferación de microorganismos. El compuesto se prepara a veces como una formulación que contiene polimatríz para dicha administración (por ejemplo, un liposoma o microsoma). Los liposomas se describen por ejemplo en la patente de EE.UU. nº 5.703.055 (Feigner, y col.) y en Gregoriadis, Liposome Technology vols. I a III (2ª ed. 1993).

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que están adaptadas para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, encapsuladas opcionalmente en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación última debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El soporte o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser realizada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización del filtro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente filtradas estériles.

Para administración tópica, los presentes compuestos pueden aplicarse en forma líquida. Los compuestos son administrados a menudo como composiciones o formulaciones, en combinación con un soporte dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido. Se conocen ejemplos de composiciones dermatológicas útiles usadas para suministrar compuestos en la piel (véase, por ejemplo, Jacquet, y col. (patente de EE.UU. nº 4.608.392), Geria (patente de EE.UU. nº 4.992.478), Smith, y col. (patente de EE.UU. nº 4.559.157) y Wortzman (patente de EE.UU. nº 4.820.508).

Los compuestos pueden formularse con un soporte sólido, que incluye sólidos finamente divididos tal como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los soportes líquidos incluyen agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que los presentes compuestos pueden disolverse o dispersarse a niveles 5 eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como aromas y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de almohadillas absorbentes, usadas para impregnar vendajes y otros apósitos, o pulverizadas en la zona afectada usando pulverizadores en aerosol o de tipo bomba. Espesantes tales como 10 polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales de minerales modificados también pueden emplearse con soportes líquidos para formar pastas extensibles, geles, pomadas, jabones, y similares, para la aplicación directamente en la piel del usuario.

En general, la concentración del compuesto en una composición líquida es a menudo de aproximadamente el 0,1% en peso a aproximadamente el 25% en peso, a veces de aproximadamente el 0,5% en peso a aproximadamente el 15 10% en peso. La concentración en una composición sólida o semisólida tal como un gel o un polvo a menudo es de aproximadamente el 0,1% en peso a aproximadamente el 5% en peso, a veces de aproximadamente el 0,5% en peso a aproximadamente el 2,5% en peso. Puede prepararse una composición del compuesto como una forma de dosificación unitaria, que se prepara de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la industria farmacéutica. En términos generales, dichas técnicas incluyen la puesta de un compuesto en asociación con soporte(s) y/o 20 excipiente(s) farmacéutico(s) en forma líquida o en forma sólida finamente dividida, o ambas, y después el conformado del producto si se necesita.

En un ejemplo en particular, la composición farmacéutica comprende aproximadamente el 2% p/p de un compuesto que tiene fórmula (I), aproximadamente el 4% de manitol, y aproximadamente el 0,5% de sacarosa. En ejemplos en 25 particular, la formulación tiene un pH de aproximadamente 3,5. Para formulaciones inyectables puede añadirse agua al peso final.

La composición del compuesto puede formularse en cualquier forma de dosificación, tal como comprimidos, cápsulas, cápsulas en gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones también 30 pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad, incluyendo por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener también uno o más estabilizadores.

35 La cantidad del compuesto, o una sal activa o un derivado del mismo, necesaria para su uso en el tratamiento variará no sólo con la sal en particular seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza de la dolencia en tratamiento y la edad y el estado del paciente y en última instancia se aplicará a discreción del médico o profesional clínico responsable.

40 La dosificación útil del compuesto se determina a menudo evaluando su actividad *in vitro* en un sistema de células o tejidos y/o la actividad *in vivo* en un sistema animal. Por ejemplo, los procedimientos para extrapolar una dosificación eficaz en ratones y otros animales en seres humanos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 4.938.949). Dichos sistemas pueden usarse para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) de un compuesto. La relación de 45 dosis entre un efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DE_{50}/DL_{50} . La dosificación del compuesto se sitúa a menudo en un intervalo de concentraciones circulantes para el que la DE_{50} se asocia con una toxicidad baja o inexistente. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse 50 inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. A veces se formula una dosis para alcanzar un intervalo de concentración circulante en plasma que cubra la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en ensayos *in vitro*, ya que dicha información se usa a menudo para determinar con más precisión dosis útiles en los seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

55 Otro ejemplo de determinación de la dosis eficaz para un sujeto es la capacidad de someter a ensayo directamente los niveles de compuesto "libre" y "ligado" en el suero del sujeto de prueba. Dichos ensayos pueden usar emuladores de anticuerpos y/o "biosensores" generados por técnicas de impresión molecular. El compuesto se usa como una plantilla, o "molécula de impresión", para organizar espacialmente monómeros polimerizables antes de su

- polimerización con reactivos catalíticos. La posterior eliminación de la molécula impresa deja una matriz de polímero que contiene una "imagen negativa" repetida del compuesto y es capaz de volver a unir selectivamente la molécula en condiciones de ensayo biológicas (véase, por ejemplo, Ansell, y col., *Current Opinion in Biotechnology* (1996) 7:89-94 y en Shea, *Trends in Polymer Science* (1994) 2:166-173). Dichas matrices de afinidad "impresas" pueden conseguirse mediante ensayos de unión a ligando, con lo que el componente de anticuerpo monoclonal inmovilizado es sustituido por una matriz impresa apropiadamente (véase, por ejemplo, Vlatakis, y col., *Nature* (1993) 361:645-647). A través del uso de marcado con isótopos, puede vigilarse fácilmente la concentración "libre" de compuesto y usarse en los cálculos de CI_{50} . Dichas matrices de afinidad "impresas" también pueden diseñarse de forma que incluyan grupos fluorescentes cuyas propiedades de emisión de fotones cambian de forma mensurable con la unión local y selectiva del compuesto. Estos cambios pueden someterse a ensayo fácilmente en tiempo real usando dispositivos apropiados de fibra óptica, lo que permite a su vez optimizar rápidamente la dosis en un sujeto de prueba basándose en su CI_{50} individual. Se discute un ejemplo de dicho "biosensor" en Kriz, y col., *Analytical Chemistry* (1995) 67:2142-2144.
- 15 En algunas realizaciones, los compuestos y composiciones proporcionados muestran biodisponibilidad oral en un ratón o un sujeto humano. En realizaciones particulares, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden el compuesto de Fórmula (VII) o (VIII) que están biodisponibles oralmente al menos en el 15% en un ratón o un sujeto humano. En otras realizaciones, las composiciones están biodisponibles oralmente al menos el 20%, el 30%, el 40% o el 50% en un ratón o un sujeto humano. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que la biodisponibilidad oral mostrada por los compuestos de la presente invención puede deberse al menos en parte al estado de protonación de la fracción básica presente en el grupo representado como -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰.

Los compuestos de ejemplo de la presente invención pueden seleccionarse de manera que el ácido conjugado de la fracción básica presente en el grupo representado como -W, -L-W, o -L-N(R)-W⁰ tiene un pKa de entre aproximadamente 7 y 9, de manera que el grupo está protonado aproximadamente el 50% en un intervalo de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0. En algunas realizaciones, el anillo de homopiperazina de la fórmula (VII) y (VIII), puede servir como fracción básica, tal como se describe anteriormente.

- 30 La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas en forma de dosificación unitaria, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII).

En realizaciones específicas, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria, que comprende un compuesto de Fórmula (VII) o Fórmula (VIII), donde una administración oral única de la forma de dosificación a un sujeto proporciona un ABC (8 h) de al menos 1.000 ng/mL*h, preferentemente más de 2.000 ng/mL*h, más preferentemente más de 10.000 ng/mL*h.

La biodisponibilidad (F) es una medida de la magnitud en que una dosis administrada de un fármaco llega a la circulación sistémica o al sitio de acción pretendido. La biodisponibilidad depende de la tasa de absorción y de la magnitud en que se elimina o metaboliza el fármaco antes de alcanzar la circulación sistémica. Por ejemplo, un fármaco administrado oralmente pasa a través del hígado antes de llegar a la circulación sistémica, y puede estar sujeto a un metabolismo de primer paso por el hígado o la excreción biliar.

Para ciertas indicaciones terapéuticas, la dosificación oral es la vía de administración preferida, debido a su seguridad, comodidad y ventajas económicas. El desarrollo de compuestos altamente biodisponibles oralmente es con frecuencia una consideración importante en el desarrollo de moléculas bioactivas como agentes terapéuticos.

Una biodisponibilidad oral deficiente puede provocar exposición variable al fármaco activo, y puede conducir a falta de eficacia o a sobreexposición a un agente en particular. Por ejemplo, la variabilidad polimórfica en enzimas de metabolización de fármacos, tales como citocromo P450 o metiltransferasas, o la coadministración con fármacos que inhiben dichas enzimas, puede reducir el aclaramiento de primer paso y aumentar la exposición al fármaco hasta niveles tóxicos o no deseados.

En la absorción, que describe la tasa y la extensión en que un fármaco sale de su sitio de administración, influyen diversas variables que incluyen las propiedades fisicoquímicas del fármaco que influyen en el transporte a través de membranas y la forma de dosificación seleccionada. Para compuestos administrados por vía oral, la absorción tiene lugar predominantemente en el tracto gastrointestinal (GI), y en ella influyen factores que incluyen el área superficial disponible para absorción, la magnitud del flujo sanguíneo, el estado físico del fármaco y la concentración local del fármaco en el sitio de absorción. En particular, la solubilidad acuosa influirá tanto en la tasa como en el sitio de

absorción. Los fármacos de baja solubilidad muestran a menudo baja biodisponibilidad o absorción irregular, donde en la magnitud de absorción influyen factores tales como el nivel de dosis, el estado nutricional del paciente y la forma de dosificación. En formas de dosificación sólidas, la tasa de disolución puede ser el factor limitante para la determinación de la absorción.

5

En la solubilidad del fármaco influye el gradiente del pH en el tracto GI. Por ejemplo, fármacos básicos que son solubles en el entorno de bajo pH del estómago (pH aproximadamente 1,2) pueden hacerse menos solubles cuando el fármaco llega al entorno de pH más elevado del intestino delgado (pH 5 a 7, en general de aproximadamente 6,5), dependiendo del pKa del fármaco. Si bien la forma no ionizada de un fármaco será absorbida más rápidamente que la forma ionizada en una posición en particular en el tracto GI, la tasa global de absorción desde el intestino es mayor que la del estómago, con independencia del estado de ionización, debido a la mayor área superficial disponible. (Véase por ejemplo, Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics (9ª ed.) (Goodman, y col., eds.) (McGraw-Hill) (1996).

10

15 Muchos fármacos están formados por ácidos débiles o bases débiles, que están presentes en solución en equilibrio entre sus formas ionizada (es decir, cargada) y no ionizada. La magnitud de la ionización está determinada por el pKa del fármaco así como por el pH de la solución. El pH influye en la tasa de disociación de los ácidos débiles y las bases débiles. Los ácidos débiles se disocian, para ionizarse, en un entorno alcalino, mientras que las bases débiles se ionizan en un entorno ácido.

20

El porcentaje de ionización puede calcularse usando la ecuación 1 para ácidos HA y la ecuación 2 para ácidos BH⁺:

$$\% \text{ ionización} = 100 / (1 + 10^{(pK_a - pH)}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

25

$$\% \text{ ionización} = 100 / (1 + 10^{(pH - pK_a)}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Quando el pH es igual al pKa, el compuesto estará ionizado al 50%; es decir, la relación entre fármaco ionizado y no ionizado será de 50:50. En la ecuación de Henderson-Hasselbalch, pKa = pH cuando el log [base conjugada]/[ácido] = 1. Un aumento en una unidad de pH con respecto al pKa (es decir, un aumento en la alcalinidad de la solución) provoca una disminución en el porcentaje de ionización de un ácido BH⁺ a sólo el 9,1%, y provoca que un ácido HA se convierta en el 90,9% en la forma de la base conjugada ionizada. Un aumento de dos unidades de pH desplaza esencialmente un ácido BH⁺ a la forma de base conjugada no iónica (0,99%), mientras que el ácido HA se vuelve casi completamente ionizado (99%). Se observa lo contrario cuando la solución se hace más ácida en relación con el valor de pKa del fármaco. (Véase por ejemplo, Block, en Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry (10ª ed.) (Delgado & Remers, eds.) (Lippincott-Raven) (1998).

35

En un aspecto, un compuesto activo oralmente de la composición de la presente invención se selecciona de manera que los compuestos están ionizados aproximadamente en el 50% a un pH comprendido entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9. Dichos compuestos pueden mostrar una biodisponibilidad oral y una eficacia óptimas.

40

En determinadas realizaciones, los grupos preferidos para -W, -L-W y -L-N(R)W⁰ son aquellos que muestran una constante de disociación, pKa, en soluciones acuosas de tal magnitud que al menos una parte de la amina está ionizada en valores de pH fisiológicos, por ejemplo, en valores de pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9. Las aminas que muestran un pKa de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10, preferentemente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, pueden ser especialmente muy adecuadas.

45

Farmacocinética

Basándose en la cantidad de un compuesto en muestras tomadas en diferentes puntos temporales, pueden determinarse los parámetros farmacocinéticos. Los tipos de parámetros farmacocinéticos y la metodología para determinar los parámetros pueden ser seleccionados apropiadamente por el experto en la materia. Los ejemplos de parámetros farmacocinéticos que pueden evaluarse incluyen, pero no se limitan a, la concentración plasmática máxima (pico) de fármaco (C_{máx}) (expresada normalmente en ng/ml); el tiempo en el que se produce la concentración plasmática máxima de fármaco (tiempo máximo; T_{máx}); y el área bajo la curva de concentración-tiempo del fluido (por ejemplo, plasma) (ABC). El experto en la materia es capaz de calcular dichos parámetros (por ejemplo, Mei y col., *AAPS Journal* (2006) 8(3) artículo 58 (dirección <http://www.aapsj.org>)).

55

La biodisponibilidad oral puede evaluarse midiendo el "área bajo la curva" (ABC) o la C_{máx}, dos parámetros bien conocidos en la técnica. El ABC se determina representando gráficamente la concentración sérica o plasmática del

fármaco a lo largo del eje de ordenadas (eje Y) con respecto al tiempo a lo largo de la abscisa (eje X). En general, los valores para ABC representan una serie de valores tomados de todos los sujetos en una población de prueba y por tanto son valores medios promediados en toda la población de prueba.

- 5 ABC_{0-8} (ng.h/ml) es el área bajo la curva de concentración plasmática con respecto al tiempo desde 0 a 8 horas, y puede calcularse usando la regla trapezoidal lineal de acuerdo con Gibaldi, M. y Perrier, D. *Pharmacokinetics*, 2ª edición, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1982). $ABC_{0-\infty}$ es el área bajo la curva de concentración plasmática con respecto al tiempo, extrapolada desde el tiempo cero al infinito (expresado en ng.h/ml).
- 10 Pueden determinarse otros parámetros farmacocinéticos. Por ejemplo, $T_{1/2}$ es la vida media terminal (expresada en h); Vd_{ss} es el volumen de distribución en estado estacionario (expresado en L/kg); y Cl_s es el aclaramiento sistémico (expresado en L/h/kg).

Dosificación

- 15 La dosificación útil del compuesto se determina a menudo evaluando su actividad *in vitro* en un sistema de células o tejidos y/o actividad *in vivo* en un sistema animal. Por ejemplo, en la técnica se conocen procedimientos para extrapolar una dosificación eficaz en ratones y otros animales a seres humanos (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 4.938.949). Dichos sistemas pueden usarse para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) de un compuesto. La relación de dosis entre un efecto tóxico y uno terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DE_{50}/DL_{50} . La dosificación del compuesto se sitúa a menudo en un intervalo de concentraciones circulantes para el que la DE_{50} se asocia con una toxicidad baja o inexistente. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración usada. Para cualquier compuesto
- 20 usado en los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis se formula a veces de manera que se alcance un intervalo de concentración plasmática circulante que cubre la Cl_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en ensayos *in vitro*, ya que la información se usa a menudo se usa para determinar con más precisión las dosis útiles en los seres
- 25 humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Otro ejemplo de determinación eficaz de la dosis para un sujeto es la capacidad de someter a ensayo directamente los niveles de compuesto "libre" y "ligado" compuesto en el suero del sujeto de prueba. Dichos ensayos pueden usar emuladores de anticuerpos y/o "biosensores" generados por técnicas de impresión molecular. El compuesto se usa

35 como plantilla, o "molécula de impresión", para organizar espacialmente monómeros polimerizables antes de su polimerización con reactivos catalíticos. La posterior eliminación de la molécula impresa deja una matriz de polímeros que contiene una "imagen negativa" repetida del compuesto y es capaz de volver a unir selectivamente la molécula en condiciones de ensayo biológicas (véase, por ejemplo, Ansell, y col., *Current Opinion in Biotechnology* (1996) 7:89-94 y en Shea, *Trends in Polymer Science* (1994) 2:166-173).

40 Dichas matrices de afinidad "impresas" pueden conseguirse mediante ensayos de unión a ligando, con lo que el componente de anticuerpo monoclonal inmovilizado es sustituido por una matriz impresa apropiadamente (véase, por ejemplo, Vlatakis, y col., *Nature* (1993) 361:645-647). A través del uso de etiquetado con isótopos, puede vigilarse fácilmente la concentración "libre" de compuesto y usarse en los cálculos de Cl_{50} . Dichas matrices de

45 afinidad "impresas" también pueden diseñarse de forma que incluyan grupos fluorescentes cuyas propiedades de emisión de fotones cambian de forma mensurable con la unión local y selectiva del compuesto. Estos cambios pueden someterse a ensayo fácilmente en tiempo real usando dispositivos apropiados de fibra óptica, lo que permite a su vez optimizar rápidamente la dosis en un sujeto de prueba basándose en su Cl_{50} individual. Se expone un ejemplo de dicho "biosensor" en Kriz, y col., *Analytical Chemistry* (1995) 67:2142-2144.

50 Las dosis de ejemplo incluyen cantidades en miligramos o microgramos del compuesto por kilogramo de sujeto o peso de la muestra, por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por

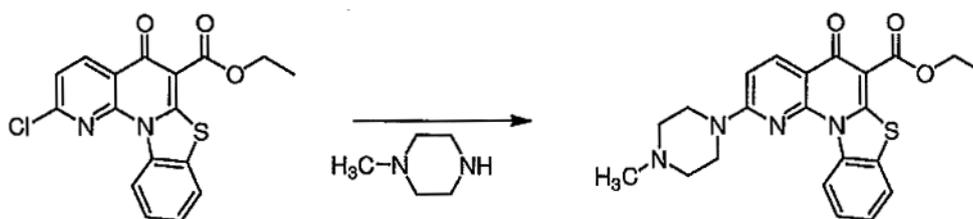
55 kilogramo. Debe entenderse que las dosis apropiadas de una molécula pequeña dependen de la potencia de la molécula pequeña con respecto a la expresión o actividad para modular. Cuando debe administrarse una o más de estas moléculas pequeñas a un animal (por ejemplo, un ser humano) con el fin de modular la expresión o actividad de un polipéptido o un ácido nucleico descrito en la presente memoria descriptiva, un médico, un veterinario o un investigador puede, por ejemplo, prescribir una dosis relativamente baja al principio, incrementando posteriormente

la dosis hasta que se obtenga una respuesta apropiada. Además, debe entenderse que la dosis específica para cualquier sujeto animal en particular dependerá de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad para su modulación.

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplo de referencia 1

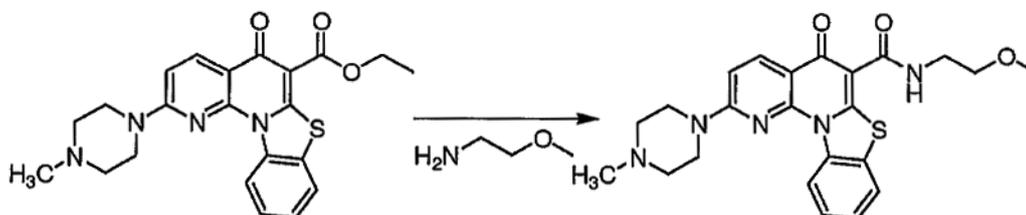
10



A una suspensión del cloroéster (5,00 g, 13,94 mmol) en ACN (50 mL) se añadió N-metilpiperazina (3,10 mL, 27,95 mmol) y se calentó la mezcla a reflujo durante toda la noche. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se recogió el precipitado por filtración para producir el producto deseado como un sólido marrón claro (4,7 g, 80%).
 15 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 9,47 (d, 1H), 8,62 (d, 1H), 7,74 (dd, 1H), 7,51 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 6,89 (d, 1H), 4,50 (q, 2H), 3,85 (t, 4H), 2,62 (t, 4H), 2,40 (s, 3H), 1,49 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 423 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 2

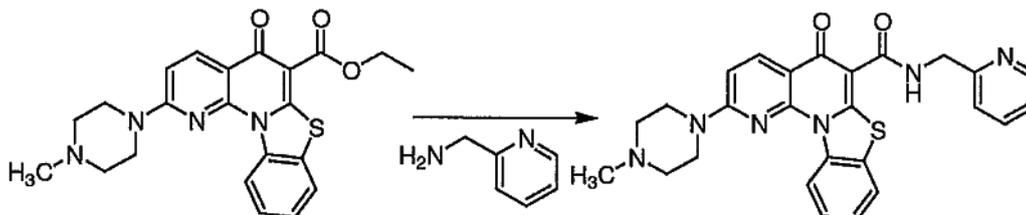
20



A una solución de éster (150 mg, 0,34 mmol) y 2-metoxietilamina (0,50 mL, 5,80 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl₃ (150 mg, 1,12 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL) y NaOH 6 N (25 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la
 25 capa orgánica con H₂O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 470 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 3

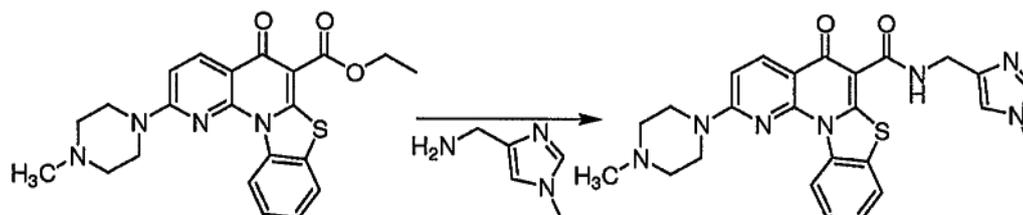
30



A una solución de éster (1,45 g, 3,44 mmol), piridin-2-ilmetanamina (1,00 mL, 9,78 mmol) y DBU (1,50 mL, 10,03
 35 mmol) en DCM (40 mL) se añadió AlCl₃ (475 mg, 7,31 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la reacción con DCM (400 mL) y NaOH 1 N (200 mL) y se agitó durante

10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 100 mL), salmuera (100 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituro el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (1,07 g, 64%). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 11,24 (t, 1H), 9,50 (d, 1H), 8,62 (m, 2H), 7,77 (dd, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,53 (m, 1H), 7,49 (m, 2H), 6,93 (d, 1H), 4,89 (d, 2H), 3,88 (t, 4H), 2,63 (t, 4H), 2,41 (s, 5 3H). LCMS (ES): m/z 485 [M+1]⁺.

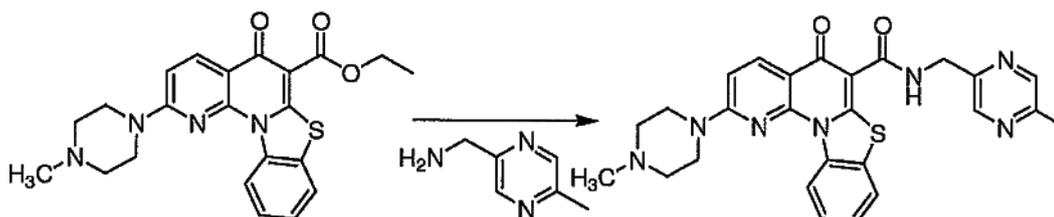
Ejemplo de referencia 4



10

A una solución de éster (150 mg, 0,34 mmol), (1-metil-1H-imidazol-4-il)metanamina (0,15 mL, 1,35 mmol) y DBU (2,00 mL, 1,33 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl₃ (130 mg, 0,97 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL) y NaOH 6 N (25 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto de la reacción
15 TCL preparatoria sobre sílice (MeOH 10%/DCM) para producir el producto deseado. LCMS (ES): m/z 506 [M+1]⁺.

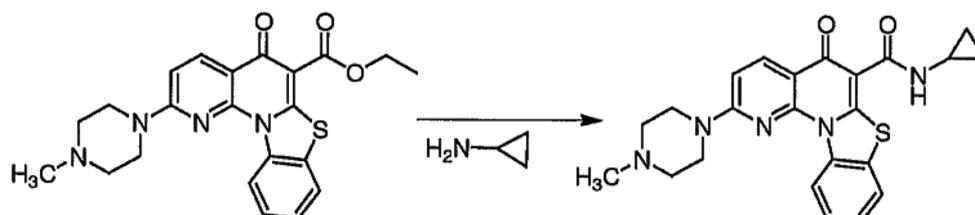
Ejemplo de referencia 5



20

A una solución de éster (72 mg, 0,17 mmol), (5-metilpirazin-2-il)metanamina (0,10 mL, 0,81 mmol) y DBU (0,20 mL, 1,34 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl₃ (80 mg, 0,60 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL) y NaOH 3 N (25 mL) y se agitó durante 10 min.
25 Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituro el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (60 mg, 71%). LCMS (ES): m/z 500 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 6



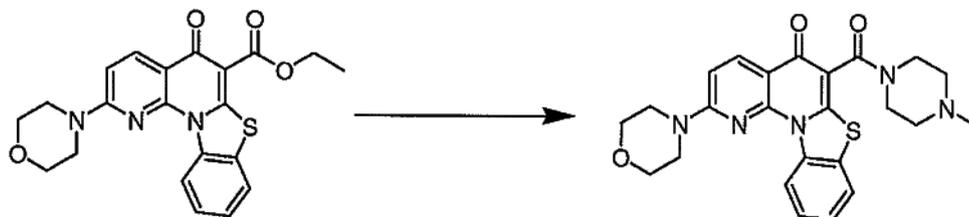
30

A una solución de éster (100 mg, 0,238 mmol) y ciclopropilamina (37,7 mg, 0,66 mmol) en DCM (10 mL) se añadió DBU (0,35 mL) y AlCl₃ (130 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la
35 reacción con DCM (30 mL) y NaOH 6 N (10 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 10 mL), salmuera (20 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión

reducida y se trituró el sólido resultante en acetato de etilo para dar el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 431 [M+1]⁺

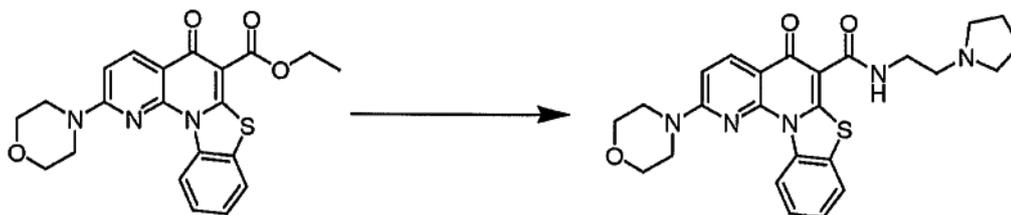
Ejemplo de referencia 7

5



A una suspensión del éster de morfolino (1,0 g, 2,44 mmol) en cloruro de metileno (20 mL) se añadió 1-metilpiperazina (370 mg, 3,66 mmol) y cloruro de aluminio (487 mg, 3,66 mmol) y se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó el disolvente a vacío y se añadió HCl 1 N (10 mL) seguido por 2 mL de una solución saturada de ácido tartárico y se agitó la mezcla durante 30 minutos, hasta homogeneidad y se diluyó con 50 mL de agua. Se extrajo la mezcla resultante 3 x 20 mL de acetato de etilo (desechado) y a continuación se basificó con NaOH 1 N. Se recogió por filtración el sólido resultante, se secó y se trituró con acetonitrilo (20 mL). La filtración proporcionó el compuesto final como un sólido blanco (1,184 g, ligeramente humedecido con acetonitrilo). LCMS (ES): m/z 464 [M+1]⁺.

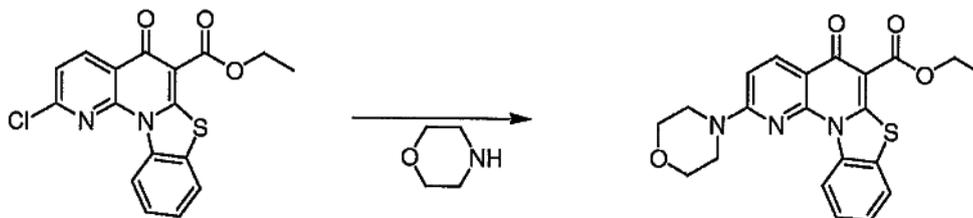
Ejemplo de referencia 8



20

A una suspensión del éster de morfolino (1,0 g, 2,44 mmol) en cloruro de metileno (20 mL) se añadió 1,2-aminoetilpirrolidina (418 mg, 3,66 mmol) y cloruro de aluminio (487 mg, 3,66 mmol) y se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó el disolvente a vacío y se añadió HCl 1 N (10 mL) seguido por 2 mL de una solución saturada de ácido tartárico y se agitó la mezcla durante 30 minutos, hasta homogeneidad y se diluyó con 50 mL de agua. Se extrajo la mezcla resultante 3 x 20 mL de acetato de etilo (desechado) y a continuación se basificó con NaOH 1 N. Se recogió por filtración el sólido resultante, se secó y se trituró con acetonitrilo (20 mL). La filtración proporcionó el compuesto final como un sólido blanco (900 mg, 77%). LCMS (ES): m/z 478 [M+1]⁺.

30 **Ejemplo de referencia 9**

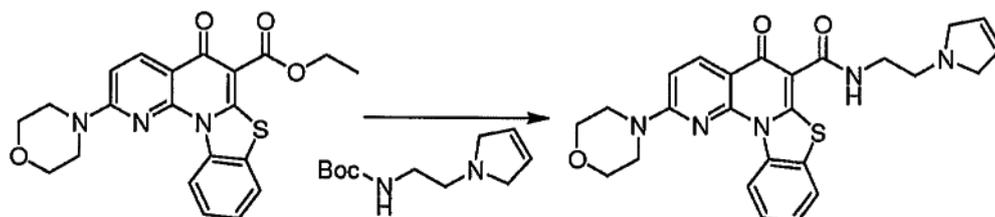


A una suspensión del cloroéster (15,00 g, 41,81 mmol) en ACN (150 mL) se añadió morfolina (7,5 mL, 85,74 mmol) y se calentó la mezcla a reflujo durante toda la noche. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se recogió el precipitado por filtración. A continuación se disolvió el sólido en CHCl₃ (600 mL) y se hizo pasar a través de un lecho

35

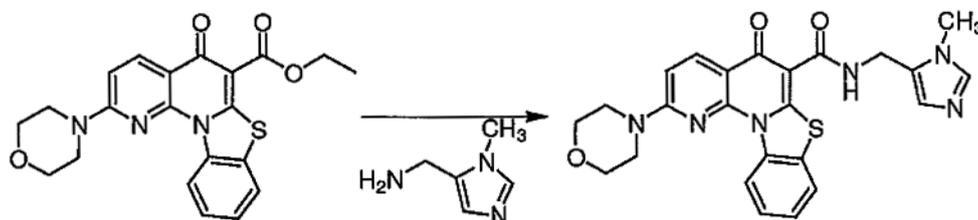
de CELITE™. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanquecino (14,00 g, 82%). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 9,36 (d, 1H), 8,60 (d, 1H), 7,70 (dd, 1H), 7,47 (m, 1H), 7,37 (m, 1H), 6,84 (d, 1H), 4,51 (q, 2H), 3,92 (t, 4H), 3,77 (t, 4H), 1,49 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 410 [M+1]⁺.

5

Ejemplo de referencia 10

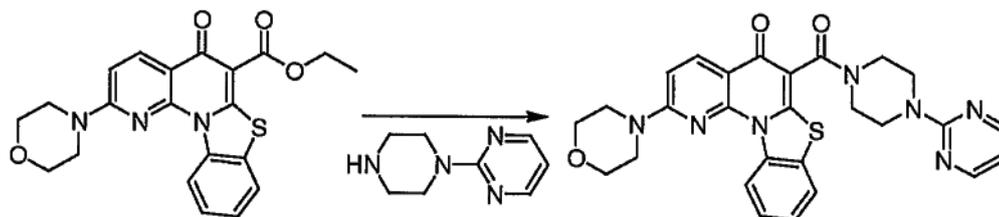
- 10 A una solución de t-butilo 2-(2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etilcarbamato (160 mg, 0,75 mmol) en DCM (1 mL) se añadió HCl (2,0 mL, 4 M en dioxano). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió en DCM (10 mL) y DBU (0,56 mL, 3,74 mmol). Se añadió el éster (150 mg, 0,37 mmol) a la reacción seguido por AlCl₃ (150 mg, 1,12 mmol) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL) y NaOH 3 N (50 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto de la reacción sobre columna de gel de sílice (MeOH 0-10%/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (130 mg, 75%). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 10,60 (t, 1H), 9,44 (d, 1H), 8,62 (d, 1H), 7,75 (dd, 1H), 7,48 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 6,91 (d, 1H), 5,78 (s, 2H), 3,94 (t, 4H), 3,81 (t, 4H), 3,66 (q, 2H), 3,63 (s, 4H), 2,96 (t, 2H). LCMS (ES): m/z 476 [M+1]⁺.

20

Ejemplo de referencia 11

- 25 A una solución de éster (150 mg, 0,37 mmol), (1-metil-1H-imidazol-5-il)metanamina (0,15 mL, 1,35 mmol) y DBU (0,20 mL, 1,34 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl₃ (150 mg, 1,12 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h, se añadió más DBU (0,30 mL, 2,01 mmol) y se agitó durante 30 min adicionales. Se diluyó la reacción con DCM (150 mL) y NaOH 6 N (25 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto de la reacción TCL preparatoria sobre sílice (MeOH 10%/DCM) para producir el producto deseado (100 mg, 58%). LCMS (ES): m/z 475 [M+1]⁺.

30

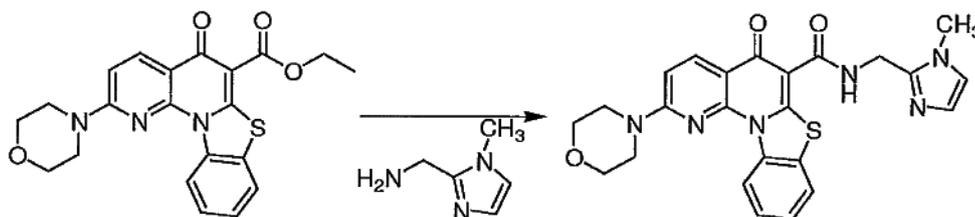
Ejemplo de referencia 12

35

A una solución de éster (100 mg, 0,24 mmol), 2-(piperazin-1-il)pirimidina (0,10 mL, 0,61 mmol) y DBU (0,10 mL, 0,67 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl_3 (100 mg, 0,75 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la reacción con DCM (150 mL) y NaOH 6 N (25 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto de la reacción sobre columna de sílice (MeOH 0-5%/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (80 mg, 63%). LCMS (ES): m/z 528 $[\text{M}+1]^+$.

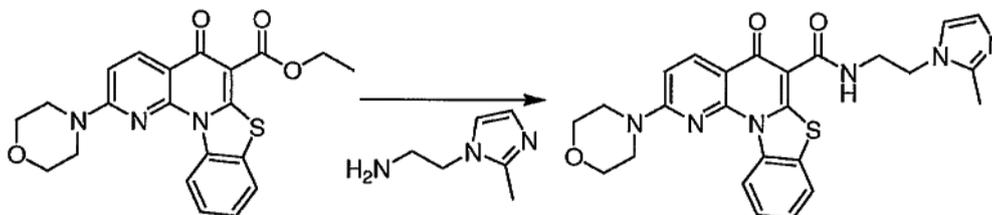
Ejemplo de referencia 13

10



A una solución de éster (750 mg, 1,83 mmol), (1-metil-1H-imidazol-2-il)metanamina (0,50 mL, 4,50 mmol) y DBU (0,80 mL, 5,35 mmol) en DCM (50 mL) se añadió AlCl_3 (750 mg, 5,62 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h. Se diluyó la reacción con DCM (200 mL) y NaOH 3 N (100 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 100 mL), salmuera (100 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto de la reacción sobre columna de sílice (MeOH 0-5%/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (275 mg, 32%). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 11,0 (t, 1H), 9,45 (d, 1H), 8,61 (d, 1H), 7,76 (dd, 1H), 7,50 (m, 1H), 7,45 (m, 1H), 6,99 (d, 1H), 6,90 (d, 1H), 6,83 (d, 1H), 4,82 (d, 2H), 3,93 (t, 4H), 3,81 (t, 4H), 3,70 (s, 3H). LCMS (ES): m/z 475 $[\text{M}+1]^+$.

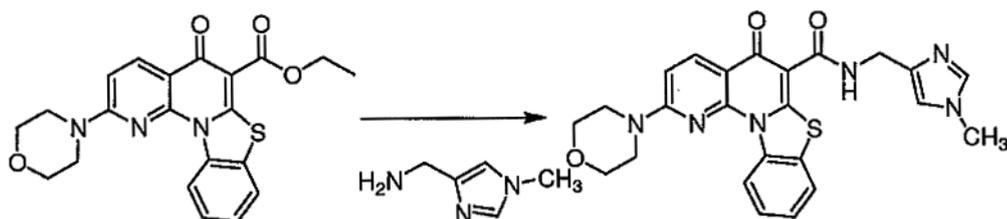
Ejemplo de referencia 14



25

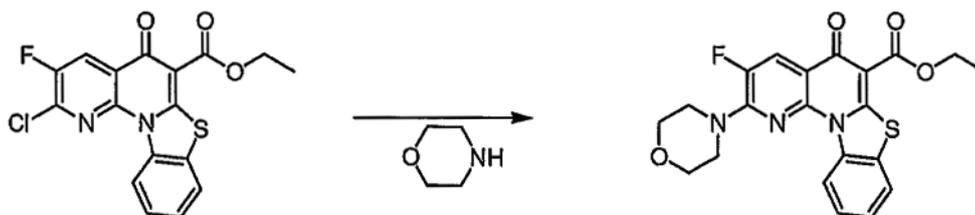
A una solución de éster (500 mg, 1,22 mmol), 2-(2-metil-1H-imidazol-1-il)etanamina (325 mg, 2,60 mmol) y DBU (1,00 mL, 6,69 mmol) en DCM (18 mL) se añadió AlCl_3 (350 mg, 2,62 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la reacción con DCM (200 mL) y NaOH 3 N (50 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanquecino (360 mg, 60%). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 10,77 (t, 1H), 9,47 (d, 1H), 8,60 (d, 1H), 7,78 (dd, 1H), 7,53 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 6,93 (m, 3H), 4,15 (t, 2H), 3,94 (t, 4H), 3,83 (t, 4H), 3,79 (q, 2H), 2,42 (s, 3H). LCMS (ES): m/z 489 $[\text{M}+1]^+$.

35 Ejemplo de referencia 15

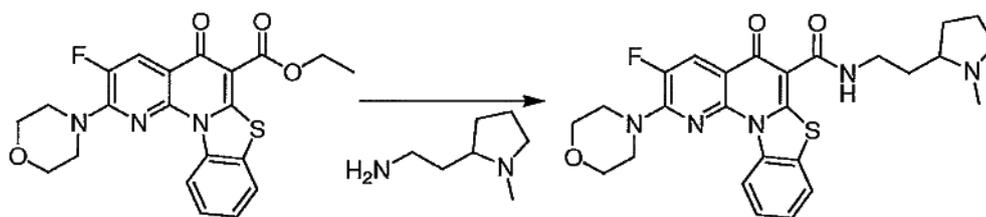


5 A una solución de éster (105 mg, 0,26 mmol), (1-metil-1H-imidazol-4-il)metanamina (0,10 mL, 0,90 mmol) y DBU (0,10 mL, 0,71 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl_3 (75 mg, 0,56 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL), NaOH 6 N (50 mL) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto de la reacción TCL preparatoria sobre sílice (MeOH 5%/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (40 mg, 33%). LCMS (ES): m/z 475 $[\text{M}+1]^+$.

10

Ejemplo de referencia 16

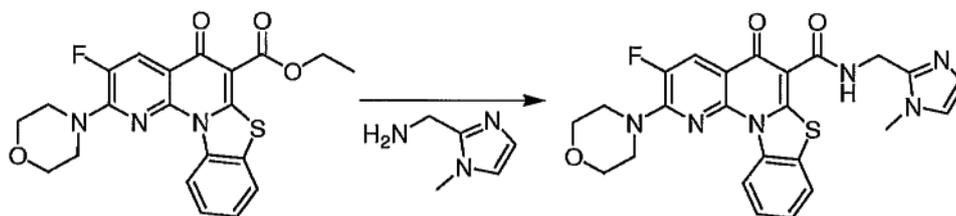
15 A una suspensión del cloroéster (6,08 g, 16,14 mmol) en ACN (100 mL) se añadió morfolina (2,8 mL, 32,01 mmol) y se calentó la mezcla a reflujo durante 3 h. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se recogió el precipitado por filtración. A continuación se disolvió el sólido en CHCl_3 (200 mL) y se hizo pasar a través de un lecho de CELITE™. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (5,00 g, 73%). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 9,37 (d, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,72 (dd, 1H), 7,47 (m, 20 1H), 7,42 (m, 1H), 4,50 (q, 2H), 3,94 (t, 4H), 3,81 (t, 4H), 1,48 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 428 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo de referencia 17

25

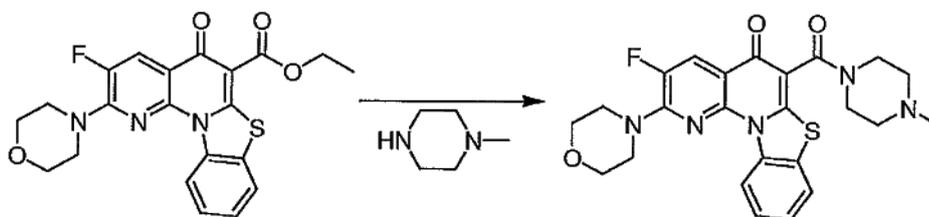
A una solución de éster (700 mg, 1,64 mmol) y 2-(1-metilpirrolidin-2-il)etanamina (0,70 mL, 4,83 mmol) en DCM (25 mL) se añadió AlCl_3 (645 mg, 4,84 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se diluyó la reacción con DCM (150 mL), NaOH 6 N (50 mL) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOAc}$ (1:1) para dar el producto deseado como un sólido blanco (690 mg, 83%). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 10,45 (t, 1H), 9,41 (d, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,76 (dd, 1H), 7,50 (m, 1H), 7,49 (m, 1H), 3,96 (t, 4H), 3,85 (t, 4H), 3,55 (m, 2H), 3,06 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,17 (m, 1H), 2,08 (m, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,56 (m, 2H). LCMS (ES): m/z 510 $[\text{M}+1]^+$.

35 **Ejemplo de referencia 18**



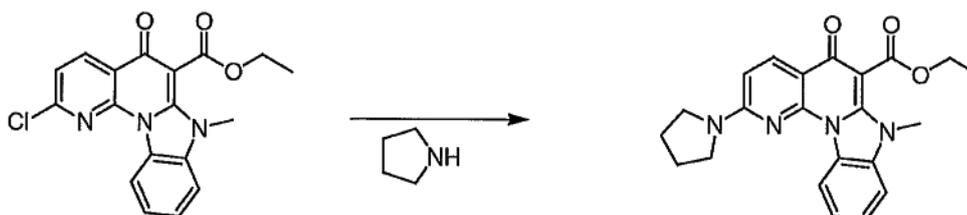
A una solución de éster (515 mg, 1,20 mmol) y C-(1-metil-1H-imidazol-2-il)-metilamina (199,5, 1,79 mmol) en DCM (40 mL) se añadió DBU (0,98 mL) y AlCl_3 (352,3 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL) y NaOH 6 N (25 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en acetato de etilo para dar el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 493 $[\text{M}+1]^+$

10 Ejemplo de referencia 19



A una solución de éster (300 mg, 0,70 mmol) y 1-metilpiperazina (0,25 mL, 2,25 mmol) en DCM (15 mL) se añadió AlCl_3 (305 mg, 2,29 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL), NaOH 6 N (50 mL) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOAc}$ (1:1) para dar el producto deseado como un sólido blanco (280 mg, 83%). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 9,37 (d, 1H), 8,29 (d, 1H), 7,65 (dd, 1H), 7,48 (m, 1H), 7,40 (m, 1H), 3,95 (t, 4H), 3,88 (m, 2H), 3,82 (t, 4H), 3,48 (m, 2H), 2,54 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 2,32 (s, 3H). LCMS (ES): m/z 482 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo de referencia 20

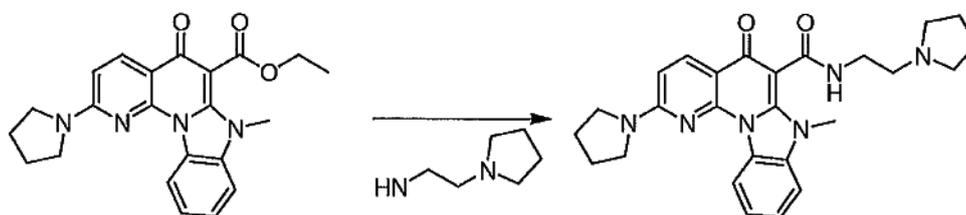


25

Se calentó una suspensión de cloroéster (800 mg, 2,25 mmol), y pirrolidina (0,40 mL, 4,79 mmol) en DMF (5,0 mL) a 65°C durante 15 min en microondas. Se diluyó la reacción con EtOAc (50 mL) y se recogió por filtración el precipitado resultante para producir el producto deseado. LCMS (ES): m/z 391 $[\text{M}+1]^+$

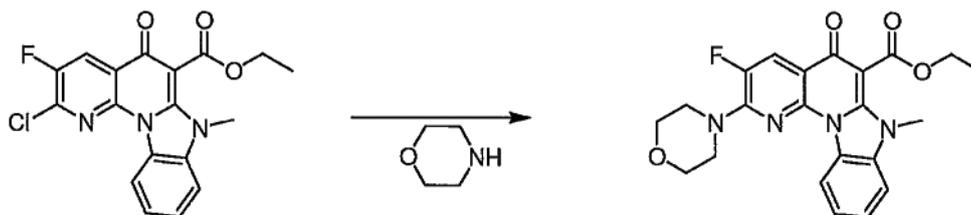
30

Ejemplo de referencia 21



A una solución de éster (675 mg, 1,73 mmol), 2-(pirrolidin-1-il)etanamina (0,65 mL, 5,13 mmol) y DBU (0,75 mL, 5,02 mmol) en DCM (30 mL) se añadió AlCl_3 (680 mg, 5,10 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL), NaOH 6 N (50 mL) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 mL) y se agitó durante 15 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 100 mL), salmuera (100 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto en bruto de la reacción sobre columna de gel de sílice (MeOH 5%/TEA 2%/DCM) para dar el producto deseado como un sólido blanco (538 mg, 68%). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 9,91 (t, 1H), 8,90 (d, 1H), 8,45 (d, 1H), 7,37 (m, 3H), 6,52 (d, 1H), 4,00-3,40 (br s, 4H), 3,81 (s, 3H), 3,65 (q, 2H), 2,79 (t, 2H), 2,63 (m, 4H), 2,14 (m, 4H), 1,81 (m, 4H). LCMS (ES): m/z 459 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo de referencia 22

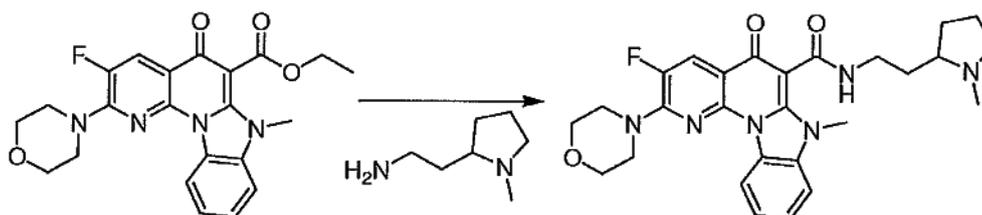


15

Se hizo reaccionar el cloroéster (1,0 eq, 250 mg, 2,67 mmol) con morfolina (0,29 ml) en NMP (1 ml) en calentamiento por microondas a 100°C durante 5 min. Se filtró el sólido que se formó al enfriarse y se lavó con NMP. Se sometió a sonicación el material en AcOEt caliente y se filtró después de enfriamiento. Se aisló el producto **2** como un sólido blanco (173 mg, 62% de rendimiento). LCMS (ES): puro al 95%, m/z 425 $[\text{M}+1]^+$.

20

Ejemplo de referencia 23



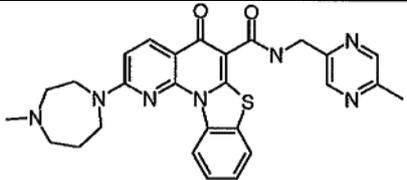
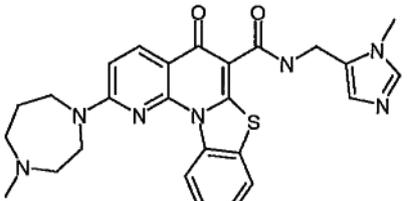
25

Se mezclaron éster (1,0 eq, 312 mg, 0,73 mmol) y 2-(1-metilpirrolidin-2-il)etanamina (2,0 eq, 0,21 ml, 1,45 mmol) con DBU (4,0 eq, 0,44 ml, 2,94 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml). Se añadió cloruro de aluminio (2,0 eq, 196 mg, 1,47 mmol) y se agitó la reacción a 45°C durante 5 horas. Se eliminó el disolvente a vacío y se trató el sólido con una solución acuosa saturada de ácido tartárico durante una hora. Después de añadir agua, se ajustó el pH a 12-14 añadiendo NaOH. Se extrajo el producto con CH_2Cl_2 (4x). Se lavaron los extractos combinados con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente al vacío. Se trituró el residuo en una mezcla de AcOEt y hexanos, se filtró y se secó para proporcionar el compuesto deseado como un sólido blanquecino (318 mg, 85% de rendimiento). LCMS (ES): puro al 95%, m/z 507 $[\text{M}+1]^+$.

30

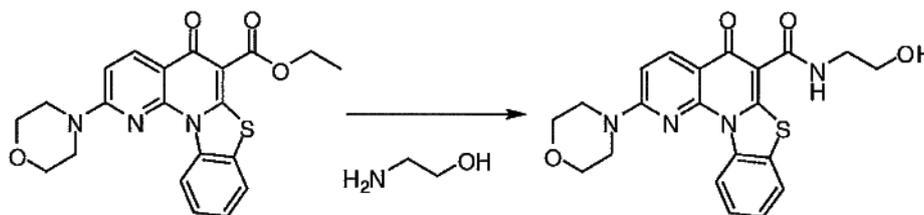
35 Los siguientes compuestos de la invención de la Tabla 1 se prepararon mediante el mismo procedimiento, usando las aminas y los ésteres de etilquinolona apropiados.

Tabla 1

Estructura	PM	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	513,62	514
	501,61	502

Ejemplo de referencia 24

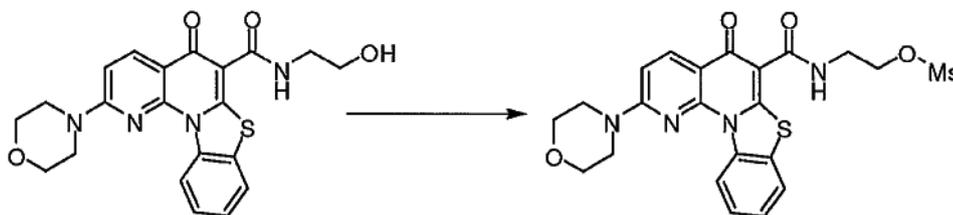
5



Una solución de éster (6,53 g, 15,97 mmol) en etanolamina (30 mL) se agitó a 150°C durante toda la noche. Se diluyó la reacción con H₂O (100 mL) y se recogió por filtración el sólido resultante. Se lavó el sólido con H₂O (2x) y ACN (2x) para producir el producto deseado como un sólido blanco (5,75 g, 85%). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 10,57 (t, 1H), 9,32 (d, 1H), 8,36 (d, 1H), 7,99 (dd, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,48 (m, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,85 (t, 1H), 3,82 (t, 4H), 3,75 (t, 4H), 3,56 (q, 2H), 3,43 (q, 2H). LCMS (ES): m/z 425 [M+1]⁺.

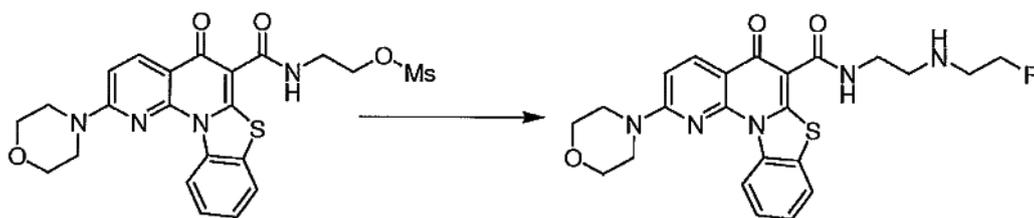
Ejemplo de referencia 25

15



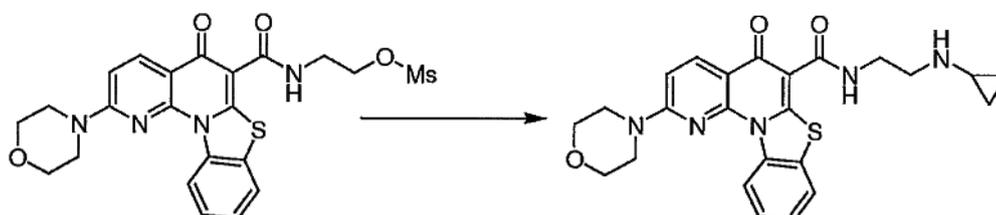
A una solución de alcohol (500 mg, 1,18 mmol) y TEA (0,50 mL, 3,58 mmol) en DCM (30 mL) se añadió MsCl (0,20 mL, 2,58 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se diluyó con DCM (100 mL) y NH₄Cl saturado (50 mL). Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (100 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el producto en bruto de la reacción en ACN para producir el producto deseado como un sólido amarillo claro (400 mg, 68%). El material se usó tal cual sin purificación adicional. LCMS (ES): m/z 503 [M+1]⁺.

25 Ejemplo de referencia 26



Una solución de mesilato (90 mg, 0,18 mmol), 2-fluoroetanamina (40 mg, 0,40 mmol) y TEA (0,05 mL) en NMP (1,5 mL) se calentó a 130°C durante 20 min en microondas. Se diluyó la reacción con ACN (5 mL) y se recogió por 5 filtración el sólido resultante. Se purificó el producto en bruto de la reacción en TLC sobre gel de sílice (MeOH 10%/DCM) para producir el producto deseado. LCMS (ES): m/z 470 [M+1]⁺.

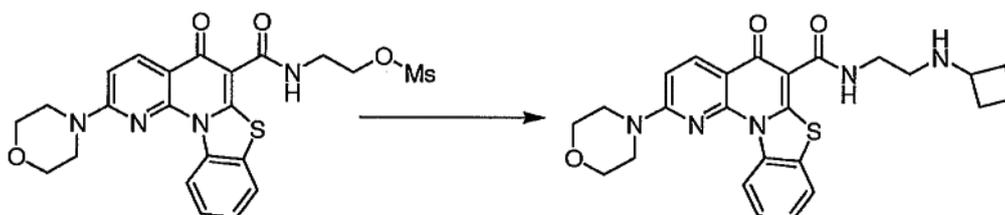
Ejemplo de referencia 27



10

Una solución de mesilato (50 mg, 0,10 mmol), ciclopropilamina (0,10 mL, 1,75 mmol), HCl (1 N, 0,05 mL) y TEA (0,05 mL) en NMP (1,5 mL) se calentó a 130°C durante 20 min en microondas. Se purificó el producto en bruto de la 15 reacción en HPLC de fase inversa para producir el producto deseado. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 10,64 (t, 1H), 9,45 (d, 1H), 8,63 (d, 1H), 7,77 (dd, 1H), 7,50 (m, 1H), 7,42 (m, 1H), 6,92 (d, 1H), 3,94 (t, 4H), 3,82 (t, 4H), 3,66 (q, 2H), 3,01 (t, 2H), 2,00 (m, 1H), 0,43 (m, 4H). LCMS (ES): m/z 464 [M+1]⁺

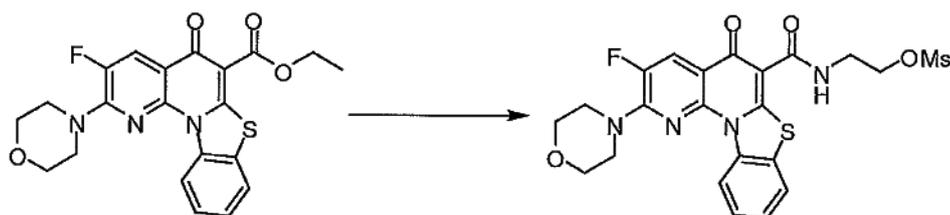
Ejemplo de referencia 28



20

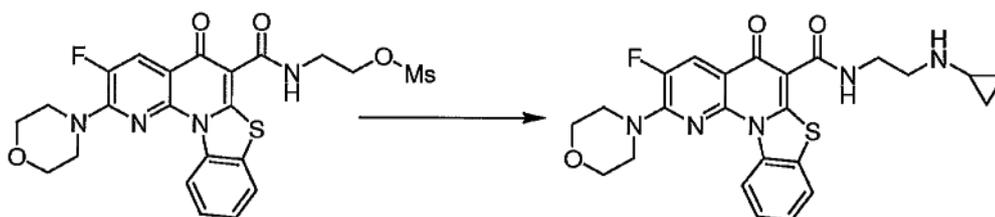
Una solución de mesilato (100 mg, 0,20 mmol), ciclobutilamina (0,10 mL, 1,41 mmol), HCl (1 N, 0,05 mL) y TEA (0,05 mL) en ACN (2,0 mL) se calentó a 120°C durante 15 min en microondas. Se recogió por filtración el precipitado 25 resultante y se purificó en TLC sobre gel de sílice (MeOH 15%/DCM) para producir el producto deseado (65 mg, 98%). LCMS (ES): m/z 478 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 29



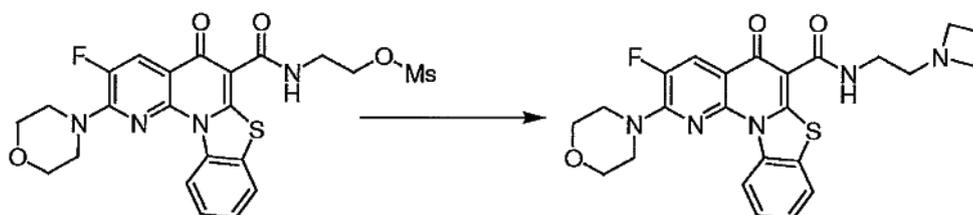
Se calentó el éster (0,5 g, 1,16 mmol) y etanolamina (0,7 mL, 11,63 mmol) en 3 mL de NMP a 160°C durante 20 min (microondas). Se filtró el sólido formado, se lavó varias veces con MeOH y se secó con aire al vacío. Se obtuvo el alcohol como un sólido blanquecino y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Al alcohol (0,204 g, 0,46 mmol) y la trietilamina en DCM (10 mL) se añadió MsCl a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió diclorometano (100 mL) y se lavó la solución resultante con solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 100 mL), salmuera (100 mL), se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío para producir el mesilato como un sólido amarillo.

10 Ejemplo de referencia 30



Una solución de mesilato (50 mg) y ciclopropilamina (0,2 mL) en ACN (1 mL) se calentó a 100°C durante 20 min (microondas). Se eliminó el disolvente al vacío y se trituroó el compuesto con acetato de etilo para dar un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 482 [M+1]⁺

Ejemplo de referencia 31

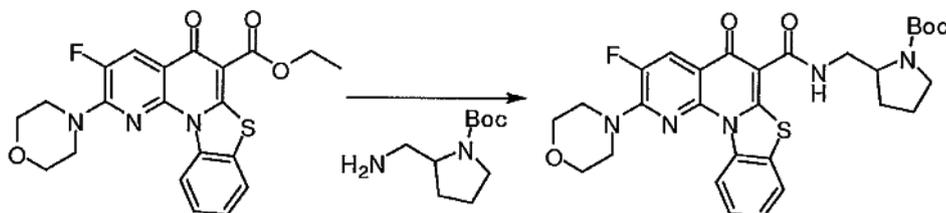


20

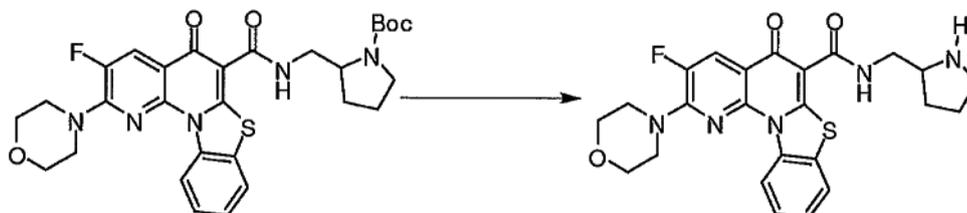
Una solución de mesilato (54 mg) y clorhidrato de ciclobutilamina (0,2 g) y TEA (0,2 mL) en ACN (1 mL) se calentó a 90°C durante 1 h (microondas). Se eliminó el disolvente al vacío y se purificó el residuo por TLC sobre gel de sílice (MeOH 10%/DCM) para dar un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 482 [M+1]⁺

25

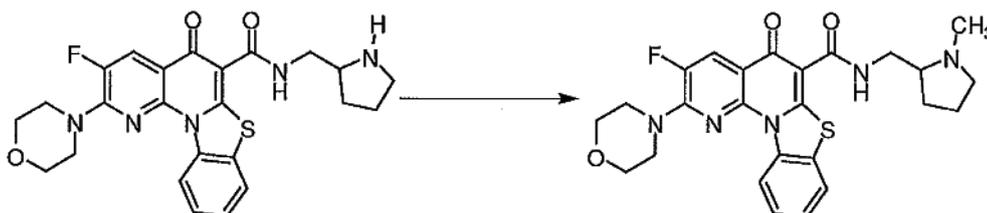
Ejemplo de referencia 32



30 A una solución de éster (1,00 g, 2,34 mmol), (1-metilpirrolidin-2-il)metanamina (1,20 g, 5,99 mmol) y DBU (1,80 mL, 12,06 mmol) en DCM (40 mL) se añadió AlCl₃ (650 mg, 4,87 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la reacción con DCM (150 mL) y NaOH 1 N (50 mL) y se agitó durante 15 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 100 mL), salmuera (100 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituroó el sólido resultante en ACN para dar el producto
35 deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 582 [M+1]⁺.

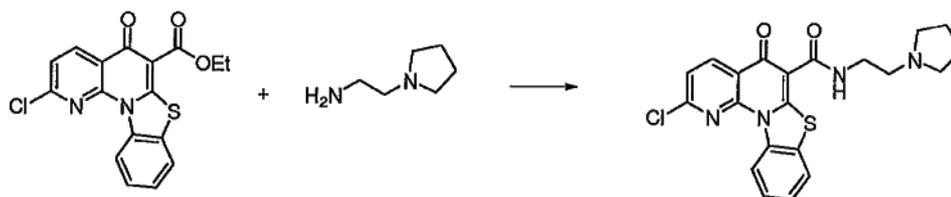
Ejemplo de referencia 33

- 5 A una solución de Boc-amina (321 mg, 0,55 mmol) en DCM (3,0 mL) se añadió HCl (3,0 mL, 4 M en dioxano) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se diluyó la reacción con DCM (150 mL) y NaOH 6 N (50 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida para producir el producto deseado como un sólido blanco (250 mg, 94%).
- 10 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 10,63 (t, 1H), 9,44 (d, 1H), 8,33 (d, 1H), 7,77 (dd, 1H), 7,53 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 3,91 (t, 4H), 3,86 (t, 4H), 3,61 (m, 1H), 3,43 (m, 2H), 3,03 (m, 1H), 2,94 (m, 1H), 1,97 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,75 (m, 1H), 1,52 (m, 1H). LCMS (ES): m/z 482 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 34

15

- A una solución de amina (40 mg, 0,08 mmol) en DCM (5,0 mL) y TEA (0,05 mL) se añadió yodometano (0,05 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituro el sólido resultante en ACN. Se purificó el producto bruto de la reacción en TLC sobre gel de sílice (MeOH 10%/DCM) para
- 20 producir el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 496 [M+1]⁺.

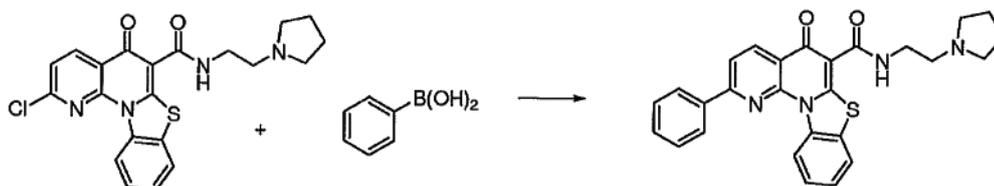
Ejemplo de referencia 35

25

- Se sintetizó la cloroamida deseada en rendimiento del 72% usando el procedimiento que usa la condición de cloruro de aluminio que usa cloroéster y amina. LCMS (ES): puro al 95%, m/z 427 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 36

30

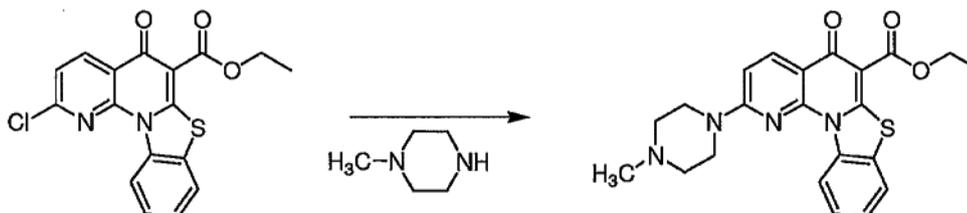


Se mezclaron la cloroamida (1,0 eq, 100 mg, 0,23 mmol) y ácido bencenoborónico (2,0 eq, 57 mg, 0,47 mmol) con acetato de sodio (3,0 eq, 58 mg, 0,70 mmol) en DMF (1 ml). Después de añadir PdCl₂ (dppf) (0,1 eq, 19 mg, 0,02 mmol), se calentó la mezcla con microondas a 100°C durante 5 min. Se filtró la solución a través de CELITE™ y se precipitó el material añadiendo acetato de etilo y hexanos. Después de purificación por HPLC preparatoria, se aisló el producto deseado como un sólido marrón (51 mg, 47% de rendimiento). LCMS (ES): puro al 95%, m/z 469 [M+1]⁺.

Ejemplo de referencia 38

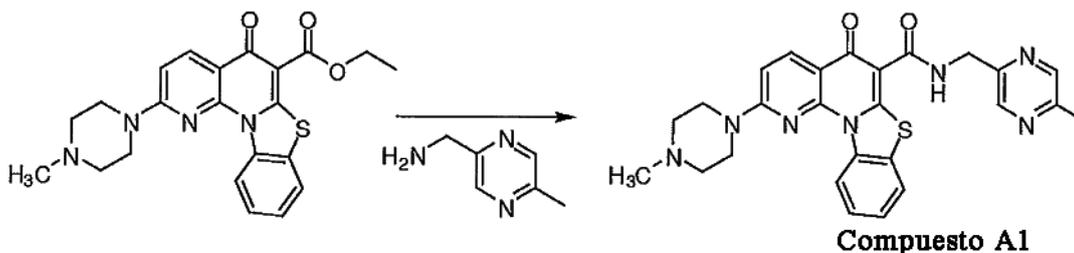
10

Síntesis del compuesto A1



15 A una suspensión del cloroéster (5,00 g, 13,94 mmol) en CH₃CN (50 mL) se añadió N-metilpiperazina (3,10 mL, 27,95 mmol) y se calentó la mezcla a reflujo durante toda la noche. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se recogió el producto por filtración para producir el producto deseado como un sólido marrón claro (4,7 g, 80%). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 9,47 (d, 1H), 8,62 (d, 1H), 7,74 (dd, 1H), 7,51 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 6,89 (d, 1H), 4,50 (q, 2H), 3,85 (t, 4H), 2,62 (t, 4H), 2,40 (s, 3H), 1,49 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 423 [M+1]⁺.

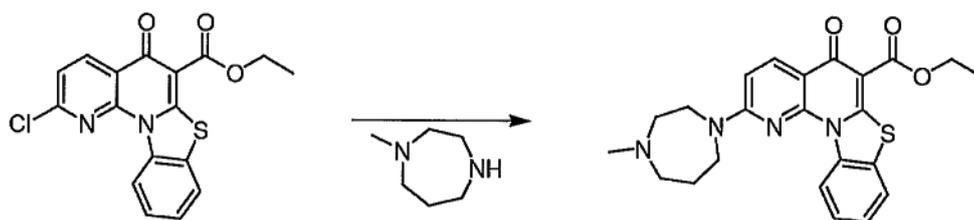
20



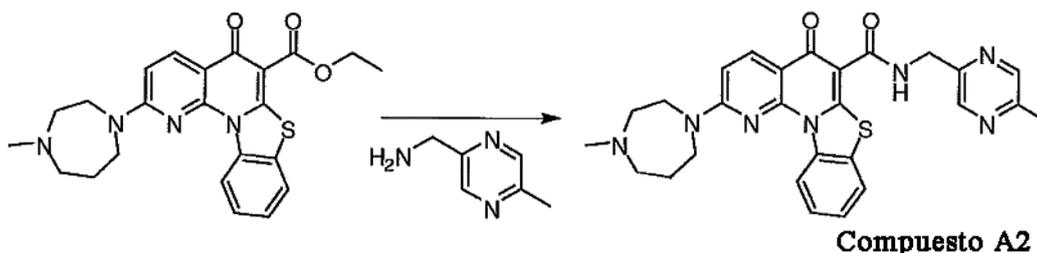
25 A una solución de éster (72 mg, 0,17 mmol), (5-metilpirazin-2-il)metanamina (0,10 mL, 0,81 mmol) y DBU (0,20 mL, 1,34 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl₃ (80 mg, 0,60 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL) y NaOH 3 N (25 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H₂O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituro el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (60 mg, 71%). LCMS (ES): m/z 500 [M+1]⁺.

30 Ejemplo 1

Síntesis del compuesto A2



A una suspensión del cloroéster (3,51 g, 9,7 mmol) en CH_3CN (50 mL) se añadió N-metilhomopiperazina (1,34 mL, 10 mmol) y trietilamina (1,49 mL, 10 mmol). Se calentó la mezcla a reflujo durante toda la noche. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se recogió el producto por filtración para producir el producto deseado como un sólido marrón claro (2,85 g). LCMS (ES): m/z 437 $[\text{M}+1]^+$.

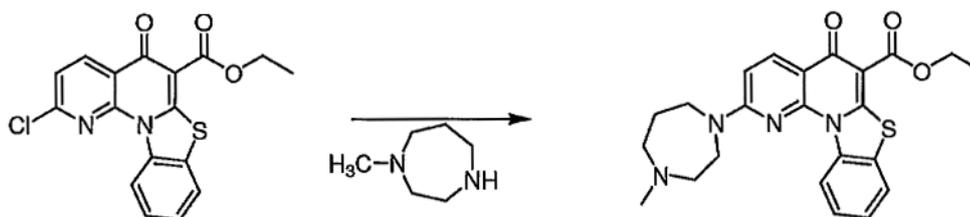


10 A una solución de éster (2,85 mg, 6,53 mmol), (5-metilpirazin-2-il)metanamina (2,45 mL), y DBU (2,93 mL) en DCM (100 mL) se añadió AlCl_3 (2,67 g). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Se diluyó la reacción con DCM (100 mL) y NaOH 4 N (100 mL) y se agitó durante 15 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 100 mL), salmuera (100 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (1,98 g). LCMS (ES): m/z 514 $[\text{M}+1]^+$.

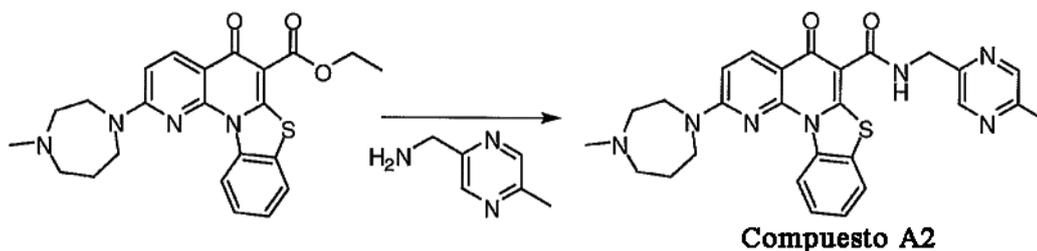
Ejemplo 2

Síntesis a gran escala del compuesto A2

20



A una suspensión del cloroéster (20,0 g, 55,90 mmol) en ACN (300 mL) se añadió N-metilhomopiperazina (13,9 mL, 111,70 mmol) y se calentó la mezcla a reflujo durante toda la noche. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se recogió el precipitado por filtración. Se disolvió el sólido resultante en CHCl_3 (500 mL) y se filtró a través de CELITE™. Se eliminó el disolvente a presión reducida para producir el producto deseado como un sólido (16,07 g, 66%). LCMS (ES): m/z 437 $[\text{M}+1]^+$.

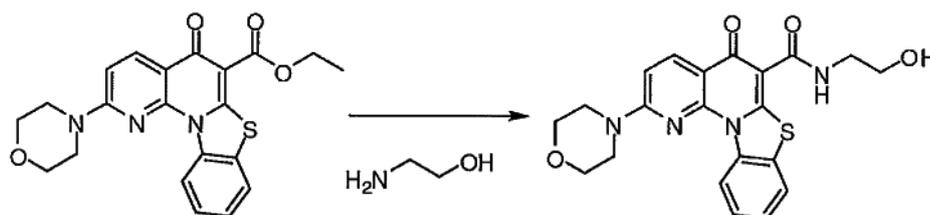


A una solución de éster (2,24 g, 5,15 mmol), 2-(aminometil)-5-metilpirazina (1,27 g, 10,32 mmol) y DBU (2,3 mL, 15,38 mmol) en DCM (50 mL) se añadió AlCl_3 (2,05 g, 15,39 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Se diluyó la reacción con DCM (200 mL) y NaOH 3 N (50 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con H_2O (2 x 100 mL), salmuera (100 mL), y se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el sólido resultante en ACN para dar el producto deseado (1,80 g) como un sólido amarillo claro. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 11,28 (t, 1H), 9,52 (d, 1H), 8,57 (m, 2H), 8,45 (d, 1H), 7,74 (m, 1H), 7,44 (m, 2H), 6,78 (d, 1H), 4,86 (d, 2H), 3,90 (br, 4H), 2,86 (m, 2H), 2,65 (m, 2H), 2,56 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,15 (m, 2H). LCMS (ES): m/z 485 $[\text{M}+1]^+$. LCMS (ES): m/z 514 $[\text{M}+1]^+$.

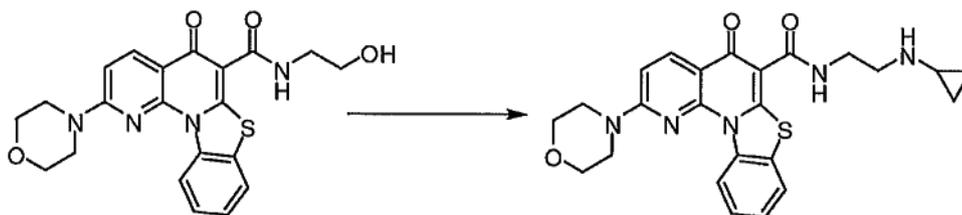
Ejemplo de referencia 39

Síntesis del compuesto A3

15



Una solución de éster (6,53 g, 15,97 mmol) en etanolamina (30 mL) se agitó a 150°C durante toda la noche. Se diluyó la reacción con H_2O (100 mL) y se recogió el precipitado resultante por filtración. Se lavó el sólido con H_2O (2x) y ACN (2x) para producir el producto deseado como un sólido blanco (5,75 g, 85%). RMN ^1H (DMSO-d_6) δ : 10,57 (t, 1H), 9,32 (d, 1H), 8,36 (d, 1H), 7,99 (dd, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,48 (m, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,85 (t, 1H), 3,82 (t, 4H), 3,75 (t, 4H), 3,56 (q, 2H), 3,43 (q, 2H). LCMS (ES): m/z 425 $[\text{M}+1]^+$.

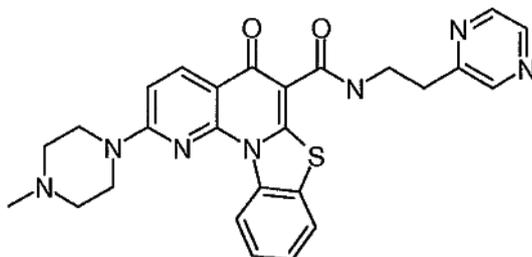


Compuesto A3

25

A una solución de alcohol (4,810 g, 11,343 mmol) y TEA (4,75 mL, 34,076 mmol) en DCM (125 mL) se añadió MsCl (1,70 mL, 21,964 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h, se diluyó con DCM (200 mL) y NH_4Cl saturado (50 mL). Se separaron las capas y se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a presión reducida y se trituró el producto en bruto de la reacción en ACN para producir el mesilato. Se calentó una solución del mesilato anterior, ciclopropilamina (2,20 mL, 33,570 mmol), HCl (1 N, 1,0 mL) y TEA (4,75 mL, 34,076 mmol) en ACN (100 mL) a reflujo durante toda la noche. Se recogió el precipitado por filtración y se purificó sobre columna de gel de sílice para producir la amina deseada como un sólido blanco (1,2 g). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 10,64 (t, 1H), 9,45 (d, 1H), 8,63 (d, 1H), 7,77 (dd, 1H), 7,50 (m, 1H), 7,42 (m, 1H), 6,92 (d, 1H), 3,94 (t, 4H), 3,82 (t, 4H), 3,66 (q, 2H), 3,01 (t, 2H), 2,00 (m, 1H), 0,43 (m, 4H). LCMS (ES): m/z 464 $[\text{M}+1]^+$

30

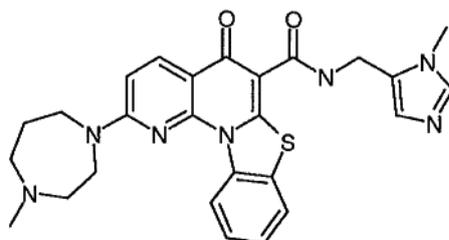
Ejemplo de referencia 40

5

Se preparó el compuesto del Ejemplo 40 por el mismo procedimiento que el compuesto A1, usando la amina y el éster de etilquinolona apropiados.

PM 499,6; LCMS (ES): m/z 500 [M+1]⁺.

10

Ejemplo 3

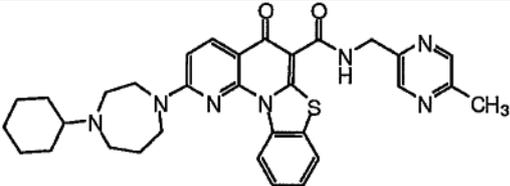
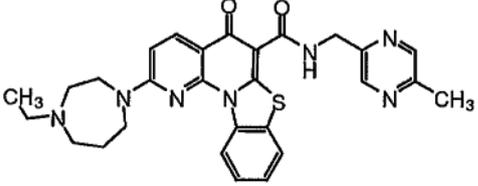
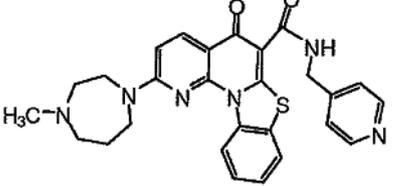
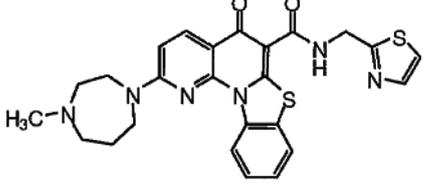
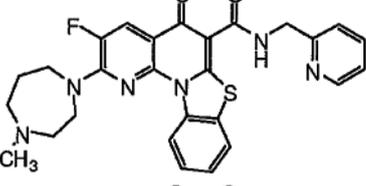
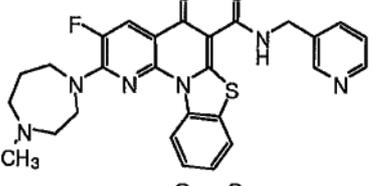
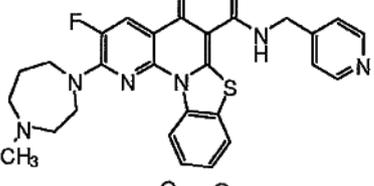
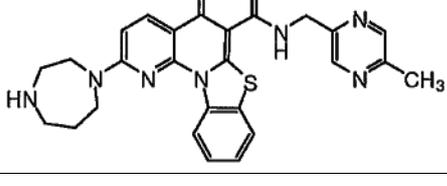
15 El compuesto de Ejemplo 3 se preparó por el mismo procedimiento que el compuesto A2, usando la amina y el éster de etilquinolona apropiados.

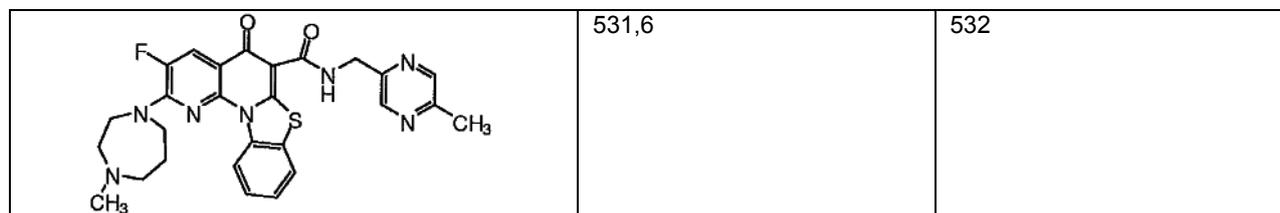
PM 501,61; LCMS (ES): m/z 502 [M+1]⁺.

20 Los siguientes análogos (compuestos de la invención) de la Tabla 6 se prepararon por el mismo procedimiento, usando la amina y el éster de etilquinolona apropiados.

Tabla 6

Estructura	PM	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	573,6	574,2
	541,6	542,2

	581,7	582,2
	527,6	528,2
	498,6	499,1
	504,6	505,2
	516,6	517
	516,6	517
	516,6	517
	499,6	500



Ejemplo 4

Actividad moduladora de la proliferación celular

5

A continuación se describe un protocolo de ensayo de proliferación celular representativo usando colorante azul Alamar (almacenado a 4°C, uso 20 µl por pocillo).

Configuración de placa de 96 pocillos y tratamiento del compuesto

10

a. Dividir y tripsinizar las células.

b. Contar las células usando un hemocitómetro.

15

c. Sembrar en placa 4.000-5.000 células por pocillo en 100 µl de medio y sembrar en placa en una placa de 96 pocillos de acuerdo con la siguiente disposición de placa. Añadir medio de cultivo celular sólo a pocillos B10 a B12. Los pocillos B1 a B9 tienen células pero no compuesto añadido.

	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12	
A	VACÍO				
B	SIN COMPUESTO AÑADIDO			Sólo medio	
C	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	Control
D	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	Comp 1
E	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	Comp 2
F	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	Comp 3
G	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	Comp 4
H	VACÍO				

20

d. Añadir 100 µl de 2x dilución de fármaco a cada pocillo en una concentración mostrada en la disposición de placa anterior. Al mismo tiempo, añadir 100 µl de medios en los pocillos de control (pocillos B10 a B12). El volumen total es 200 µl/pocillo.

e. Incubar cuatro (4) días a 37°C, CO₂ al 5% en una incubadora humidificada.

25

f. Añadir 20 µl de reactivo de azul de Alamar a cada pocillo.

g. Incubar durante cuatro (4) horas a 37°C, CO₂ al 5% en una incubadora humidificada,

30

h. Registrar fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm usando un lector de microplacas.

En los ensayos, se cultivan células con un compuesto de prueba durante aproximadamente cuatro días, a continuación se añade el colorante a las células y se detecta fluorescencia de colorante no reducido después de aproximadamente cuatro horas. Pueden usarse diferentes tipos de células en los ensayos (por ejemplo, células de carcinoma colorrectal humano HCT-116, células cancerosas prostáticas humanas PC-3 y células de carcinoma pancreático humano MiaPaca). Posteriormente se proporcionan los efectos antiproliferativos de compuestos representativos.

40 **Ejemplo 5**

Medida de valores de ARNm en ensayos celulares

Puede usarse un procedimiento de PCR cuantitativo en tiempo real (QPCR) para detectar los cambios del c-myc diana y las copias del gen GAPDH de referencia endógeno en el mismo tubo. En general, las células (15.000 células/pocillo) se siembran en placas de 96 pocillos de base plana (Corning, NY) y se incuban en condiciones de crecimiento normales durante toda la noche. Al día siguiente, se intercambia el medio de cultivo por el que contiene fármacos anticancerosos en diversas concentraciones y se incuban durante 4 h en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37°C. Se extrae ARN total (ARNt) usando el kit RNeasy 96 (QIAGEN, CA). Se determina la concentración del ARNt por el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen (Molecular Probes, OR).

10 Puede realizarse una reacción de transcripción inversa (RT) usando 50 ng de ARNt de cada pocillo en una reacción de 25 µl que contiene 1x tampón TaqMan RT, hexámeros aleatorios 2,5 µM, MgCl₂ 5,5 mM, 0,5 mM de cada trifosfato de desoxinucleósido (dNTP), 30 U de transcriptasa inversa MultiScribe y 10 U de inhibidor de ARNasa. Se incuban las reacciones RT durante 10 min a 25°C, se someten a transcripción inversa durante 30 min a 48°C, se inactivan durante 5 min a 95°C y se colocan a 4°C. Todos los reactivos de RT pueden adquirirse en Applied Biosystems, CA.

La reacción QPCR en tiempo real puede realizarse en una reacción de 50 µl que contiene los 5 µl de ADNc, 1x Universal PCR Master Mix, 1x de conjunto de cebadores y sonda c-myc predesarrollados y 0,8x de conjunto de cebadores y sonda GAPDH predesarrollados. Debido a la abundancia relativa de gen GAPDH en Hela, la concentración de cebadores y sonda GAPDH puede ajustarse para obtener ciclos umbral (C_U) precisos para los dos genes del mismo tubo. El ciclo umbral (C_U) indica el número de ciclos fraccionario al que la cantidad de diana amplificada alcanza un umbral fijado. Al hacerlo, la amplificación GAPDH se interrumpe antes de que pueda limitar los reactivos comunes disponibles para la amplificación del c-myc. El valor ΔRn representa la señal indicadora normalizada menos la señal de base. ΔRn aumenta durante la PCR a medida que aumenta el número de copias de amplicones hasta que la reacción se aproxima a una meseta.

La sonda c-myc se marca con colorante MGB 6FAM™ y la sonda GAPDH se marca con colorante MGB VIC™. Se realiza preincubación durante 2 min a 50°C para activar la enzima AmpErase UNG y a continuación durante 10 min a 95°C para activar la ADN polimerasa AmpliTaq. Se amplifica el ADN durante 40 ciclos de 15 s a 95°C y durante 1 min a 60°C. El c-myc humano y el ADNc GAPDH se amplifican, se detectan y se cuantifican en tiempo real usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, CA), que se ajusta para detectar los colorantes indicadores 6-FAM y VIC simultáneamente.

35 Los datos pueden analizarse usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM y Microsoft Excel. La cuantificación relativa se realiza usando la curva patrón y el procedimiento de C_U comparativo al mismo tiempo, y los dos procedimientos dieron resultados equivalentes. Se sabe que el ciclo para el cual la gráfica de amplificación cruza el C_U refleja de forma precisa los valores de ARNm relativos. (Véase Heid, y col., *Genome Res.* (1996) 6:986-994; Gibson, y col., *Genome Res.* (1996) 6:995-1001). Las reacciones QPCR se preparan por triplicado para cada muestra de ADNc y se promedian los valores C_U triplicados. Todos los reactivos, incluido el conjunto de cebadores y sonda predesarrollado pueden adquirirse en Applied Biosystems, CA.

Ejemplo 645 Caracterización *in vitro*

Pueden usarse varios procedimientos para la caracterización *in vitro* de los compuestos de la presente invención, lo que incluye pero no se limita a i) ensayos de detención; ii) ensayo de competencia cuádruple/doble; iii) huellas de cuadroma; y iv) ensayo directo en ausencia de una molécula competidora.

50 Ensayos de detención

Los ensayos de detención son pantallas de primer paso de alto rendimiento para la detección de fármacos que se unen a y estabilizan el G-cuádruple diana. En general, se crea un oligonucleótido de plantilla de ADN, que contiene la secuencia de nucleótidos de la estructura cuádruple "diana" con respecto a la cual se desea realizar un cribado del fármaco. A continuación se hibrida un ADN cebador de marcado por fluorescencia en el extremo 3' del ADN de plantilla. A continuación se introduce una polimerasa de ADN como, por ejemplo, polimerasa Taq para sintetizar una cadena complementaria de ADN extendiéndola a partir del cebador marcado por fluorescencia. Cuando el avance de la polimerasa Taq no se ve entorpecido, sintetiza una copia de longitud completa de la plantilla. La adición de un

fármaco de ensayo que simplemente se une a un ADN bicatenario pero que no se une selectivamente a la región cuádruple produce una disminución en la síntesis del producto de longitud completa y un aumento concomitante de copias de ADN de longitud variable. Sin embargo, si el fármaco de prueba se une selectivamente a y estabiliza el cuádruple, el avance de la polimerasa se detiene sólo en el cuádruple, y se sintetiza un "producto de detención" 5 característico.

Los compuestos se criban inicialmente en una única concentración, y se vuelven a someter a ensayo los "aciertos" en un intervalo de dosis para determinar un valor CI_{50} (es decir, la concentración de fármaco necesaria para producir una proporción entre producto de detención/producto de longitud completa de 1:1). Estos productos se visualizan 10 mediante electroforesis capilar.

Ensayo de competidor cuádruple/doble

La selectividad de compuestos para la secuencia cuádruple diana en relación con el ADN bicatenario puede medirse 15 usando un ensayo de competencia (es decir, "cribado de selectividad"). Este cribado de selectividad usa el ensayo de detención como un sistema indicador para medir la capacidad relativa de una secuencia de ADN añadida externamente para competir con la estructura cuádruple diana formada en la plantilla de ADN para la unión del fármaco. Por ejemplo, los competidores son la secuencia cuádruple c-myc, que es idéntica a la secuencia cuádruple presente en el ADN de plantilla; o un ADN de plásmido que emula el ADN bicatenario genómico complejo. El grado 20 en el que cada competidor "impregna" con éxito el fármaco en solución se refleja en la disminución cuantitativa en la síntesis del producto de detención. De esta manera, se determinan las afinidades de unión relativas del fármaco tanto a la estructura cuádruple diana como al ADN bicatenario.

Huellas de cuadroma

25 Los compuestos pueden evaluarse también en cuanto a su capacidad de unión a otras estructuras cuádruples nativas de relevancia biológica, lo que incluye elementos de control de estructuras cuádruples que regulan un intervalo de diferentes oncogenes. Los datos resultantes se usan para crear una huella de cuadroma.

30 Ensayo de interacción directa

Los compuestos pueden evaluarse en cuanto a su capacidad de interactuar directamente con ácidos nucleicos capaces de formar una estructura cuádruple, donde el ácido nucleico no es un ácido nucleico telomérico. El ensayo puede realizarse en el mismo recipiente o en recipientes diferentes. Por ejemplo, un compuesto puede ponerse en 35 contacto con cada ácido nucleico en el mismo recipiente. Alternativamente, un compuesto puede ponerse en contacto por separado con cada uno de los ácidos nucleicos sometidos a ensayo en un recipiente diferente. Un ácido nucleico telomérico tal como se usa en la presente memoria descriptiva representa una región de ácido nucleico altamente repetitivo en el extremo de un cromosoma. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se mide la interacción directa sin presencia de un ácido nucleico competidor.

40 Una interacción entre el compuesto y el ácido nucleico puede determinarse por ejemplo, midiendo los valores CI_{50} , que son indicativos de la unión y/o la estabilización de la estructura cuádruple. La selectividad de interacciones puede determinarse, por ejemplo, comparando los valores CI_{50} medidos. Por ejemplo, pueden usarse los valores CI_{50} más bajos para indicar una intensa interacción entre el compuesto y el ácido nucleico, mientras que los valores 45 CI_{50} más altos muestran una baja interacción, mostrando así la selectividad de interacción. Los productos de reacción pueden caracterizarse por electroforesis capilar.

Ejemplo 7

50 Propiedades farmacéuticas de compuestos RBI

Se usó un procedimiento de dosificación por casete para determinar las propiedades farmacéuticas de los compuestos divulgados en la presente memoria descriptiva. En este procedimiento, los compuestos para cada casete (es decir, un cóctel) se seleccionan basándose en que las señales de espectrometría de masas para cada 55 compuesto no interferirán entre sí en el análisis de espectrometría de masas (por ejemplo, no se superpondrán). La concentración de cada compuesto en el casete de dosificación es a menudo de aproximadamente 20 mg/mL para conseguir un nivel de dosis oral de 25 mg/kg en ratones ICR. A continuación se describen los aspectos del procedimiento de dosificación por casete.

Desarrollo del procedimiento MS/MS

Se preparan 0,5 mL de 20 mg/mL de solución de dosificación (en PBS o vehículo de formulación) de 12 compuestos de prueba. Se diluye una solución de dosificación 20 veces transfiriendo 10 μ L de la solución de reserva a 190 μ L de acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,1% para conseguir una concentración final de 1 mg/mL. Se diluye adicionalmente 1 mg/mL de solución 1.000 veces transfiriendo 1 μ L de la solución de reserva a 999 μ L de acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,1% para conseguir una concentración final de 1 μ g/mL. Se usa el 1 μ g/mL de solución para desarrollo de un método de espectrometría de masas basándose en infusión directa. Se determinan los espectros de masas primario/secundario de cada compuesto usando monitorización de reacción múltiple (MRM). Se comparan los espectros de masas primario/secundario de cada compuesto para asegurarse de que no existe interferencia de reacciones cruzadas durante las medidas de CL-EM/EM. Basándose en los espectros de masas MRM se determina la composición de todos los casetes.

Preparación del casete de dosificación

Se mezclan 250 μ L de cuatro soluciones de dosificación preparadas y un patrón interno de PK oral (20 mg/mL cada una) de acuerdo con el diseño de los casetes para conseguir una concentración final de 4 mg/mL. Se someten los casetes a vortización rigurosa y ultrasonificación para obtener una solución transparente o una suspensión homogénea. Se usan las soluciones de los casetes para administrar las dosis a los animales por vía de administración oral a 25 mg/kg.

Animales y dosificación

Todos los experimentos *in vivo* siguen los protocolos aprobados por el Comité de Uso y Cuidados en Animales. Se obtienen ratones ICR hembra (IcrTac:ICR), de 8-10 semanas de vida, en Taconic (Hudson, Nueva York). Los ratones se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h con acceso ad libitum a agua y comida. Después de un periodo mínimo de aclimatación de dos semanas, se aleatoriza a los ratones en grupos con un tamaño mínimo de grupo de cuatro. Los animales usados para estudios farmacocinéticos tienen un intervalo de peso corporal de 25-35 g. Se administra oralmente una dosis de 25 mg/kg (4 mg/ml) de una casete descrita en el Ejemplo 1 a los ratones que han estado en ayunas durante toda la noche.

Preparación del análisis de sangre

Después de la administración del compuesto, se recogen muestras de sangre en serie mediante punción retroorbitaria con un tubo capilar en varios puntos temporales (15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6 y 8 horas). Se transfieren las muestras a un tubo de microcentrífuga de 0,5 mL heparinizado y se colocan en hielo. Se separa el plasma por centrifugación y se almacenan las muestras a -80°C hasta el ensayo.

Preparación de soluciones patrón de trabajo

Se diluye una solución de dosificación de casete (4 mg/mL) cuatro veces transfiriendo 25 μ L de la solución de reserva a 75 μ L de acetonitrilo al 50% que contiene ácido fórmico al 0,1% para conseguir la concentración de 1 mg/mL. Se diluye esta solución de reserva adicionalmente por diluciones en serie para preparar 0,01, 0,1, 1 y 5 μ g/mL de soluciones patrón de trabajo.

Preparación de una solución de inactivación

Se preparan 500 mL de 0,5 μ g/mL de solución de patrón interno bioanalítico usando acetonitrilo al 100% con ácido fórmico al 0,1%. Se almacena la solución de inactivación en un frasco hermético sellado a 4°C.

Preparación de patrón de calibración para análisis

Se transfieren 15 μ L de plasma de ratón de referencia a una placa de 96 pocillos y se precipitan proteínas plasmáticas pipeteando 120 μ L de solución de inactivación para todas las partes alícuotas de plasma. Se cubre la placa con una cubierta de placa adecuada y se mezcla bien durante 30-60 segundos usando un agitador vertical multitubo.

Se añaden 15 μ L de la solución patrón de trabajo de la casete correspondiente a plasma inactivado y se somete la

placa a vortización durante 30-60 segundos adicionales. A continuación, se centrifuga la placa a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Sin perturbar el estado de los sedimentos de proteína plasmática, se transfieren 120 µL del sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y se seca la muestra en nitrógeno usando un evaporador de placa TurboVap® (Caliper Life Sciences; Hopkinton, Massachusetts). Se reconstituyen los residuos secados con 120 µL de acetonitrilo al 20% que contiene ácido fórmico al 0,1%. Se somete la placa a vortización durante 30-60 segundos y se somete a análisis de CL-EM/EM (descrito más adelante).

Preparación de muestra de estudio para análisis

- 10 Se transfieren 15 µL de plasma de ratón de referencia a una placa de 96 pocillos y se precipitan las proteínas plasmáticas pipeteando 120 µL de solución de inactivación para todas las partes alícuotas de plasma. Se cubre la placa con una cubierta de placa adecuada y se mezcla bien durante 30-60 segundos usando un agitador vertical multitubo.
- 15 Se añaden 15 µL de la solución patrón de trabajo de la casete correspondiente a plasma inactivado y se somete la placa a vortización durante 30-60 segundos adicionales. Se añaden 15 µL de acetonitrilo al 50% que contiene ácido fórmico al 0,1% para inactivar el plasma de manera que se corresponda con la matriz y se somete la placa a vortización durante 30-60 segundos adicionales. A continuación, se centrifuga la placa a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Sin perturbar el estado de los sedimentos de proteína plasmática, se transfieren 120 µL del sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y se seca la muestra en nitrógeno usando un evaporador de placa TurboVap® (Caliper Life Sciences; Hopkinton, Massachusetts). Se reconstituyen los residuos secados con 120 µL de acetonitrilo al 20% que contiene ácido fórmico al 0,1%. Se somete la placa a vortización durante 30-60 segundos y se somete a análisis CL-EM/EM (descrito más adelante).

25 Análisis CL-EM/EM

Se analizan las mezclas de reacción en relación con la cantidad de cada entidad química en los casetes para la forma primaria de acuerdo con las siguientes condiciones de HPLC:

- 30 Columna: PHENOMENEX® Synergi™ Polar RP, 20,0 x 2,0 mm, 3 µM

Columna de guarda: PHENOMENEX® C18, 4,0 x 2,0 mm

Velocidad de flujo: 0,25 mL/min

35

Temperatura de columna: 40°C

Temperatura de muestra: 10°C

- 40 Volumen de inyección: 10 µL

Tiempo de ejecución: 3,5 min

Sistema de disolvente de gradiente:

45

Disolvente A: ácido fórmico al 0,1% en agua

Disolvente B : ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo

- 50 Perfil de gradiente de disolvente:

Tiempo, min	%A	%B
0,0	95	5
1,0	95	5
1,5	5	95
2,0	5	95
2,5	95	5
3,5	95	5

Parámetros de espectrometría de masas:

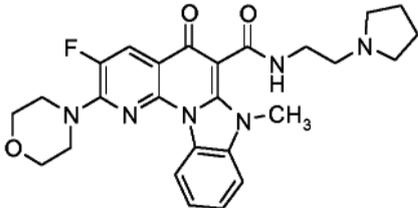
- Modo MS: ESI (+)
- 5 Capilar: 3,5 kV
- Cono: 40 V
- 10 Extractor: 3 V
- Lente RF: 0,2 V
- Fuente T: 120°C
- 15 Desolvación T: 300°C
- Desolvación de gas: 450 L/h
- 20 Cono de gas: 72 L/h
- Resolución LM: 15,0
- Resolución HM: 15,0
- 25 Energía iónica: 0,5
- Multiplicador: 650

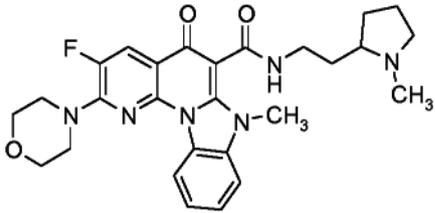
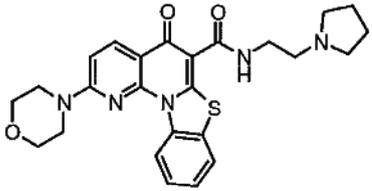
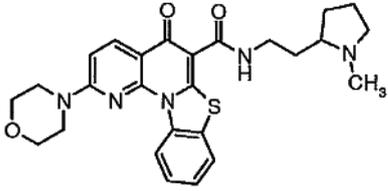
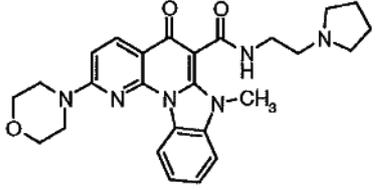
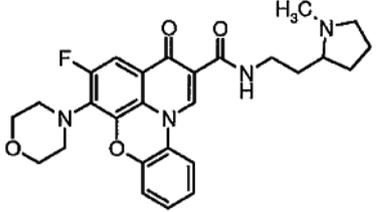
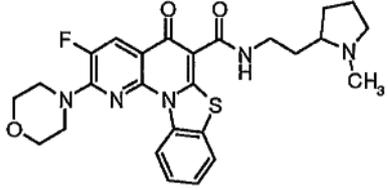
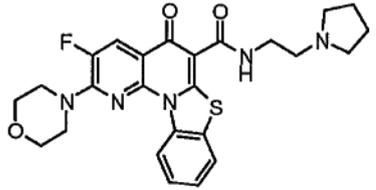
30 Análisis farmacocinético

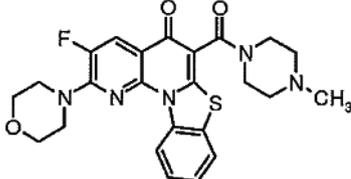
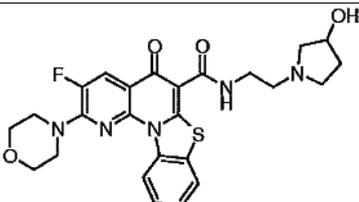
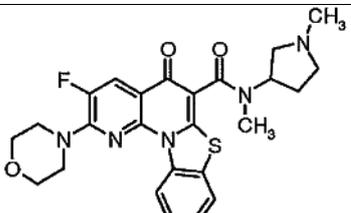
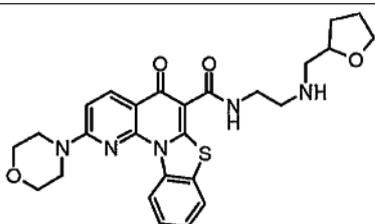
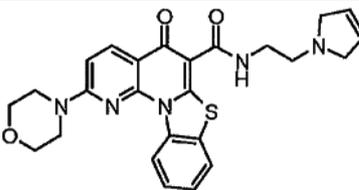
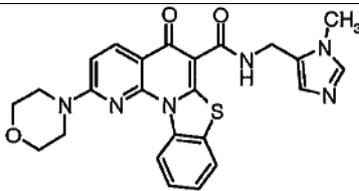
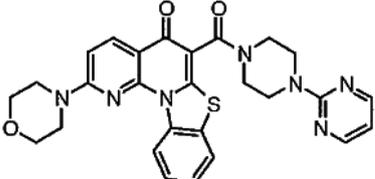
Se aplica análisis farmacocinético no compartimental para administración oral. Se registran los valores $C_{m\acute{a}x}$ y $T_{m\acute{a}x}$ observados. Se usa la regla trapezoidal lineal para calcular ABC (0-8) de acuerdo con Gibaldi, M. y Perrier, D. Pharmacokinetics, 2ª edición, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1982.

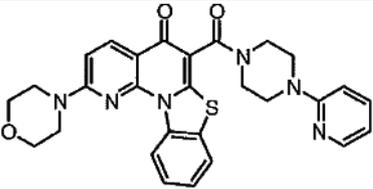
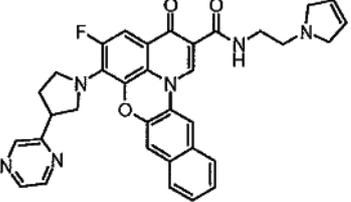
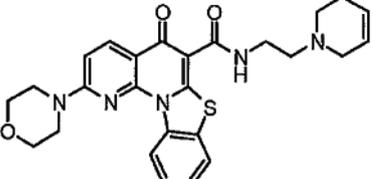
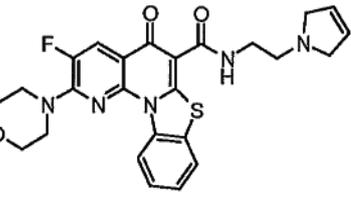
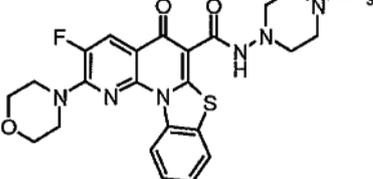
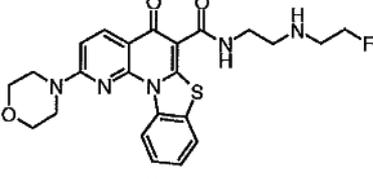
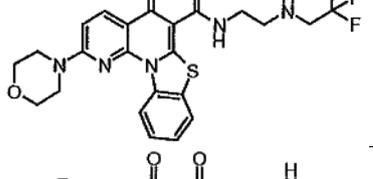
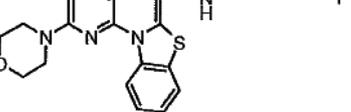
35 En la tabla 8 se ofrecen los datos de dosificación de casete y biodisponibilidad representativos, junto con la inhibición de la proliferación celular (por ensayo con azul de Alamar (AA) (por ejemplo, Ejemplo 4 en la presente memoria descriptiva) e inhibición de ARNr (por ensayo de PCR cuantitativa (QPCR) (por ejemplo, Ejemplo 5 en la presente memoria descriptiva).

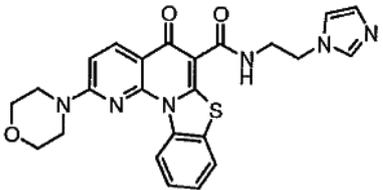
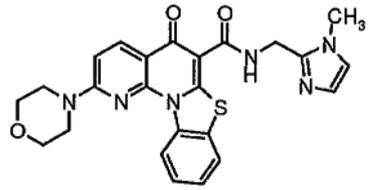
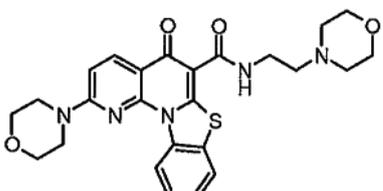
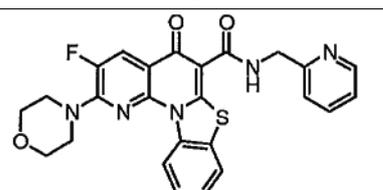
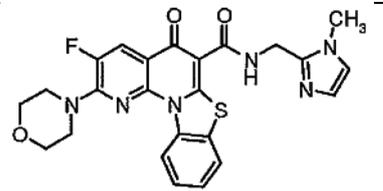
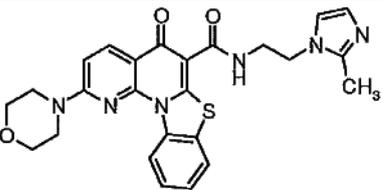
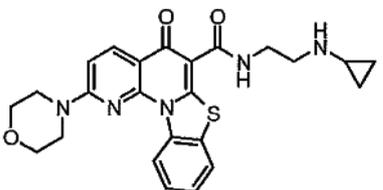
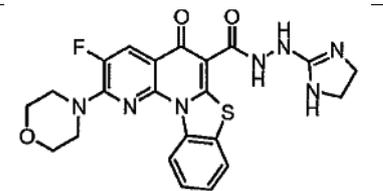
40 Tabla 8. Datos representativos de dosificación de casetes y biodisponibilidad y datos de actividad farmacéutica

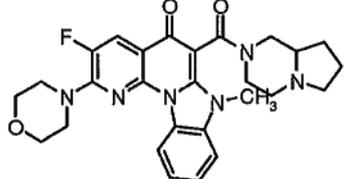
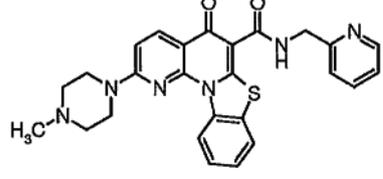
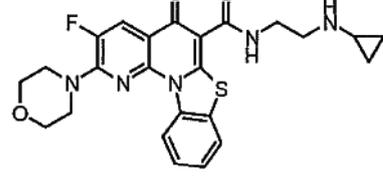
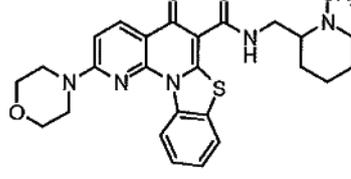
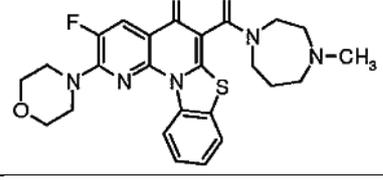
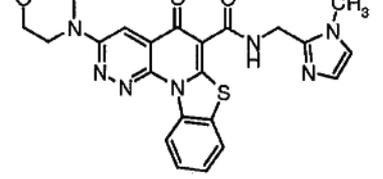
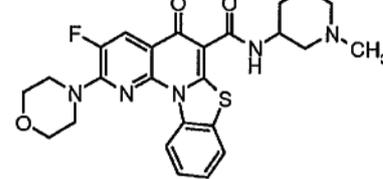
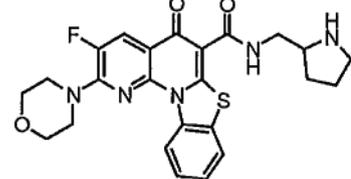
Estructura	AA: HCT-116 (μM)	QPCR: ADNr (μM)	Selectividad	ABC (8 h)- casete	Biodisponibilidad (%F)
	0,307	0,318	7	2.002	

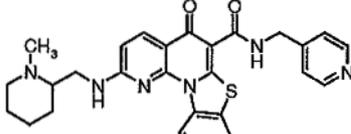
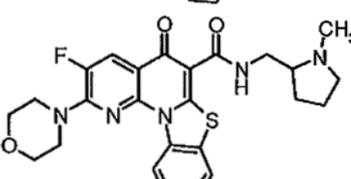
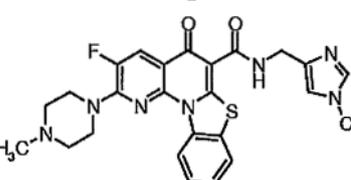
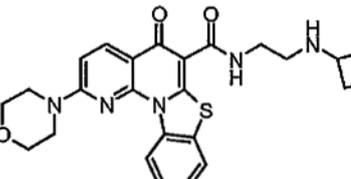
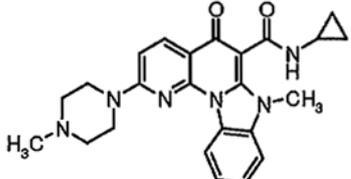
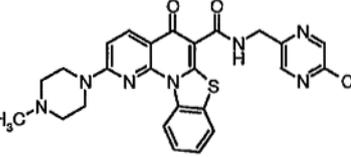
	0,21	0,521	8	1.190	10,4
	0,059	0,052	162	2.151	10,7
	0,055	0,249	42	2.586	
	0,075	0,261	3	1.260	
	0,389	0,405	12	1.426	
	0,337	0,892	10	3.807	22,4
	0,081	0,127	70	2.261	

	0,386	1,153	7	6.163	30,3
	0,055	0,01	10	1.086	
	0,174	0,381	5	2.133	
	0,116	0,04	119	1.904	2
	0,13	0,064	22	7.939	27,5
	0,174	0,262	60	2.915	12,4
	0,461	0,578	13	15.344	31,1

	0,21	0,723	17	1.742	
	0,398	1,041	24	8.042	
	0,098	0,032	64	632	
	0,392	0,042	3	1.999	
	0,265	0,102	89	4.362	
	0,135	0,059	48	5.015	
	0,535	0,502	15	9.447	
	0,484	0,147	70	2.223	

	0,473	0,431	24	4.028	
	0,145	0,173	9	5.491	17,9
	0,454	0,496	16	2.985	
		22,632	1	90.599	
	0,199	0,134	11	20.272	15,8
	0,166	0,084	21	4.378	
	0,065	0,1	39	5.372	43,3
	0,001	0,028	893	2.429	0,1

	0,843	0,841	10	3.206	
	0,147	0,112	111	51.054	41,4
	0,132	0,248	53	5.154	
	0,006	0,009	2.778	1.048	
	0,3	0,233	10	4.226	
	0,174	0,334	53	3.779	
	0,027	0,029	862	1.026	
	0,009	0,016	25	1.049	

	0,008	0,067	39	790	
	0,128	0,383	45	3.957	
	0,303	0,139	69	45.116	
	0,286	0,176	16	3.176	
	0,202	0,127	4	5.195	
	0,391	0,069	13	165.786	

Ejemplo 8Evaluación de propiedades farmacocinéticas

5

Se investigan las propiedades farmacocinéticas de los fármacos en ratones ICR después de dosis de un bolo intravenoso (IV) y oral (PO) del fármaco a 5 mg/kg y 25 mg/kg, respectivamente. Se toman muestras de sangre en instantes predeterminados y se separa el plasma. El plasma se separa de las muestras de sangre recogidas a 5, 15 y 30 minutos y 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la dosis.

10

Se cuantifican los niveles de fármaco mediante el procedimiento CL/EM/EM descrito a continuación. Se aplica análisis farmacocinético no compartimental para administración intravenosa. Se usa la regla trapezoidal lineal para calcular ABC(0-24) o ABC(0-8). Se calcula el $t_{1/2}$ terminal y C_0 usando los últimos tres y los tres primeros puntos de datos, respectivamente

15

Se realiza un bioanálisis usando un instrumento de CL/EM/EM Quattro Micro en el modo de detección MRM, con un patrón interno (PI). Brevemente, se preparan muestras de plasma de 15 μ L para el análisis usando precipitación de proteínas con 120 μ L de acetonitrilo. Se transfieren los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos y se someten a

análisis CL-EM/EM usando una columna de HPLC Polar-RP PHENOMENEX®. Las fases móviles son NH₄HCO₃ 10 mM en agua (Solución A) y NH₄HCO₃ 10 mM en metanol (Solución B). La columna se equilibra inicialmente con Solución B al 25% y se sigue con Solución B al 100% durante 5 minutos. El procedimiento tiene un intervalo dinámico de 1 a 10.000 ng/mL. La cuantificación de los analitos se realiza en modo de lotes con dos curvas de calibración de encuadramiento de acuerdo con la lista de muestras bioanalíticas.

Ejemplo 9

Ensayo de inhibición del citocromo P450 (CYP450)

10

Los compuestos de la presente invención pueden evaluarse en cuanto a su actividad inhibidora potencial en relación con isoenzimas de citocromo P450. En general, se prepararán seis tubos de reacción con 100 µL de una solución que contiene 50 mM de fosfato de potasio, pH 7,4, 2,6 mM de NADP⁺, 6,6 mM de 6-fosfato de glucosa, 0,8 U de 6-fosfato de glucosa deshidrogenasa/mL y diluciones en serie 1:6 del compuesto de prueba preparados junto con seis tubos de diluciones 1:6 de un inhibidor de control positivo adecuado. Las reacciones se iniciarán añadiendo 100 µL de una solución precalentada de enzimas/sustrato a los tubos de reacción. Se preparará una reacción de control en el punto temporal cero añadiendo 50 µL de acetonitrilo a 100 µL de solución de cofactor para inactivar las enzimas, añadiendo a continuación 100 µL de solución de enzimas/sustrato. También puede prepararse una reacción de control sin inhibidor. Después de una incubación adecuada a 37°C, se terminarán las reacciones añadiendo 50 µL de acetonitrilo. Se analizarán las reacciones en cuanto a las formas de metabolitos del sustrato de la sonda usando CL/EM/EM.

15

20

Ejemplo 10

25 Evaluación de la eficacia del compuesto en supresión tumoral

Un experimento representativo para evaluar la eficacia de los compuestos de la presente invención en modelos de ratones sin pelo atímicos de carcinoma humano puede diseñarse del modo siguiente. Se usarán animales machos o hembras (ratón, Sim) (NCR, nu/nu) de cinco a seis semanas de vida y que pesen más de 20 gramos. Los animales se criarán para este fin y no se habrán sometido a experimentos al inicio del estudio. Los tumores se propagarán a partir de células inyectadas o del paso de fragmentos de tumor. Las líneas celulares que se usarán incluyen, pero no se limitan a, entre otras, alia Paca-2, HPAC, Hs700T, Panc10.05, Panc 02.13, PL45, SW 190, Hs 766T, CFPAC-1 y PANC-1.

30

35 Implantación de las células. Se inoculará de uno a diez millones de células suspendidas en 0,1 ml de medios de cultivo con o sin Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Inc, Bedford, MA) subcutáneamente en el flanco derecho de sesenta animales. Se aplicará sólo una inyección por animal. A los 7-14 días de la inyección se desarrollarán tumores para un tamaño de uso de estudio de aproximadamente 1,0 cm³. Se considerará un pequeño subconjunto (< 10/60) de animales. Se criarán los donantes y se harán desarrollar los tumores 10-28 días y hasta un tamaño de 1,5 cm³ con el fin de usarlos para trasplante en serie.

40

Trasplante de fragmentos. Se aplicará eutanasia en los animales donantes y se extirparán quirúrgicamente los tumores y se cortarán en fragmentos de 2 mm³ de tamaño usando técnica aséptica. Los animales en los que se realizará el implante se anestésiarán ligeramente con isoflurano. Se limpiará el área para el implante con alcohol al 45 70% y betadine. A continuación se implantará un único fragmento subcutáneamente usando un trocar.

45

Estudios de eficacia. Se dividirán aleatoriamente grupos de 50-60 animales portadores de tumores. Por ejemplo, en un estudio representativo, los animales pueden dividirse aleatoriamente en de tres a ocho grupos que contienen 7 animales cada uno, tal como se describe en la Tabla 9.

50

Tabla 9

Nº grupo	Número de machos/hembras	Nivel de dosis	Vol. dosis (µL)	Conc. solución de dosis (mg/mL)	Número de animales sometidos a eutanasia en: día 28-42
1	N = 7	Control negativo	250		todos

2	N = 7	Control positivo **	10-400 IP 10-250 IV 125-500 PO	2 a 5 IP 2,5 a 5 IV ≤ 10 PO	todos
Grupos 3-8	N = 7/grupo < 56 total	Compuesto de prueba 1 a 25 IP 1 a 50 IV 50 a 200 PO	10-400 IP 10-250 IV 125-500 PO	2,5 a 5 IP 2,5 a 5 IV 10 PO	todos

*Vehículo/diluyente

**Como controles positivos se usarán compuestos anticancerosos disponibles comercialmente que incluyen, pero no se limitan a, taxol, CPT11 y Gemcitabina.

10 Procedimiento de dosificación. Los compuestos se administrarán QD, QOD, Q3D o una vez por semana por vía IP, IV (vena caudal lateral) o PO. Se administrará el compuesto a los animales en un orden sistemático que distribuye el tiempo de dosificación de forma similar en todos los grupos. Para administración de bolo IP y PO, se sujetará a los animales manualmente. Para administración de bolo IV o infusión IV de corta duración (un minuto), se sujetará a los animales mecánicamente pero no se los sedará. Se usarán jeringas estériles desechables para cada animal/dosis. Se someterá a prueba también un compuesto de prueba en combinación con aproximadamente 10-100 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 40 mg/kg) de agente quimioterapéutico tal como gemcitabina, normalmente por administración IP una vez por semana.

15

Ejemplo 11

Evaluación de dosis máximas toleradas

20 Un experimento representativo para evaluar la dosis máxima tolerada (DMT) de los compuestos de la presente invención puede diseñarse del modo siguiente.

25 Estudios de toxicidad aguda. En un estudio representativo para determinar la DMT después de una sola dosis, se dividirá aleatoriamente a sesenta animales no sometidos anteriormente a experimentación, por ejemplo, en grupos que contendrán 10 animales (5 machos y 5 hembras) y recibirán un compuesto a través de dos vías de administración o bien dos compuestos a través de una sola vía de administración. Se ha revelado que se tolerará una dosis única de 50 mg/kg IV, y se usa como niveles de dosis bajos preliminares. La dosis baja para estudios orales se basa en la tolerabilidad prevista y se ajustará en sentido descendente en caso necesario. En la Tabla 10 se describe un diseño representativo de niveles de dosis, volúmenes de dosis y concentración de solución de dosis.

30

Tabla 10

Nº grupo	Número de machos (M) y hembras (F)	Nivel de dosis (mg/kg)	Vol. dosis (µL)	Conc. solución de dosis (mg/mL)	Número de animales sometidos a eutanasia en: día 7
1	N = 5 M N = 5 F	Compuesto de prueba #1 50 IV 100 PO	250 IV 500 PO	5 IV 5 PO	todos
2	N = 5 M N = 5 F	Compuesto de prueba #1 75 IV 200 PO	250 IV 500 PO	8,25 IV 10 PO	todos
3	N = 5 M N = 5 F	Compuesto de prueba #1 100 IV 300 PO	250 IV 500 PO	10 IV 15 PO	todos
4	N = 5 M N = 5 F	Compuesto de prueba #2 50 IV 100 PO	250 IV 500 PO	5 IV 5 PO	todos
5	N = 5 M N = 5 F	Compuesto de prueba #2 75 IV 200 PO	250 IV 500 PO	8,25 IV 10 PO	todos
6	N = 5 M N = 5 F	Compuesto de prueba #2 100 IV 300 PO	250 IV 500 PO	10 IV 15 PO	todos

Estudios subcrónicos. En un estudio representativo para caracterizar las relaciones dosis-respuesta después de 5 dosificación repetida, se dividirá aleatoriamente a 25 animales no sometidos anteriormente a experimentación, por ejemplo, en grupos que contenían 5 animales cada uno tal como se describe en la Tabla 11. Cada dos semanas el estudio someterá a prueba sólo un compuesto a través de una única vía de administración en una dosis óptima derivada de los datos recogidos en estudios previos de toxicidad aguda.

10

Tabla 11

Nº grupo	Número de machos o hembras	Nivel de dosis (mg/kg)	Vol. dosis (µL)	Conc. solución de dosis (mg/mL)	Número de animales sometidos a eutanasia en: día 14
1	N = 5	Control negativo	250 IV 500 PO	Depende del nivel de dosis	todos
2 QD	N = 5	Compuesto de prueba según se determina en estudios de DMT	250 IV 500 PO	Depende del nivel de dosis	todos
3 QOD	N = 5	Compuesto de prueba según se determina en estudios de DMT	250 IV 500 PO	Depende del nivel de dosis	todos
4 Q3D	N = 5	Compuesto de prueba según se determina en estudios de DMT	250 IV 500 PO	Depende del nivel de dosis	todos
5 Q7D	N = 5	Compuesto de prueba según se determina en estudios de DMT	250 IV 500 PO	Depende del nivel de dosis	todos

Procedimiento de dosificación. Los compuestos se administrarán QD, QOD, Q3D o Q7D por vía IV (vena caudal lateral) o PO. Se administrará la dosis a los animales en un orden sistemático que distribuye el tiempo de dosificación de forma similar en todos los grupos. Para administración PO, se sujetará a los animales manualmente. Para administración de bolo IV o infusión IV de corta duración (un minuto), se sujetará a los animales mecánicamente pero no se los sedará. Se usarán jeringas estériles desechables para cada animal/dosis.

Ejemplo 12

20

Actividad farmacéutica de los compuestos A1, A2 y A3

La actividad inhibidora en la proliferación celular de los compuestos A1, A2 y A3 se determinó usando un ensayo de viabilidad celular con azul de Alamar (por ejemplo, Ejemplo 39 en la presente memoria descriptiva) usando una diversidad de tipos celulares que son representativos de diferentes cánceres. En la tabla siguiente (Tabla 12) se presentan los valores de inhibición (CI_{50}) en concentraciones micromolares.

Tabla 12

Enfermedad	Línea celular	Tipo celular	CI_{50} (micromolar)		
			A1	A2	A3
Próstata	LNCAP	Fibroblastoide	0,077	0,029	0,045
	PC-3	Epitelial	0,600	0,089	0,563
Colorrectal	HCT-116	Epitelial	0,097	0,032	0,093
	HT-29	Epitelial	0,073	0,042	0,102
	COLO-205	Epitelial		0,096	
Pulmón	H1299	CPNM	0,112	0,069	0,102
	H460	Epitelial	0,142	0,090	0,123
	SK-MES-1	Carcinoma escamoso	0,105	0,021	0,134
Páncreas	Miapaca-2	Epitelial	0,103	0,036	0,122
	Miapaca-R5	Epitelial	0,149	0,034	0,133
	BXPC3	Epitelial	0,056	0,035	0,071
	PANC-1	Epitelial	0,148		0,103
Mama	MCF-7	Carcinoma mamario	0,348		0,267
	MDA-MB-231	Epitelial	0,105	0,052	0,139
Hematopoyético	K562	Linfoblasto	0,140	0,042	0,120
	Jurkat	Linfoma	0,069	0,025	0,060
	HL60	Linfoma	0,264	0,083	0,160
	HL60/MX2	Linfoma	0,244	0,147	0,219
Piel	A375	Epitelial	0,090	0,023	0,070
Ovario	SK-OV-3	Epitelial	0,215	0,064	0,279
Huesos	U2OS	Epitelial	0,752	0,089	0,476
	Saos-2	Epitelial	0,264	0,124	0,249

10

También se sometieron a prueba los compuestos A1, A2 y A3 en cuanto a inhibición tumoral en roedores con xenoinjertos. A roedores que tenían tumores de xenoinjertos celulares A375 se les administraron dosis de 100 mg/kg, 75 mg/kg y 100 mg/kg de los Compuestos A1, A2 y A3, respectivamente, por suministro oral dos veces al día.

15 Cada uno de estos compuestos inhibió significativamente el crecimiento tumoral de A375 durante un periodo de siete días con respecto a un grupo de control sin tratar. Además, a roedores que tenían tumores de xenoinjerto MiaPaCa se les administraron dosis de 100 mg/kg del Compuesto A1 y A3 por suministro oral dos veces al día. Cada uno de estos compuestos significativamente inhibió el crecimiento tumoral de MiaPaCa durante un periodo de veintidós días con respecto a un grupo de control sin tratar.

20 **Ejemplo 13**Datos de CI_{50} basados en células representativas

25 La actividad inhibidora en la proliferación celular de compuestos de la invención representativos se determinó usando un ensayo de viabilidad celular con azul de Alamar (por ejemplo, Ejemplo 39 en la presente memoria descriptiva) usando una diversidad de tipos celulares que son representativos de diferentes cánceres. En la Tabla 13 y en la Tabla 14 se presentan los valores de inhibición (CI_{50}) en concentraciones micromolares. “*” indica estructura y datos dados para referencia.

Tabla 13

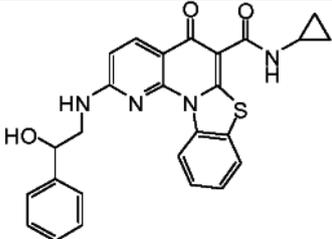
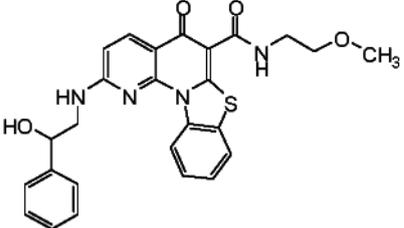
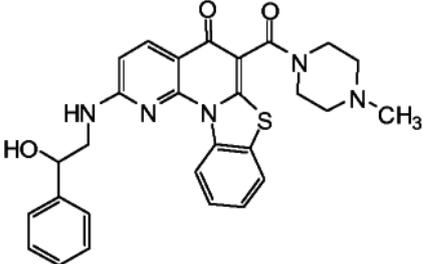
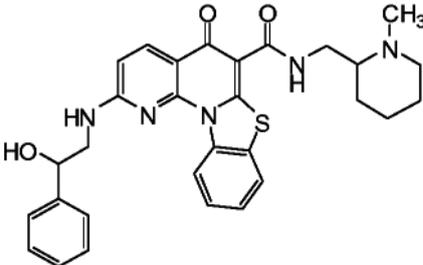
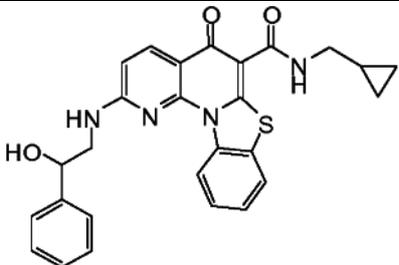
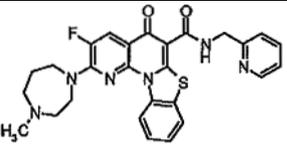
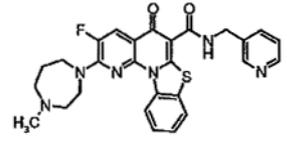
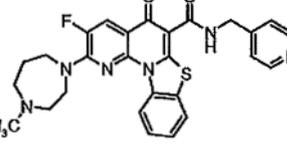
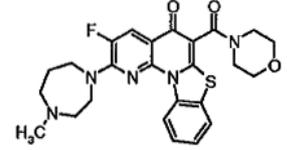
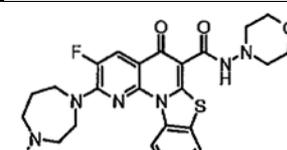
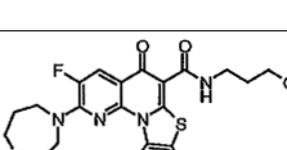
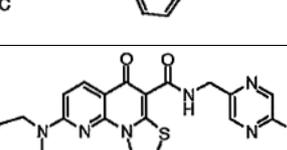
Estructura	AA: MV-4-11 (CI50, μM)	AA: PC3 (CI50, μM)	AA: HCT-116 (CI50, μM)	AA: K-562 (CI50, μM)	M+1
	> 10	> 10	> 10	> 10	471
		3,736	0,133		489
	0,543	6,666	2,507	3,127	514
		0,633	0,267		542
	5,032	6,08	> 10	> 10	485

Tabla 14

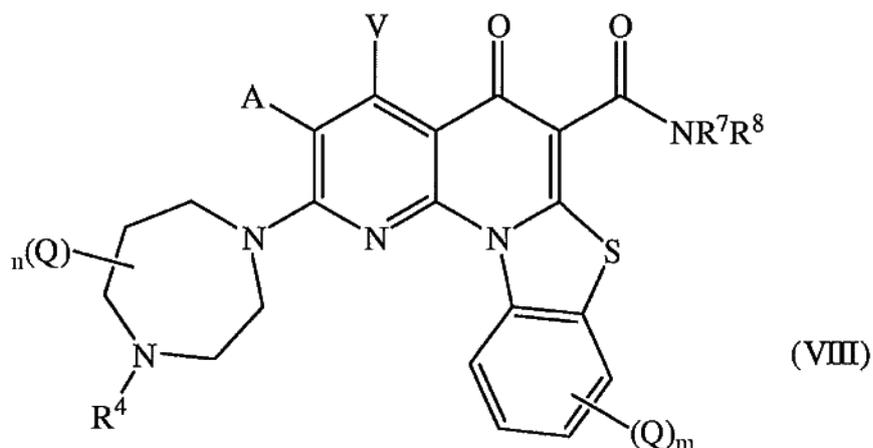
Estructura	AA: MV-4-11 (CI50, μM)	AA: K-562 (CI50, μM)	AA: THP-1 (CI50, μM)	AA: PC3 (CI50, μM)	AA: MiaPaCa (CI50, μM)
	0,043	0,118	1,334	7,773	0,941
	< 3-e-002	0,032	0,356	2,485	0,133
	< 3-e-002	0,095	1,064	6,59	0,131
	< 3-e-002	0,11	0,59	1,212	0,352
	0,124	0,267	1,317	1,804	0,359
	0,032	0,051	0,571	2,645	< 0,12
	0,084	0,101			0,637

Ejemplo 14. Realizaciones representativas

5

Las siguientes realizaciones se ofrecen para ilustrar pero no para limitar la invención.

1. Un compuesto de la fórmula (VIII),



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 donde:

A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

10 cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo;

15

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, u =O;

R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alqueno C2-C10 o heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido;

20

R³ es un alquilo C1-C10, alqueno C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido;

25

cada R⁴ es independientemente H, o alquilo C1-C6; o R⁴ puede ser -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰;

cada R es independientemente H o alquilo C1-C6;

30 R⁷ es H y R⁸ es alquilo C1-C4, sustituido por un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido;

m es 0, 1, 2, 3 ó 4;

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

35

p es 0, 1, 2 ó 3;

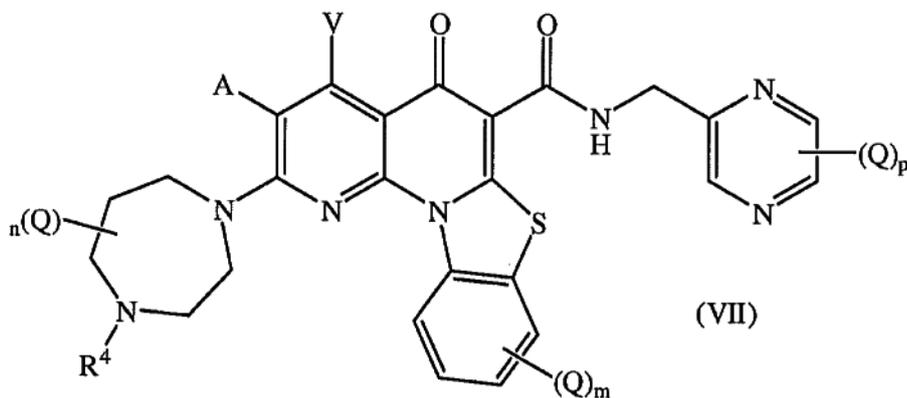
L es un conector de alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alqueno C2-C10 o heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en halógeno, oxo (=O) o alquilo C1-C6;

40

W es un anillo azacíclico de 4 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo; y

W^0 es un anillo carbocíclico de 3 a 4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con 1 a 4 átomos de flúor.

- 5 2. El compuesto de acuerdo con la realización 1, donde el anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido se selecciona de entre piridina, pirimidina, pirazina, imidazol, pirrolidina y tiazol.
3. Un compuesto de Fórmula (VII),



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15 A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

20 en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo;

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, u =O;

25 R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alquenilo C2-C10 o heteroalquenilo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido;

30 R³ es un alquilo C1-C10, alquenilo C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido;

cada R⁴ es independientemente H, o alquilo C1-C6; o R⁴ puede ser -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰;

35 cada R es independientemente H o alquilo C1-C6;

m es 0, 1, 2, 3 ó 4;

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

40

p es 0, 1, 2 ó 3;

L es un conector de alquilenilo C1-C10, heteroalquilenilo C1-C10, alquenilenilo C2-C10 o heteroalquenilenilo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de entre el

45

grupo que consiste en halógeno, oxo (=O) o alquilo C1-C6;

W es un anillo azacíclico de 4 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo; y

5 W^0 es un anillo carbocíclico de 3 a 4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de 1 a 4 átomos de flúor.

4. El compuesto de acuerdo con la realización 3, donde A y V son independientemente H o halo.

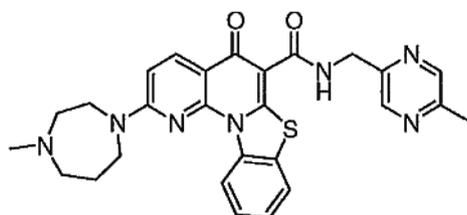
10 5. El compuesto de acuerdo con la realización 3 ó 4, donde R^4 es H o alquilo C1-4.

6. El compuesto de acuerdo con la realización 3, 4 ó 5, donde m y n son los dos 0.

7. El compuesto de acuerdo con la realización 3-6, donde p es 0 ó 1,

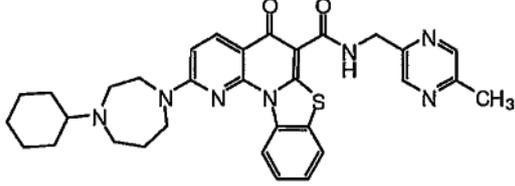
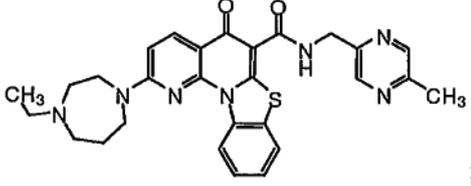
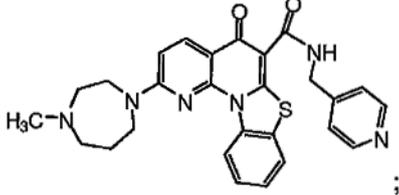
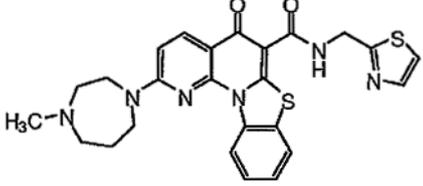
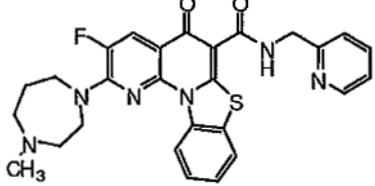
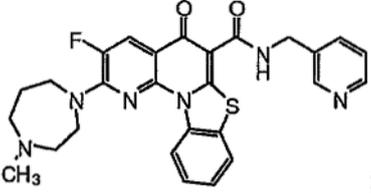
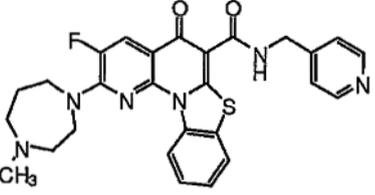
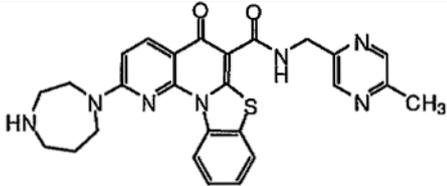
15

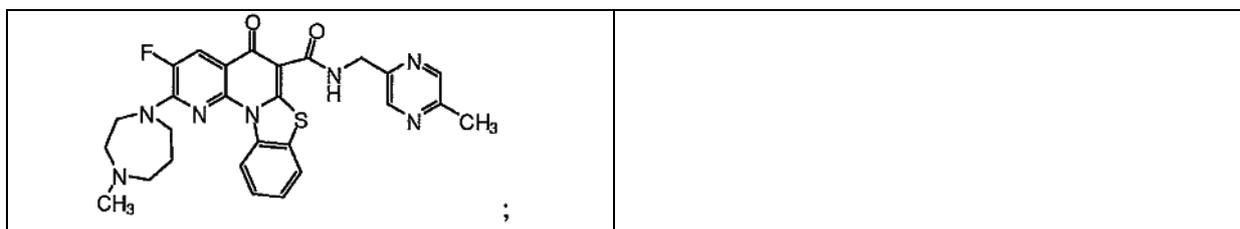
8. El compuesto de acuerdo con la realización 3-7 que tiene la estructura:



20 o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

9. Un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en:



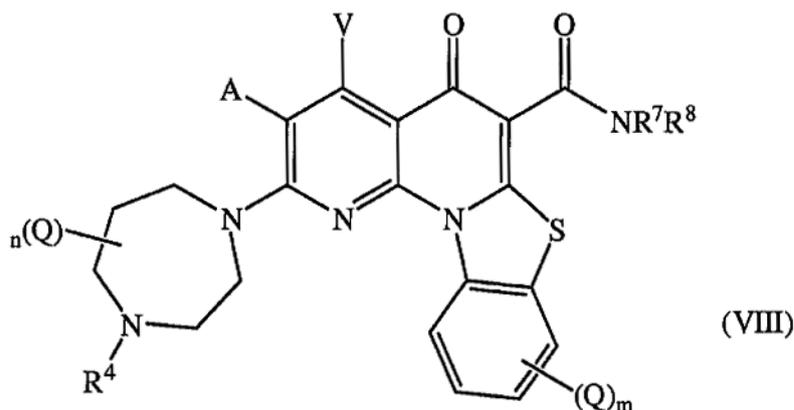
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 10. Un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en los compuestos de las Tablas 1 y 6, y en los Ejemplos, aparte de los suministrados como referencia o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente
10 aceptable.

12. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la realización 1, o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 13. Compuesto de fórmula (VIII) para uso en un método para el tratamiento o la mejoría de un trastorno de proliferación celular en un sujeto,



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

donde A, V, X, Q, m, n, p, R⁴, R⁷ y R⁸ se definen tal como en la realización 1;

tratando o mejorando de este modo el trastorno de proliferación celular.

25

14. Un compuesto para uso en un método para el tratamiento o la mejoría de un trastorno de proliferación celular en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración a un sujeto necesitado del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1-13 tratando o mejorando de este modo dicho trastorno de proliferación celular.

30

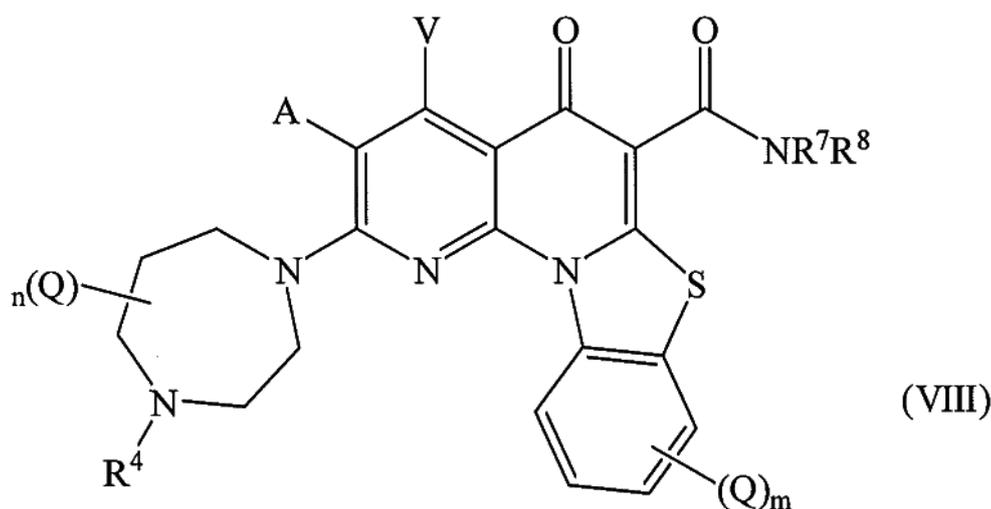
15. El compuesto para uso de acuerdo con la realización 13 ó 14, donde el sujeto es un ser humano.

Aunque la invención se ha descrito en detalle sustancial con referencia a una o más realizaciones específicas, los expertos en la materia reconocerán que pueden realizarse cambios en las realizaciones divulgadas específicamente
35 en la presente solicitud, y además que estas modificaciones y mejoras están dentro del alcance de la invención. La invención descrita de forma ilustrativa en la presente memoria descriptiva puede ponerse en práctica de manera

adecuada en ausencia de cualquier elemento no divulgado específicamente en la presente memoria descriptiva. Así, por ejemplo, en cada caso en la presente memoria descriptiva cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede sustituirse por cualquiera de los otros dos términos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (VIII),



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

donde:

10

A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

15

W⁰; cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo;

20

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, u =O;

R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alquenilo C2-C10 o heteroalquenilo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido;

25

R³ es un alquilo C1-C10, alquenilo C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido;

30

cada R⁴ es independientemente H, o alquilo C1-C6; o R⁴ puede ser -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰;

cada R es independientemente H o alquilo C1-C6;

35

R⁷ es H y R⁸ es alquilo C1-C4, sustituido por un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido;

m es 0, 1, 2, 3 ó 4;

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

p es 0, 1, 2 ó 3;

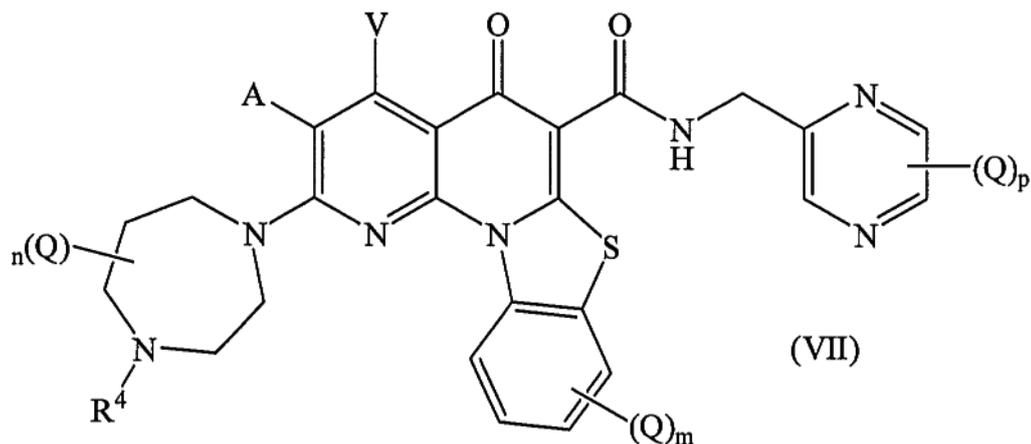
L es un conector de alquileo C1-C10, heteroalquileo C1-C10, alquenileno C2-C10 o heteroalquenileno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en halógeno, oxo (=O) o alquilo C1-C6;

W es un anillo azacíclico de 4 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo; y

10 W^0 es un anillo carbocíclico de 3 a 4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de 1 a 4 átomos de flúor.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde R^3 es un alquilo C₁₋₄ sustituido por un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido, seleccionado de entre piridina, pirimidina, pirazina, imidazol, 15 pirrolidina y tiazol.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de Fórmula (VII),



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

25 cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

30 en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo;

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, u =O;

35 R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alquenilo C2-C10 o heteroalquenilo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido;

40 R³ es un alquilo C1-C10, alquenilo C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de los mismos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido;

cada R⁴ es independientemente H, o alquilo C1-C6; o R⁴ puede ser -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰;

cada R es independientemente H o alquilo C1-C6;

m es 0, 1, 2, 3 ó 4;

5

n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

p es 0, 1, 2 ó 3;

10 L es un conector de alquileo C1-C10, heteroalquileo C1-C10, alquenileno C2-C10 o heteroalquenileno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en halógeno, oxo (=O) o alquilo C1-C6;

W es un anillo azacíclico de 4 a 7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de entre N, O y S como miembro del anillo; y

15

W⁰ es un anillo carbocíclico de 3 a 4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de 1 a 4 átomos de flúor.

20 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde A y V son independientemente H o halo.

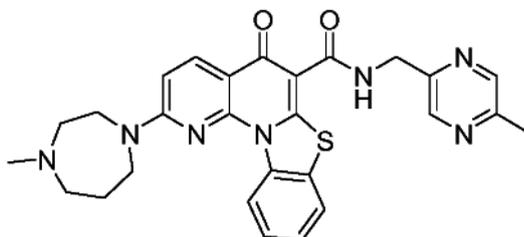
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde R⁴ es H o alquilo C1-4.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde m y n son los dos 0.

25

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde p es 0 ó 1,

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 que tiene la estructura:

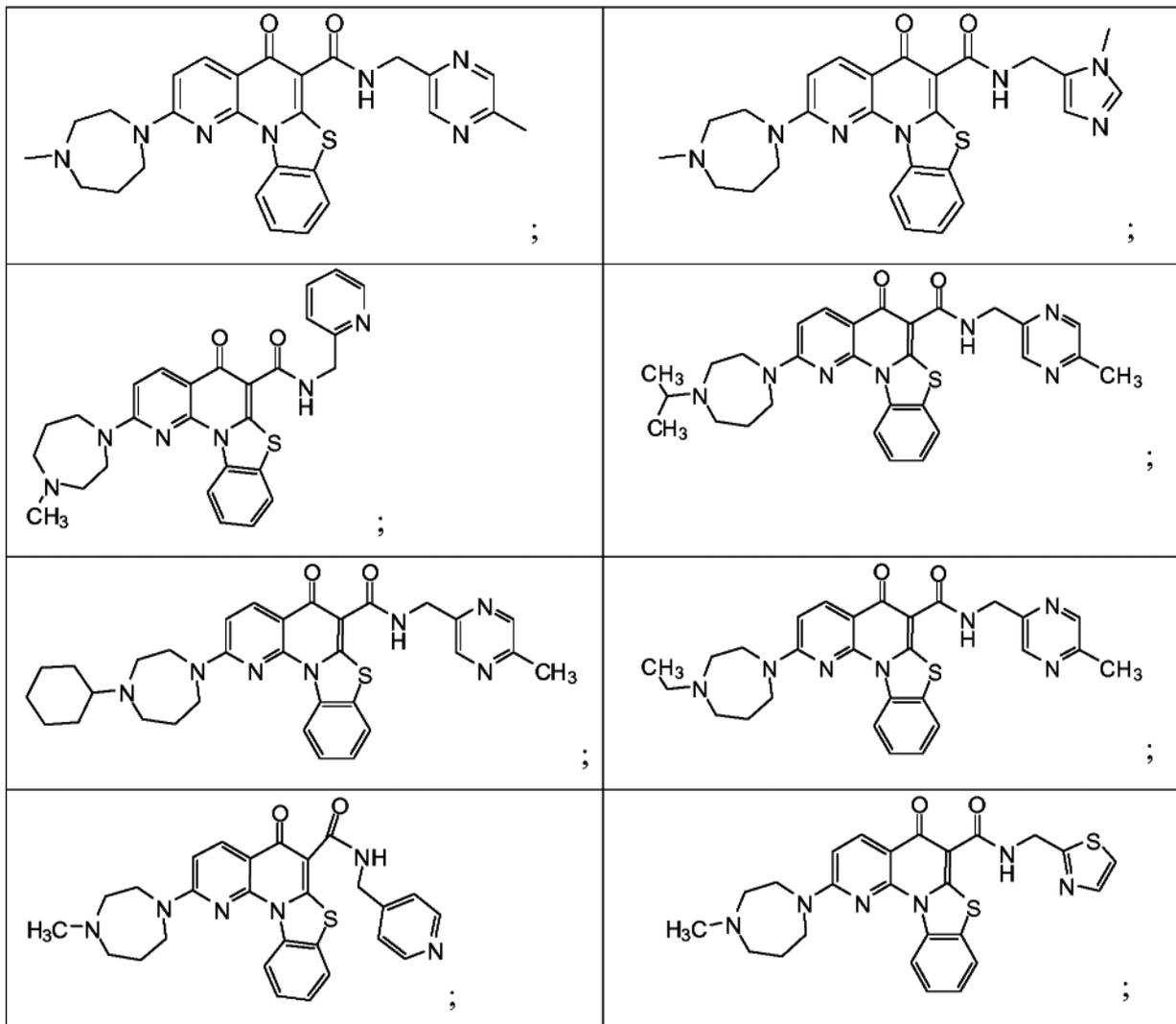


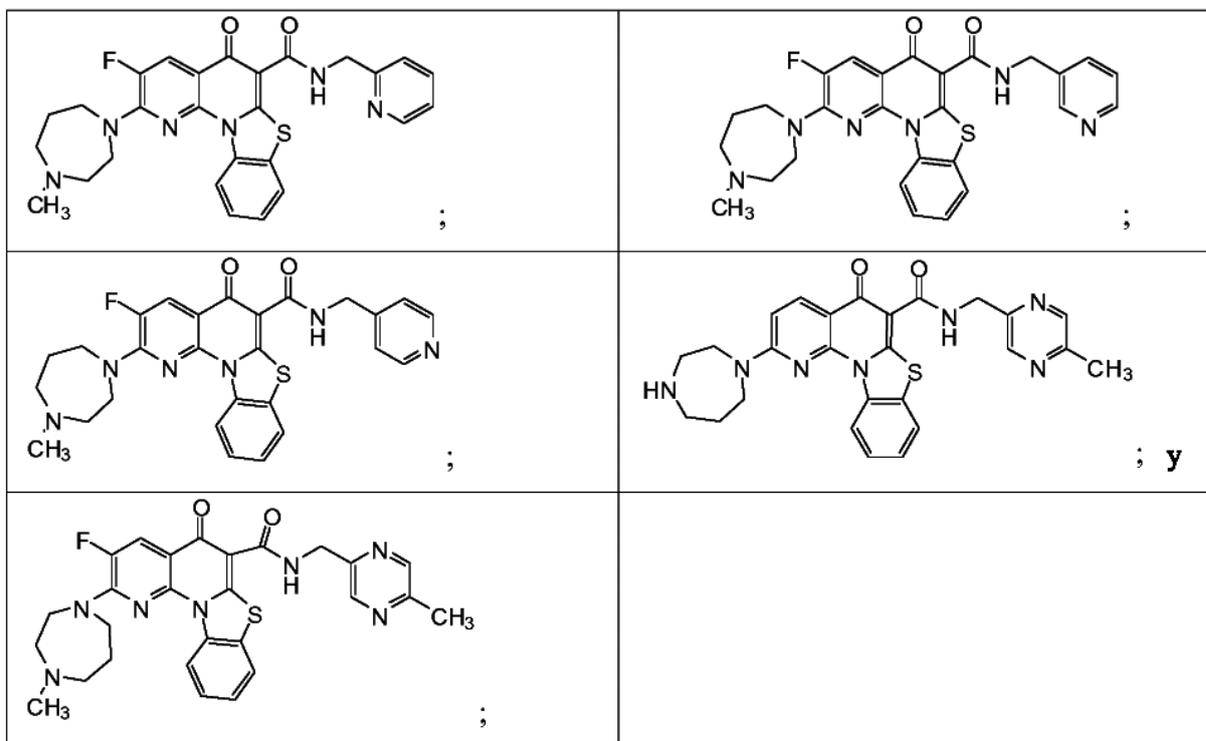
30

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado de entre el grupo que consiste en:

35





o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Un compuesto tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en un procedimiento para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular.
12. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 11 donde el trastorno de proliferación celular es un tumor o cáncer.
- 15 13. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 12 donde el trastorno de proliferación celular es un trastorno neoplásico hematopoyético.
14. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 12 donde el trastorno de proliferación celular es un cáncer colorrectal, de mama, de pulmón, de hígado, de páncreas, de los ganglios linfáticos, de colon, de próstata, del encéfalo, de cabeza y cuello, de piel, de hígado, de riñón y de corazón.
- 20

Figura 1

Comparación de valores ABC individuales y de casete para administración oral de compuestos RBI

