

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 704**

51 Int. Cl.:

C07D 237/34 (2006.01)

A61K 31/502 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2014 PCT/EP2014/001467**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14206524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014 E 14728832 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 3013804**

54 Título: **Derivados de ftalazina.**

30 Prioridad:

24.06.2013 EP 13003205

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**BUCHSTALLER, HANS-PETER;
DORSCH, DIETER;
ESDAR, CHIRSTINA y
LEUTHNER, BIRGITTA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 623 704 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de ftalazina

Antecedentes de la invención

5 La invención tiene por objeto encontrar nuevos compuestos que tienen propiedades valiosas, en particular, aquellos que pueden usarse para la preparación de medicamentos.

10 La presente invención se refiere a derivados de ftalazina que inhiben la actividad de las tanquirasas (TANK) y de la poli(ADP-ribosa)polimerasa PARP-1. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son útiles para tratar enfermedades tales como cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades cardiovasculares, lesiones del sistema nervioso central y diferentes formas de inflamación. La presente invención también proporciona métodos para preparar estos compuestos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos, y dichos compuestos para su uso para tratar enfermedades utilizando composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos.

15 La enzima nuclear poli(ADP-ribosa)polimerasa-1 (PARP-1) es un miembro de la familia de enzimas de PARP. Esta creciente familia de enzimas consiste en las PARP, por ejemplo: PARP-1, PARP-2, PARP-3 y Vault-PARP; y las tanquirasas (TANK), tales como, por ejemplo: TANK-1 y TANK-2. PARP también se cita como poli(adenosina 5'-difosfo-ribosa)polimerasa o PARS (poli(ADP-ribosa)sintetasa).

20 TANK-1 parece ser necesaria para la polimerización de la poli(ADP-ribosa) asociada al huso mitótico. La actividad de poli(ADP-ribosil)ación de TANK-1 puede ser crucial para la formación y mantenimiento preciso de la bipolaridad del huso. Además, se ha demostrado que la actividad de PARP de TANK-1 es necesaria para la separación normal de los telómeros antes de la anafase. La interferencia con la actividad de PARP de tanquirasa da como resultado una mitosis aberrante, que genera una detención del ciclo celular transitoria, probablemente debido a la activación del punto de control del huso, seguido de muerte celular. Por lo tanto, se espera que la inhibición de las tanquirasas tenga un efecto citotóxico en las células tumorales en proliferación (documento WO 2008/107478).

Se describen inhibidores de PARP por M. Rouleau et al. en Nature Reviews, Volumen 10, 293-301 en Clinical Cancer Studies (tabla 2, página 298).

25 De acuerdo con una revisión de Horvath y Szabo (Drug News Perspect 20(3), abril de 2007, 171-181) los estudios más recientes demostraron que los inhibidores de PARP potencian la muerte de células cancerosas principalmente debido a que interfieren con la reparación del ADN a varios niveles. Los estudios más recientes han demostrado también que los inhibidores de PARP inhiben la angiogénesis, ya sea inhibiendo la expresión de factores de crecimiento, o inhibiendo las respuestas proliferativas celulares inducidas por factores de crecimiento. Estos hallazgos también pueden tener implicaciones en el modo de los efectos anticáncer de los inhibidores de PARP *in vivo*.

35 Asimismo, un estudio de Tentori et al. (Eur. J. Cancer, 2007, 43 (14) 2124-2133) demuestra que los inhibidores de PARP suprimen la migración inducida por VEGF o el factor de crecimiento placentario e impiden la formación de redes similares a los microtúbulos en sistemas basados en células, e impiden la angiogénesis *in vivo*. El estudio también demuestra que la angiogénesis inducida por factores de crecimiento es deficiente en ratones con supresión génica de PARP-1. Los resultados del estudio proporcionan pruebas del uso como diana de PARP para la anti-angiogénesis, añadiendo nuevas implicaciones terapéuticas al uso de inhibidores de PARP en el tratamiento para el cáncer.

40 Es de sobra conocido que los defectos en las vías de señalización conservadas desempeñan papeles clave en los orígenes y el comportamiento esencialmente de todos los cánceres (E.A. Fearon, Cancer Cell, Volumen 16, 5ª edición, 2009, 366-368). La vía de Wnt es una diana para la terapia anti-cáncer. Una característica clave de la vía de Wnt es la proteólisis (degradación) regulada de β -catenina por medio del complejo de destrucción de β -catenina. Las proteínas como WTX, ACP o Axina están implicadas en el proceso de degradación. Es importante una degradación adecuada de la β -catenina para evitar una activación inadecuada de la vía de Wnt, que se ha observado en muchos cánceres. Las tanquirasas inhiben la actividad de Axina y por lo tanto inhiben la degradación de la β -catenina. Por consiguiente, los inhibidores de tanquirasa aumentan la degradación de β -catenina. Un artículo en la revista *Nature* no solo ofrece nuevas perspectivas importantes acerca de proteínas que regulan la señalización de Wnt, sino que también apoya la estrategia de antagonizar los niveles y la localización de β -catenina mediante moléculas pequeñas (Huang et al., 2009; Nature, Vol 461, 614-620). El compuesto XAV939 inhibe el crecimiento de células cancerosas DLD-1. Los autores descubrieron que XAV9393 bloquea la acumulación de β -catenina estimulada por Wnt aumentando los niveles de las proteínas AXIN1 y AXIN2. Los autores determinaron en estudios posteriores que XAV939 regula los niveles de AXIN mediante la inhibición de las tanquirasas 1 y 2 (TNKS1 y TNKS2), siendo ambas miembros de la familia de proteínas de poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) (S.J. Hsiao et al., Biochimie 90, 2008, 83-92).

Se ha descubierto que los compuestos de acuerdo con la invención y las sales de los mismos tienen propiedades farmacológicas muy valiosas a la vez que son bien tolerados.

5 La presente invención se refiere específicamente a compuestos de la fórmula I que inhiben a tanquirasa 1 y 2, a composiciones que comprenden estos compuestos, y a compuestos para su uso para el tratamiento de enfermedades y afecciones inducidas por TANK.

Además, los compuestos de fórmula I pueden usarse para el aislamiento y la investigación de la actividad o la expresión de las TANK. Además, son particularmente adecuados para su uso en métodos diagnósticos para enfermedades en relación con la actividad de TANK no regulada o alterada.

10 El hospedador o paciente puede pertenecer a cualquier especie de mamífero, por ejemplo, especies de primates, en particular, seres humanos; roedores, incluyendo ratones, ratas y hámsteres; conejos; caballos, vacas, perros, gatos, etc. Son interesantes los modelos animales para investigaciones experimentales, que proporcionan un modelo para el tratamiento de enfermedades humanas.

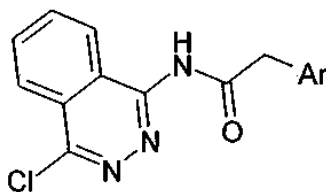
15 La susceptibilidad de una célula concreta al tratamiento con los compuestos de acuerdo con la invención puede determinarse mediante pruebas *in vitro*. Típicamente, se combina un cultivo de las células con un compuesto de acuerdo con la invención a diversas concentraciones durante un periodo de tiempo que es suficiente para permitir que los agentes activos, tales como anti-IgM, induzcan una respuesta celular, tal como la expresión de un marcador de superficie, normalmente entre aproximadamente una hora y una semana. Pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* usando células cultivadas de la sangre o de una muestra de biopsia. La cantidad de marcador de superficie expresada se evalúa mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos que reconocen al marcador.

20 La dosis varía dependiendo del compuesto específico usado, la enfermedad concreta, el estado del paciente, etc. Una dosis terapéutica normalmente es considerablemente suficiente para reducir la población de células no deseadas en el tejido diana mientras que se mantiene la viabilidad del paciente. Generalmente, el tratamiento continúa hasta que se ha producido una reducción considerable, por ejemplo, una reducción de al menos el 50% en la carga de células, y puede continuarse esencialmente hasta que no se detectan células no deseadas en el organismo.

Técnica anterior

E. Wahlberg et al., Nature Biotechnology (2012), 30(3), 283.

M. Elagawany et al. describen en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23 (2013) 2007-2013 el compuesto

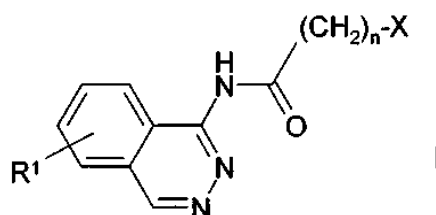


30 Este compuesto es inactivo para inhibir a tanquirasas.

Se describen otros inhibidores de tanquirasas en los documentos WO 2013/012723, WO 2013/010092 y WO 2013/082217.

Sumario de la invención

La invención se refiere a compuestos de fórmula I



35

en la que

R¹ indica H, Hal, CH₃, OCH₃ o CH₂OH,

X indica Ar o Cyc,

5 Ar indica fenilo, bifenilo o naftilo, estando cada uno de ellos sin sustituir o mono, di o trisustituido por Hal, NO₂, CN, A, [C(R²)₂]_pOR², S(O)_mR², [C(R²)₂]_pN(R²)₂, [C(R²)₂]_pCOOR², [C(R²)₂]_pCON(R²)₂, [C(R²)₂]_pSO₂N(R²)₂, NR²COR², NR²SO₂R², NR²CON(R²)₂, NHCOOA, O[C(R²)₂]_nN(R²)₂, CHO y/o COA,

R² indica H o A,

10 A indica un alquilo ramificado o sin ramificar con 1-10 átomos de C, en el que dos átomos de carbono adyacentes pueden formar un doble enlace y/o pueden reemplazarse uno o dos grupos CH y/o CH₂ no adyacentes por átomos de N, O y/o S y en el que pueden reemplazarse 1-7 átomos de H por F, Cl y/u OH,

Cyc indica cicloalquilo con 3, 4, 5, 6 o 7 átomos de C,

Hal indica F, Cl, Br o I,

m indica 0, 1 o 2,

n indica 1, 2 o 3,

15 p indica 0, 1, 2, 3 o 4

y sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

La invención también se refiere a las formas ópticamente activas (estereoisómeros), los enantiómeros, los racematos, los diastereómeros y los hidratos y solvatos de estos compuestos.

20 Además, la invención se refiere a derivados farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I.

El término solvatos de los compuestos se usa para referirse a aductos de moléculas de disolventes inertes en los compuestos que se forman debido a sus fuerzas de atracción mutuas. Los solvatos son, por ejemplo, mono o dihidratos o alcóxidos.

25 Se entiende que la invención también se refiere a los solvatos de las sales. La expresión derivados farmacéuticamente aceptables se usa para referirse, por ejemplo, a las sales de los compuestos de acuerdo con la invención.

30 Como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "profármaco" significa un derivado de un compuesto de fórmula I que puede hidrolizarse, oxidarse o reaccionar de otro modo en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar un compuesto activo, particularmente un compuesto de fórmula I. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero sin limitación, derivados y metabolitos de un compuesto de fórmula I que incluyen restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidas biohidrolizables y análogos de fosfato biohidrolizables. En determinadas realizaciones, los profármacos de compuestos con grupos funcionales carboxilo son los ésteres de alquilo inferior del ácido carboxílico. Los ésteres de carboxilato se forman convenientemente esterificando cualquiera de los restos de ácido carboxílico presentes en la molécula. Los profármacos pueden prepararse típicamente usando métodos bien conocidos, tal como los descritos en Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 6^ª ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) y Design and Application of Prodrugs (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers Gmfh).

40 La expresión "cantidad eficaz" indica la cantidad de un medicamento o de un principio activo farmacéutico que produce en un tejido, sistema, animal o ser humano una respuesta biológica o médica que se persigue o desea, por ejemplo, por un investigador o médico.

Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" indica una cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido esta cantidad, tiene las siguientes consecuencias:

tratamiento, curación, prevención o eliminación mejoradas de una enfermedad, síndrome, afección, dolencia,

trastorno o efectos secundarios o también la reducción en el avance de una enfermedad, dolencia o trastorno.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" también abarca las cantidades que son eficaces para aumentar la función fisiológica normal.

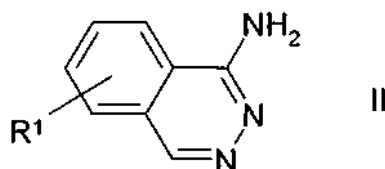
5 La invención también se refiere a mezclas de los compuestos de fórmula I, por ejemplo, mezclas de dos diastereómeros, por ejemplo, a una proporción de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:100 o 1:1000.

Estas son mezclas particularmente preferentes de compuestos estereoisoméricos.

"Tautómeros" se refiere a las formas isoméricas de un compuesto que están en equilibrio unas con otras. Las concentraciones de las formas isoméricas dependerán del entorno en el que se encuentra el compuesto y pueden ser distintas dependiendo de, por ejemplo, si el compuesto es un sólido o está en una solución orgánica o acuosa.

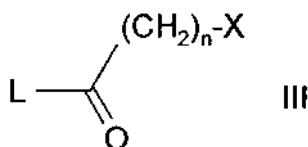
10 La invención se refiere a los compuestos de fórmula I y sales de los mismos y a un proceso para la preparación de compuestos de fórmula I y sales solvatos, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, caracterizados por que

se hace reaccionar un compuesto de fórmula II



15 en el que R¹ tiene los significados indicados en la reivindicación 1

con un compuesto de fórmula III



en el que X y n tienen los significados indicados en la reivindicación 1,

y L indica Cl, Br, I o un grupo OH libre o reactivo modificado funcionalmente,

20 y/o

una base o un ácido de fórmula I se transforma en una de sus sales.

Con anterioridad y en lo sucesivo, los radicales R¹ y Ar tienen los significados indicados para la fórmula I, a menos que se indique expresamente de otro modo.

25 A indica alquilo, ya sea no ramificado (lineal) o ramificado, y tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de C. A preferentemente indica etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo o *terc*-butilo, adicionalmente también pentilo, 1-, 2- o 3-metilbutilo, 1,1-, 1,2- o 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1-, 2-, 3- o 4-metilpentilo, 1,1-, 1,2-, 1,3-, 2,2-, 2,3- o 3,3-dimetilbutilo, 1- o 2-etilbutilo, 1-etil-1-metilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2- o 1,2,2-trimetilpropilo, además preferentemente, por ejemplo, trifluorometilo.

30 A de manera muy particularmente preferente indica alquilo que tiene 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de C, preferentemente etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo o 1,1,1-trifluoroetilo. Además, A indica preferentemente CH₂OCH₃, CH₂CH₂OH o CH₂CH₂OCH₃.

R¹ preferentemente indica H, Hal o CH₃.

R² preferentemente indica H, metilo, etilo, propilo, butilo o trifluorometilo.

Ar preferentemente indica fenilo, que no está sustituido o está mono-, di o trisustituido por Hal, NO₂, CN, A y/o [C(R²)₂]_pOR².

p preferentemente indica 0, 1 o 2.

5 Hal preferentemente indica F, Cl o Br, pero también I, de forma particularmente preferente F o Cl.

Cyc preferentemente indica ciclopentilo o ciclohexilo.

A lo largo de la invención, todos los radicales que aparecen más de una vez pueden ser idénticos o diferentes, es decir, son independientes unos de otros.

10 Los compuestos de fórmula I pueden tener uno o más centros quirales y por lo tanto pueden encontrarse en diversas formas estereoisoméricas. La fórmula I abarca todas estas formas.

Por consiguiente, la invención se refiere, en particular, a los compuestos de fórmula I en los que al menos uno de dichos radicales tiene uno de los significados preferidos indicados anteriormente. Algunos grupos preferidos de compuestos pueden expresarse por las siguientes fórmulas la a ld, las cuales conforman la fórmula I y en las que los radicales no designados en mayor detalle tienen el significado indicado por la fórmula I, pero en los que

15 en la R¹ indica H, Hal o CH₃;

en lb Ar indica fenilo, que no está sustituido o está mono-, di o trisustituido por Hal, NO₂, CN, A y/o [C(R²)₂]_pOR²;

en lc A indica alquilo no ramificado o ramificado con 1-6 átomos de C, en el que pueden reemplazarse 1-5 átomos de H por F;

en ld R¹ indica H, Hal o CH₃,

20 Ar indica fenilo, que no está sustituido o está mono-, di o trisustituido por Hal, NO₂, CN, A y/o [C(R²)₂]_pOR²,

R² indica H o A,

A indica un alquilo ramificado o sin ramificar con 1-6 átomos de C, en el que pueden reemplazarse 1-5 átomos de H por F,

Hal indica F, Cl, Br o I,

25 p indica 0, 1, 2, 3 o 4

y sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

30 Los compuestos de fórmula I y también los materiales de partida para sus preparaciones, además, se preparan por métodos en sí conocidos, como se describe en la bibliografía (por ejemplo en los trabajos convencionales, tales como Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie [Métodos de química orgánica], Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart), para ser exactos, en condiciones de reacción que son conocidas y adecuadas para dichas reacciones. También se puede hacer uso en este caso de variantes en sí conocidas que no se mencionan con mayor detalle en el presente documento.

35 Los compuestos iniciales de las fórmulas II y III son generalmente conocidos. Si son nuevos, sin embargo, pueden prepararse por métodos en sí conocidos.

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse preferentemente haciendo reaccionar un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III.

40 En los compuestos de fórmula III, L preferentemente indica Cl, Br, I o un grupo OH libre o reactivo modificado, tal como, por ejemplo, un éster activado, una imidazolida o un alquilsulfoniloxi que tiene 1-6 átomos de C (preferentemente metil-sulfoniloxi o trifluorometilsulfoniloxi) o arilsulfoniloxi que tiene 6-10 átomos de C (preferentemente fenil o p-tolilsulfoniloxi).

Generalmente, la reacción se lleva a cabo en presencia de un agente de unión a ácido, preferentemente una base orgánica, tal como DIPEA, trietilamina, dimetilamina, piridina o quinolina.

También puede ser favorable la adición de un hidróxido de metal alcalino o alcalinotérreo, carbonato o bicarbonato u otra sal de un ácido débil de metales alcalinos o alcalinotérreos, preferentemente de potasio, sodio, calcio o cesio.

- 5 Dependiendo de las condiciones que se usen, el tiempo de reacción es de entre unos pocos minutos y 14 días, la temperatura de reacción es de entre aproximadamente -30°C y 140°C, normalmente entre -10°C y 90°C, en particular entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 70°C.

Los ejemplos de disolventes inertes adecuados son hidrocarburos tales como hexano, éter de petróleo, benceno, tolueno o xileno; hidrocarburos clorados, tales como tricloroetileno, 1,2-dicloroetano, tetracloruro de carbono, cloroformo o diclorometano; alcoholes, tales como metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol o *tert*-butanol; éteres, tales como éter dietílico, éter diisopropílico, tetrahidrofurano (THF) o dioxano; éteres de glicol, tales como monometil o monoetil éter de etilenglicol, dimetil éter de etilenglicol (diglima); cetonas, tales como acetona o butanona; amidas, tales como acetamida, dimetilacetamida o dimetilformamida (DMF); nitrilos, tales como acetonitrilo; sulfóxidos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO); disulfuro de carbono; ácidos carboxílicos, tales como ácido fórmico o ácido acético; nitrocompuestos, tales como nitrometano o nitrobenzeno; ésteres, tales como acetato de etilo, o mezclas de dichos disolventes.

Se prefieren de forma particular acetonitrilo, 1,2-dicloroetano, diclorometano y/o DMF.

Sales farmacéuticas y otras formas

Los compuestos de acuerdo con la invención mencionados pueden usarse en su forma final no de sal. Por otro lado, la presente invención también abarca el uso de estos compuestos en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, que pueden derivarse de distintos ácidos y bases orgánicos e inorgánicos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Las formas de sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de fórmula I se preparan en su mayoría por métodos convencionales. Si el compuesto de fórmula I contiene un grupo carboxilo, una de sus sales adecuadas puede formarse haciendo reaccionar el compuesto con una base adecuada para conseguir la correspondiente sal de adición de base. Dichas bases son, por ejemplo, hidróxidos de metal alcalino, incluyendo hidróxido potásico, hidróxido sódico e hidróxido de litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos, tales como hidróxido de bario e hidróxido de calcio; alcóxidos de metal alcalino, por ejemplo, etóxido de potasio y propóxido de sodio; y diversas bases orgánicas, tales como piperidina, dietanolamina y N-metil-glutamina. Las sales de aluminio de los compuestos de fórmula I se incluyen igualmente. En el caso de ciertos compuestos de fórmula I, pueden formarse sales de adición de ácido tratando estos compuestos con ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplos haluros de hidrógeno, tales como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno o yoduro de hidrógeno, otros ácidos minerales y las sales correspondientes de los mismos, tales como sulfato, nitrato o fosfato y similares, y alquil y monoarilsulfonatos, tales como etanosulfonato, toluenosulfonato y bencenosulfonato, y otros ácidos orgánicos y las sales correspondientes de los mismos, tales como acetato, trifluoroacetato, tartrato, maleato, succinato, citrato, benzoato, salicilato, ascorbato y similares. Por consiguiente, las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I incluyen las siguientes: acetato, adipato, alginato, arginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato (besilato), bisulfato, bisulfito, bromuro, butirato, canforato, canforsulfonato, caprilato, cloruro, clorobenzoato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dihidrogenofosfato, dinitrobenzoato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, formiato, galacterato (del ácido múcico), galacturonato, glucoheptanoato, gluconato, glutamato, glicerofosfato, hemisuccinato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hipurato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, yoduro, isetionato, isobutirato, lactato, lactobionato, malato, maleato, malonato, mandelato, metafosfato, metanosulfonato, metilbenzoato, monohidrogenofosfato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, oleato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilacetato, 3-fenilpropionato, fosfato, fosfonato, ftalato, pero esto no indica una restricción.

Además, las sales básicas de los compuestos de acuerdo con la invención incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre, hierro (III), hierro (II), litio, magnesio, manganeso (III), manganeso (II), potasio, sales de sodio y cinc, pero no se pretende que indiquen una restricción. De las sales anteriormente mencionadas, se prefieren las de amonio; las sales de los metales alcalinos sodio y potasio, y las sales de los metales alcalinotérreos calcio y magnesio. Las sales de los compuestos de fórmula I que se derivan de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, incluyendo también aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, por ejemplo arginina, betaína, cafeína, cloroprocaína, colina, N,N'-dibenciletildiamina (benzamina), dicitclohexilamina, dietanolamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lidocaína, lisina, meglumina, N-metil-D-glucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietanolamina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina y tris-(hidroximetil) metilamina (trometamina), pero no se pretende que indiquen una restricción.

Los compuestos de la presente invención que contienen grupos básicos que contienen nitrógeno pueden

cuaternizarse usando agentes tales como haluros de alquilo (C₁-C₄), por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro de metilo, etilo, isopropilo y *terc*-butilo; sulfatos de dialquilo (C₁-C₄), por ejemplo sulfato de dimetilo, dietilo y diamilo; haluros de alquilo (C₁₀-C₁₈), por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro de decilo, docecilo, laurilo, miristilo y estearilo; y haluros de arilalquilo (C₁-C₄), por ejemplo cloruro de bencilo y bromuro de fenetilo. Pueden prepararse compuestos tanto hidrosolubles como liposolubles de acuerdo con la invención usando dichas sales.

Las sales farmacéuticas anteriormente mencionadas preferidas incluyen acetato, trifluoroacetato, besilato, citrato, fumarato, gluconato, hemisuccinato, hipurato, clorhidrato, bromhidrato, isetionato, mandelato, meglumina, nitrato, oleato, fosfonato, pivalato, fosfato sódico, estearato, sulfato, sulfosalicilato, tartrato, tiomalato, fosforilato y trometamina, pero no se pretende que indiquen una restricción.

Se prefieren de forma particular clorhidrato, diclorhidrato, bromhidrato, maleato, fosforilado, fosfato, sulfato y succinato.

Las sales de adición de ácido de los compuestos básicos de fórmula I se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado, provocando la formación de la sal de una manera convencional. La base libre puede regenerarse poniendo la forma de sal en contacto con una base y aislando la base libre de una manera convencional. Las formas de base libre difieren en cierta manera de las formas de sal correspondientes de las mismas en cuanto a ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares; sin embargo, para los fines de la invención, por el contrario, las sales corresponden a las respectivas formas de base libre de las mismas.

Como se ha mencionado, las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos y metales alcalinotérreos o aminas orgánicas. Los metales preferidos son sodio, potasio, magnesio y calcio. Las aminas orgánicas preferidas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metil-D-glucamina y procaina.

Las sales de adición de base de compuestos ácidos de acuerdo con la invención se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada, provocando la formación de la sal de una manera convencional. El ácido libre puede regenerarse poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de una manera convencional. Las formas de ácido libre difieren en cierto modo de las correspondientes formas de sal de las mismas con respecto a ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares; sin embargo, para los fines de la invención, por el contrario, las sales corresponden a las respectivas formas de ácido libre de los mismos.

Si un compuesto de acuerdo con la invención contiene más de un grupo que sea capaz de formar sales farmacéuticamente aceptables de este tipo, la invención también abarca sales múltiples. Las formas de sal múltiple típicamente incluyen, por ejemplo, bitartrato, diacetato, difumarato, dimeglumina, difosfato, disodio y triclorhidrato, pero no se pretende que indiquen una restricción.

Con respecto a lo indicado con anterioridad, puede observarse que la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" a este respecto se entiende que significa un principio activo que comprende un compuesto de fórmula I en la forma de una de sus sales, en particular, si esta forma de sal proporciona propiedades farmacocinéticas mejoradas al principio activo en comparación con la forma libre del principio activo o cualquier otra forma de sal del principio activo usada con anterioridad. La forma de sal farmacéuticamente aceptable del principio activo también puede proporcionar por primera vez este principio activo con una propiedad farmacocinética deseada que no tenía antes e incluso puede tener una influencia positiva en la farmacodinámica de este principio activo con respecto a su eficacia terapéutica en el cuerpo.

Isótopos

Además, se prevé que un compuesto de fórmula I incluya formas del mismo marcadas con isótopos. Una forma marcada con isótopos de un compuesto de fórmula I es idéntica a este compuesto excepto por el hecho de que uno o más átomos del compuesto se han reemplazado por un átomo o átomos que tienen una masa atómica o un número másico que difiere de la masa atómica o el número másico del átomo que habitualmente se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden adquirirse fácilmente en el mercado y que pueden incorporarse en un compuesto de fórmula I mediante métodos bien conocidos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, por ejemplo, ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F y ³⁶Cl, respectivamente. Se pretende que un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que contiene uno o más de los isótopos anteriormente mencionados y/u otros isótopos de otros átomos forme parte de la presente invención. Se puede usar un compuesto de fórmula I marcado con isótopos de distintas formas beneficiosas. Por ejemplo, un compuesto marcado con isótopos de fórmula I en el que se ha incorporado, por ejemplo, un radioisótopo, tal como ³H o ¹⁴C, es adecuado para medicamentos y/o ensayos de distribución de sustrato en tejidos. Estos radioisótopos, es decir, tritio (³H) y carbono-14 (¹⁴C), se prefieren en particular debido a su fácil preparación y

excelente detectabilidad. La incorporación de isótopos más pesados, por ejemplo, deuterio (^2H), en un compuesto de fórmula I tiene ventajas terapéuticas debido a la mayor estabilidad metabólica de este compuesto marcado con isótopos. Una mayor estabilidad metabólica se traduce directamente en una semivida *in vivo* aumentada o en dosificaciones menores, que en la mayoría de circunstancias podrían representar una realización preferida de la presente invención. Un compuesto de fórmula I marcado con isótopos normalmente puede prepararse llevando a cabo los procedimientos divulgados en los esquemas de síntesis y en la descripción relacionada en el apartado de ejemplos y en el apartado de preparación en el presente texto, reemplazando un reactivo no marcado con isótopos por un reactivo fácilmente disponible marcado con isótopos.

También puede incorporarse deuterio (^2H) en un compuesto de fórmula I con el propósito de manipular el metabolismo oxidativo del compuesto mediante el efecto isotópico cinético primario. El efecto isotópico cinético primario es un cambio en la velocidad de una reacción química como resultado del intercambio de núcleos isotópicos, que a su vez está causado por el cambio en las energías de estado fundamental necesarias para la formación de enlaces covalentes después de este intercambio isotópico. El intercambio de un isótopo más pesado normalmente da como resultado un descenso en la energía de estado fundamental para un enlace químico y por lo tanto provoca una reducción en la velocidad en la ruptura del enlace limitante de la velocidad. Si la ruptura del enlace se produce en, o cerca de, una región de punto de silla a lo largo de la coordenada de una reacción multi-producto, las velocidades de distribución del producto pueden alterarse sustancialmente. A modo explicativo: si el deuterio se une a un átomo de carbono en una posición no intercambiable, son típicas diferencias de velocidad de $k_M/k_D = 2-7$. Si esta diferencia de velocidad se aplica con éxito al compuesto de fórmula I que es susceptible a la oxidación, puede modificarse drásticamente el perfil de este compuesto *in vivo* y dar como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Cuando se descubren y desarrollan agentes terapéuticos, el experto en la materia intenta optimizar parámetros farmacocinéticos a la vez que se mantienen propiedades *in vitro* deseables. Es razonable suponer que muchos compuestos con perfiles farmacocinéticos limitados sean susceptibles al metabolismo oxidativo. Los ensayos con microsomas hepáticos *in vitro* disponibles en la actualidad proporcionan información valiosa acerca del transcurso del metabolismo oxidativo de este tipo, que a su vez permite el diseño racional de compuestos deuterados de la fórmula I con estabilidad mejorada mediante la resistencia a dicho metabolismo oxidativo. De este modo se obtienen mejoras significativas en los perfiles farmacocinéticos de los compuestos de la fórmula I, y pueden expresarse cuantitativamente en términos de mejoras en la semivida *in vivo* ($t/2$), concentración con el máximo efecto terapéutico ($C_{\text{máx}}$), área bajo la curva de dosis-respuesta (ABC), y F; y en términos de eliminación, dosis y costes materiales reducidos.

Lo siguiente pretende ilustrar lo anterior: se prepara un compuesto de fórmula I que tiene múltiples sitios de ataque potenciales para el metabolismo oxidativo, por ejemplo, átomos de hidrógeno bencílicos y átomos de hidrógeno unidos a un átomo de nitrógeno, en forma de una serie de análogos en los que se reemplazan varias combinaciones de átomos de hidrógeno por átomos de deuterio, de tal forma que algunos, la mayoría o todos estos átomos de hidrógeno se han reemplazado por átomos de deuterio. Las determinaciones de la semivida permiten una determinación favorable y precisa de la magnitud hasta la que se ha mejorado el grado de mejora en la resistencia al metabolismo oxidativo. De este modo, se determina que puede extenderse la semivida del compuesto parental hasta un 100% como resultado del intercambio deuterio-hidrógeno de este tipo.

También puede usarse el intercambio de deuterio-hidrógeno en un compuesto de la fórmula I para lograr una modificación favorable del espectro de metabolitos del compuesto de partida para reducir o eliminar los metabolitos tóxicos no deseados. Por ejemplo, Si aparece un metabolito tóxico durante la escisión oxidativa del enlace carbono-hidrógeno (C-H), puede suponerse de manera razonable que el análogo deuterado disminuirá enormemente o eliminará la producción del metabolito indeseado, incluso si la oxidación particular no es una etapa determinante de la velocidad. Puede encontrarse información adicional sobre el estado de la técnica con respecto al intercambio deuterio-hidrógeno, por ejemplo, en Hanzlik et al., J. Org. Chem. 55, 3992-3997, 1990, Reider et al., J. Org. Chem. 52, 3326-3334, 1987, Foster, Adv. Drug Res. 14, 1-40, 1985, Gillette et al, Biochemistry 33(10) 2927-2937, 1994, y Jarman et al. Carcinogenesis 16(4), 683-688, 1993.

La invención se refiere además a medicamentos que comprenden al menos un compuesto de fórmula I y/o derivados, solvatos y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, y opcionalmente, excipientes y/o adyuvantes.

Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse en forma de unidades de dosificación que comprenden una cantidad predeterminada de principio activo por unidad de dosificación. Dicha unidad puede comprender, por ejemplo, de 0,5 mg a 1 g, preferentemente de 1 mg a 700 mg, de manera particularmente preferente de 5 mg a 100 mg, de un compuesto de acuerdo con la invención, dependiendo de la afección tratada, del método de administración y de la edad, peso y estado del paciente, o pueden administrarse las formulaciones farmacéuticas en forma de dosis unitarias que comprenden una cantidad predeterminada de principio activo por unidad de dosificación. Las formulaciones en dosis unitaria preferidas son aquellas que comprenden una dosis diaria o una dosis parcial, tal como se ha indicado anteriormente, o una fracción correspondiente de la misma de un principio

activo. Además, pueden prepararse formulaciones farmacéuticas de este tipo usando un proceso que se conoce de manera general en la técnica farmacéutica.

5 Las formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para su administración mediante cualquier método adecuado deseado, por ejemplo, por métodos orales (incluyendo bucales o sublinguales), rectales, nasales, tópicos (incluyendo bucales, sublinguales o transdérmicos), vaginales o parenterales (incluyendo subcutáneos, intramusculares, intravenosos o intradérmicos). Dichas formulaciones pueden prepararse usando todos los procesos conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, combinando el principio activo con los excipientes o adyuvantes.

10 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden administrarse como unidades separadas, tales como, por ejemplo, cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas comestibles o alimentos en espuma; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de aceite en agua.

15 Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de principio activo puede combinarse con un excipiente inerte oral, no tóxico y farmacéuticamente aceptable, tales como, por ejemplo, etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan triturando finalmente el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un excipiente farmacéutico triturado finamente de un modo similar, tal como, por ejemplo, un carbohidrato comestible, tales como, por ejemplo, almidón o manitol. Igualmente, puede estar presente un aromatizante, un conservante, un dispersante y un colorante.

20 Las cápsulas se producen preparando una mezcla de polvo como se ha descrito anteriormente y rellenando vainas de gelatina con esa forma con la misma. Pueden añadirse emolientes y lubricantes tales como, por ejemplo, ácido silícico altamente disperso, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol en forma sólida a la mezcla de polvo antes de la operación de rellenado. Igualmente, puede añadirse un disgregante o solubilizante tal como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio, para mejorar la disponibilidad del medicamento después de que se haya ingerido la cápsula.

25 Además, en caso de que se desee o sea necesario, pueden incorporarse igualmente a la mezcla aglutinantes, lubricantes y disgregantes adecuados, así como colorantes. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como, por ejemplo, glucosa o beta-lactosa, edulcorantes procedentes del maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como, por ejemplo, goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitarse a los mismos, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantano y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o comprimiendo en seco la mezcla, añadiendo un lubricante y un disgregante y comprimiendo la mezcla completa para dar comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto finamente triturado de un modo adecuado con un diluyente o una base, como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente con un aglutinante, tal como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinil-pirrolidona, un retardante de la disolución, tal como, por ejemplo, parafina, un acelerador de la absorción, tal como, por ejemplo, una sal cuaternaria, y/o un absorbente, tal como, por ejemplo, bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo puede granularse humectándola con un aglutinante, tal como, por ejemplo, jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de celulosa o materiales poliméricos y comprimiéndola contra un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla de polvo puede pasarse por una máquina para la elaboración de comprimidos, proporcionando aglomerados de forma no uniforme, que se disgregan para formar gránulos. Los gránulos pueden lubricarse por adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral para evitar la adherencia a los moldes para formar los comprimidos. Después se comprime la mezcla lubricada para dar comprimidos. Los compuestos de acuerdo con la invención también pueden combinarse con un excipiente inerte fluido y después comprimirlo directamente para dar comprimidos sin llevar a cabo las etapas de granulación o de prensado en seco. Puede estar presente una capa protectora transparente u opaca que consiste en una capa sellante de goma laca, una capa de azúcar o material polimérico y una capa brillante de cera. Pueden añadirse colorantes a estos recubrimientos para facilitar la diferenciación entre diferentes dosis unitarias.

50 Los líquidos orales, tales como, por ejemplo, solución, jarabes y elixires, pueden prepararse en forma de dosis unitarias de tal forma que una cantidad dada comprende una cantidad preespecificada del compuesto. Los jarabes pueden prepararse disolviendo el compuesto en una solución acuosa con un aroma adecuado, mientras que los elixires se preparan usando un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones pueden formularse mediante la dispersión del compuesto en un vehículo no tóxico. Igualmente, pueden añadirse solubilizantes y emulsionantes, tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservantes, aditivos saporíferos, tales como, por ejemplo, aceite de menta o edulcorantes naturales o sacarina, u otros edulcorantes artificiales y similares.

Si se desea, las formulaciones en dosis unitaria para administración oral pueden encapsularse en microcápsulas. La formulación puede asimismo prepararse de tal modo que la liberación se prolongue o retarde, tal como, por ejemplo,

recubriendo o incluyendo el material en partículas en polímeros, cera y similares.

Los compuestos de fórmula I y las sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticos de los mismos también pueden administrarse en forma de sistemas de suministro de liposomas, tal como, por ejemplo, vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de diversos fosfolípidos, tal como, por ejemplo, colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

5 Los compuestos de fórmula I y las sales, tautómeros y estereoisómeros de los mismos también pueden suministrarse usando anticuerpos monoclonales como portadores individuales a los que se acoplan las moléculas de compuesto. Los compuestos también pueden acoplarse a polímeros solubles en forma de portadores para medicamentos dirigidos. Dichos polímeros pueden abarcar polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamidofenol, polihidroxietilpartimidofenol u óxido de polietileno-polilisina, sustituidos con radicales palmitoílo. Además, los compuestos pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables que son adecuados para lograr la liberación controlada de un medicamento, por ejemplo, ácido poliláctico, poli-épsilon-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polihidroxipiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrógenos.

15 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden administrarse en forma de emplastos independientes para un contacto íntimo y prolongado con la epidermis del receptor. Por lo tanto, por ejemplo, el principio activo puede suministrarse a partir del emplasto mediante iontoforesis, tal como se describe de manera general en Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986).

20 Los compuestos farmacéuticos adaptados para administración tópica pueden formularse en forma de pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites.

25 Para el tratamiento del ojo u otro tejido externo, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferentemente en forma de una pomada o crema tópica. En el caso de una formulación para dar una pomada, puede emplearse el principio activo con una base para crema bien parafínica o bien miscible en agua. Como alternativa, el principio activo puede formularse para dar una crema con una base para crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para aplicación tópica al ojo incluyen gotas oculares, en las que el principio activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, en particular, un disolvente acuoso.

Las formulaciones farmacéuticas para aplicación tópica en la boca abarcan pastillas para chupar, pastillas y enjuagues bucales.

30 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden administrarse en forma de supositorios o enemas.

35 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal en las que la sustancia portadora es un sólido comprenden un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20-500 micrómetros, que se administra del modo en que se consume el snuff, es decir, mediante una inhalación rápida por los conductos nasales desde un contenedor que contiene el polvo mantenido próximo a la nariz. Las formulaciones adecuadas para administración en forma de pulverización nasal o de gotas nasales con un líquido como sustancia portadora abarcan soluciones de principio activo en agua o aceite.

40 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación abarcan polvos o nieblas en partículas finas, que pueden generarse por medio de diversos tipos de dispensadores a presión con aerosoles, nebulizadores o insufladores.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden administrarse en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverizador.

45 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que comprenden antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, mediante los cuales se hace isotónica la formulación con la sangre del receptor que va a ser tratado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden comprender medios de suspensión y espesantes. Las formulaciones pueden administrarse en una sola dosis o en recipientes multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y almacenarse en estado criodesecado (liofilizado), de tal forma que solo es necesaria la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para fines de inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección preparadas de acuerdo con la recta pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

50

Huelga decir que, además de los constituyentes particularmente mencionados anteriores, las formulaciones también pueden comprender otros agentes habituales en la técnica con respecto al tipo particular de formulación; por lo tanto, por ejemplo, las formulaciones que son adecuadas para administración oral pueden comprender aromas.

5 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I depende de una serie de factores, incluyendo, por ejemplo, la edad y el peso del animal, la enfermedad concreta que requiera tratamiento, y su gravedad, la naturaleza de la formulación y el método de administración, y en última instancia, se determina por el médico o veterinario tratante. Sin embargo, una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención se encuentra generalmente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal del receptor (mamífero) por día y en particular, típicamente en el intervalo de 1 a 10 mg/kg de peso corporal por día. Por lo tanto, la cantidad real por día para un mamífero adulto que pese 70 kg es normalmente de entre 70 y 700 mg, pudiéndose administrar esta cantidad en forma de una sola dosis por día o normalmente en una serie de dosis parciales (tales como, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) al día, de tal forma que la dosis diaria total sea la misma. Una cantidad eficaz de una sal o un solvato de un derivado fisiológicamente funcional del mismo puede determinarse como la fracción de la cantidad eficaz del compuesto de acuerdo con la invención en sí. Puede inferirse que, para el tratamiento de otras afecciones mencionadas anteriormente, son adecuadas dosis similares.

Puede lograrse un tratamiento combinado de este tipo con la ayuda de la dispensación simultánea, consecutiva o separada de los componentes individuales del tratamiento. Los productos de combinación de este tipo emplean los compuestos de acuerdo con la invención.

20 La invención se refiere además a medicamentos que comprenden al menos un compuesto de fórmula I y/o sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, y al menos un principio activo medicinal adicional.

La invención también se refiere a un conjunto (kit) que consiste en envases separados de

- (a) una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I y/o sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, y
- 25 (b) una cantidad eficaz de un principio activo medicinal adicional.

El conjunto comprende recipientes adecuados, tales como cajas, botellas individuales, bolsas o ampollas. El conjunto puede, por ejemplo, comprender ampollas separadas, conteniendo cada una una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula I y/o sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, y una cantidad eficaz de un principio activo medicinal adicional en forma disuelta o liofilizada.

"Tratar" tal como se usa en el presente documento, significa aliviar, total o parcialmente, los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o frenar, o detener la progresión o empeoramiento adicional de aquellos síntomas, o la prevención o profilaxis de la enfermedad o trastorno en un sujeto en riesgo de desarrollar el trastorno o enfermedad.

35 La expresión "cantidad eficaz" en relación con n compuesto de fórmula (I) puede significar una cantidad capaz de aliviar, total o parcialmente, los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o de frenar o detener la progresión o empeoramiento adicional de aquellos síntomas, o de prevenir o proporcionar profilaxis para la enfermedad o trastorno en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad divulgada en el presente documento, tal como afecciones inflamatorias, afecciones inmunológicas, cáncer o afecciones metabólicas.

40 En una realización, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) es una cantidad que inhibe una tanquirasa en una célula, tal como, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) inhibe la tanquirasa en una célula en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99%, en comparación con la actividad de la tanquirasa en una célula no tratada. La cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I), por ejemplo, en una composición farmacéutica, puede encontrarse a un nivel que ejerza el efecto deseado; por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg/kg del peso corporal de un sujeto a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal de un sujeto en dosis unitaria para administración tanto oral como parenteral.

Uso

Los presentes compuestos son adecuados como principios activos farmacéuticos para mamíferos, especialmente para seres humanos, en el tratamiento del cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades cardiovasculares, lesiones del sistema nervioso central y diferentes formas de inflamación.

50 La presente invención abarca el uso de los compuestos de fórmula I y/o de sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la

prevención del cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades cardiovasculares, lesiones del sistema nervioso central y diferentes formas de inflamación.

Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis de contacto, reacción de hipersensibilidad retardada y similares.

5 También se encuentra abarcado el uso de los compuestos de fórmula I y/o de sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inducida por tanquirasa o una afección inducida por tanquirasa en un mamífero, comprendiendo este método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención a un mamífero enfermo que necesita dicho tratamiento. La cantidad terapéutica varía dependiendo de la enfermedad
10 concreta y puede determinarse por el experto en la materia sin un esfuerzo indebido.

La expresión "enfermedades o afecciones inducidas por tanquirasa" se refiere a patologías que dependen de la actividad de una o más tanquirasas. Las enfermedades asociadas con la actividad de tanquirasa incluyen cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades cardiovasculares, lesiones del sistema nervioso central y diferentes formas de inflamación.

15 La presente invención se refiere específicamente a compuestos de fórmula I y a sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, para su uso en el tratamiento de enfermedades en las que está implicada la inhibición, la regulación y/o la modulación de la inhibición de tanquirasa.

20 La presente invención se refiere específicamente a compuestos de fórmula I y a sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, para su uso en la inhibición de tanquirasa.

25 La presente invención se refiere específicamente a compuestos de fórmula I y a sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, para su uso en el tratamiento del cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades cardiovasculares, lesiones del sistema nervioso central y diferentes formas de inflamación.

30 Los cánceres representativos para cuyo tratamiento o prevención son útiles los compuestos de fórmula I incluyen, pero sin limitación, cáncer de cabeza, de cuello, de ojo, de boca, de garganta, de esófago, de bronquios, de laringe, de faringe, de pecho, de huesos, de pulmón, de colon, de recto, de estómago, de próstata, de vejiga urinaria, uterino, de cuello de útero, de mama, de ovarios, de testículo u otros órganos reproductivos, de piel, de tiroides, de la sangre, de los ganglios linfáticos, de riñón, de hígado, de páncreas, de cerebro, del sistema nervioso central, tumores sólidos y tumores hematológicos.

35 Las enfermedades cardiovasculares representativas para cuyo tratamiento o prevención son útiles los compuestos de fórmula I incluyen, pero sin limitación, restenosis, aterosclerosis y sus consecuencias, tales como accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, daño isquémico en el corazón, pulmón, intestino, riñón, hígado, páncreas, bazo o cerebro.

Los compuestos divulgados de fórmula I pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos, incluyendo agentes anticáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término "agente anticáncer" se refiere a cualquier agente que se administre a un paciente con cáncer con el fin de tratar el cáncer.

40 El tratamiento anticáncer definido en el presente documento puede aplicarse como terapia única o puede implicar, además del compuesto de la invención, cirugía, radioterapia o quimioterapia convencional. Dicha quimioterapia puede incluir una o más de las siguientes categorías de agentes antitumorales:

(i) agentes antiproliferativos/antineoplásicos/dañinos para el ADN y combinaciones de los mismos, tal como se usan en la oncología médica, tales como agentes alquilantes (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, melfalano, clorambucilo, busulfán y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos, tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina, hidroxiurea y gemcitabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas, como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la vinca, como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina, y taxoides, como taxol y taxotere); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas, como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán, irinotecán y camptotecina) y agentes de diferenciación celular (por ejemplo, ácido todo trans-retinoico, ácido 13-cis-retinoico y fenretinida);

(ii) agentes citostáticos, tales como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno,

droloxifeno y yodoxifeno), reguladores negativos del receptor de estrógenos (por ejemplo, fulvestrant), antiandrógenos (por ejemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LRHR (por ejemplo, goserelina, leuprorelina y buserelina), progesteronas (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de aromatasas (por ejemplo, anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5 α -reductasa, tal como finasterida;

(iii) agentes que inhiben la invasión de células cancerosas (por ejemplo, inhibidores de metaloproteínasa, como marimastat, e inhibidores de la función receptora de activador de plasminógeno de urocinasas);

(iv) inhibidores de la función de factores de crecimiento, por ejemplo, dichos inhibidores incluyen anticuerpos para factores de crecimiento, anticuerpos para receptores de factores de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo anti-erbB2, trastuzumab [Herceptin™] y el anticuerpo anti-erbB1, cetuximab [C225]), inhibidores de farnesil transferasa, inhibidores de tirosina cinasa e inhibidores de serina/treonina cinasa, por ejemplo, inhibidores de la familia de factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, inhibidores de tirosina cinasa de la familia de EGFR, tales como N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)-quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)-quinazolin-4-amina (CI 1033)), por ejemplo, inhibidores de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas y por ejemplo, inhibidores de la familia de factores de crecimiento de hepatocitos;

(v) agentes antiangiogénicos, tales como aquellos que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, (por ejemplo, el anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular bevacizumab [Avastin™], compuestos tales como aquellos divulgados en las Solicitudes Internacionales de Patente Publicadas WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354) y compuestos que funcionan por medio de otros mecanismos (por ejemplo, linomida, inhibidores de la función de integrina avp3 y angiostatina);

(vi) agentes dañinos para los vasos, tales como combretastatina A4 y compuestos divulgados en las Solicitudes Internacionales de patente WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213;

(vii) terapias antisentido, por ejemplo, aquellos que se dirigen a las dianas enumeradas anteriormente, tales como ISIS 2503, y antisentido anti-Ras;

(viii) estrategias de terapia génica, incluyendo, por ejemplo, estrategias para el reemplazo de genes aberrantes, tales como p53 aberrante o BRCA1 o BRCA2 aberrantes, estrategias de GDEPT (terapia profarmacológica enzimática dirigida a genes), tales como aquellas que usan citosina desaminasa, timidina cinasa o una enzima nitrorreductasa bacteriana, y estrategias para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o radioterapia, tales como la terapia génica de resistencia a múltiples fármacos; y

(ix) estrategias inmunoterapéuticas, incluyendo, por ejemplo, estrategias *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales de un paciente, tales como transfección con citocinas, tales como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, estrategias para reducir la anergia de las células T, estrategias que usan células inmunitarias transfectadas, tales como células dendríticas transfectadas con citocinas, estrategias que usan líneas celulares tumorales transfectadas con citocinas, y estrategias que usan anticuerpos anti-idiotípicos.

El tratamiento anticáncer definido anteriormente puede aplicarse como monoterapia o puede implicar, además de los compuestos divulgados en el presente documento de fórmula I, cirugía o radioterapia o terapia médica convencional. Dicha terapia medicinal, por ejemplo, una quimioterapia o una terapia dirigida, puede incluir uno o más, pero preferentemente uno, de los siguientes agentes antitumorales:

Agentes alquilantes

Tales como altretamina, bendamustina, busulfán, carmustina, clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, tosilato de improsulfán, lomustina, melfalano, mitobronitol, mitolactol, nimustina, ranimustina, temozolomida, tiotepa, treosulfán, mecloretamina, carbocina, apazicuaona, fotemustina, glufosfamida, palifosfamida, pipobromano, trofosfamida, uramustina;

Compuestos de platino

Tales como carboplatino, cisplatino, heptaplatino, hidrato de miriplatino, oxaliplatino, lobaplatino, nedaplatino, picoplatino, satraplatino;

Agentes que alteran el ADN

Tales como amrubicina, bisantreno, decitabina, mitoxantrona, procarbazona, trabectedina, clofarabina, amsacrina, brostalicina, pixantrona, laromustina;

Inhibidores de topoisomerasa

5 Tales como etopósido, irinotecán, razoxano, sobuzoxano, tenipósido, topotecán, amonafida, belotecán, acetato de eliptinio, voreloxina;

Modificadores de los microtúbulos

Tales como cabazitaxel, docetaxel, eribulina, ixabepilona, paclitaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina, vinflunina, fosbretabulina, tesetaxel;

Antimetabolitos

10 Tales como asparaginasa, azacitidina, levofolinato cálcico, capecitabina, cladribina, citarabina, encitabina, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, nelarabina, pemetrexed, pralatrexato, azatioprina, tioguanina, carmofur, doxifluridina, elacitarabina, raltitrexed, sapacitabina, tegafur, trimetrexato;

Antibióticos anticáncer

15 Tales como bleomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, levamisol, miltefosina, mitomicina C, romidepsina, estreptozocina, valrubicina, zinostatina, zorrubicina, daunorubicina, plicamicina, aclarrubicina, peplomycin, pirarubicina;

Hormonas/antagonistas

20 Tales como abarelix, abiraterona, bicalutamida, buserelina, calusterona, clorotrianiseno, degarelix, dexametasona, estradiol, fluocortolona, fluoximesterona, flutamida, fulvestrant, goserelina, histrelina, leuprorelina, megestrol, mitotano, nafarelina, nandrolona, nilutamida, octreótido, prednisolona, raloxifeno, tamoxifeno, tiotropina alfa, toremifeno, trilostano, triptorelina, dietilbestrol, acolbifeno, danazol, deslorelina, epitioestanol, orteronel, enzalutamida;

Inhibidores de aromatasas

Tales como aminoglutetimida, anastrozol, exemestano, fadrozol, letrozol, testolactona, formestano;

25 Inhibidores de cinasa de molécula pequeña

30 Tales como crizotinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, pazopanib, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, vandetanib, vemurafenib, bosutinib, gefitinib, axitinib, afatinib, alisertib, dabrafenib, dacomitinib, dinaciclib, dovitinib, enzastaurina, nintedanib, lenvatinib, linifanib, linsitinib, masitinib, midostaurin, motesanib, neratinib, orantinib, perifosina, ponatinib, radotinib, rigosertib, tipifarnib, tivantinib, tivozanib, trametinib, pimasetib, alaninato de brivanib, cediranib, apatinib, S-malato de cabozantinib, carfilzomib, ibrutinib, icotinib;

Fotosensibilizantes

Tales como metoxalén, porfímero sódico, talaporfina, temoporfina;

Anticuerpos

35 Tales como alemtuzumab, besilesomab, brentuximab vedotina, cetuximab, denosumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, trastuzumab, bevacizumab, catumaxomab, elotuzumab, epratuzumab, farletuzumab, mogamulizumab, necitumumab, nimotuzumab, obinutuzumab, ocaratuzumab, oregovomab, ramucirumab, rilotumumab, siltuximab, tocilizumab, zalutumumab, zanolimumab, matuzumab, dalotuzumab, onartuzumab, pertuzumab, racotumomab, tabalumab;

Citocinas

40 Tales como aldesleucina, interferón alfa, interferón alfa2a, interferón alfa2b, tasonermina, teceleucina, oprelvecina;
Conjugados de fármaco

Tales como denilecina diftotox, ibrutumomab tiuxetan, iobenguano 1123, prednimustina, trastuzumab emtansina, estramustina, ozogamicina de gemtuzumab, aflibercept, cintredekin besudotox, edotretotida, inotuzumab ozogamicina, naptumomab estafenatox, oportuzumab monatox, tecnecio (99mTc) arcitumomab, vintafolida;

Vacunas

- 5 Tales como sipuleucel, vitespen, emepepimut-S, oncoVAX, rindopepimut, troVax, stimuvax;

Misceláneos

- 10 alitretinoína, bexaroteno, bortezomib, everolimus, ácido ibandrónico, imiquimod, lenalidomida, lentinano, metirosina, mifamurtida, ácido pamidrónico, pegaspargasa, pentostatina, sipuleucel3, sizofirán, tamibaroteno, temsirolimus, talidomida, tretinoína, vismodegib, ácido zoledrónico, talidomida, vorinostat, celecoxib, cilengitida, entinostat, etanidazol, ganetespib, idronoxilo, iniparib, ixazomib, lonidamina, nimorazol, panobinostat, peretinoina, plitidepsina, pomalidomida, procodazol, ridaforolimus, tasquinimod, telotristat, timalfasina, tirapazamina, tosedostat, trabederseno, ubenimex, valsopodar, gencicina, picibanil, reolisin, clorhidrato de retaspimicina, trebananib, virulizina.

- 15 Las siguientes abreviaturas se refieren, respectivamente, a las definiciones a continuación: ac. (acuoso), h (hora), g (gramo), l (litro), mg (miligramo), MHz (Megahercio), min (minuto), mm (milímetro), mmol (milimol), mM (milimolar), p.f. (punto de fusión), equiv (equivalente), ml (mililitro), L (microlitro), ACN (acetonitrilo), AcOH (ácido acético), CDCl₃ (cloroformo deuterado), CD₃OD (metanol deuterado), CH₃CN (acetonitrilo), c-hex (ciclohexano), DCC (diciclohexil carbodiimida), DCM (diclorometano), DIC (diisopropil carbodiimida), DIEA (diisopropil-etil-amina), DMF (dimetilformamida), DMSO (dimetilsulfóxido), DMSO-d₆ (dimetilsulfóxido deuterado), EDC (1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etilcarbodiimida), IEN (ionización por electropulverización), EtOAc (acetato de etilo), Et₂O (éter dietílico), EtOH (etanol), HATU (hexafluorofosfato de dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)-metileno]-dimetilamonio), HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), i-PrOH (2-propanol), K₂CO₃ (carbonato de potasio), CL (cromatografía líquida), MeOH (metanol), MgSO₄ (sulfato de magnesio), EM (espectrometría de masas), MTBE (metil *terc*-butil éter), NaHCO₃ (bicarbonato de sodio), NaBH₄ (borohidruro sódico), NMM (N-metil morfolina), RMN (resonancia magnética nuclear), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio), TA (temperatura ambiente), Tr (tiempo de retención), SPE (extracción en fase sólida), TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), TEA (trietilamina), TFA (ácido trifluoroacético), THF (tetrahidrofurano), TLC (cromatografía en capa fina), UV (ultravioleta).
- 20
25

Descripción de los ensayos *in vitro*

Abreviaturas:

- 30 GST = Glutati6n-S-transferasa

FRET= transferencia de energía de resonancia de fluorescencia

HTRF® = (fluorescencia resuelta en tiempo homogénea)

HEPES = tamp6n de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulf6nico

DTT = Ditiotreit6l

- 35 BSA = seroalbúmina bovina

CHAPS = detergente;

CHAPS = 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

- 40 Streptavidin-XLent® es un conjugado de alto grado de estreptavidina-XL665 para el que se han optimizado las condiciones de acoplamiento para proporcionar un conjugado con rendimiento mejorado para algunos ensayos, en particular para aquellos que requieren de una alta sensibilidad.

Pruebas de actividad bioquímica de tanquirasa 1 y 2: Ensayo de autoparsilaci6n

- 45 El ensayo de autoparsilaci6n se lleva a cabo en dos etapas: la reacci6n enzimática en la que la tanquirasa 1 marcada con GST y la tanquirasa 2 resp te autotransferían ADP-ribosa biotinilada a partir de NAD biotinilado como co-sustrato y la reacci6n de detecci6n, en donde se analiza la FRET resuelta en tempo entre anti-GST marcado con criptato unido a marcador GST de la enzima y estreptavidina marcada con Xlent® unida al resto de parsilaci6n de

biotina. La actividad de autoparsilación fue detectable directamente mediante el aumento en la señal de HTRF.

5 El ensayo de autoparsilación se lleva a cabo con el formato de ensayo HTRF® de 384 pocillos (Cisbio, Codolet, France) en placas de 384 pocillos Greiner de bajo volumen y se usa para una exploración de alto rendimiento. Se incuban tanquirasa 1 marcada con GST 250 nM (1023-1327 aa), respectivamente, aproximadamente 250 nM de tanquirasa 2 marcada con GST (873-1166 aa) y 5 µM de bio-NAD (Biolog, Life science Inst., Bremen, Alemania) como co-sustrato en un volumen total de 5 µl (HEPES 50 mM, cloruro de Mg 4 mM, Pluronic F-68 al 0,05 %, DTT 1,4 mM, DMSO al 0,5 %, pH 7,7) en ausencia o presencia del compuesto de ensayo (10 concentraciones de disolución) durante 90 min a 30°C. La reacción se detiene mediante la adición de 1 µl de solución de EDTA 50 mM. Se añaden 2 µl de la solución de detección (SA-Xlent® 1,6 mM (Cisbio, Codolet, Francia), Anti-GST-K® 7,4 mM (anti-GST marcado con Eu, Cisbio, Codolet, Francia) en HEPES 50 mM, KF 800 mM, BSA al 0,1 %, EDTA 20 mM, CHAPS al 0,1 %, pH 7,0). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se mide la HTRF con un lector multimodo Envision (Perkin Elmer LAS Germany GmbH) a una longitud de onda de excitación de 340 nm (modo láser) y longitudes de onda de emisión de 615 nm y 665 nm. Se determina la relación de las señales de emisión. El valor completo usado es la reacción libre de inhibidor. El valor cero farmacológico usado es XAV-939 (Tocris) a una concentración final de 5 mM. Se determinan los valores inhibidores (CI50) usando el programa Symys Assay Explorer® o Condosseo® de GeneData.

Medición de la inhibición celular de tanquirasa

20 Ya que se ha descrito que las tanquirasas modulan el nivel celular de Axina2 (Huang et al., 2009; Nature) se usa el aumento de Axina2 como lectura para la determinación de la inhibición celular de las tanquirasas en un ensayo basado en Luminex.

25 Se siembran células de la línea celular de carcinoma de colon DLD1 en placas de 96 pocillos a $1,5 \times 10^4$ células por pocillo. Al día siguiente, se tratan las células con una dilución seriada de compuesto de ensayo en siete etapas por triplicado con una concentración final de DMSO del 0,3%. Después de 24 horas, se lisan las células en tampón de lisis (Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, NP40 al 1%, glicerol al 10%) y se eliminan los lisados por centrifugación a través de una placa de filtro de 96 pocillos (0,65 µm). La proteína Axina2 se aísla de los lisados celulares por incubación con un anticuerpo monoclonal anti-axina2 (R&D Systems, n.º MAB6078) que está unido a carboxi-perlas fluorescentes. Después, se detecta específicamente la axina2 unida con un anticuerpo policlonal anti-axina2 (Cell Signalling n.º 2151) y un anticuerpo secundario fluorescente acoplado a PE adecuado. La cantidad de proteína Axina2 aislada se determina en una máquina Luminex²⁰⁰ (Luminex Corporation) según las instrucciones del fabricante contando 100 eventos por pocillo. La inhibición de tanquirasa por los compuestos de ensayo da como resultado niveles mayores de axina2, que se correlacionan directamente con un aumento de la fluorescencia detectable. Como controles, las células se tratan solo con disolvente (control neutro) y con un inhibidor de referencia de tanquirasa IWR-2 (3E-06 M) que se usa como referencia como control para el aumento máximo de Axina2. Para su análisis, los datos obtenidos se normalizan frente al control de disolvente no tratado y se ajustan para la determinación de los valores de CE₅₀ usando el programa informático Assay Explorer (Accelerlys).

Descripción del ensayo de PARP1

Prueba de actividad bioquímica de PARP-1: Ensayo de autoparsilación

40 El ensayo de autoparsilación se lleva a cabo en dos etapas: la reacción enzimática, en la que parp-1 marcada con His transfiere ADP-ribosa biotinilada/ADP-ribosa a sí misma a partir de NAD biotinilado/NAD como co-sustrato y la reacción de detección, donde se analiza una FRET resuelta en tiempo entre anticuerpo anti-His marcado con criptato unido al marcador His de la enzima y la estreptavidina marcada con Xlent® unida al resto de parsilación de biotina. La actividad de autoparsilación es detectable directamente mediante el aumento en la señal de HTRF.

45 El ensayo de autoparsilación se lleva a cabo con el formato de ensayo HTRF® de 384 pocillos (Cisbio, Codolet, France) en placas de 384 pocillos Greiner de bajo volumen. Se incuban Parp-1 marcada con His 35 nM (humana, recombinante, Enzo Life Sciences GmbH, Lorrach, Alemania) y una mezcla de bio-NAD 125 nM (Biolog, Life science Inst., Bremen, Alemania) y NAD 800 nM como co-sustrato en un volumen total de 6 µl (Tris/HCl 100 mM, cloruro de Mg 4 mM, IGEPAL® CA630 al 0,01 %, DTT 1 mM, DMSO al 0,5 %, pH 8, 13 ng/µl de ADN activado (BPS Bioscience, San Diego, EE.UU.)) en ausencia o presencia del compuesto de ensayo (10 concentraciones de disolución) durante 150 min a 23°C. La reacción se detiene mediante la adición de 4 µl de solución de parada/detección (SA-Xlent® 70 nM (Cisbio, Codolet, Francia), Anti-His-K® 2,5 mM (anti-His marcado con Eu, Cisbio, Codolet, France) en HEPES 50 mM, KF 400 mM, BSA al 0,1 %, EDTA 20 mM, pH 7.0). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se mide la HTRF con un lector multimodo Envision (Perkin Elmer LAS Germany GmbH) a una longitud de onda de excitación de 340 nm (modo láser) y longitudes de onda de emisión de 615 nm y 665 nm. Se determina la relación de las señales de emisión. El valor completo usado es la reacción libre de inhibidor. El valor cero farmacológico usado es Olaparib (LClabs, Woburn, EE.UU.) a una concentración final de 1 µM. Se determinan los valores inhibidores (CI50) usando el programa Symys Assay Explorer® o Condosseo® de GeneData.

Descripción del ensayo ELISA de TNKS1 y TNKS2

Prueba de actividad bioquímica de TNKS 1 y 2: ELISA de actividad (ensayo de autoparsilación)

5 Para el análisis de la actividad de autoparsilación de TNKS 1 y 2, se lleva a cabo un ELISA de actividad: En la primera etapa, se captura TNKS marcada con GST sobre una placa recubierta con glutatión. Después, se efectúa el ensayo de actividad con NAD biotinilado en ausencia/presencia de los compuestos. Durante la reacción enzimática, la TNKS marcada con GST transfiere ADP-ribosa biotinilada a sí misma a partir de NAD biotinilado como co-sustrato. Para la detección, se añade conjugado de estreptavidina-HRP que se une a la TNKS biotinilada y de este modo se captura sobre las placas. Se detecta la cantidad de TNKS autoparsilada resuspendida biotinilada con un sustrato luminiscente para HRP. El nivel de señal de luminiscencia se correlaciona directamente con la cantidad de TNKS autoparsilada y por lo tanto con la actividad de TNKS.

15 El ensayo de ELISA de actividad se lleva a cabo en placas de microtitulación recubiertas con glutatión de 384 pocillos (placa recubierta de glutatión de captura Express, Biocat, Heidelberg, Alemania). Las placas se pre-equilibran con PBS. Después, se incuban las placas con 50 µl de TNKS-1 marcada con GST a 20 ng/pocillo (1023-1327 aa, preparada en el propio laboratorio), respectivamente, TNKS-2 marcada con GST (873-1166 aa, preparada en el propio laboratorio) en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, cloruro de Mg 4 mM, Pluronic F-68 al 0,05 %, DTT 2 mM, pH 7,7) durante una noche a 4°C. Las placas se lavan 3 veces con PBS-Tween-20. Los pocillos se bloquean por incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos con 50 µl de tampón de bloqueo (PBS, Tween 20 al 0,05 %, BSA al 0,5 %). Posteriormente, se lavan 3 veces las placas con PBS-Tween-20. La reacción enzimática se lleva a cabo en 50 µl de solución de reacción (HEPES 50 mM, cloruro de Mg 4 mM, Pluronic F-68 al 0,05 %, DTT 1,4 mM, DMSO al 0,5 %, pH 7,7) con bio-NAD 10 µM (Biolog, Life science Inst., Bremen, Alemania) como co-sustrato en ausencia o presencia del compuesto de ensayo (10 concentraciones de dilución) durante 1 hora a 30°C. La reacción se detiene lavando 3 veces con PBS-Tween-20. Para detección, se añaden 50 µl de estreptavidina 20ng/ml, conjugado de HRP (MoBiTec, Gottingen, Alemania) en PBS/Tween-20 al 0,05%/BSA al 0,01% y se incuban las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS-Tween-20, se añaden 50 µl de solución de sustrato de máxima sensibilidad femtomolar para ELISA SuperSignal (ThermoFisherScientific (Pierce), Alemania). Después de una incubación de 1 minuto a temperatura ambiente, se miden las señales de luminiscencia con un lector multimodo Envison (Perkin Elmer LAS Germany GmbH) a 700 nm. El valor completo usado es la reacción libre de inhibidor. El valor cero farmacológico usado es XAV-939 (Tocris) a una concentración final de 5 mM. Se determinan los valores inhibidores (CI50) usando el programa Symys Assay Explorer® o Condosseo® de GeneData.

35 Anteriormente y más adelante, todas las temperaturas se indican en °C. En los siguientes ejemplos, "elaboración convencional" significa: se añade agua en caso necesario, se ajusta el pH, en caso necesario, a valores entre 2 y 10, dependiendo de la constitución del producto final, la mezcla se extrae con acetato de etilo o diclorometano, se separan las fases, se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se evapora, y el residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice y/o por cristalización. Valores de Rf sobre gel de sílice; eluyente: acetato de etilo/metanol 9:1.

P: Método HPLC:

gradiente: 5,5 min; caudal: 2,75 ml/min de 99:1 a 0:100 de H₂O/acetonitrilo; agua + TFA (al 0,01 % vol.); acetonitrilo + TFA (al 0,01 % vol.)

40 columna: Chromolith SpeedROD RP 18e 50-4,6

longitud de onda: 220 nm

Merck HitachiLa Chrome

N: Método HPLC:

45 gradiente: 5,5 min; caudal: 2,75 ml/min de 90:10 a 0:100 de H₂O/acetonitrilo; agua + TFA (al 0,01 % vol.); acetonitrilo + TFA (al 0,01 % vol.)

columna: Chromolith SpeedROD RP 18e 50-4,6

longitud de onda: 220 nm

Merck HitachiLa Chrome

X: condiciones HPLC/EM

columna: Chromolith Performance ROD RP-18e, 100 x 3 mm²

gradiente: A:B = 99:1 a 0:100 en 1,8 min

caudal: 2,0 ml/min

5 eluyente A: agua + ácido fórmico al 0,05 %

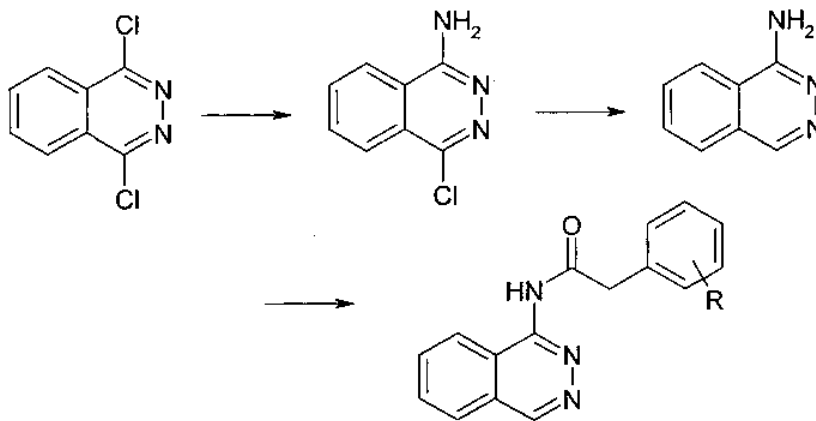
eluyente B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,04 %

longitud de onda: 220 nm

10 Se registró la RMN ¹H en un espectrómetro Bruker DPX-300, DRX-400 o AVII-400, usando una señal residual de disolvente deuterado como referencia interna. Los cambios químicos (δ) se indican en ppm con respecto a la señal del disolvente residual (δ = 2,49 ppm para la RMN ¹H en DMSO-d₆). Se registran los datos de la RMN ¹H como sigue: cambio químico (multiplicidad, constantes de acoplamiento y número de hidrógenos). La multiplicidad se abrevia como sigue: s (singlete), d (duplete), t (triplete), c (cuadruplete), m (multiplete), a (ancho).

La química de microondas se lleva a cabo en un reactor de microondas CEM.

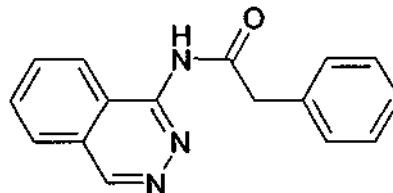
Ftalazinas: Síntesis



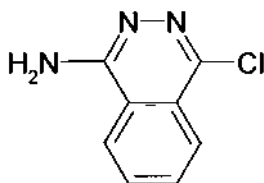
15

Ejemplo 1

Síntesis de 2-fenil-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A1")

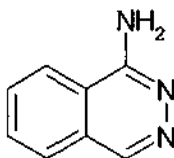


1.1 4-cloro-ftalazin-1-ilamina



5 Se disolvió sulfato de cobre (II) pentahidratado (632,4 mg; 2,53 mmol) en una solución acuosa de amoníaco (32 %, 25 ml). Se añadió una suspensión de 1,4-dicloro-ftalazina (2 g; 10,05 mmol) en THF (25 ml) y se calentó la mezcla en 2 fases durante 1,5 h a 65-80 °C (máx. 13 bar) y 1,5 h a 100 °C en un horno microondas (CEM Discover). En la fase orgánica se formó un precipitado. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, el filtrado se filtró por succión, se lavó con agua, una pequeña cantidad de acetato de etilo y dietil éter y se secó al vacío a 50 °C durante 14 h; rendimiento: 1,6 g (89 %), cristales de color rosa (pureza: 100 %, Tr: 2,49 min).

10 1.2: Ftalazin-1-ilamina



15 Se hidrogenó 4-cloro-ftalazin-1-ilamina (750 mg; 4,18 mmol) en metanol (20 ml) y solución de hidróxido de sodio 2 N (3,7 ml) con Pd/C (5 %) a temperatura ambiente durante 14 h. La solución de reacción se filtró y se concentró. Se diluyó el residuo acuoso con agua (5 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo se trituró con éter dietílico, se filtró por succión y se secó. La fase acuosa procedente de la extracción se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en una mezcla de agua y acetonitrilo y se liofilizó. El sólido se suspendió en diclorometano/metanol (10 %), se agitó durante 30 min y se filtró por succión. El filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se trituró con diclorometano, se filtró por succión, se lavó con dietil éter y se secó. Ambos sólidos se combinaron; rendimiento: 545 mg (90 %), sólido de color pardo claro (pureza: 100 %, Tr: 2,25 min).

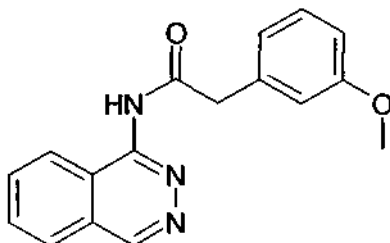
1.3 2-fenil-N-ftalazin-1-il-acetamida

25 Se suspendió ftalazin-1-ilamina (50 mg; 0,34 mmol) en THF (2 ml) y se trató en atmósfera de argón con N-etildiisopropilamina (76,2 ml; 0,45 mmol). Se añadió gota a gota fenilacetilcloruro (54,6 ml; 0,41 mmol) a temperatura ambiente y se calentó la mezcla a 70 °C. Se formó una solución de color amarillo claro durante un corto periodo de tiempo, antes de que se precipitase un sólido. Después de agitar a 70 °C durante 1 h, se añadieron THF (2 ml), N-etildiisopropilamina (76,2 ml; 0,45 mmol) y fenilacetilcloruro (54,6 ml; 0,41 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a 70 °C durante 14 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se trató con metanol(0,5 ml) y se evaporó a sequedad. El residuo de color pardo claro se trató con acetonitrilo (1 ml) y metanol (1 ml) y se sometió a ultrasonidos. Se filtró el precipitado formado mediante succión, se lavó con metanol y dietil éter y se secó al vacío a 30 50 °C. Se aisló producto adicional mediante cromatografía en columna; rendimiento: 25 mg (28 %), sólido incoloro (pureza: 100 %, Tr: 2,89 min);

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,97 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 8,17 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 8,08 - 7,82 (m, 3H), 7,47 - 7,20 (m, 5H), 3,89 (s, 2H).

Ejemplo 2

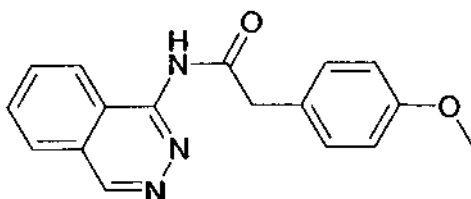
35 Síntesis de 2-(3-metoxifenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A2")



5 Se suspendió ftalazin-1-ilamina (57 mg; 0,39 mmol) en 1,2-dicloroetano (4 ml) en atmósfera de argón. Se añadió N-etil-diisopropilamina (0,141 ml; 0,83 mmol) seguido de adición gota a gota de cloruro de (3-metoxifenil)-acetilo (0,123 ml; 0,79 mmol) mediante una jeringa. Durante la adición, aumentó la temperatura de 20 °C a 35 °C. Después de un minuto se obtuvo una solución de color pardo claro. La reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía (columna: gel de sílice RP18 40 g; combiflash companion); rendimiento: 6 mg (5 %), sólido incoloro (pureza: 100 %, Tr: 2,94 min); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,96 (s, 1H), 9,59 (s, 1H), 8,19 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 8,08 - 7,79 (m, 3H), 7,29 (t, J = 7,9 Hz, 1 H), 7,10 - 6,74 (m, 3H), 3,86 (s, 2H), 3,77 (s, 3H).

10 Ejemplo 3

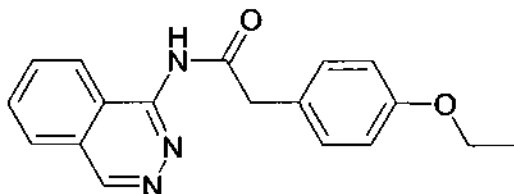
Síntesis de 2-(4-metoxifenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A3")



15 Se preparó "A3" a partir de ftalazin-1-ilamina (60 mg; 0,41 mmol), N-etildiisopropilamina (0,148 ml; 0,87 mmol) y cloruro de (4-metoxifenil)-acetilo (0,126 ml; 0,83 mmol) en 1,2-dicloroetano (3 ml) de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 2; rendimiento: 16 mg (13 %), sólido incoloro (pureza: 100 %, Tr: 2,91 min); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,92 (s, 1H), 9,58 (s, 1 H), 8,19 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 8,07 - 7,83 (m, 1 H), 7,34 (d, J = 8,5 Hz, 1 H), 6,94 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 3,81 (s, 1 H), 3,76 (s, 2H).

Ejemplo 4

Síntesis de 2-(4-etoxifenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A4")

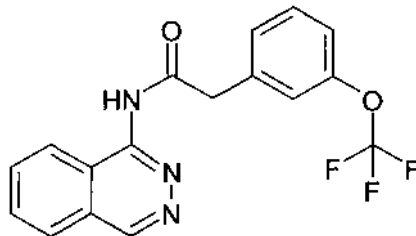


20 Se disolvieron ácido (4-etoxifenil)-acético (74,5 mg; 0,41 mmol), hidrato de benzotriazol-1-ol (65,3 mg; 0,41 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (103 mg; 0,54 mmol) en DMF (2 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 min, se añadió ftalazin-1-ilamina (60 mg; 0,41 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 2 h. El sólido, que precipitó durante la reacción, se retiró por filtración, se lavó con una pequeña porción de DMF, acetonitrilo y dietil éter y se secó al vacío a 50 °C. El filtrado se diluyó con agua (40 ml) y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo (sólido amarillo claro) se trituró con etanol, se retiró por filtración, se lavó con etanol y dietil éter y se secó al vacío a 50 °C. Ambos sólidos se combinaron; rendimiento: 81 mg (63 %), sólido incoloro amorfo (pureza: 100 %, Tr: 3,03 min);

25
30 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,91 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,18 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 8,07 - 7,84 (m, 3H), 7,33 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,92 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,03 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 3,81 (s, 2H), 1,33 (t, J = 6,9 Hz, 3H).

Ejemplo 5

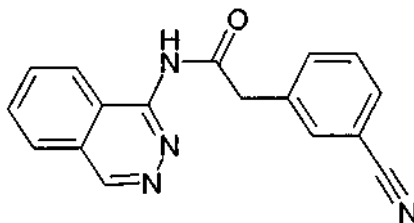
Síntesis de N-ftalazin-1-il-2-(3-trifluorometoxifenil)-acetamida ("A5")



5 Se preparó "A5" a partir de ácido (3-trifluorometoxifenil)-acético (93,8 mg; 0,41 mmol), hidrato de benzotriazol-1-ol (65,3 mg; 0,41 mmol), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (103 mg; 0,54 mmol) y ftalazin-1-ilamina (60 mg; 0,41 mmol) en DMF (2 ml) como se ha descrito para el ejemplo 4. Después de 3 h de agitación a temperatura ambiente la mezcla de reacción se diluyó con agua (40 ml) y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico y se evaporaron a sequedad. El residuo se trituró con etanol, se retiró por filtración, se lavó con dietil éter y se secó al vacío a 50 °C. Se obtuvo
10 producto adicional a partir del filtrado mediante cromatografía (columna: gel de sílice RP18 40 g; combiflash companion); rendimiento: 58 mg (39 %), sólido de color amarillo claro (pureza: 98 %, Tr: 3,29 min); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 11,02 (s, 1 H), 9,58 (s, 1 H), 8,26 - 8,15 (m, 1 H), 8,09 - 7,84 (m, 3H), 7,58 - 7,38 (m, 3H), 7,34 - 7,22 (m, 1 H), 3,98 (s, 2H).

Ejemplo 6

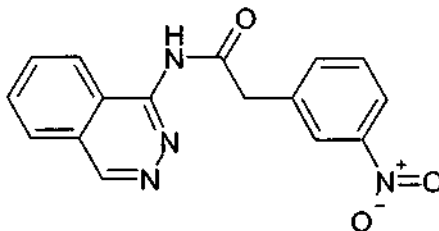
15 Síntesis de 2-(3-cianofenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A6")



20 Se preparó "A6" a partir de ácido (3-cianofenil)-acético (66,6 mg; 0,41 mmol), hidrato de benzotriazol-1-ol (65,3 mg; 0,41), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (103 mg; 0,54 mmol) y ftalazin-1-ilamina (60 mg; 0,41 mmol) en DMF (2 ml) como se ha descrito para el ejemplo 5; rendimiento: 89 mg (75 %), sólido incoloro (pureza: 100 %, Tr: 2,91 min); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 11,03 (s, 1 H), 9,60 (s, 1 H), 8,26 - 8,15 (m, 1 H), 8,12 - 7,94 (m, 3H), 7,92 - 7,52 (m, 4H), 4,03 (s, 2H).

Ejemplo 7

Síntesis de 2-(3-nitrofenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A7")



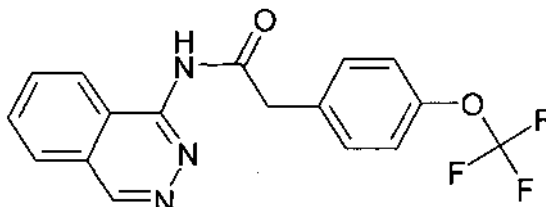
25 Se preparó "A7" a partir de ácido (3-nitrofenil)-acético (62,4 mg; 0,34 mmol), hidrato de benzotriazol-1-ol (54,4 mg; 0,34 mmol), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (85,8 mg; 0,45 mmol) y ftalazin-1-ilamina (50 mg; 0,34 mmol) en DMF (2,5 ml) como se ha descrito para el ejemplo 4; rendimiento: 84 mg (79 %), sólido de

color amarillo claro (pureza: 100 %, Tr: 3,01 min);

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 11,07 (s, 1 H), 9,60 (s, 1 H), 8,32 (t, *J* = 2,0 Hz, 1 H), 8,25 - 8,11 (m, 2H), 8,10 - 7,96 (m, 3H), 7,88 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,68 (t, *J* = 7,9 Hz, 1 H), 4,12 (s, 2H).

Ejemplo 8

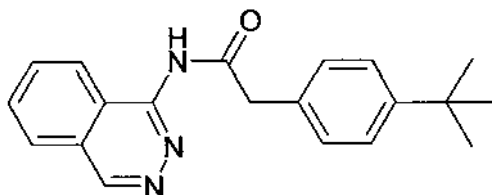
- 5 Síntesis de N-ftalazin-1-il-2-(4-trifluorometoxifenil)-acetamida ("A8")



- 10 Se preparó "A8" a partir de ácido (4-trifluorometoxifenil)-acético (92,9 mg; 0,41 mmol), hidrato de benzotriazol-1-ol (65,3 mg; 0,41 mmol), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)carbodiimida (103 mg; 0,54 mmol) y ftalazin-1-ilamina (60 mg; 0,41) en DMF (2 ml) como se ha descrito para el ejemplo 4; rendimiento: 105 mg (72 %), sólido incoloro (pureza: 99 %, Tr: 3,29 min);
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,99 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 8,23-8,14 (m, 1 H), 8,09 - 7,86 (m, 3H), 7,53 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,41 - 7,30 (m, 2H), 3,95 (s, 2H).

Ejemplo 9

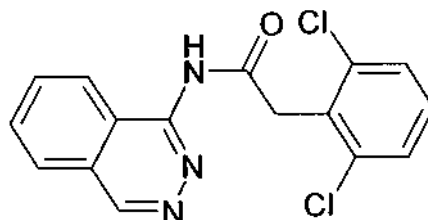
- Síntesis de 2-(4-*tert*-butilfenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A9")



- 15 Se preparó "A9" a partir de ácido (4-*tert*-butilfenil)-acético (66,2 mg; 0,34 mmol), hidrato de benzotriazol-1-ol (54,4 mg; 0,34 mmol), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (85,8 mg; 0,45 mmol) y ftalazin-1-ilamina (50 mg; 0,34) en DMF (2 ml) como se ha descrito para el ejemplo 5; rendimiento: 67 mg (61 %), sólido incoloro (pureza: 100 %, Tr: 3,38 min);
20 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,93 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 8,23 - 8,14 (m, 1 H), 8,08 - 7,83 (m, 3H), 7,43 - 7,28 (m, 4H), 3,84 (s, 2H), 1,28 (s, 9H).

Ejemplo 10

- Síntesis de 2-(2,6-diclorofenilo)-N-ftalazin-1-il-acetamida ("A10")

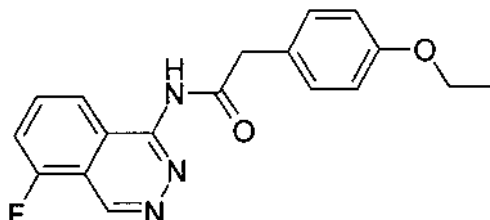


- 25 Se preparó "A9" a partir de ácido (2,6-diclorofenil)-acético (70,6 mg; 0,34 mmol), hidrato de benzotriazol-1-ol (54,4 mg; 0,34 mmol), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (85,8 mg; 0,45 mmol) y ftalazin-1-ilamina (50 mg; 0,34) en DMF (2 ml) como se ha descrito para el ejemplo 5; rendimiento: 74 mg (65 %), sólido incoloro (pureza: 100 %, Tr: 3,27 min);

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 11,12 (s, 1 H), 9,59 (s, 1 H), 8,27 - 8,15 (m, 1 H), 7,98 - 8,07 (m, 3H), 7,51 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,35 (t, J = 8,0 Hz, 1 H), 4,31 (s, 2H).

Los siguientes compuestos se han preparado de forma análoga:

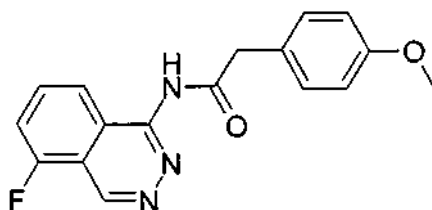
2-(4-etoxi-fenil)-N-(5-fluoro-ftalazin-1-il)-acetamida ("A11")



5

M+H 326; HPLC 1,73 (X); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,96 (s, 1 H), 9,61 (d, J = 2,6 Hz, 1 H), 8,07 - 7,99 (m, 2H), 7,80 - 7,69 (m, 1 H), 7,31 - 7,23 (m, 2H), 6,94 - 6,84 (m, 2H), 4,00 (c, J = 7,0 Hz, 2H), 3,72 (s, 2H), 1,32 (t, J = 7,0 Hz, 3H);

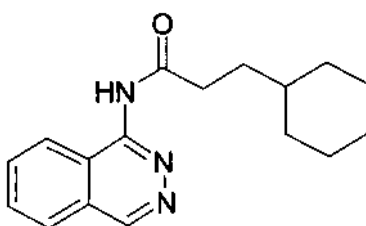
N-(5-fluoro-ftalazin-1-il)-2-(4-metoxi-fenil)-acetamida ("A12")



10

M+H 312; HPLC 1,61 (X);

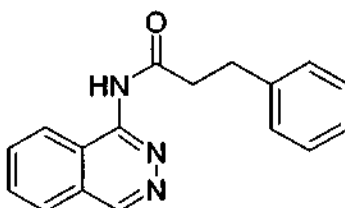
3-ciclohexil-N-ftalazin-1-il-propionamida ("A13")



15

M+H 284; HPLC 2,37 (N); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,68 (s, 1H), 9,57 (s, 1 H), 8,22 - 8,14 (m, 1 H), 8,06 - 7,93 (m, 3H), 2,55 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 1,79 - 1,54 (m, 7H), 1,36 - 1,11 (m, 4H), 0,99 - 0,87 (m, 2H);

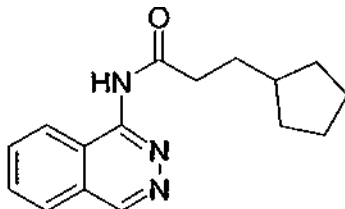
3-fenil-N-ftalazin-1-il-propionamida ("A14")



M+H 278; HPLC 1,99 (N); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,74 (s, 1 H), 9,56 (s, 1 H), 8,16 (d, J = 8,0 Hz, 1

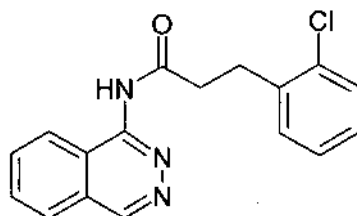
H), 8,04 - 7,97 (m, 1 H), 7,96 - 7,88 (m, 1 H), 7,75 (d, J = 8,3 Hz, 1 H), 7,37 - 7,28 (m, 4H), 7,27 - 7,19 (m, 1H), 3,00 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,88 (t, J = 7,9 Hz, 2H);

3-ciclopentil-N-ftalazin-1-il-propionamida ("A15")



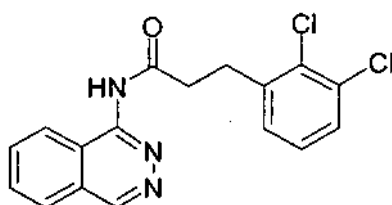
5 M+H 270; HPLC 2,19 (N); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,68 (s, 1 H), 9,57 (s, 1 H), 8,21 - 8,15 (m, 1 H), 8,05 - 7,93 (m, 3H), 2,59 - 2,53 (m, 2H), 1,90 - 1,74 (m, 3H), 1,74 - 1,65 (m, 2H), 1,65 - 1,46 (m, 4H), 1,22 - 1,09 (m, 2H);

3-(2-cloro-fenil)-N-ftalazin-1-il-propionamida ("A16")



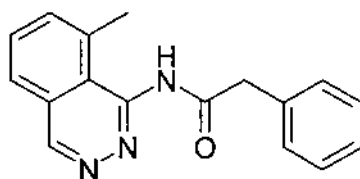
10 HPLC 2,21 (N); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,79 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 8,18 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 8,08 - 7,99 (m, 1 H), 7,99 - 7,91 (m, 1 H), 7,85 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,49 - 7,41 (m, 2H), 7,36 - 7,24 (m, 2H), 3,10 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,91 (t, J = 7,7 Hz, 2H);

3-(2,3-dicloro-fenil)-N-ftalazin-1-il-propionamida ("A17")



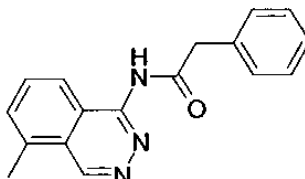
15 HPLC 2,44 (N); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,81 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,17 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 8,05 - 7,99 (m, 1 H), 7,99 - 7,93 (m, 1 H), 7,85 (d, J = 8,3 Hz, 1 H), 7,55 - 7,50 (m, 1 H), 7,44 - 7,40 (m, 1 H), 7,38 - 7,29 (m, 1H), 3,15 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,93 (t, J = 7,6 Hz, 2H);

N-(8-metil-ftalazin-1-il)-2-fenil-acetamida ("A18")



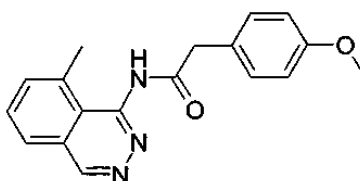
20 M+H 278; HPLC 1,61 (X); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,92 (s, 1 H), 9,68 (s, 1 H), 7,87 - 7,77 (m, 2H), 7,77 - 7,68 (m, 1 H), 7,45 - 7,39 (m, 2H), 7,36 (m, 2H), 7,32 - 7,24 (m, 1H), 3,87 (s, 2H), 2,77 (s, 3H);

N-(5-metil-ftalazin-1-il)-2-fenil-acetamida ("A19")



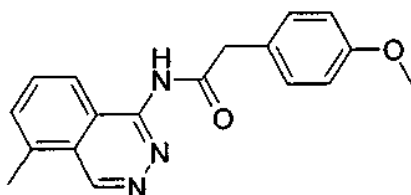
5 M+H 278; HPLC 1,71 (X); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,74 (s, 1 H), 9,54 (s, 1 H), 8,02 (d, J = 6,8 Hz, 1 H), 7,87 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,74 (dd, J = 7,2, 1,4 Hz, 1 H), 7,42 - 7,30 (m, 4H), 7,30 - 7,22 (m, 1 H), 3,80 (s, 2H), 2,59 (s, 3H);

2-(4-metoxi-fenil)-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-acetamida ("A20")



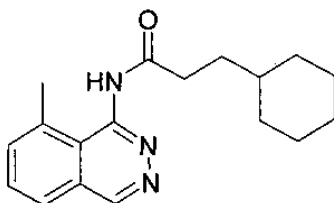
M+H 308; HPLC 1,61 (X); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 10,85 (s, 1 H), 9,68 (s, 1 H), 7,88 - 7,76 (m, 2H), 7,71 (d, J = 7,7 Hz, 1 H), 7,38 - 7,27 (m, 2H), 6,98 - 6,88 (m, 2H), 3,79 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 2,77 (s, 3H);

10 2-(4-metoxi-fenil)-N-(5-metil-ftalazin-1-il)-acetamida ("A21")

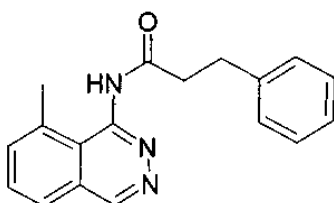


M+H 308; HPLC 1,69 (X); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, TFA-d₁) δ [ppm] 10,11 (s, 1 H), 8,44 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 8,23 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 8,15 (d, J = 7,5 Hz, 1 H), 7,34 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,78 (s, 3H), 2,80 (s, 3H);

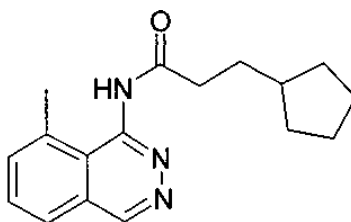
15 3-ciclohexil-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida ("A22")



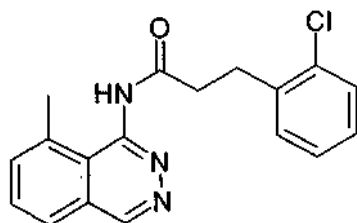
3-fenil-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida ("A23")



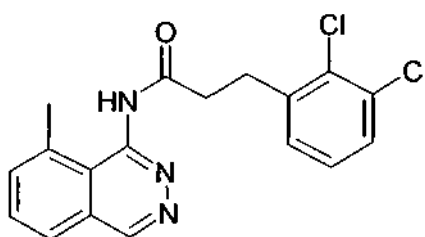
3-ciclopentil-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida ("A24")



3-(2-clorofenil)-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida ("A25")



5 3-(2,3-diclorofenilo)-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida ("A26")



Datos farmacológicos

Tabla 1. Inhibición de tanquirasas de algunos compuestos representativos de fórmula I

Compuesto n.º	Cl ₅₀ del ensayo enzimático de TNKS1	Cl ₅₀ del ensayo enzimático de TNKS2	Cl ₅₀ del ensayo celular
"A1"	A	B	C
"A2"	B	B	C
"A3"	A	B	C
"A4"	A	B	C
"A5"	B	C	
"A6"	B	C	
"A7"	B	B	
"A8"	A	B	
"A9"	B	B	
"A10"	C	C	
"A11"	C	C	
"A12"	B	C	
"A13"	B	B	
"A14"	A	B	C
"A15"	A	A	C

Compuesto n.º	Cl ₅₀ del ensayo enzimático de TNKS1	Cl ₅₀ del ensayo enzimático de TNKS2	Cl ₅₀ del ensayo celular
"A16"	A	A	C
"A17"	A	B	C
"A18"	B	B	C
"A19"	C	C	
"A20"	B	B	C
"A21"	C	C	

Cl₅₀: <0,3 mM = A 0,3 - 3 mM = B 3-50 mM = C

Los compuestos mostrados en la tabla 1 son compuestos particularmente preferidos de acuerdo con la invención.

Tabla 2. Inhibición de tanquirasas de algunos compuestos representativos de fórmula I

Compuesto n.º	Cl ₅₀ de PARP	Cl ₅₀ de ELISA de TNKS1	Cl ₅₀ de ELISA de TNKS2
"A1"	C	A	B
"A2"	C	B	B
"A3"	C	A	A
"A4"	C	A	A
"A5"	C	B	B
"A6"	B	B	B
"A7"	B	B	B
"A8"	C	A	A
"A9"	C	A	A
"A10"	C		
"A13"	C	A	A
"A14"		A	A
"A15"	C	A	A
"A16"	C	A	A
"A17"		A	A
"A18"	B	A	A
"A20"	B	A	A

5

Cl₅₀: <0,3 mM = A 0,3 - 3 mM = B 3-50 mM = C

Los compuestos mostrados en la tabla 2 son compuestos particularmente preferidos de acuerdo con la invención.

Los siguientes ejemplos se refieren a medicamentos:

Ejemplo A: Viales para inyección

- 10 Se ajusta a pH 6,5 una solución de 100 g de un principio activo de fórmula I y 5 g de hidrogenofosfato disódico en 3 l de agua bidestilada usando ácido clorhídrico 2 N, se esteriliza por filtración, se transfiere a viales para inyección, se liofiliza en condiciones estériles y se sella en condiciones estériles. Cada val para inyección contiene 5 mg de principio activo.

Ejemplo B: Supositorios

Se derrite una mezcla de 20 g de un principio activo de fórmula I con 100 g de lecitina de soja y 1400 g de manteca de cacao, se vierte en moldes y se deja enfriar. Cada supositorio contiene 20 mg de principio activo.

Ejemplo C: Solución

- 5 Se prepara una solución a partir de 1 g de un principio activo de fórmula I, 9,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$, 28,48 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12 \text{H}_2\text{O}$ y 0,1 g de cloruro de benzalconio en 940 ml de agua bidestilada. El pH se ajusta a 6,8, y se enrasa la solución hasta 1 l y se esteriliza por irradiación. Esta solución podría emplearse en forma de gotas para los ojos.

Ejemplo D: Pomada

- 10 Se mezclan 500 mg de un principio activo de fórmula I con 99,5 g de vaselina en condiciones asépticas.

Ejemplo E: Comprimidos

Se comprime de manera convencional una mezcla de 1 kg de principio activo de fórmula I, 4 kg de lactosa, 1,2 kg de almidón de patata, 0,2 kg de talco y 0,1 kg de estearato de magnesio para dar comprimidos de tal forma que cada comprimido contiene 10 mg de principio activo.

- 15 **Ejemplo F: Grageas**

Se preparan comprimidos de manera análoga al Ejemplo E y posteriormente se recubren de un modo convencional con un recubrimiento de sacarosa, almidón de patata, talco, tragacanto y colorante.

Ejemplo G: Cápsulas

- 20 Se introducen 2 kg de principio activo de fórmula I en cápsulas de gelatina dura de una manera convencional, de tal forma que cada cápsula contiene 20 mg del principio activo.

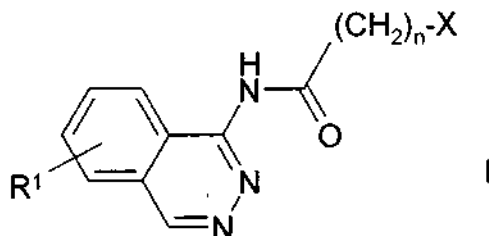
Ejemplo H: Ampollas

Se esteriliza por filtración una solución de 1 kg de principio activo de fórmula I en 60 l de agua bidestilada, se transfiere a ampollas, se liofiliza en condiciones estériles y se sella en condiciones estériles. Cada ampolla contiene 10 mg de principio activo.

- 25

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula I



en la que

5 R¹ indica H, Hal, CH₃, OCH₃ o CH₂OH,

X indica Ar o Cyc,

Ar indica fenilo, bifenilo o naftilo, estando cada uno de ellos sin sustituir o mono, di o trisustituido por Hal, NO₂, CN, A, [C(R²)₂]_pOR², S(O)_mR², [C(R²)₂]_pN(R²)₂, [C(R²)₂]_pCOOR², [C(R²)₂]_pCON(R²)₂,

10 [C(R²)₂]_pSO₂N(R²)₂, NR²COR², NR²SO₂R², NR²CON(R²)₂, NHCOOA, O[C(R²)₂]_nN(R²)₂, CHO y/o COA, R² indica H o A,

A indica alquilo no ramificado o ramificado con 1-10 átomos de C, en el que dos átomos de carbono adyacentes pueden formar un doble enlace y/o pueden reemplazarse uno o dos grupos CH y/o CH₂ no adyacentes por átomos de N, O y/o S y en el que pueden reemplazarse 1-7 átomos de H por F, Cl y/u OH,

Cyc indica cicloalquilo con 3, 4, 5, 6 o 7 átomos de C,

15 Hal indica F, Cl, Br o I, m indica 0, 1 o 2, n indica 1, 2 o 3, p indica 0, 1, 2, 3 o 4,

y sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

2. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 en los que

R¹ indica H, Hal o CH₃,

20 y solvatos, sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

3. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en los que

Ar indica fenilo, que no está sustituido o está mono-, di o trisustituido por Hal, NO₂, CN, A y/o [C(R²)₂]_pOR²,

25 y solvatos, sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

4. Compuestos de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1-3 en los que

A indica alquilo no ramificado o ramificado con 1-6 átomos de C, en el que pueden reemplazarse 1-5 átomos de H por F,

30 y solvatos, sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

5. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que

R¹ indica H, Hal o CH₃,

ES 2 623 704 T3

X indica Ar o Cyc,

Ar indica fenilo, que no está sustituido o está mono-, di o trisustituido por Hal, NO₂, CN, A y/o [C(R²)₂]_pOR², R² indica H o A,

Cyc indica cicloalquilo con 3, 4, 5, 6 o 7 átomos de C,

5 A indica alquilo no ramificado o ramificado con 1-6 átomos de C, en el que pueden reemplazarse 1-5 átomos de H por F,

Hal indica F, Cl, Br o I,

p indica 0, 1, 2, 3 o 4,

n indica 1, 2 o 3,

10 y sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

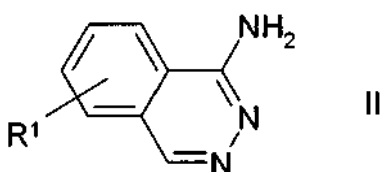
6. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionados del grupo

N.º	Nombre
"A1"	2-fenil-N-ftalazin-1'-il-acetamida
"A2"	2-(3-metoxifenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida
"A3"	2-(4-metoxifenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida
"A4"	2-(4-etoxifenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida
"A5"	N-ftalazin-1-il-2-(3-trifluorometoxifenil)-acetamida
"A6"	2-(3-cianofenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida
"A7"	2-(3-nitrofenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida
"A8"	N-ftalazin-1-il-2-(4-trifluorometoxifenil)-acetamida
"A9"	2-(4- <i>terc</i> -butilfenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida
"A10"	2-(2,6-diclorofenil)-N-ftalazin-1-il-acetamida
"A11"	2-(4-etoxi-fenil)-N-(5-fluoro-ftalazin-1-il)-acetamida
"A12"	N-(5-fluoro-ftalazin-1-il)-2-(4-metoxi-fenil)-acetamida
"A13"	3-ciclohexil-N-ftalazin-1-il-propionamida
"A14"	3-fenil-N-ftalazin-1-il-propionamida
"A15"	3-ciclopentil-N-ftalazin-1-il-propionamida
"A16"	3-(2-cloro-fenil)-N-ftalazin-1-il-propionamida
"A17"	3-(2,3-dicloro-fenil)-N-ftalazin-1-il-propionamida
"A18"	N-(8-metil-ftalazin-1-il)-2-fenil-acetamida
"A19"	N-(5-metil-ftalazin-1-il)-2-fenil-acetamida
"A20"	2-(4-metoxi-fenil)-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-acetamida
"A21"	2-(4-metoxi-fenil)-N-(5-metil-ftalazin-1-il)-acetamida
"A22"	3-ciclohexil-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida
"A23"	3-fenil-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida

N.º	Nombre
"A24"	3-ciclopentil-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida
"A25"	3-(2-clorofenil)-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida
"A26"	3-(2,3-diclorofenil)-N-(8-metil-ftalazin-1-il)-propionamida

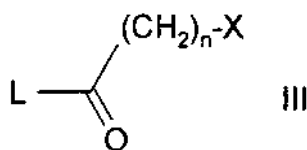
y solvatos, sales, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en cualquier proporción.

- 5 7. Proceso para la preparación de compuestos de fórmula I de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 y sales, solvatos, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, **caracterizado por que** se hacer reaccionar un compuesto de fórmula II



en el que R¹ tiene los significados indicados en la reivindicación 1

- 10 con un compuesto de fórmula III



en el que X y n tienen los significados indicados en la reivindicación 1,

y L indica Cl, Br, I o un grupo OH libre o reactivo modificado funcionalmente,

y/o

- 15 una base o un ácido de fórmula I se transforma en una de sus sales.

8. Medicamentos que comprenden al menos un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 y/o sales, solvatos, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, y opcionalmente, un portador, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 20 9. Compuestos de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 y sales, solvatos, tautómeros y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, para su uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer, esclerosis múltiple, enfermedades cardiovasculares, lesiones del sistema nervioso central y diferentes formas de inflamación.

- 25 10. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso para el tratamiento y/o prevención de enfermedades seleccionadas del grupo de cáncer de cabeza, de cuello, de ojo, de boca, de garganta, de esófago, de bronquios, de laringe, de faringe, de pecho, de huesos, de pulmón, de colon, de recto, de estómago, de próstata, de vejiga urinaria, uterino, de cuello de útero, de mama, de ovarios, de testículo u otros órganos reproductivos, de piel, de tiroides, de la sangre, de los ganglios linfáticos, de riñón, de hígado, de páncreas, de cerebro, del sistema nervioso central, tumores sólidos y tumores hematológicos.

- 30 11. Medicamentos que comprenden al menos un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 y/o sales, solvatos y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas de los mismos en

todas las proporciones, y al menos un principio activo medicinal adicional.

12. Conjunto (kit) que consiste en paquetes separados de

- 5
- (a) una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 y/o sales, solvatos, sales y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, y
 - (b) una cantidad eficaz de un principio activo medicinal adicional.