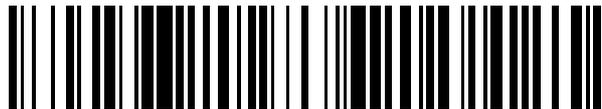


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 752**

51 Int. Cl.:

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2010 PCT/EP2010/051316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10089327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2010 E 10702310 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2393801**

54 Título: **Inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53**

30 Prioridad:

04.02.2009 EP 09152089

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

30.10.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**SCHOENTJES, BRUNO;
DESCAMPS, SOPHIE y
AMBLARD, NATHALIE, CLAUDIE, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 639 752 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos y composiciones de indol que contienen dichos compuestos que actúan como agentes anticancerosos. Más aún, la presente invención proporciona procesos para la preparación de los compuestos descritos, composiciones que los comprenden y los usan, por ejemplo como medicina, en particular para el tratamiento de cáncer.

10 La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente europea nº 09152089.0. Sin estar ligado a ninguna teoría, en la actualidad que cree que aunque MDM2 y p53 representan elementos clave en la biología de la célula tumoral y tienen papeles clave en la respuesta celular a la agresión celular o el estrés, y aunque los presentes compuestos incrementan la expresión de p53, en apariencia es posible que no representen los principales objetivos moleculares por los cuales los presentes compuestos desencadenan su potente actividad antitumoral preclínica demostrada. Las observaciones iniciales señalan hacia un efecto directo o indirecto sobre la síntesis de ADN y/o la
15 respuesta replicativa al estrés como aval de la actividad preclínica antitumoral observada de los compuestos. Los presentes compuestos también exhiben efectos antiproliferativos en células tumorales que carecen de p53, carecen de p53 funcional, o tienen p53 mutante, y además pueden sensibilizar las células tumorigénicas para la quimioterapia y radioterapia.

20 p53 es una proteína supresora de tumor que juega un papel fundamental en la regulación del balance entre la proliferación celular y la detención del crecimiento celular/apoptosis. En condiciones normales, la vida media de p53 es muy corta y en consecuencia el nivel de p53 en las células es bajo. Sin embargo, en respuesta al daño de ADN celular o al estrés celular (por ejemplo activación de oncogén, erosión de telómero, hipoxia), los niveles de p53 aumentan. Este incremento de los niveles de p53 conduce a la activación de la transcripción de una cantidad de genes que dirigen la célula a la detención del crecimiento o hacia los procesos de apoptosis. En consecuencia, una
25 importante función de p53 consiste en prevenir la proliferación incontrolada de las células dañadas y así proteger el organismo contra el desarrollo de cáncer. El término "MDM2" (Murine Double Minute 2) se usa en la presente para definir una proteína obtenida como resultado de la expresión del gen mdm2. Dentro del significado de este término, MDM2 abarca todas las proteínas codificadas por mdm2, sus mutantes, sus proteínas de ajuste alternativas, y sus proteínas fosforiladas. Además, tal como se usa en la presente, el término "MDM2" incluye análogos de MDM2, por
30 ejemplo MDMX, también denominado MDM4, y homólogos y análogos de MDM2 de otros animales, por ejemplo el homólogo humano HDM2 o el análogo humano HDMX. MDM2 es un regulador negativo clave de la función de p53. Forma un bucle autorregulador negativo al unirse al dominio de transactivación amino terminal de p53 y, en consecuencia, MDM2 inhibe la capacidad de p53 para activar la transcripción y dirige p53 para la degradación proteolítica. En condiciones normales, este bucle regulador es responsable de mantener los niveles bajos de p53.

35 Antecedentes de la invención

El documento JP 11130750 describe, entre otros, los derivados sustituidos de fenilaminocarbonilindolilo como antagonistas de receptor de 5-HT.

40 El documento EP1129074 describe amidas de ácido antranílico como inhibidores de receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y de utilidad en el tratamiento de trastornos angiogénicos. El documento WO 01/42224 proporciona derivados carboxiamido para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El documento EP 1317443 describe derivados de terc-amina tricíclicos, de utilidad como moduladores del receptor de quimiocina CXCR4 o CCR5 para tratar virus de inmunodeficiencia humana y virus de inmunodeficiencia felina.

45 El documento EP 1379239 describe N-(2-ariletil)bencilaminas como antagonistas del receptor de 5-HT₆. El documento WO 00/15357 proporciona derivados de piperazin-4-fenilo como inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53. El documento EP1137418 proporciona compuestos tricíclicos para restablecer la estabilidad conformacional de una proteína de la familia de p53. El documento WO 03/040402 proporciona compuestos que inhiben las interacciones entre proteínas, tales como la interacción entre MDM2 y p53. El documento EP 1443937 describe 1,4-benzodiazepinas sustituidas y sus usos como inhibidores de las interacciones MDM2-p53. El
50 documento EP 1458380 proporciona cis-2,4,5-trifenil-imidazolonas que inhiben la interacción de la proteína MDM2 con péptidos similares a p53 y que tienen actividad antiproliferativa.

El documento EP 1519932 describe compuestos de bisarilsulfonamida que se unen a MDM2 y que se pueden usar en la terapia de cáncer.

Los documentos WO2006/032631, WO2007/107543, WO2007/107545, WO2009/019274, WO2009/037308 y WO2009/037343 describen inhibidores de la interacción entre MDM2 y p53.

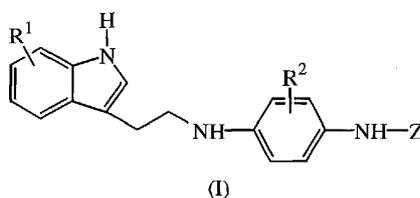
Hay una necesidad de moléculas pequeñas efectivas que tengan potente efecto inhibitor contra el crecimiento de las células tumorales, que tengan un amplio perfil de seguridad, y menos efectos secundarios indeseables.

- 5 Los compuestos de la presente invención muestran excelente actividad *in vitro* y excelentes efectos antitumorales *in vivo*. Tienen baja afinidad por las enzimas P450, que reducen el riesgo de interacción adversa fármaco-fármaco, lo cual permite un margen de seguridad más amplio. Más aún, los compuestos de la presente invención tienen bajos efectos neurológicos inducidos por fármacos y tienen un perfil cardiovascular mejorado que puede influir favorablemente sobre la toxicidad limitante de la dosis de los compuestos.

Descripción de la invención

- 10 La presente descripción proporciona compuestos, composiciones y métodos para tratar cáncer. Además, los compuestos y las composiciones de la presente invención son útiles para mejorar la efectividad de la quimioterapia y la radioterapia.

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

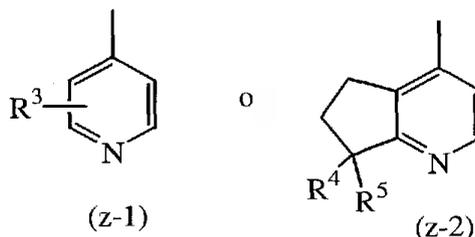


incluyendo cualquiera de sus formas estereoquímicamente isoméricas, en la que

- 15 R^1 es hidroxialquilo de C_{1-6} o alqueno de C_{2-6} ; con la condición de que el sustituyente R^1 se ubique en la posición 6 o 7 del resto de indol;

R^2 es hidrógeno o alquilo de C_{1-4} ;

Z es un radical seleccionado de



- 20 R^3 es hidrógeno o hidroxialquilo de C_{1-4} ;

R^4 es hidroxilo o alquilo de C_{1-4} ;

R^5 es hidrógeno o alquilo de C_{1-4} ; o

R^4 y R^5 se toman juntos para formar oxo;

una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

- 25 Los compuestos de la fórmula (I) también pueden existir en sus formas tautoméricas. Aunque no se indica explícitamente en la fórmula anterior, se pretende que dichas formas estén incluidas en el alcance de la presente invención.

La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de la fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer, y a un compuesto de la fórmula (I) para usar en el tratamiento de cáncer.

- 30 A continuación se explican numerosos términos usados en las definiciones anteriores y en lo sucesivo se explican en la presente. Estos términos en ocasiones se usan como tales o en términos compuestos.

- 35 Alquilo de C_{1-4} como grupo o parte de un grupo define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono tales como metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo; alquilo de C_{1-6} como grupo o parte de un grupo define radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 6 átomos de carbono tales como el grupo definido por alquilo de C_{1-4} y pentilo, hexilo, 2-metilbutilo, y similares. Alqueno de C_{2-6} define radicales hidrocarbonados de cadena lineal y ramificada que contienen un doble

enlace y que tienen de 2 a 6 átomos de carbono tales como, por ejemplo, etenilo, 2-propenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 3-metil-2-butenilo, y similares.

Las líneas trazadas desde los sustituyentes hacia el interior de los sistemas de anillos indican que el enlace puede estar unido a cualquiera de los átomos del anillo adecuados.

- 5 Para el uso terapéutico, las sales de los compuestos de la fórmula (I) son aquellas en las cuales el contraión es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o la purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. Todas las sales, sean farmacéuticamente aceptables o no, están incluidas en el ámbito de la presente invención.
- 10 Las sales farmacéuticamente aceptables mencionadas con anterioridad o en adelante en la presente pretenden comprender las formas de sales de adición de ácidos no tóxicas terapéuticamente activas que pueden formar los compuestos de la fórmula (I). Estos últimos se pueden obtener convenientemente al tratar la forma básica con los ácidos apropiados tales como ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácidos halohídricos, por ejemplo ácido clorhídrico, bromhídrico y similares; ácido sulfúrico; ácido nítrico; ácido fosfórico y similares; o ácidos orgánicos, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, 2-hidroxi-propanoico, 2-oxopropanoico, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, 4-metil-bencenosulfónico, ciclohexanosulfónico, 2-hidroxibenzoico, 4-amino-2-hidroxibenzoico, y ácidos similares. Por otra parte, la forma salina se puede convertir en la forma de base libre por tratamiento con álcali.
- 20 Los compuestos de la fórmula (I) que contienen protones ácidos se pueden convertir en sus formas de sales metálicas o de adición de aminas no tóxicas terapéuticamente activas por tratamiento con las bases orgánicas e inorgánicas adecuadas. Las sales farmacéuticamente aceptables mencionadas con anterioridad o más adelante en la presente pretenden también comprender las formas de sales terapéuticamente activas no tóxicas metálicas o de adición de aminas (formas de sales de adición de bases) que pueden formar los compuestos de la fórmula (I). Las formas de sales de adición de bases apropiadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalino-térreos, por ejemplo las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares, las sales con bases orgánicas, por ejemplo aminas primarias, secundarias y terciarias alifáticas y aromáticas tales como metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, los cuatro isómeros de butilamina, dimetilamina, dietilamina, dietanolamina, dipropilamina, diisopropilamina, di-*n*-butilamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, trimetilamina, trietilamina, tripropilamina, quinuclidina, piridina, quinolina e isoquinolina, las sales de benzatina, *N*-metil-D-glucamina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, hidrabamina, y las sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina, y similares.

A su vez, la forma de sal se puede convertir en la forma de ácido libre por tratamiento con ácido.

- 35 El término sal también comprende las sales de amonio cuaternario (aminas cuaternarias) que pueden formar los compuestos de la fórmula (I) por reacción entre un nitrógeno básico de un compuesto de la fórmula (I) y un agente de cuaternización apropiado, tal como, por ejemplo, haluro de alquilo de C₁₋₆ opcionalmente sustituido, haluro de arilo, haluro de alquilo de C₁₋₆-carbonilo, haluro de arilalquilo de C₁₋₆, por ejemplo yoduro de metilo o yoduro de bencilo, en el que arilo representa fenilo no sustituido o sustituido. También se pueden usar otros agentes reaccionantes con buenos grupos salientes, tales como por ejemplo trifluorometanosulfonatos de alquilo de C₁₋₆, metanosulfonatos de alquilo de C₁₋₆, y *p*-toluenosulfonatos de alquilo de C₁₋₆. Una amina cuaternaria tiene un nitrógeno con carga positiva. Los contraiones farmacéuticamente aceptables incluyen cloro, bromo, yodo, trifluoroacetato, acetato, triflato, sulfato, sulfonato. El contraión de elección se puede introducir mediante el uso de resinas de intercambio iónico.

- 45 Con preferencia, el término sal significa las formas de sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y formas de sales metálicas o de adición de aminas farmacéuticamente aceptables.

El término solvato comprende las formas de adición de hidratos y de disolventes que pueden formar los compuestos de la fórmula (I), así como sus sales correspondientes. Los ejemplos de dichas formas son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

- 50 Se apreciará que algunos de los compuestos de la fórmula (I) y sus sales y solvatos pueden contener uno o más centros de quiralidad y existir como formas estereoquímicamente isoméricas.

- La expresión "formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de la fórmula (I)", tal como se usa con anterioridad en la presente, define todos los compuestos posibles conformados por los mismos átomos enlazados por la misma secuencia de enlaces, pero con diferentes estructuras tridimensionales que no son intercambiables, que pueden poseer los compuestos de la fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables o derivados fisiológicamente funcionales.

A menos que se mencione o indique otra cosa, la designación química de los compuestos denota la mezcla de todas las posibles formas estereoquímicamente isoméricas, así como cada una de las formas isoméricas individuales de la

fórmula (I) y sus sales o solvatos, sustancialmente libres, es decir, asociados con menos de 50%, con preferencia menos de 20%, con mayor preferencia menos de 10%, con aún mayor preferencia menos de 5%, con mayor preferencia aún menos de 2%, y con máxima preferencia menos de 1% del(os) otro(s) isómero(s). En consecuencia, cuando un compuesto de la fórmula (I) se especifica por ejemplo como R, esto significa que el compuesto está sustancialmente libre del isómero S. O si por ejemplo un compuesto de la fórmula (I) se especifica como E, esto significa que el compuesto está sustancialmente libre del isómero Z.

En particular, los centros estereogénicos pueden tener la configuración R o S; los sustituyentes sobre radicales bivalentes cíclicos (parcialmente) saturados pueden tener la configuración *cis* o *trans*. Los compuestos que abarcan dobles enlaces pueden tener una estereoquímica E (*entgegen*) o Z (*zusammen*) en dichos dobles enlaces. Los términos *cis*, *trans*, R, S, E y Z son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de la fórmula (I) obviamente pretenden estar abarcados en el alcance de la presente invención.

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

Según las convenciones de nomenclatura CAS, cuando dos centros estereogénicos de configuración absoluta conocida están presentes en una molécula, se asigna un descriptor R o S (sobre la base de la regla de secuencia de Cahn-Ingold-Prelog) al centro quiral de número menor, el centro de referencia. La configuración del segundo centro estereogénico se indica mediante el uso de descriptores relativos [*R*^{*},*R*^{*}] o [*R*^{*},*S*^{*}], en los que *R*^{*} siempre se especifica como centro de referencia, y [*R*^{*},*R*^{*}] indica los centros con la misma quiralidad, y [*R*^{*},*S*^{*}] indica los centros de distinta quiralidad. Por ejemplo, si el centro quiral de número menor en la molécula tiene una configuración S y el segundo centro es R, el estereodescriptor se especificaría como S-[*R*^{*},*S*^{*}]. Si se usan "α" y "β": la posición del sustituyente de mayor prioridad en el átomo de carbono asimétrico en el sistema de anillo que tiene el menor número del anillo siempre está arbitrariamente en la posición "α" del plano medio determinado por el sistema del anillo. La posición del sustituyente de mayor prioridad sobre los demás átomos de carbono asimétricos en el sistema de anillo respecto de la posición del sustituyente de mayor prioridad sobre el átomo de referencia se denomina "α", si está en el mismo lado del plano medio determinado por el sistema del anillo, o "β", si está en el otro lado del plano medio determinado por el sistema del anillo.

Cuando se usan los términos *cis* y *trans* en la presente, es de acuerdo con la nomenclatura de Chemical Abstracts (J. Org. Chem. 1970, 35 (9), 2849-2867), y se refiere a la posición de los sustituyentes sobre el resto de un anillo.

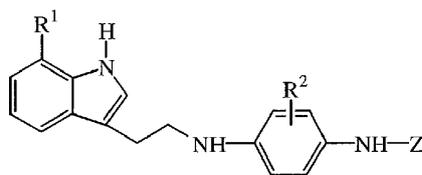
Los compuestos de (I) se pueden sintetizar en la forma de mezclas racémicas de enantiómeros que se pueden separar entre sí según procedimientos de resolución conocidos en la técnica. Los compuestos racémicos de la fórmula (I) pueden ser convertidos en las correspondientes formas de sales diastereoméricas por reacción con un ácido quiral adecuado. Dichas formas de sales diastereoméricas luego se separan, por ejemplo, por cristalización selectiva o fraccionada, y los enantiómeros se liberan de ellas mediante álcalis. Una alternativa para separar las formas enantioméricas de los compuestos de la fórmula (I) implica la cromatografía de líquidos mediante el uso de una fase estacionaria quiral. Dichas formas puras estereoquímicamente isoméricas también se pueden derivar de las correspondientes formas puras estereoquímicamente isoméricas de los materiales de partida apropiados, siempre que la reacción tenga lugar estereoespecíficamente. Con preferencia, si se desea un estereoisómero específico, dichos compuestos son sintetizados por métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales enantioméricamente puros.

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

Siempre que se use en adelante en la presente, la expresión "compuestos de la fórmula (I)" o "compuestos de la presente invención" pretende incluir también las sales farmacéuticamente aceptables, en particular las sales de adición de ácidos o bases (metal o amina), todas las formas estereoisoméricas, los solvatos, y todas las formas cristalinas polimórficas o formas amorfas.

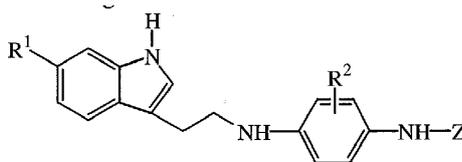
Siempre que se usan con anterioridad o más adelante en la presente, los sustituyentes se pueden seleccionar cada uno independientemente de una lista de numerosas definiciones, se pretenden todas las posibles combinaciones que sean químicamente posibles.

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I) en la que el sustituyente R¹ está ubicado en la posición 7 del resto de indol. Por ende, compuestos que tienen la siguiente fórmula



(I-a)

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), en la que el sustituyente R^1 está ubicado en la posición 6 del resto de indol. Por ende, compuestos que tienen la siguiente fórmula



(I-b)

5 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b), en la que R^1 es hidroxialquilo de C_{1-6} , en particular $-CH_2-OH$, $-C(CH_3)_2-OH$, $-CH(CH_3)-OH$, $-CH_2-CH_2-OH$, $-CH(CH_2CH_3)-OH$, $-CH(CH_2CH_2CH_3)-OH$, $-CH_2-CH_2-CHOH-CH_3$, más en particular $-C(CH_3)_2-OH$.

10 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b), en la que R^1 es alqueno de C_{2-6} , en particular $-CH=CH_2$, $-C(CH_3)=CH_2$.

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b), o una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^2 es hidrógeno.

15 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^2 es alquilo de C_{1-4} , en particular metilo.

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^3 representa hidrógeno.

20 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^3 representa hidroxialquilo de C_{1-4} , en particular $-CH_2-OH$. Con preferencia, este sustituyente R^3 está ubicado en la posición 2 del resto de piridina.

25 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^4 representa hidroxilo.

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^4 representa alquilo de C_{1-4} , en particular metilo.

30 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^5 representa hidrógeno.

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^5 representa alquilo de C_{1-4} , en particular metilo.

35 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^4 y R^5 se toman juntos para formar oxo.

40 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^4 es hidroxilo y R^5 es hidrógeno.

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^4 es hidroxilo y R^5 es alquilo de C_{1-4} , en particular metilo.

- 5 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que R^4 es alquilo de C_{1-4} y R^5 es hidrógeno.

Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que Z es un radical de la fórmula (z-1).

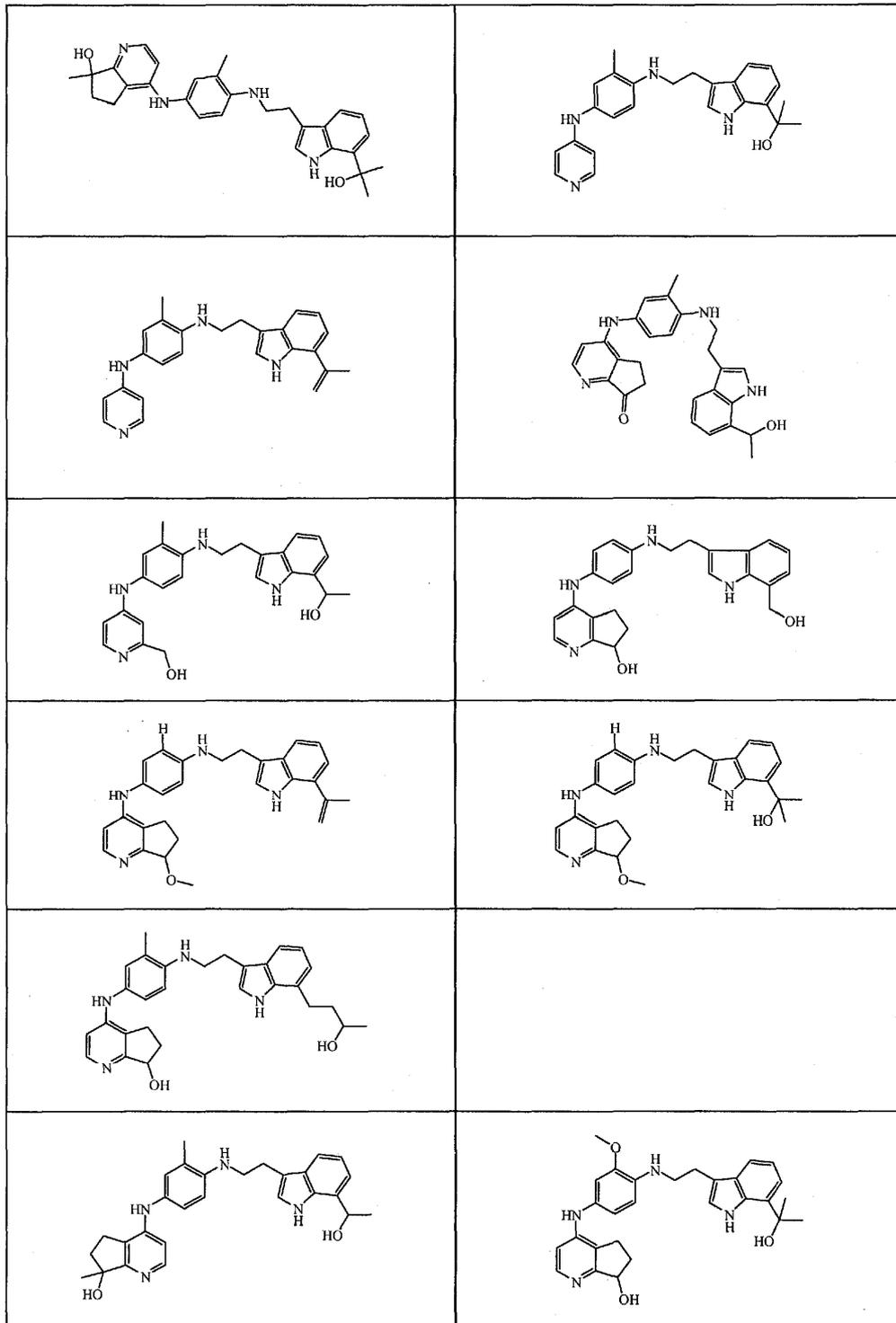
- 10 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b) o, de ser posible, una de sus formas interesantes de realización tal como se indicó con anterioridad, en la que Z es un radical de la fórmula (z-2).

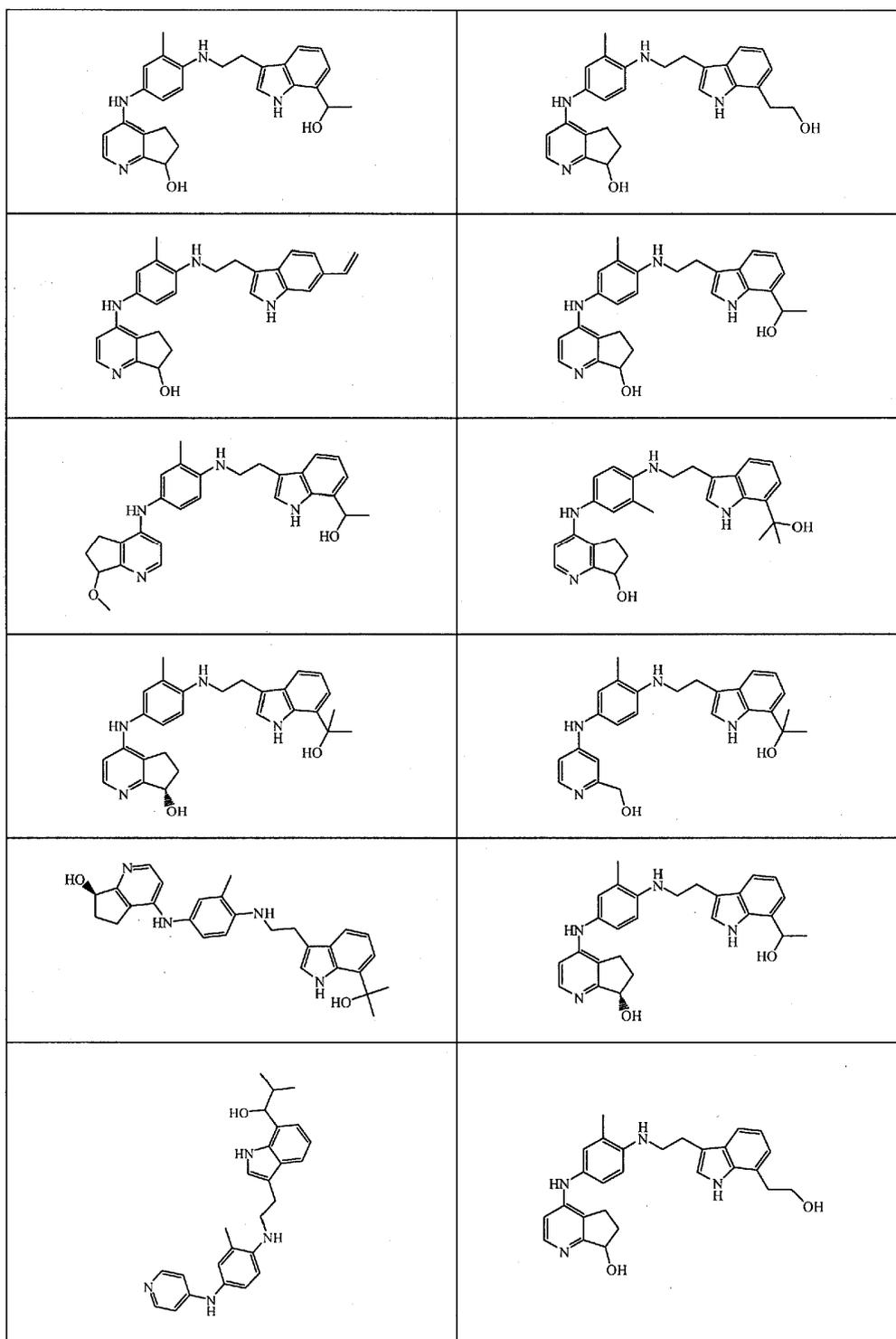
Todas las posibles combinaciones de las realizaciones interesantes antes indicadas se consideran comprendidas dentro del alcance de esta invención.

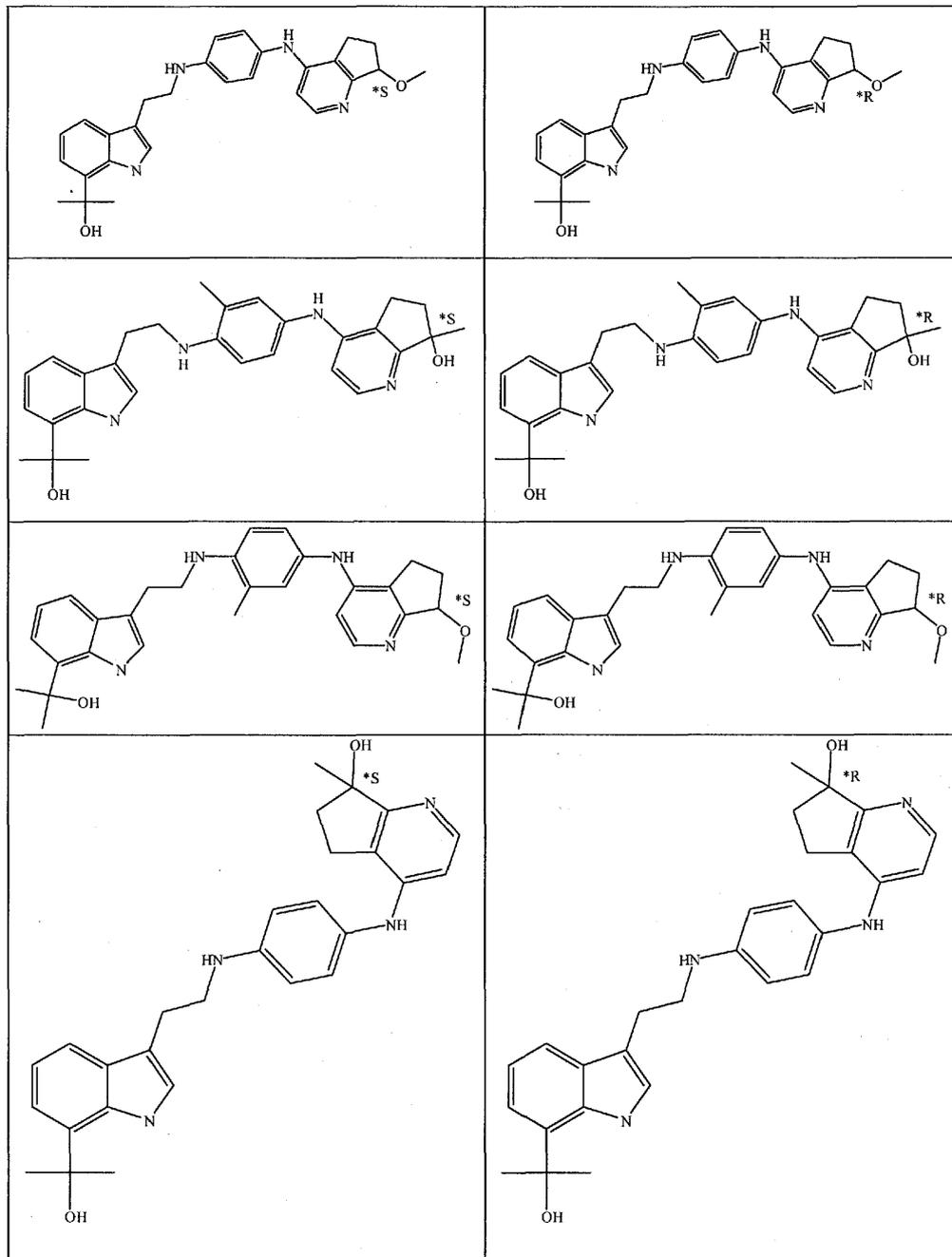
- 15 Una realización interesante de la presente invención son aquellos compuestos de la fórmula (I), (I-a) o (I-b), en la que R^1 es $-CH_2-OH$, $-C(CH_3)_2-OH$, $-CH(CH_3)-OH$, $-CH_2-CH_2-OH$, $-CH(CH_2CH_3)-OH$, $-CH_2-CH_2-CHOH-CH_3$, $-CH=CH_2$ o $C(CH_3)=CH_2$; R^2 es hidrógeno o metilo; R^3 es hidrógeno o $-CH_2-OH$; R^4 es hidroxilo o metiloxi; R^5 es hidrógeno o metilo, o R^4 y R^5 se toman juntos para formar oxo.

Con preferencia, los compuestos de las realizaciones interesantes antes indicadas son estereoquímicamente puros.

- 20 Los compuestos preferidos de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en





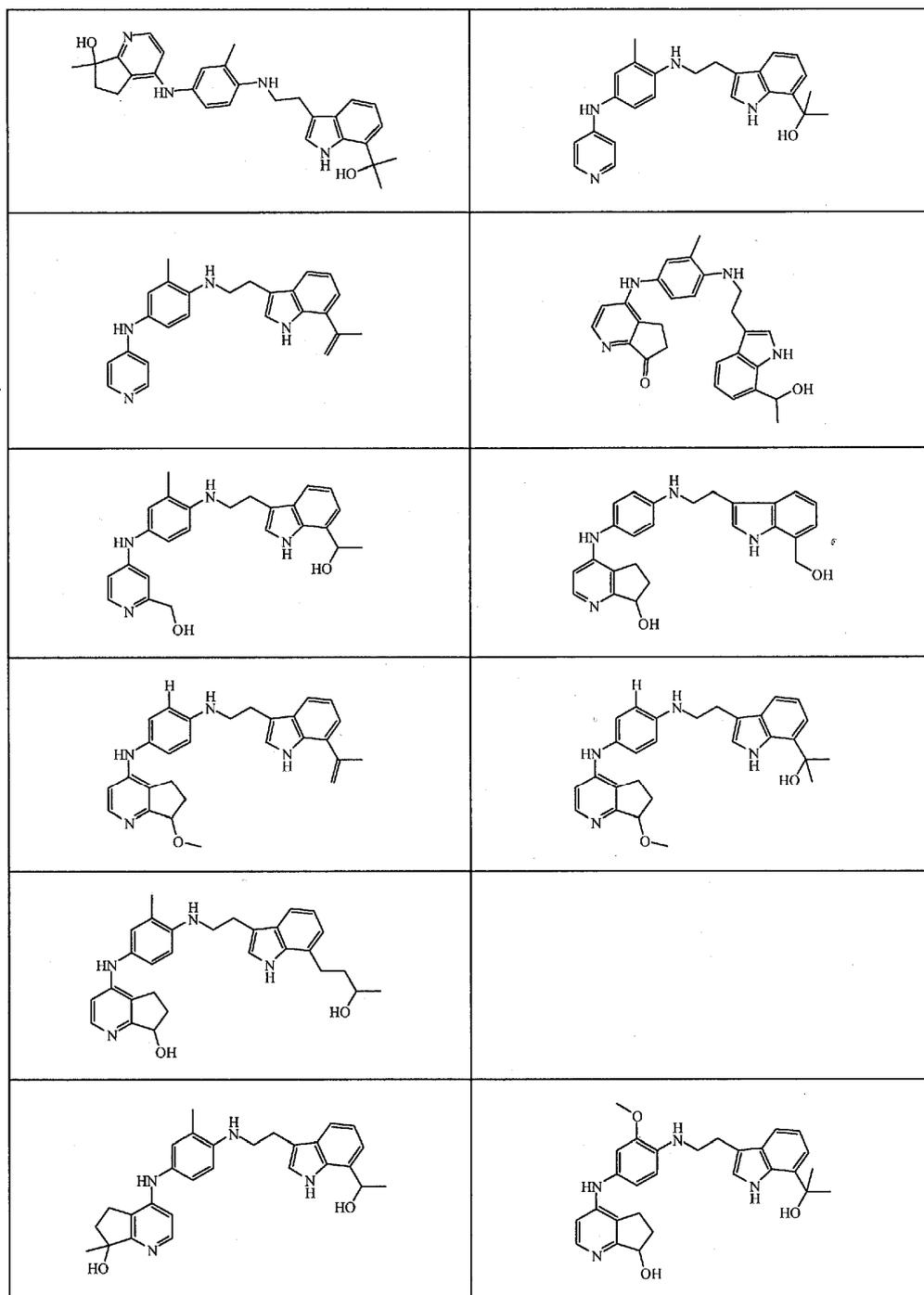


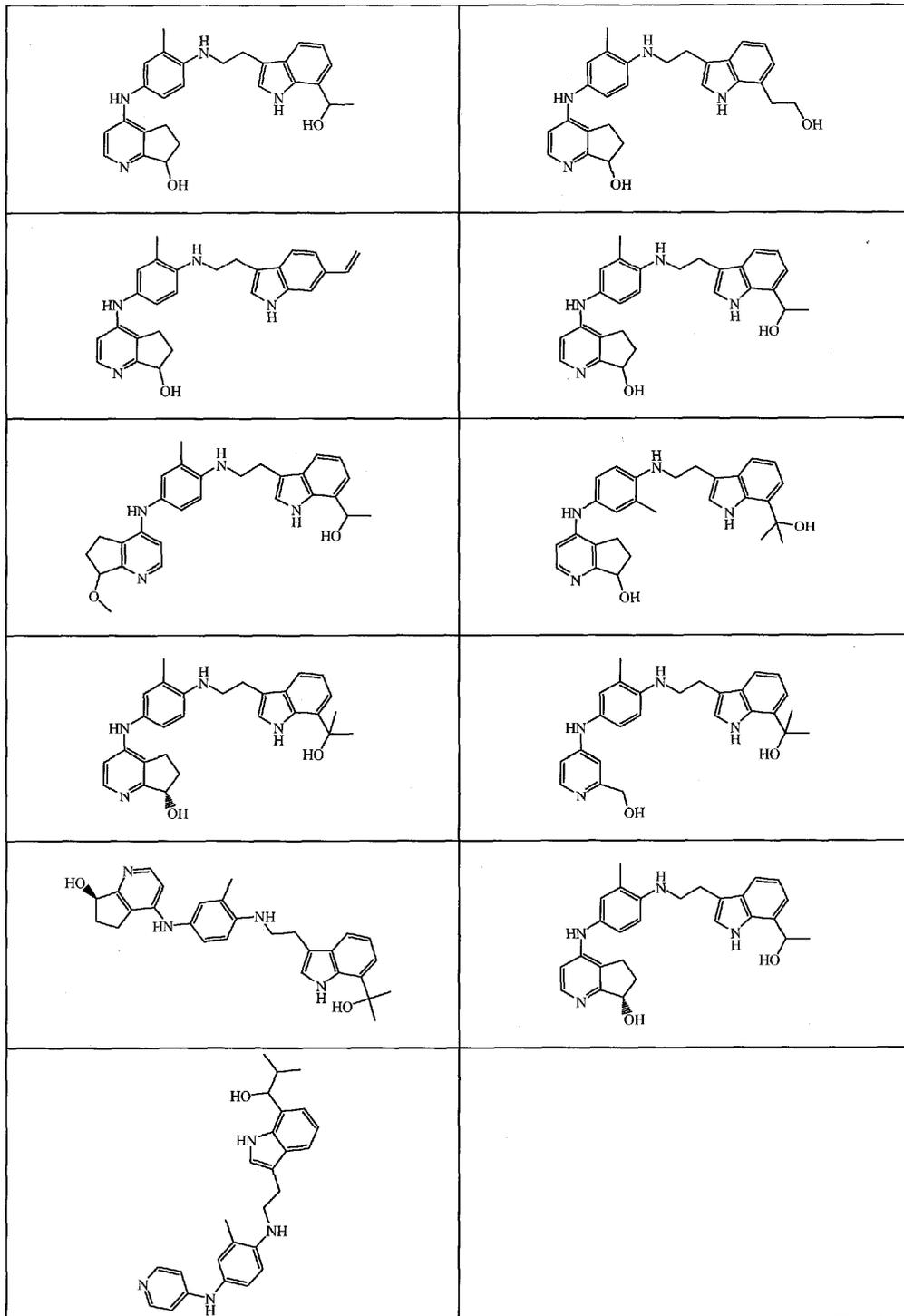
incluyendo cualquiera de sus formas estereoquímicamente isoméricas;

una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

(* significa estereoquímica relativa)

- 5 Los compuestos preferidos de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en

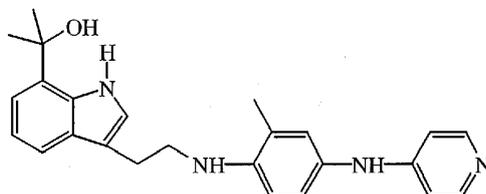




incluyendo cualquiera de sus formas estereoquímicamente isoméricas;

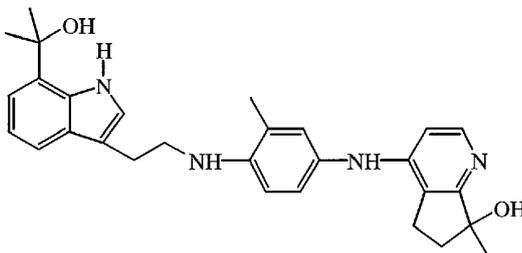
una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

Un compuesto preferido de la presente invención es el compuesto que tiene la siguiente fórmula



una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

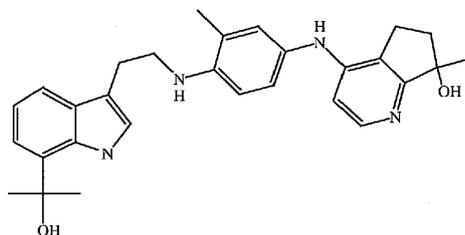
Un compuesto preferido de la presente invención es el compuesto que tiene la siguiente fórmula



incluyendo cualquiera de sus formas estereoquímicamente isoméricas;

5 una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

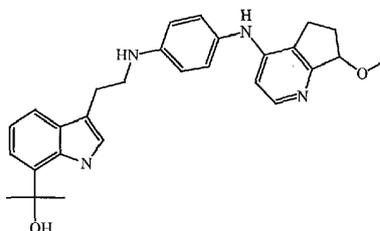
Un compuesto preferido de la presente invención es el enantiómero que tiene la siguiente fórmula



10 y que tiene una rotación levorrotatoria medida con luz a la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C y una longitud de recorrido de celda de 1 dm en cloroformo a una concentración de 8,59 mg/ml; o

una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

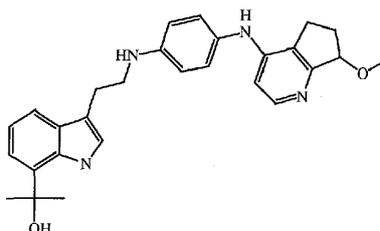
Un compuesto preferido de la presente invención es el enantiómero que tiene la siguiente fórmula



15 y que tiene una rotación dextrorrotatoria medida con luz a la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C y una longitud de recorrido de celda de 1 dm en metanol a una concentración de 10,33 mg/ml; o

una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

Un compuesto preferido de la presente invención es el enantiómero que tiene la siguiente fórmula



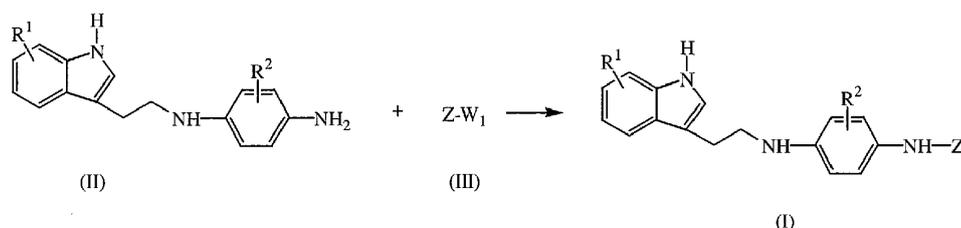
20 y que tiene una rotación levorrotatoria medida con luz a la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C y una longitud de recorrido de celda de 1 dm en metanol a una concentración de 10,74 mg/ml; o

una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

Los compuestos de la fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables y sus formas estereoquímicamente isoméricas se pueden preparar de una manera convencional. Los materiales de partida y algunos de los intermedios son compuestos conocidos y están disponibles en comercios o se pueden preparar de acuerdo con procedimientos de reacción convencionales tal como se conocen en general en la técnica. También se hace referencia al respecto a los métodos de síntesis descritos en el documento WO 2006/032631.

Se describirá una cantidad de tales métodos de preparación en la presente más adelante, con mayor detalle. Se describen en los ejemplos otros métodos para obtener los compuestos finales de la fórmula (I).

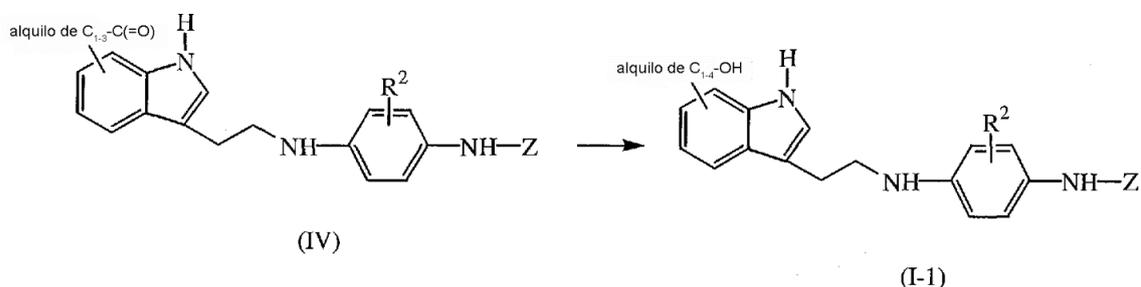
En general, los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (II) con un intermedio de la fórmula (III), en la que W_1 es un grupo saliente apropiado tal como, por ejemplo, halo, por ejemplo, fluoro, cloro, bromo o yodo, o un radical sulfonilo tal como metilsulfonilo, 4-metilfenilsulfonilo, y similares. La reacción se puede llevar a cabo en un disolvente inerte a la reacción tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol, etanol, 2-metoxi-etanol, propanol, butanol, y similares; un éter, por ejemplo 1,4-dioxano, con preferencia en presencia de un ácido apropiado, tal como por ejemplo HCl, 1,1'-oxibispropano, y similares; una cetona, por ejemplo 4-metil-2-pentanona; o N,N-dimetilformamida, nitrobeneno, acetonitrilo, y similares. La adición de una base apropiada tal como, por ejemplo un carbonato o hidrogenocarbonato de metal alcalino o alcalino-térreo, o una base orgánica, por ejemplo N,N-diisopropiletilamina, trietilamina, carbonato de sodio o carbonato de potasio, se puede utilizar para recoger el ácido que se libera durante el curso de la reacción. Se puede añadir una pequeña cantidad de un yoduro metálico apropiado, por ejemplo yoduro de sodio o de potasio, para promover la reacción. La agitación puede mejorar la velocidad de la reacción. La reacción se puede llevar a cabo, de manera conveniente, a una temperatura que va de la temperatura ambiente a la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción y, si se desea, la reacción se puede llevar a cabo a una mayor presión.



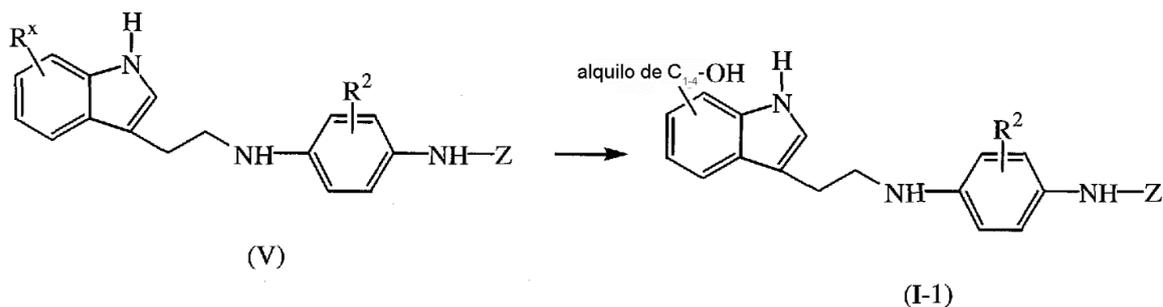
En la reacción anterior, los intermedios de la fórmula (II), en la que R^1 es $-\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$, pueden dar como resultado el compuesto final correspondiente de la fórmula (I), en la que R^1 es $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$.

La reacción anterior de un intermedio de la fórmula (III) con un intermedio de la fórmula (II) también se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador apropiado, tal como, por ejemplo, $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (bis[(1,2,4,5-η)-1,5-difenil-1,4-pentadien-3-ona]-paladio), un ligando apropiado, tal como, por ejemplo, BINAP (2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftilo), una base apropiada, tal como, por ejemplo, terc-butóxido de sodio, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tolueno.

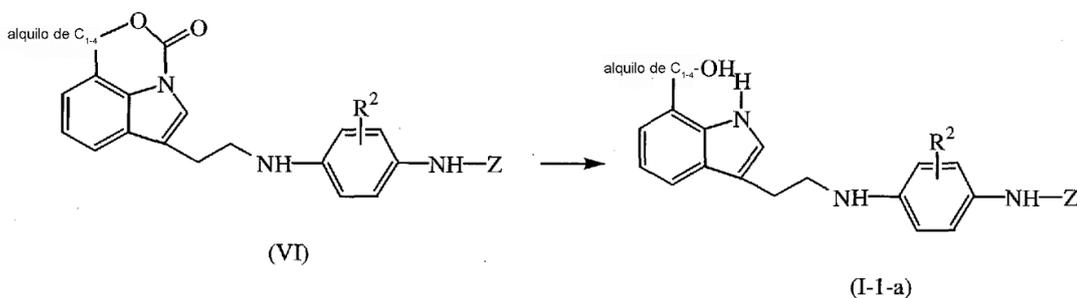
Los compuestos de la fórmula (I), en la que R^1 representa hidroxialquilo de C_{1-4} , estando representados dichos compuestos por la fórmula (I-1), también se pueden preparar reduciendo el derivado de carbonilo correspondiente de la fórmula (IV) en presencia de un agente reductor apropiado, tal como, por ejemplo, NaBH_4 , y un disolvente apropiado, tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol, y similares.



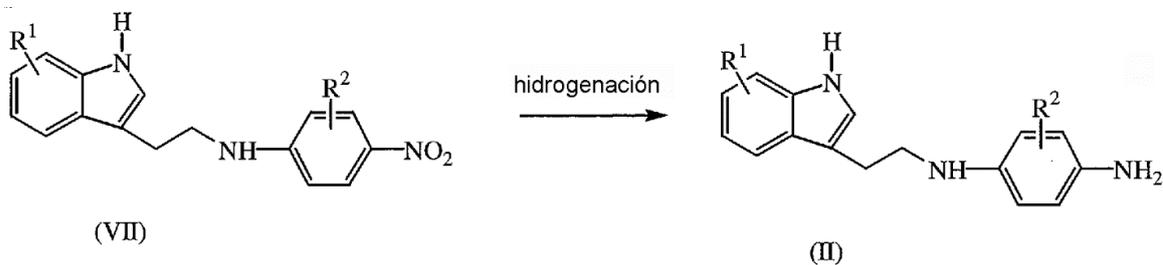
Los compuestos de la fórmula (I-1) también se pueden preparar reduciendo el derivado de éster correspondiente de la fórmula (V), en la que R^x representa $-\text{alquilo de } \text{C}_{1-3}-\text{C}(\text{=O})\text{Oalquilo de } \text{C}_{1-4}$, en presencia de un agente reductor apropiado, tal como, por ejemplo, LiAlH_4 , y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano.



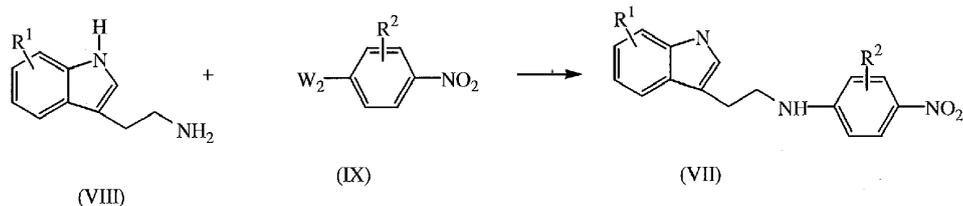
- Los compuestos de la fórmula (I-1), en la que el R¹ representa hidroxialquilo de C₁₋₄ y dicho hidroxialquilo de C₁₋₄ está ubicado en la posición 7 del resto de indol, estando dichos compuestos representados por la fórmula (I-1-a), también se pueden preparar por hidrólisis de un intermedio de la fórmula (VI) con una base apropiada, tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano, o un alcohol, por ejemplo etanol y similares.



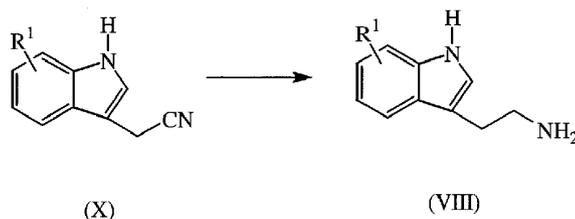
- Los compuestos de la fórmula (I) también se pueden convertir entre sí por medio de reacciones conocidas en la técnica o transformaciones de grupos funcionales.
- 10 Los compuestos de la fórmula (I) también se pueden convertir en una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable por reacción con un ácido apropiado, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, en un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo 2-propanol, éter dietílico, éter diisopropílico.
- Algunos de los intermedios y materiales de partida son compuestos conocidos y pueden ser asequibles en comercios o se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.
- 15 En general, los intermedios de la fórmula (II) se pueden preparar hidrogenando un intermedio de la fórmula (VII) en presencia de un catalizador metálico apropiado, tal como, por ejemplo, níquel Raney, en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol o etanol y similar; o platino sobre carbón, en presencia de un veneno catalizador apropiado, tal como una disolución de tiofeno y pentóxido de vanadio, en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano.



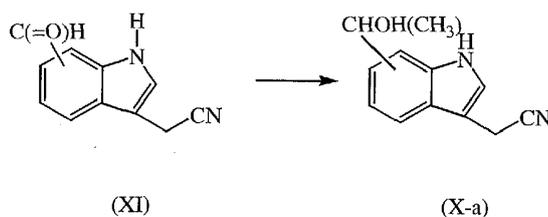
- Los intermedios de la fórmula (VII) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (VIII) con un intermedio de la fórmula (IX), en la que W₂ representa un grupo saliente apropiado, tal como, por ejemplo, un átomo de halo, por ejemplo cloro, bromo, fluoro, y similares, en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, N,N-dimetilsulfóxido. La adición de una base apropiada tal como, por ejemplo, un carbonato o hidrogenocarbonato de metal alcalino o alcalino-térreo o una base orgánica, por ejemplo N,N-diisopropiletamina, trietilamina, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio o carbonato de potasio, se puede utilizar para recoger el ácido que se libera durante el curso de la reacción.



Los intermedios de la fórmula (VIII) se pueden preparar a partir del intermedio de la fórmula (X) correspondiente en presencia de níquel Raney y NH₃ en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol y similares.

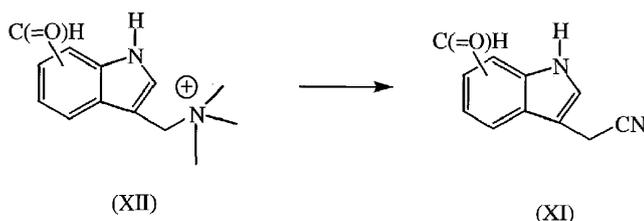


- 5 Los intermedios de la fórmula (X), en la que R¹ representa hidroxialquilo de C₁₋₄, por ejemplo -CH(OH)(CH₃), estando representados dichos intermedios por la fórmula (X-a), se pueden preparar a partir de un intermedio de la fórmula (XI) por reacción con CH₃MgCl en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano.

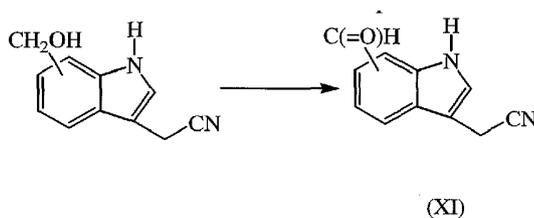


- 10 Se puede usar la misma reacción para preparar otras alternativas de hidroxialquilo de C₁₋₄. Por ejemplo, los intermedios, en los que R¹ representa -C(OH)(CH₃)₂, se pueden preparar a partir del intermedio correspondiente con -C(=O)-CH₃.

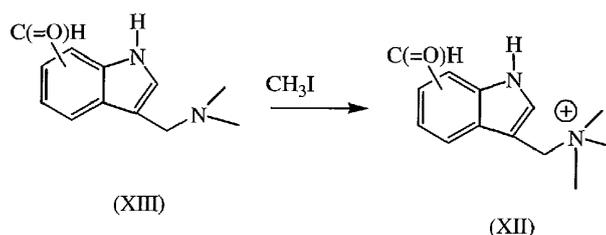
Los intermedios de la fórmula (XI) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XII) con cianuro de sodio en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, N,N-dimetilformamida.



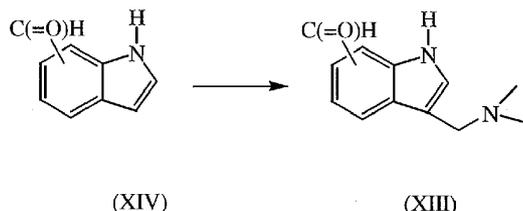
- 15 De modo alternativo, los intermedios de la fórmula (XI) también se pueden preparar por oxidación a partir del análogo de hidroxilo correspondiente en presencia de peryodinano de Dess-Martin y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, diclorometano.



- 20 Los intermedios de la fórmula (XII) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XIII) con CH₃I en presencia de un disolvente apropiado tal como un alcohol, por ejemplo etanol.

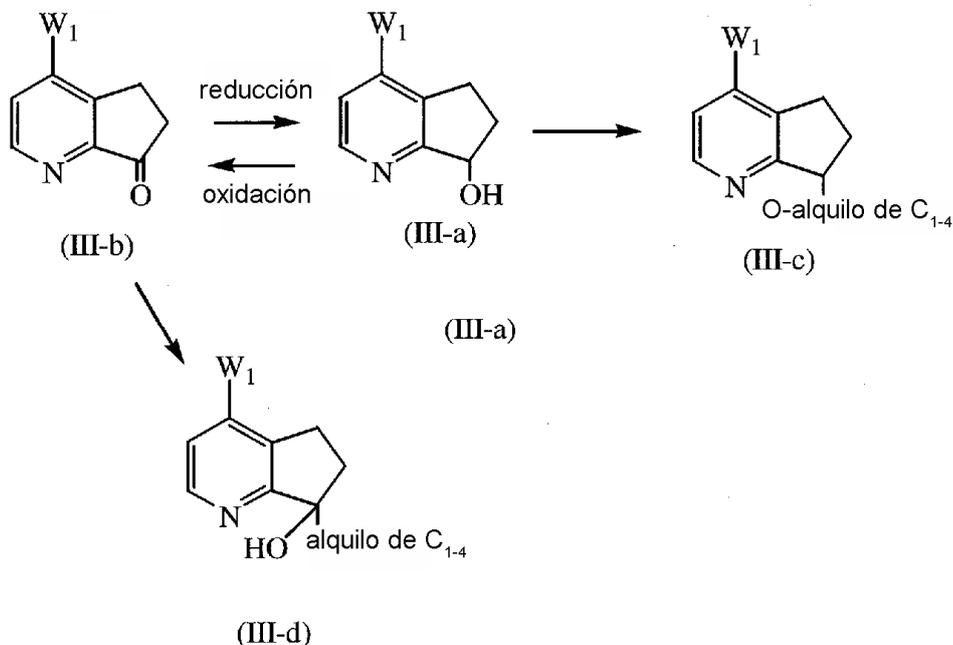


Los intermedios de la fórmula (XIII) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XIV) con sal de Eschenmosser en presencia de ácido acético.

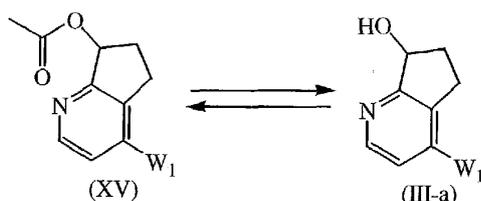


5 Los intermedios de la fórmula (XIV) se pueden preparar oxidando el análogo de hidroxilo correspondiente en presencia de un agente oxidante apropiado tal como, por ejemplo, MnO_2 , en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, diclorometano.

Los intermedios de la fórmula (III), en la que Z es un radical de la fórmula (z-2) y R^4 es hidroxilo, estando representados dichos intermedios por la fórmula (III-a), se pueden preparar reduciendo un intermedio de la fórmula (III-b) con un agente reductor apropiado tal como, por ejemplo, $NaBH_4$, en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol. Los intermedios de la fórmula (III-a) se pueden convertir en un intermedio de la fórmula (III-c) por reacción con yoduro de alquilo de C_{1-4} , en presencia de una base apropiada tal como hidruro de sodio y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano. Los intermedios de la fórmula (III-b) se pueden preparar por oxidación de un intermedio de la fórmula (III-a) por reacción con un agente oxidante apropiado, tal como, por ejemplo, MnO_2 , en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, diclorometano. Los intermedios de la fórmula (III-b) se pueden convertir en un intermedio de la fórmula (III-d) por reacción con alquilo de $C_{1-4}MgCl$ en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano.



20 Los intermedios de la fórmula (III-a) también se pueden preparar agitando el intermedio de la fórmula (XV) en una mezcla de metanol/ NH_3 . Si se desea, el intermedio de la fórmula (III-a) se puede convertir en el intermedio de la fórmula (XV) agitando en una mezcla de anhídrido acético y piridina.

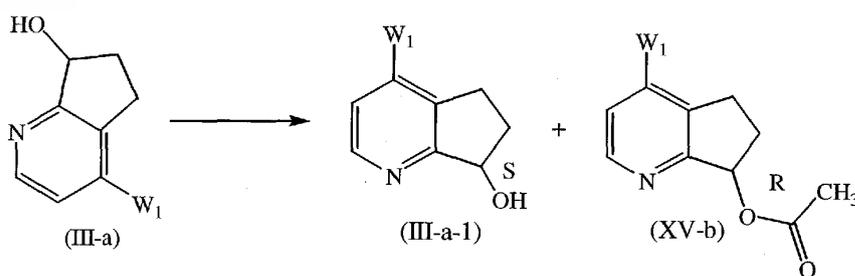


El enantiómero S del intermedio (III-a), mencionado en la presente como el intermedio de la fórmula (III-a-1), y el enantiómero R del intermedio de la fórmula (XV), mencionado en la presente como el intermedio de la fórmula (XV-b), se pueden preparar añadiendo Lipase Candida Antartica B a una mezcla racémica del intermedio de la fórmula (III-a) en un disolvente apropiado tal como éster etenlico de ácido acético (véase el Esquema 1). Cuando se desee, el intermedio de la fórmula (XV-b) se puede convertir en el enantiómero R del intermedio (III-a), mencionado en la presente como intermedio de la fórmula (III-a-2), por reacción en MeOH/NH₃.

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

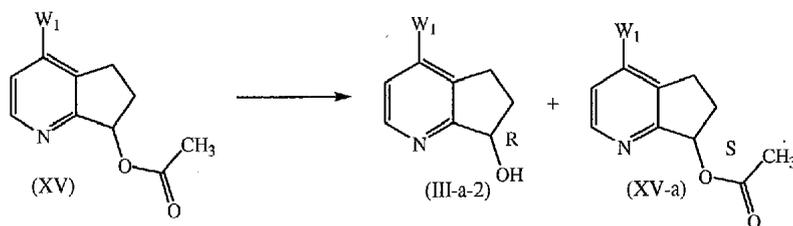
La expresión exceso enantiomérico (ee) es bien conocida por el experto en la técnica de la esteoquímica. Para una mezcla de enantiómeros (+) y (-), con la composición dada como las fracciones molares o en peso de F(+) y F(-) (en el que F(+) + F(-) = 1), el exceso enantiomérico para F(*) se define como F(+) - F(-), y el exceso enantiomérico en porcentaje como 100*[F(+) - F(-)].

Esquema 1



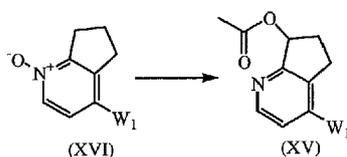
De modo alternativo, el enantiómero R del intermedio (III-a), mencionado en la presente como el intermedio de la fórmula (III-a-2), y el enantiómero S del intermedio de la fórmula (XV), mencionado en la presente como el intermedio de la fórmula (XV-a), se pueden preparar añadiendo Lipase Candida Antartica B a una mezcla racémica del intermedio de la fórmula (XV) en agua (véase el Esquema 2). Cuando se desee, el intermedio (XV-a) se puede convertir en el intermedio (III-a-1) por reacción en MeOH/NH₃.

Esquema 2

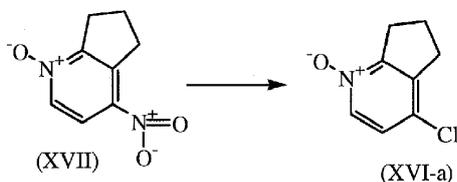


De modo alternativo, el intermedio de la fórmula (III-a) también se puede separar en sus enantiómeros por cromatografía quiral en columna.

Los intermedios de la fórmula (XV) se pueden preparar agitando el intermedio de la fórmula (XVI) en anhídrido acético.



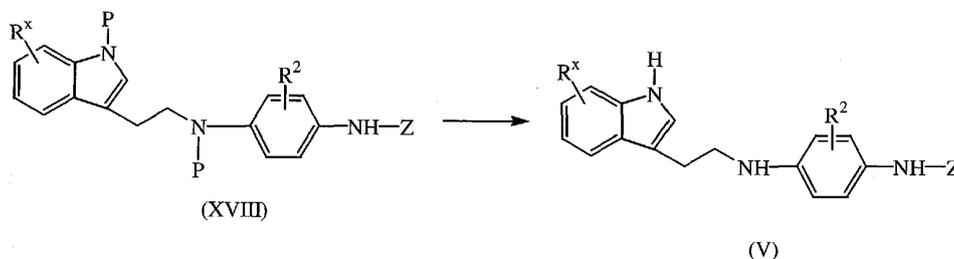
Los intermedios de la fórmula (XVI), en la que W_1 es cloro, mencionado en la presente como el intermedio de la fórmula (XVI-a), se pueden preparar añadiendo cloruro de benciltrietilamonio y cloruro de sodio a una disolución del intermedio de la fórmula (XVII) en acetonitrilo, seguido de la adición de ácido clorhídrico concentrado.



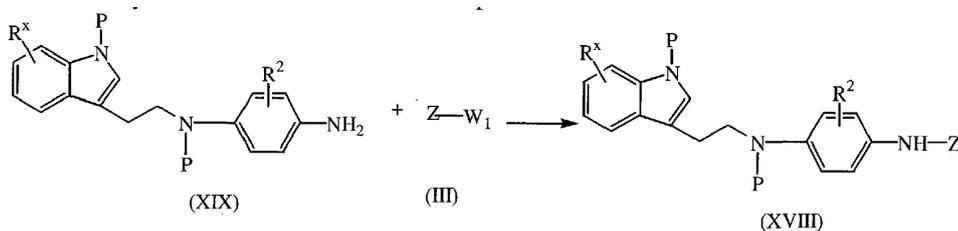
5 Los intermedios de la fórmula (XVII) se pueden preparar añadiendo ácido nítrico fumante a ácido sulfúrico, seguido de la adición en porciones de 1-óxido de 6,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]piridina.

Los intermedios de la fórmula (IV) se pueden preparar de acuerdo con los protocolos de reacción anteriores para los intermedios de la fórmula (II).

10 Los intermedios de la fórmula (V) se pueden preparar desprotegiendo un intermedio de la fórmula (XVIII), en la que P representa un grupo protector apropiado tal como, por ejemplo, $-C(=O)-O-C(CH_3)_3$, en presencia de un ácido apropiado, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, acetonitrilo.

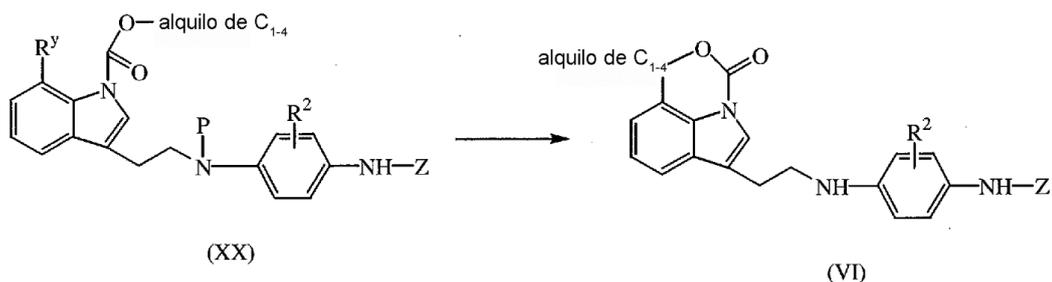


15 Los intermedios de la fórmula (XVIII) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XIX) con un intermedio de la fórmula (III) en presencia de un disolvente inerte a la reacción tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol, etanol, 2-metoxi-etanol, propanol, isopropanol, butanol, y similares; un éter, por ejemplo 1,4-dioxano, con preferencia en presencia de un ácido apropiado tal como, por ejemplo, HCl, 1,1'-oxibispropano, y similares; una cetona, por ejemplo 4-metil-2-pentanona; o N,N-dimetilformamida, nitrobenzeno, acetonitrilo, y similares. La adición de una base apropiada tal como, por ejemplo, un carbonato o hidrogenocarbonato de metal alcalino o alcalino-térreo o una base orgánica, por ejemplo N,N-diisopropiletilamina, trietilamina, carbonato de sodio o carbonato de potasio, se puede utilizar para recoger el ácido que se libera durante el curso de la reacción. Se puede añadir una pequeña cantidad de un yoduro metálico apropiado, por ejemplo yoduro de sodio o de potasio, para promover la reacción. La agitación puede mejorar la velocidad de la reacción. La reacción se puede llevar a cabo de manera conveniente a una temperatura que oscila entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, y, si se desea, la reacción se puede llevar a cabo a una mayor presión.

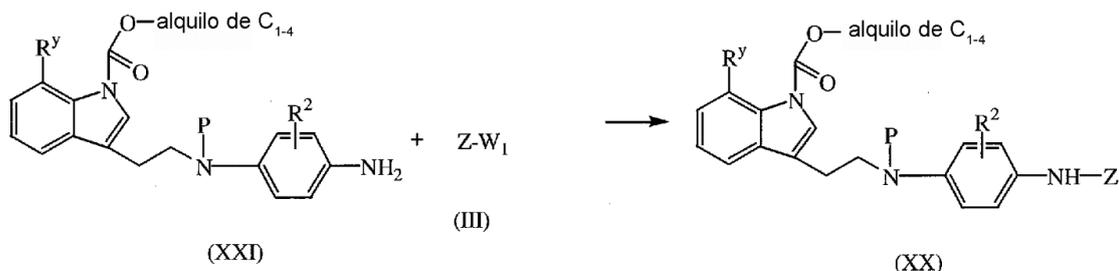


25 Los intermedios de la fórmula (XIX) se pueden preparar de acuerdo con los protocolos de reacción descritos con anterioridad para los intermedios de la fórmula (II).

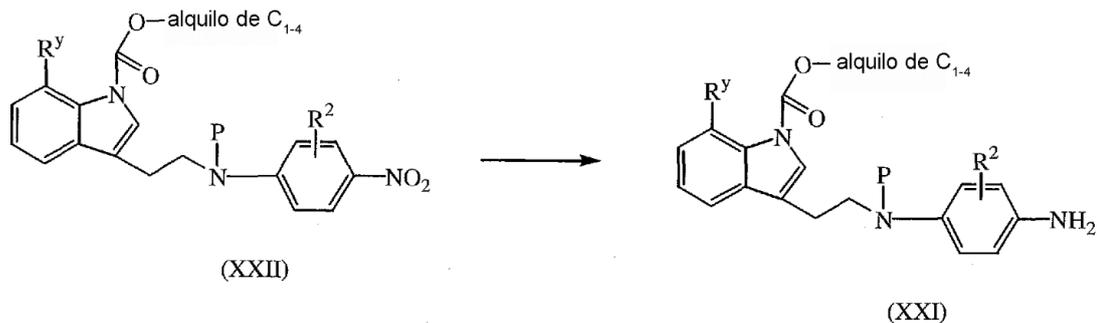
30 Los intermedios de la fórmula (VI) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XX), en la que P representa un grupo protector apropiado tal como se definió con anterioridad, y R^y representa $-alquilo$ de C_{1-4} - $O-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$, en presencia de un ácido apropiado, tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, diclorometano.



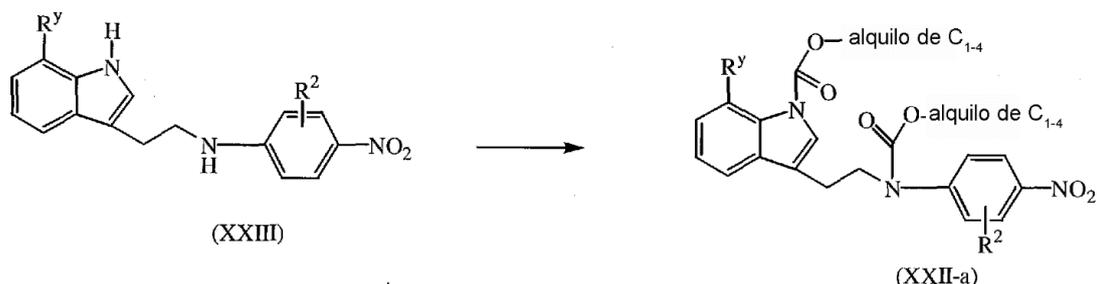
Los intermedios de la fórmula (XX) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XXI) con un intermedio de la fórmula (III) en presencia de un disolvente inerte a la reacción tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol, etanol, 2-metoxi-etanol, propanol, isopropanol, butanol, y similares; un éter, por ejemplo 1,4-dioxan, con preferencia en presencia de un ácido apropiado tal como, por ejemplo, HCl, 1,1'-oxibispropano, y similares; una cetona, por ejemplo 4-metil-2-pentanona; o N,N-dimetilformamida, nitrobenzono, acetonitrilo, y similares. La adición de una base apropiada tal como, por ejemplo, un carbonato o hidrogenocarbonato de metal alcalino o alcalino-térreo o una base orgánica, por ejemplo N,N-diisopropiletilamina, trietilamina, carbonato de sodio o carbonato de potasio, se puede utilizar para recoger el ácido que se libera durante el curso de la reacción. Se puede añadir una pequeña cantidad de un yoduro metálico apropiado, por ejemplo yoduro de sodio o de potasio, para promover la reacción. La agitación puede mejorar la velocidad de la reacción. La reacción se puede llevar a cabo de manera conveniente a una temperatura que oscila entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, y, si se desea, la reacción se puede llevar a cabo a una mayor presión.



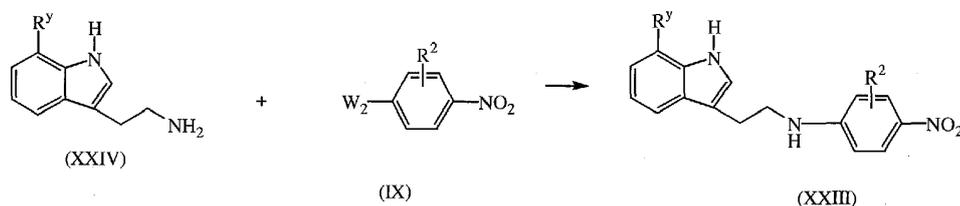
Los intermedios de la fórmula (XXI) se pueden preparar a partir del intermedio nitro correspondiente de la fórmula (XXII) por hidrogenación en presencia de un catalizador apropiado, tal como, por ejemplo, níquel Raney, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol y similares.



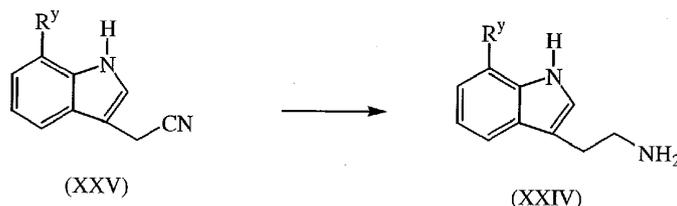
Los intermedios de la fórmula (XXII), en la que P representa -C(=O)-O-alkilo de C₁₋₄, estando representado dicho intermedio por la fórmula (XXII-a), se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XXIII) con dicarbonato de di-terc-butilo en presencia de una base apropiada tal como, por ejemplo, trietilamina, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, 4-(dimetil)aminopiridina.



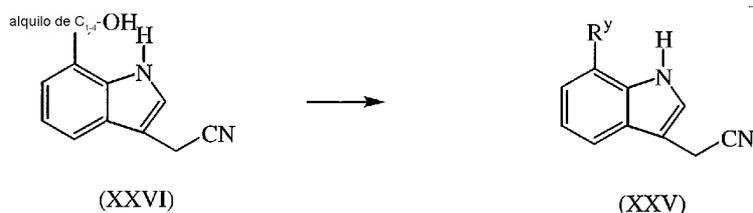
Los intermedios de la fórmula (XXIII) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XXIV) con un intermedio de la fórmula (IX) en presencia de una base apropiada, tal como, por ejemplo, bicarbonato de sodio, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, N,N-dimetilsulfóxido.



- 5 Los intermedios de la fórmula (XXIV) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XXV) con NH_3 en presencia de un catalizador apropiado, tal como, por ejemplo, níquel Raney, en presencia de un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo metanol y similares.



- 10 Los intermedios de la fórmula (XXV) se pueden preparar haciendo reaccionar un intermedio de la fórmula (XXVI) con cloruro de terc-butildimetilsililo en presencia de una base apropiada tal como, por ejemplo, imidazol, y un disolvente apropiado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano.



Los intermedios de la fórmula (XXVI) se pueden preparar tal como se describió con anterioridad para los intermedios de la fórmula (XI).

- 15 Los compuestos de la fórmula (I) y algunos de los intermedios de la presente invención pueden contener un átomo de carbono asimétrico. Las formas puras estereoquímicamente isoméricas de dichos compuestos y dichos intermedios se pueden obtener por la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los diastereoisómeros se pueden separar por métodos físicos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatográficas, por ejemplo distribución en contracorriente, cromatografía de líquidos y métodos similares. Los enantiómeros se pueden obtener a partir de mezclas racémicas convirtiendo primero dichas mezclas racémicas con
 20 agentes de resolución adecuados tales como, por ejemplo, ácidos quirales, en mezclas de sales o compuestos diastereoméricos; luego separando físicamente dichas mezclas de sales o compuestos diastereoméricos, por ejemplo, por técnicas de cristalización selectiva, cromatografía de fluidos supercríticos o cromatográficas, por ejemplo métodos de cromatografía de líquidos y similares; y finalmente convirtiendo dichas sales o compuestos
 25 diastereoméricos separados en los enantiómeros correspondientes. Las formas puras estereoquímicamente isoméricas también se pueden obtener a partir de las formas puras estereoquímicamente isoméricas de los intermedios y materiales de partida adecuados, siempre que las reacciones que intervienen ocurran en forma estereoespecífica.

- 30 Los compuestos de la fórmula (I), incluyendo cualquiera de sus formas estereoquímicamente isoméricas, sus sales farmacéuticamente aceptables o sus solvatos, tienen valiosas propiedades farmacológicas por cuanto incrementan la expresión de p53, muestran poderosa actividad antiproliferativa, muestran poderosa actividad antitumoral.

Tal como se indicó con anterioridad, los compuestos de la invención incrementan la expresión de p53 en el ensayo descrito en C.1. Este incremento puede ser causado, sin limitaciones, por uno o más de los siguientes mecanismos de acción:

- 35 - interacciones con dianas aguas arriba o aguas abajo, por ejemplo cinasas, o actividades de enzima incluidas en la ubiquitinación o la modificación SUMO,

- estabilización directa o indirecta de la proteína p53, por ejemplo al mantener su forma estructural funcional, o al prevenir el plegamiento equivocado,
 - mejorar la expresión de p53 o la expresión de miembros de la familia de p53, por ejemplo p63 y p73,
 - incrementar la actividad de p53, por ejemplo (sin limitarse a), mejorar su actividad transcripcional, y/o
- 5 - incrementar la expresión de genes y proteínas de la ruta de señalización de p53, por ejemplo (sin limitarse a) p21waf1, cip1, MIC-1 (GDF-15), PIG-3, Bax, Puma, Noxa, y ATF-3

En consecuencia, la presente invención describe los compuestos de la fórmula (I) para su uso como medicina, en particular para el tratamiento de cáncer o enfermedades relacionadas, para inhibir el crecimiento tumoral, para incrementar la expresión de p53.

- 10 Además, la invención también se refiere al uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por la expresión disminuida de p53, en particular para el tratamiento de cáncer, en el que dicho compuesto es un compuesto de la fórmula (I).

- 15 El término “tratar” o “tratamiento”, tal como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad y/o condición patológica en un animal, particularmente un ser humano, e incluye: (i) impedir que una enfermedad y/o condición patológica ocurra en un sujeto que pueda estar predispuesto a la enfermedad y/o condición patológica pero al que no se le ha diagnosticado aún; (ii) inhibir la enfermedad y/o condición patológica, es decir, detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad y/o condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad y/o condición patológica.

- 20 Con la expresión “un trastorno mediado por la expresión disminuida de p53” se entiende cualquier condición patológica indeseada o perjudicial que pueda ser inhibida por, cuyo desarrollo pueda ser detenido por, que pueda ser aliviada por, o cuya regresión pueda ser causada por apoptosis, inducción de muerte celular, o regulación del ciclo celular.

- 25 Esta descripción también proporciona un método para tratar un trastorno mediado por una expresión disminuida de p53, en particular para tratar cáncer, al administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesite dicho tratamiento.

Los compuestos de la invención pueden tener efectos antiproliferativos sobre las células tumorales, incluso si dichas células carecen de p53 funcional. Más en particular, los compuestos de la invención pueden tener efectos antiproliferativos sobre tumores con p53 de tipo salvaje o mutante y/o sobre tumores que sobreexpresan MDM2. Los compuestos pueden afectar la angiogénesis, la migración, la invasión o la metástasis de las células tumorales.

- 30 En consecuencia, esta descripción también proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral al administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesite de dicho tratamiento.

- 35 Los ejemplos de tumores que incluyen neoplasias de adultos y pediátricas, los cuales pueden ser inhibidos por los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico (por ejemplo adenocarcinoma), cánceres de páncreas, cánceres de colon (por ejemplo carcinomas colorrectales tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer de esófago, carcinoma oral de células escamosas, carcinoma de lengua, carcinoma gástrico, cáncer de hígado, cáncer nasofaríngeo, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide (por ejemplo leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt), linfoma no Hodgkin (por ejemplo linfoma de células del manto), enfermedad de Hodgkin, leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielogenosa aguda (AML) o leucemia mielogenosa crónica (CML)), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica (CLL), cáncer de foliculo tiroideo, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimatoso, sarcomas de tejidos blandos, liposarcomas, sarcomas de estroma gastrointestinal, tumores malignos de la vaina nerviosa periférica (MPNST), sarcomas de Ewing, leiomiomas, condrosarcomas mesenquimatosos, linfosarcomas, fibrosarcomas, rhabdomyosarcomas,
- 40 melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, tumores cerebrales, meduloblastoma, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo cáncer de mama avanzado), carcinoma renal, nefroblastoma, carcinoma de ovario, carcinoma cervical, carcinoma endometrial, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata, incluyendo la enfermedad avanzada y cáncer de próstata refractario a hormonas, cánceres testiculares, osteosarcoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma epidérmico, mieloma múltiple (por ejemplo mieloma múltiple refractario), mesotelioma. Los cánceres particulares que pueden ser tratados con los compuestos de la presente invención son cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, leucemia mielógena aguda (AML).
- 45
- 50

Los compuestos de la presente invención también se pueden usar para el tratamiento y la prevención de condiciones inflamatorias.

En consecuencia, esta descripción también proporciona un método para el tratamiento y la prevención de condiciones inflamatorias al administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesite dicho tratamiento.

5 Los compuestos de la presente invención también se pueden usar para el tratamiento de enfermedades y condiciones autoinmunes. Con la expresión “enfermedades autoinmunes” se entiende cualquier enfermedad en la cual el sistema inmune de un animal reacciona de forma adversa a un autoantígeno. Con el término “autoantígeno” se entiende cualquier antígeno que normalmente se encuentra en el cuerpo del animal. Las enfermedades autoinmunes representativas incluyen, pero no se limitan a: tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE o lupus), dermatomiositis, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener, enfermedad antimembrana basal glomerular, síndrome antifosfolípido, dermatitis herpetiforme, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis, glomerulonefritis membranosa, síndrome del Goodpasture, síndrome de Lambert-Eaton, síndrome miasténico, miastenia grave, pénfigo ampoloso, poliendocrinopatías, enfermedad de Reiter, y síndrome del hombre rígido.

15 En consecuencia, esta descripción también proporciona un método para el tratamiento de enfermedades y condiciones autoinmunes al administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesite dicho tratamiento.

Los compuestos de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas con proteínas conformacionales inestable o mal plegadas.

20 Los ejemplos de enfermedades asociadas con proteínas conformacionales inestables o mal plegadas incluyen, pero sin limitarse a: fibrosis quística (CFTR), síndrome de Marfan (fibrilina), esclerosis lateral amiotrófica (superóxido dismutasa), escorbuto (colágeno), enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (complejo de alfa-cetoácido deshidrogenasa), osteogénesis imperfecta (procolágeno pro-alfa tipo I), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (priones), enfermedad de Alzheimer (beta-amiloide), amiloidosis familiar (lisozima), cataratas (cristalino), hipercolesterolemia familiar (receptor de LDL), deficiencia de α 1-antitripsina, enfermedad de Tay-Sachs (beta-hexosaminidasa), retinitis pigmentosa (rodopsina), y leprechaunismo (receptor de insulina).

25 En consecuencia, esta descripción también proporciona un método para el tratamiento de enfermedades asociadas con proteínas conformacionales inestables o mal plegadas al administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más particularmente un ser humano) que necesite dicho tratamiento.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los compuestos objeto se pueden formular en diversas formas farmacéuticas con fines de administración.

35 Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, como ingrediente activo, se combina en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, portador el cual puede adoptar una amplia variedad de formas según la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas de manera deseable están en una forma de dosificación unitaria adecuada, con preferencia, para la administración oral, rectal, percutánea o por inyección parenteral. Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares, en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y disoluciones; o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares, en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos.

45 Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso obviamente se emplean portadores farmacéuticos sólidos. Para las composiciones parenterales, los portadores usualmente comprenden agua estéril, al menos en gran medida, si bien se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo para favorecer la solubilidad. Se pueden preparar disoluciones inyectables, por ejemplo, en las cuales el portador comprende disolución salina, disolución de glucosa, o una mezcla de disolución salina y glucosa. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos, agentes de suspensión y similares apropiados. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador opcionalmente comprende un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, opcionalmente combinado con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos los cuales no causan efecto significativo perjudicial a la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser de utilidad para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones se pueden administrar de diversas maneras, por ejemplo como parche transdérmico, como una unción puntual, como ungüento. Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas antes mencionadas en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el

portador farmacéutico requerido. Los ejemplos de dichas formas de dosificación unitaria son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y sus múltiples segregados.

5 Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas antes mencionadas en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de las dosis. La forma de dosificación unitaria tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador farmacéutico requerido. Los ejemplos de dichas formas de dosificación unitaria son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y sus múltiples segregados.

El compuesto de la invención es administrado en una cantidad suficiente para inducir la apoptosis, inducir la muerte celular, o regular el ciclo celular.

15 En consecuencia, el compuesto de la invención es administrado en una cantidad suficiente para incrementar la expresión de p53, o ejercer su actividad antitumoral.

Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad la cantidad efectiva a partir de los resultados de los ensayos presentados a continuación. En general se contempla que una cantidad terapéuticamente efectiva sería desde 0,005 mg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal, y en particular desde 0,005 mg/kg hasta 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser adecuado administrar la dosis requerida como dosis única, o dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados durante el día. Dichas subdosis se pueden formular como formas de dosificación unitaria, por ejemplo que contienen 0,5 a 500 mg, en particular 1 mg a 500 mg, más particularmente 10 mg a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

20 Según el modo de administración, la composición farmacéutica con preferencia comprende desde 0,05 hasta 99% en peso, con mayor preferencia desde 0,1 hasta 70% en peso, con aún mayor preferencia desde 0,1 hasta 50% en peso del compuesto de la presente invención, y desde 1 hasta 99,95% en peso, con mayor preferencia desde 30 hasta 99,9% en peso, con aún mayor preferencia desde 50 hasta 99,9% en peso de un portador farmacéuticamente aceptable, basándose todos los porcentajes en el peso total de la composición.

Como otro aspecto de la presente invención, se visualiza una combinación de un compuesto de la presente invención con otro agente anticanceroso, especialmente para el uso como medicina, más específicamente en el tratamiento de cáncer o enfermedades relacionadas.

30 Para el tratamiento de las condiciones patológicas anteriores, los compuestos de la invención se pueden emplear ventajosamente en combinación con uno o más de otros agentes medicinales, más particularmente con otros agentes anticancerosos o coadyuvantes en la terapia del cáncer. Los ejemplos de agentes anticancerosos o coadyuvantes (agentes de apoyo en la terapia) incluyen, pero no se limitan a:

- 35 - compuestos de coordinación de platino, por ejemplo cisplatino opcionalmente combinado con amifostina, carboplatino u oxaliplatino;
- compuestos de taxano, por ejemplo paclitaxel, partículas de paclitaxel fijadas a proteínas (Abraxane™) o docetaxel;
- 40 - inhibidores de topoisomerasa I tales como compuestos de camptotecina, por ejemplo irinotecán, SN-38, topotecán, topotecán hcl;
- inhibidores de topoisomerasa II tales como derivados de epipodofilotoxinas o podofilotoxinas antitumorales, por ejemplo etopósido, fosfato de etopósido, o tenipósido;
- alcaloides de la vinca antitumorales, por ejemplo vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- 45 - derivados de nucleósidos antitumorales, por ejemplo 5-fluorouracilo, leucovorina, gemcitabina, gemcitabina hcl, capecitabina, cladribina, fludarabina, nelarabina;
- agentes alquilantes tales como mostaza nitrogenada o nitrosourea, por ejemplo ciclofosfamida, clorambucilo, carmustina, tiotepa, mefalán (melfalán), lomustina, altretamina, busulfano, dacarbazina, estramustina, ifosfamida opcionalmente en combinación con mesna, pipobromano, procarbazona, estreptozocina, telozolomida, uracilo;
- 50 - derivados de antraciclina antitumorales, por ejemplo daunorrubicina, doxorrubicina opcionalmente en combinación con dexrazoxano, doxilo, idarrubicina, mitoxantrona, epirubicina, epirubicina hcl, valrubicina;
- moléculas dirigidas al receptor de IGF-1, por ejemplo picropodofilina;

ES 2 639 752 T3

- derivados de tetracarcina, por ejemplo tetrocarcina A; glucocorticoides, por ejemplo prednisona; anticuerpos, por ejemplo trastuzumab (anticuerpo anti-HER2), rituximab (anticuerpo anti-CD20), gemtuzumab, gemtuzumab ozogamicina, cetuximab, pertuzumab, bevacizumab, alemtuzumab, eculizumab, ibritumomab tiuxetano, nofetumomab, panitumumab, tositumomab, CNTO 328;
- 5 - antagonistas de receptor de estrógeno o moduladores selectivos de receptor de estrógeno o inhibidores de la síntesis de estrógeno, por ejemplo tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, droloxifeno, faslodex, raloxifeno o letrozol;
- inhibidores de aromatasa tales como exemestano, anastrozol, letrozol, testolactona y vorozol;
- 10 - agentes de diferenciación tales como retinoides, vitamina D o ácido retinoico y agentes bloqueadores del metabolismo de ácido retinoico (RAMBA), por ejemplo acutano;
- inhibidores de ADN metiltransferasa, por ejemplo azacitidina o decitabina;
- antifolatos, por ejemplo premetrexed disodio; antibióticos, por ejemplo antinomicina D, bleomicina, mitomicina C, dactinomicina, carminomicina, daunomicina, levamisol, plicamicina, mitramicina;
- 15 - antimetabolitos, por ejemplo clofarabina, aminopterina, citosina arabinósido o metotrexato, azacitidina, citarabina, floxuridina, pentostatina, tioguanina;
- agentes inductores de apoptosis y agentes antiangiogénicos tales como inhibidores de Bcl-2, por ejemplo YC 137, BH 312, ABT 737, gosipol, HA 14-1, TW 37 o ácido decanoico;
- agentes de unión a tubulina, por ejemplo combrestatina, colchicinas o nocodazol;
- 20 - inhibidores de cinasas (por ejemplo inhibidores de EGFR (receptor de factor de crecimiento epitelial), inhibidores de MTKI (inhibidores de cinasas que actúan sobre múltiples dianas), inhibidores de mTOR), por ejemplo flavoperidol, mesilato de imatinib, erlotinib, gefitinib, dasatinib, lapatinib, ditosilato de lapatinib, sorafenib, sunitinib, maleato de sunitinib, temsirolimus;
- inhibidores de farnesil transferasa, por ejemplo tipifarnib;
- 25 - inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), por ejemplo butirato de sodio, ácido suberoilanolidhidroxamida (SAHA), depsipéptido (documento FR 901228), NVP-LAQ824, R306465, JNJ-26481585, tricostatina A, vorinostat;
- inhibidores de la ruta de ubiquitina-proteasoma, por ejemplo PS-341, MLN.41 o bortezomib;
- Yondelis;
- inhibidores de telomerasa, por ejemplo telomestatina;
- 30 - inhibidores de metaloproteinasas de la matriz, por ejemplo batimastat, marimastat, prinostat o metastat.
- Interleucinas recombinantes, por ejemplo aldesleucina, denileucina diftotox, interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, peginterferón alfa 2b
- inhibidores de MAPK
- retinoides, por ejemplo alitretinoína, bexaroteno, tretinoína
- 35 - trióxido de arsénico
- asparaginasa
- esteroides, por ejemplo propionato de dromostanolona, acetato de megestrol, nandrolona (decanoato, fenpropionato), dexametasona
- 40 - agonistas o antagonistas de hormona liberadora de gonadotropina, por ejemplo abarelix, acetato de goserelina, acetato de histrelina, acetato de leuprolida
- talidomida, lenalidomida
- mercaptopurina, mitotano, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, rasburicasa
- miméticos de BH3, por ejemplo ABT-737
- inhibidores de MEK, por ejemplo PD98059, AZD6244, CI-1040

- análogos del factor estimulante de colonias, por ejemplo filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim; eritropoyetina o sus análogos (por ejemplo darbepoetina alfa); interleucina 11; oprelvequina; zoledronato, ácido zoledrónico; fentanilo; bisfosfonato; palifermina.
- un inhibidor de una citocromo-P450 17alfa-hidroxilasa-17,20-liasa esteroidea (CYP17), por ejemplo abiraterona, acetato de abiraterona.

Tal como se especificó con anterioridad, los compuestos de la presente invención también tienen aplicaciones terapéuticas al sensibilizar las células tumorales para radioterapia y quimioterapia.

En consecuencia, los compuestos de la presente invención se pueden usar como “radiosensibilizadores” y/o “quimiosensibilizadores”, o se pueden administrar en combinación con otro “radiosensibilizador” y/o “quimiosensibilizador”.

El término “radiosensibilizador”, tal como se usa en la presente, es definido como una molécula, con preferencia una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente efectivas a fin de incrementar la sensibilidad de las células a la radiación ionizante y/o promover el tratamiento de enfermedades que son tratables con radiación ionizante.

El término “quimiosensibilizador”, tal como se usa en la presente, es definido como una molécula, con preferencia una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente efectivas a fin de incrementar la sensibilidad de las células a la quimioterapia y/o promover el tratamiento de enfermedades que son tratables con sustancias quimioterapéuticas.

En la bibliografía se han sugerido varios mecanismos para el modo de acción de los radiosensibilizadores, incluyendo: radiosensibilizadores de células hipóxicas (por ejemplo, compuestos de 2-nitroimidazol, y compuestos de dióxido de benzotriazina) que simulan el oxígeno o alternativamente se comportan como agentes biorreductores en situación de hipoxia; los radiosensibilizadores de células no hipóxicas (por ejemplo, pirimidinas halogenadas) pueden ser análogos de bases de ADN y con preferencia se incorporan en el ADN de las células cancerosas y así promueven la ruptura de las moléculas de ADN inducida por radiación y/o impiden los mecanismos normales de reparación de ADN; y se han planteado hipótesis de diversos otros potenciales mecanismos de acción para los radiosensibilizadores en el tratamiento de enfermedades.

Muchos protocolos de tratamiento de cáncer actualmente emplean radiosensibilizadores junto con radiación de rayos X. Los ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FudR), hidroxurea, cisplatino, y sus análogos y derivados terapéuticamente efectivos.

La terapia fotodinámica (PDT) de cánceres emplea luz visible como activador de radiación del agente sensibilizante. Los ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen los siguientes, pero no se limitan a: derivados de hematoporfirina, fotofrina, derivados de benzoporfirina, etioporfirina de estaño, feoborbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc, y sus análogos y derivados terapéuticamente efectivos.

Los radiosensibilizadores se pueden administrar junto con una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de otros compuestos, incluyendo, pero no se limitan a: compuestos que promueven la incorporación de radiosensibilizadores a las células diana; compuestos que controlan el flujo de sustancias terapéuticas, nutrientes, y/u oxígeno a las células diana; agentes quimioterapéuticos que actúan sobre el tumor con o sin radiación adicional; u otros compuestos terapéuticamente efectivos para tratar cáncer u otras enfermedades.

Los quimiosensibilizadores se pueden administrar junto con una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de otros compuestos, incluyendo, pero no se limitan a: compuestos que promueven la incorporación de quimiosensibilizadores a las células diana; compuestos que controlan el flujo de sustancias terapéuticas, nutrientes, y/u oxígeno a las células diana; agentes quimioterapéuticos que actúan sobre el tumor u otros compuestos terapéuticamente efectivos para tratar cáncer u otra enfermedad. Se halló que los antagonistas de calcio, por ejemplo verapamilo, son útiles en combinación con agentes antineoplásicos para establecer la quimiosensibilidad en células tumorales resistentes a agentes quimioterapéuticos aceptados y para potenciar la eficacia de dichos compuestos en neoplasias sensibles a los fármacos.

En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los componentes de las combinaciones de acuerdo con la invención, es decir, el uno o más de otros agentes medicinales y el compuesto de acuerdo con la presente invención se pueden formular en diversas formas farmacéuticas con fines de administración. Los componentes se pueden formular por separado en composiciones farmacéuticas individuales, o en una composición farmacéutica unitaria que contiene todos los componentes.

En consecuencia, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el uno o más de otro agente medicinal y el compuesto de acuerdo con la presente invención juntos con un portador farmacéutico.

La presente invención también se refiere al uso de una combinación de acuerdo con la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

5 La presente invención también se refiere a un producto que contiene como primer ingrediente activo un compuesto de acuerdo con la invención, y como otro ingrediente activo uno o más agentes anticancerosos, como preparación combinada para el uso simultáneo, separado o en secuencia en el tratamiento de pacientes que padecen cáncer.

10 Los uno o más de otros agentes medicinales y el compuesto de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en forma simultánea (por ejemplo en composiciones separadas o unitarias) o secuencialmente en cualquier orden. En el último caso, los dos o más compuestos se administrarán dentro de un período y en una cantidad y forma que es suficiente para asegurar que se logre un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el método y el orden de administración preferidos y las respectivas cantidades de dosis y regímenes para cada componente de la combinación dependerán del otro agente medicinal particular y el compuesto de la presente invención administrados, su vía de administración, el tumor particular tratado y el huésped particular tratado. El método y orden de administración óptimo y las cantidades y régimen de dosificación pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica mediante el uso de métodos convencionales y en vista de la información
15 expuesta en la presente.

20 La relación en peso del compuesto de acuerdo con la presente invención y los uno o más de otros agentes anticancerosos cuando se dan en combinación puede ser determinada por el experto en la técnica. Dichas relaciones y la dosis exacta y la frecuencia de administración dependen del compuesto particular de acuerdo con la invención y los demás agentes anticancerosos usados, la condición particular tratada, la gravedad de la condición tratada, la edad, el peso, el sexo, la dieta, el momento de administración y la condición física general del paciente particular, el modo de administración así como otra medicación que pueda tomar el individuo, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Además, es evidente que la cantidad diaria efectiva puede ser reducida o incrementada según la respuesta del sujeto tratado y/o según la evaluación del médico que prescribe los compuestos de la presente invención. Una relación en peso particular para el presente compuesto de la fórmula (I) y otro agente anticanceroso puede variar desde 1/10 hasta 10/1, más en particular desde 1/5 hasta 5/1, aún más en particular desde 1/3 hasta 3/1.
25

El compuesto de coordinación de platino se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 50 a 400 mg/m^2 , particularmente para cisplatino en una dosis de aproximadamente 75 mg/m^2 y para carboplatino en aproximadamente 300 mg/m^2 por curso de tratamiento.

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

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

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

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

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

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

55 El derivado antitumoral de antraciclina se administra ventajosamente en una dosis de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, por ejemplo 15 a 60 mg/m^2 , particularmente para doxorubicina en una dosis de aproximadamente 40 a 75 mg/m^2 , para daunorrubicina en una dosis de aproximadamente 25 a 45 mg/m^2 , y para idarrubicina en una dosis de aproximadamente 10 a 15 mg/m^2 por curso de tratamiento.

El agente antiestrógeno se administra ventajosamente en una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg diarios según el agente particular y la condición tratada. Tamoxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de 5 a 50 mg, con preferencia 10 a 20 mg dos veces por día, y continuando la terapia por tiempo suficiente para lograr y mantener un efecto terapéutico. Toremifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 60 mg una vez por día, continuando la terapia por tiempo suficiente para lograr y mantener un efecto terapéutico. Anastrozol se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 1 mg una vez por día. Droloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 20-100 mg una vez por día. Raloxifeno se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 60 mg una vez por día. Exemestano se administra ventajosamente por vía oral en una dosis de aproximadamente 25 mg una vez por día.

Los anticuerpos se administran ventajosamente en una dosis de aproximadamente 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, o tal como sea conocido en la técnica, si es diferente. Trastuzumab se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de superficie corporal, particularmente 2 a 4 mg/m^2 por curso de tratamiento.

Estas dosis se pueden administrar por ejemplo una, dos o más veces por curso de tratamiento, el cual se puede repetir, por ejemplo, cada 7, 14, 21 o 28 días.

Los compuestos de la fórmula (I), las sales de adición farmacéuticamente aceptables, en particular las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, y sus formas estereoisoméricas pueden tener propiedades de diagnóstico valiosas por cuanto se pueden usar para detectar o identificar la formación de un complejo entre un compuesto marcado y otras moléculas, péptidos, proteínas, enzimas o receptores.

Los métodos de detección o identificación pueden usar compuestos que se marcan con marcadores tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc. Los ejemplos de radioisótopos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C . Las enzimas usualmente se tornan detectables por conjugación de un sustrato apropiado, el cual a su vez cataliza una reacción detectable. Los ejemplos correspondientes incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malatodeshidrogenasa, con preferencia peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aecuatorina y luciferasa.

Las muestras biológicas se pueden definir como tejido corporal o fluidos corporales. Los ejemplos de fluidos corporales son fluido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero, orina, esputo, saliva y similares.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

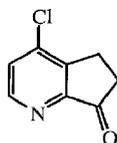
Parte experimental

Aquí en lo sucesivo, "DMF" se define como *N,N*-dimetilformamida, "DCM" se define como diclorometano, "DIPE" se define como éter diisopropílico, "DMSO" se define como dimetilsulfóxido, "EtOAc" se define como acetato de etilo, "EtOH" se define como etanol, "MeOH" se define como metanol y "THF" se define como tetrahidrofurano.

A. Preparación de los compuestos intermedios

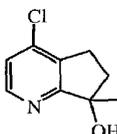
Ejemplo A1

a) Preparación del **intermedio 1**



Se añadió óxido de manganeso (33,31 g, 13 Eq., 0,3832 moles) en porciones a una disolución de 4-cloro-6,7-dihidro-5*H*-ciclopenta[b]piridin-7-ol (intermedio 3) [CAS 126053-15-4] (5 g, 1 Eq., 0,029 moles) en DCM (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y después se filtró sobre celita. El disolvente se evaporó, produciendo 3,25 g (66%) de **intermedio 1**.

b) Preparación del **intermedio 2**

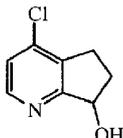


Se añadió gota a gota cloruro de metilmagnesio (1,47 ml, 3,2 Eq., 0,004 moles) a una disolución de **intermedio 1** (0,220 g, 1 Eq., 0,0013 moles) en THF (4 ml) a -5 hasta 0°C bajo un caudal de N₂. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas.

- 5 A 0-10°C, se añadieron cloruro de amonio (10% en agua) y EtOAc. La mezcla se extrajo tres veces con EtOAc, y después la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (0,215 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/EtOAc 50/50). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 0,120 g (50%) de **intermedio 2**.

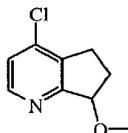
Ejemplo A2

a) Preparación del **intermedio 3**



- 10 Se añadió tetrahidrobórato de sodio (1,92 g, 50,67 mmoles) en porciones a 5°C a una disolución de **intermedio 1** (7,72 g, 46,06 mmoles) en MeOH (80 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 noche, y después se vertió en agua. La mezcla se extrajo tres veces con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y disolución de NaCl, se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó, produciendo 6,38 g (81,7%) de **intermedio 3** (mezcla 50/50 de RS). Este producto se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente.

b) Preparación del **intermedio 4**

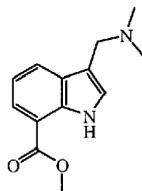


- 20 A 0°C y bajo una atmósfera de N₂, se añadió en porciones hidruro de sodio (1,06 g, 44,22 mmoles) a una disolución de **intermedio 3** (3,00 g, 17,70 mmoles) en THF (anhidro, 30 ml). La reacción se agitó durante 15 minutos a 0°C. Después, a 0°C, se añadió gota a gota yodometano (1,65 ml, 26,53 mmoles) a la mezcla. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 noche. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se añadió gota a gota agua fría. La mezcla se agitó durante 1 hora y después se extrajo con EtOAc tres veces. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó, produciendo 3,10 g (95,4%) de **intermedio 4**.

Este producto se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente.

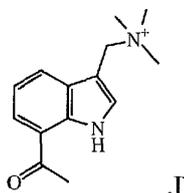
Ejemplo A3

a) Preparación del **intermedio 5**



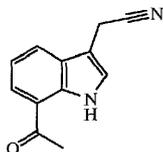
- 30 Se calentaron a 65°C durante 2 horas éster metílico del ácido 1H-indol-7-carboxílico (0,091 moles), sal de Eschenmoser (0,1 moles) en ácido acético (300 ml). El precipitado se separó por filtración, se disolvió en DCM y carbonato de potasio al 10%. Se añadió carbonato de potasio (sólido), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se extrajo. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó, produciendo 10 g de **intermedio 5**.

b) Preparación del **intermedio 6**



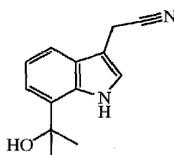
Se agitaron **intermedio 5** (0,043 moles), yodometano (0,047 moles) en EtOH (300 ml) a temperatura ambiente toda la noche. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 8,3 g de **intermedio 6**.

c) Preparación del **intermedio 7**



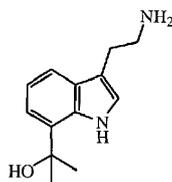
- 5 Se calentaron a 110°C durante 2 horas **intermedio 6** (0,023 moles), cianuro de sodio (0,03 moles) en DMF (100 ml). La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo, se agitó durante 1 hora. El precipitado se separó por filtración y se recogió en DCM. La disolución se extrajo, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, produciendo 5,1 g de **intermedio 7**.

d) Preparación del **intermedio 8**



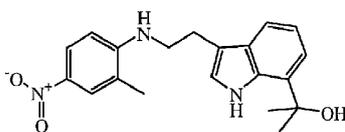
- 10 Se añadió gota a gota cloruro de metilmagnesio (0,058 moles) a una disolución de **intermedio 7** (0,018 moles) en THF (50 ml) a 5°C bajo un caudal de N₂. La mezcla de reacción se agitó a 5°C durante 1 hora. Se añadió gota a gota cloruro de amonio al 10% a 5°C. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, produciendo 4 g de **intermedio 8**.

15 e) Preparación del **intermedio 9**



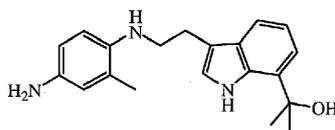
Se hidrogenaron **intermedio 8** (0,019 moles), níquel Raney (4 g) en MeOH/NH₃ (50 ml) a temperatura ambiente a 3 bares durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre celita, se lavó con DCM, y el filtrado se evaporó, produciendo 3,5 g de **intermedio 9**.

20 f) Preparación del **intermedio 10**



- 25 Una mezcla de **intermedio 9** (0,016 moles), 2-fluoro-5-nitrotolueno (0,018 moles), anión de carbonato monosódico (0,019 moles) en DMSO (100 ml) se calentó a 60°C toda la noche. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadió agua con hielo, se añadió DCM. La mezcla de reacción se extrajo, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/EtOAc 60/40). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 2,8 g de **intermedio 10**.

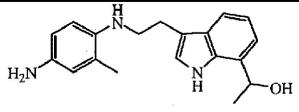
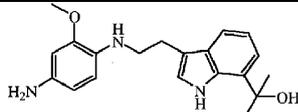
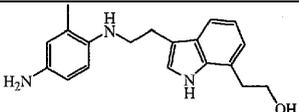
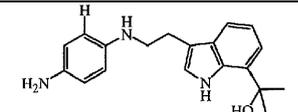
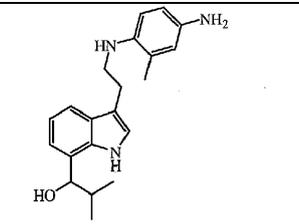
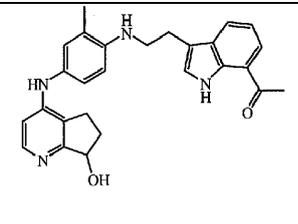
g) Preparación del **intermedio 11**



- 30 Se hidrogenaron **intermedio 10** (0,0079 moles), óxido de vanadio (0,05 g), disolución de tiofeno (4%) en DIPE (1 ml), Pt/C al 5% (1,3 g) en THF (50 ml) a presión atmosférica durante 1 noche a temperatura ambiente. La reacción

se filtró, y el disolvente se evaporó, produciendo **intermedio 11**. Este producto se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente.

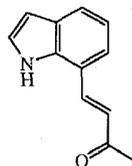
Los siguientes intermedios se obtuvieron según el método A3

	
intermedio n° 44	intermedio n° 45
	
intermedio n° 46	intermedio n° 47
	
intermedio n° 48	intermedio n° 49

5 Ejemplo A4

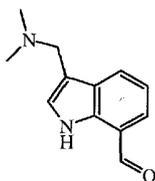
El intermedio 7 también se preparó de forma alternativa según lo siguiente

a) Preparación del **intermedio 12**



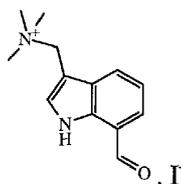
10 Se añadió 1-(trifenilfosforaniliden)-2-propanona (34,4 mmoles) en porciones a temperatura ambiente a una disolución de 1*H*-Indol-7-carboxaldehído (34,44 mmoles) en metilbenceno (60 ml). La mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 3 horas, y después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad. El residuo (17,4 g) se purificó mediante HPLC sobre sílice: 20-45 μm (450 g). (Eluyente DCM/MeOH 99,5/0,5). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 4,3 g de **intermedio 12**.

b) Preparación del **intermedio 13**



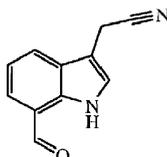
15 Se calentaron a 65°C durante 2 horas **intermedio 12** (3,4 mmoles) y sal de Eschenmoser (3,8 mmoles) en ácido acético (10 ml). El precipitado se separó por filtración, se disolvió en DCM y carbonato de potasio al 10%. Se añadió carbonato de potasio (sólido), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se extrajo, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 , se filtró, y el disolvente se evaporó, produciendo 0,7 g de **intermedio 13**.

c) Preparación del **intermedio 14**



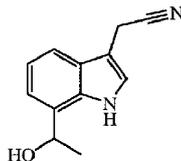
Se agitaron **intermedio 13** (0,13 moles), yodometano (0,14 ml) en EtOH (300 ml) a temperatura ambiente durante 2 días. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 47 g de **intermedio 14**.

d) Preparación del **intermedio 15**



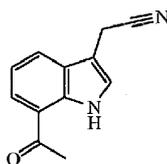
5 Se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas **intermedio 14** (136,5 mmoles), cianuro de sodio (177,5 mmoles) en DMF (400 ml). Se añadió agua, y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (SiOH irregular 20-45 μm 1000 g MATREX). Fase móvil: ciclohexano al 70%/EtOAc al 30%). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 11,8 g de **intermedio 15**.

e) Preparación del **intermedio 16**



15 Se añadió cloruro de metilmagnesio (0,07 moles) gota a gota a una disolución de **intermedio 15** (0,022 moles) en THF (50 ml). Se añadieron NH_4Cl al 10% y EtOAc. La mezcla de reacción se extrajo, la capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (2,9 g) se purificó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (SiOH irregular 20-45 μm 450 g MATREX). Fase móvil: ciclohexano al 60%/EtOAc al 40%). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 2 g de **intermedio 16**.

f) Preparación del **intermedio 7**

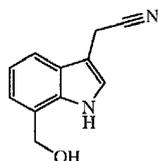


20 Se añadió peryodinato de Dess-Martin (24,9 ml) gota a gota a temperatura ambiente a una disolución de **intermedio 16** (10 mmoles) en DCM (20 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, después se vertió en agua con hielo, se filtró sobre celita, y el filtrado se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, y el disolvente se concentró. El residuo (2,8 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente ciclohexano/EtOAc 60/40). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 0,8 g de **intermedio 7**.

Ejemplo A5

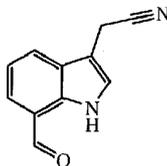
El intermedio 15 también se preparó de forma alternativa según lo siguiente.

a) Preparación del **intermedio 17**



Se añadió tetrahidroaluminato de litio (0,018 moles, 0,69 g) en porciones a una disolución de éster metílico del ácido 3-(cianometil)-1*H*-indol-7-carboxílico (0,012 moles, 2,6 g) en THF (50 ml) a 5°C, bajo un caudal de N₂. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió agua gota a gota a 5°C, y la mezcla de reacción se filtró sobre celita, se lavó con EtOAc y se extrajo. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró, produciendo 2,4 g de **intermedio 17**.

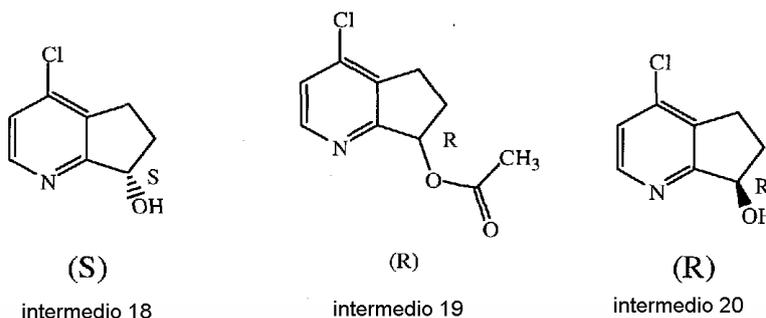
b) Preparación del **intermedio 15**



Se añadió peryodinato de Dess-Martin (0,016 moles) gota a gota a 5°C a una disolución de **intermedio 17** (0,0081 moles) en DCM (15 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre celita, el filtrado se evaporó. El residuo se purificó sobre gel de sílice mediante cromatografía en columna (eluyente ciclohexano/EtOAc 70/30). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 0,5 g de **intermedio 15**.

Ejemplo A6

Preparación de los **intermedios 18, 19 y 20**



Una mezcla de 4-cloro-6,7-dihidro-5*H*-ciclopenta[b]piridin-7-ol (5 g, 0,029 moles) y Lipase Candida Antartica B (2,5 g) en éster etenílico del ácido acético (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre Celita. La Celita se lavó con DCM. El disolvente del filtrado se evaporó. El residuo (6,3 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH desde 100/0 hasta 98/2; 15-40 μm). Se recogieron dos fracciones de producto diferentes, y el disolvente de cada fracción de producto se evaporó, produciendo 2,1 g de **intermedio 18** (42%; enantiómero **S**), y 3,6 g de **intermedio 19** (58%; enantiómero **R**). Cuando se desee, el **intermedio 19** se puede convertir en el enantiómero R del **intermedio 18** mediante reacción en MeOH/NH₃, produciendo **intermedio 20**.

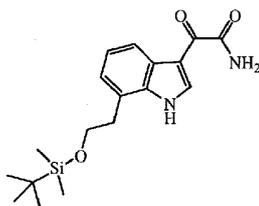
Como alternativa, los intermedios 18 y 20 también se prepararon según lo siguiente.

Se añadió tetrahidroborato de sodio (1,37 g, 36,10 mmoles) en porciones a 5°C a una disolución de **intermedio 1** (5,50 g, 32,82 mmoles) en MeOH (50 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 noche y después se vertió en agua, y la mezcla se extrajo tres veces mediante EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y disolución de NaCl en agua, se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (4,42 g) se purificó mediante cromatografía de fluidos supercríticos quiral sobre CHIRALPAK AD-H 5 μm 250 x 20 mm. Fase móvil: 85% de CO₂, 15% de MeOH.

Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 1,625 g (29,2%) de **compuesto 18** (enantiómero **S**) (DMF, 20°C, concentración 0,33% p/v, 589 nm: -77,58°) y 1,620 g (29,1%) de **compuesto 20** (enantiómero **R**) (DMF, 20°C, concentración 0,33% p/v, 589 nm: +76,74°).

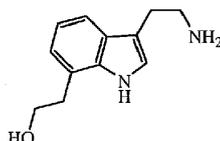
Ejemplo A7

Preparación del **intermedio 21**



- 5 Se añadió cloruro de oxalilo (0,0079 moles) gota a gota a 7-[2-[[[1,1-dimeteil]dimetilsilil]oxi]etil]-1*H*-indol (0,0047 moles) en éter dietílico (20 ml) a 5°C. La mezcla de reacción se agitó a 5°C durante 2 horas. Se añadió gota a gota NH₄OH (concentrado, 20 ml) a la disolución a 5°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se añadieron agua y EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró, produciendo 1,8 g de **intermedio 21**.

Preparación del **intermedio 22**

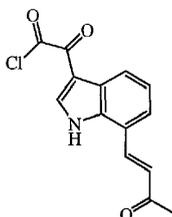


- 10 Se añadió tetrahidroaluminato de litio (0,021 moles) en porciones a una disolución de **intermedio 21** (0,0052 moles) en THF (50 ml) a 5°C.

La mezcla se agitó a reflujo toda la noche, después se enfrió a 5°C sobre un baño de hielo. El exceso de tetrahidroaluminato de litio se hidrolizó con precaución añadiendo agua gota a gota. La mezcla se separó por filtración sobre celita, se lavó con DCM y se extrajo. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró, produciendo 0,6 g de **intermedio 22**.

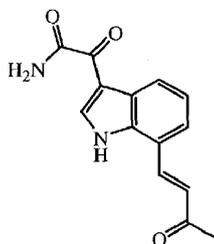
15 **Ejemplo A8**

a) Preparación del **intermedio 23**



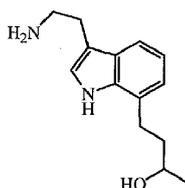
- 20 Se añadió cloruro de oxalilo (2,9 mmoles) gota a gota a 5°C a una disolución de 4-(1*H*-indol-7-il)-3-buten-2-ona (2,7 mmoles) en éter dietílico (10 ml). El baño frío se retiró, y la reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente (1,5 horas). El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 0,49 g de **intermedio 23**.

b) Preparación del **intermedio 24**



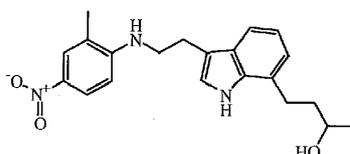
- 25 Se añadió gota a gota hidróxido de amonio (10 ml) a una disolución de **intermedio 23** (0,725 mmoles) en éter dietílico (10 ml) a 5°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 0,11 g de **intermedio 24**.

c) Preparación del **intermedio 25**



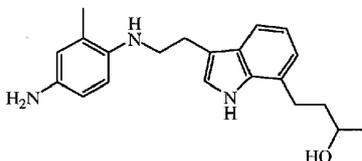
Se añadió en porciones tetrahidroaluminato de litio (39,5 mmoles) a una disolución de **intermedio 24** (7,9 mmoles) en THF (20 ml) a 5°C. La mezcla se agitó a 80°C durante 2 horas, después se enfrió a 5°C sobre un baño de hielo. El exceso de tetrahidroaluminato de litio se hidrolizó con precaución añadiendo agua gota a gota. La mezcla se separó por filtración sobre celita, se lavó con DCM y se extrajo. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró, produciendo 1 g de **intermedio 25**.

d) Preparación del **intermedio 26**



Una mezcla de **intermedio 25** (4,3 mmoles), 2-fluoro-5-nitrotolueno (4,7 mmoles), anión de carbonato monosódico (5,1 mmoles) en DMSO (10 ml) se calentó a 60°C toda la noche. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadió agua con hielo, se añadió DCM. La mezcla de reacción se extrajo, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: DCM/MeOH 97/3). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (SiOH irregular 15-40 µm 300 g MERCK). Fase móvil (NH₄OH al 0,1%-diclorometano al 99%-MeOH al 1%). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 200 mg de **intermedio 26**.

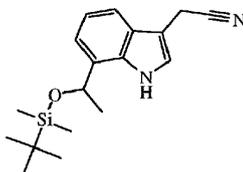
e) Preparación del **intermedio 27**



Una mezcla de **intermedio 26** (0,35 mmoles), níquel Raney (200 mg) en MeOH (5 ml) se hidrogenó a presión atmosférica a temperatura ambiente. El residuo se filtró sobre celita, se lavó con DCM, y el residuo se evaporó, produciendo 0,14 g de **intermedio 27**.

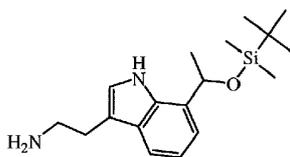
Ejemplo A9

a) Preparación del **intermedio 28**



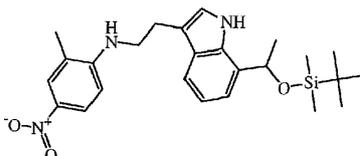
Se añadió cloruro de terc-butildimetilsililo (195 mg, 0,91 mmoles) a una disolución de **intermedio 16** (162 mg, 0,81 mmoles), imidazol (143 mg, 2,1 mmoles) en THF (5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El precipitado se separó por filtración y se lavó con DCM. El filtrado se evaporó. El residuo (365 mg) se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (15-40 µm, 30 g, DCM/MeOH: 100/0 hasta 99/1). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron hasta sequedad, produciendo 190 mg de **intermedio 28**.

b) Preparación del **intermedio 29**



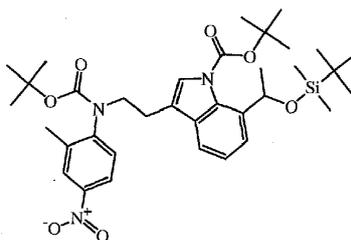
Se agitaron **Intermedio 28** (190 mg, 0,6 mmoles), níquel Raney (0,7 g) en NH_3 en MeOH 7N (10 ml) a temperatura ambiente a 3 bares de H_2 durante 4 horas. La reacción se filtró sobre celita, y la celita se lavó con DCM/MeOH (90/10) tres veces. El disolvente se evaporó para dar 147 mg de **intermedio 29**.

5 c) Preparación del **intermedio 30**



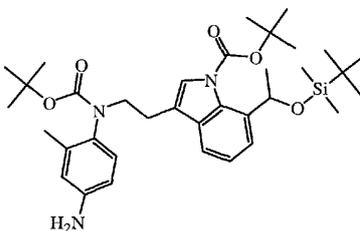
10 Una mezcla de **intermedio 29** (147 mg, 0,46 mmoles), 1-fluoro-2-metil-4-nitro-benceno (78 mg, 0,51 mmoles), sal sódica del ácido carbónico (1:1) (85 mg, 1 mmol) en DMSO (2 ml) se calentó a 65°C durante 1 noche. La mezcla se vertió en hielo y se agitó 10 minutos, se añadió DCM, y la mezcla se extrajo con DCM dos veces. La capa orgánica se lavó con agua, después se secó sobre MgSO_4 , se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice gel (15-40 μm , 30 g, ciclohexano/EtOAc 85/15). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron hasta sequedad, produciendo 200 mg de **intermedio 30**.

d) Preparación del **intermedio 31**



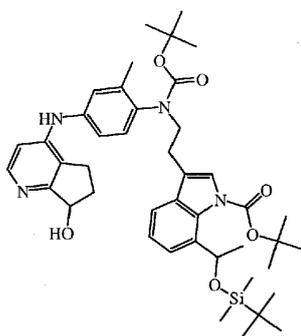
15 Se agitaron durante 24 horas a 60°C **intermedio 30** (2,8 g, 6,17 mmoles), dicarbonato de di-terc-butilo (8 g, 37 mmoles), 4-dimetilaminopiridina (0,15 g, 1,2 mmoles) y trietilamina (1,89 ml, 13,6 mmoles) en THF (50 ml). La mezcla se evaporó hasta sequedad. El residuo (7,4 g) se purificó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones sobre gel de sílice (Cartucho 15-40 μm , 90 g). Fase móvil (ciclohexano al 50%; diclorometano al 50%). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 3,3 g de **intermedio 31**.

20 e) Preparación del **intermedio 32**



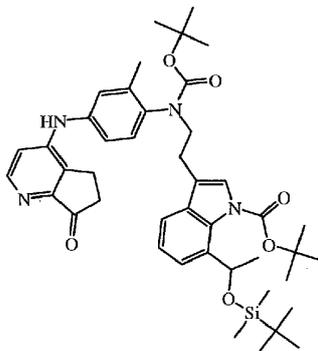
Una mezcla de **intermedio 31** (3,3 g, 5 mmoles), níquel Raney (3 g) en MeOH (100 ml) se hidrogenó a 2,5 bares durante 2 horas. El residuo se filtró sobre celita, se lavó con DCM, y el residuo se evaporó, produciendo 2,7 g de **intermedio 32**.

25 f) Preparación del **intermedio 33**



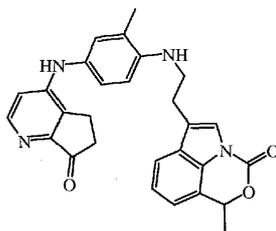
- 5 Se calentaron a 65°C durante 72 horas **intermedio 32** (2,6 g, 4,2 mmoles), 4-cloro-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]piridin-7-ol (0,78 g, 4,6 mmoles), HCl 4M en dioxano (0,21 ml, 0,8 mmoles) en acetonitrilo (28 ml) y EtOH (7 ml). Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadieron agua y carbonato de potasio en polvo, y la mezcla se extrajo dos veces con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (SiOH irregular 20-45 μm 450 g MATREX). Fase móvil (NH₄OH al 0,5%; diclorometano al 95%; MeOH al 5%). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 2,35 g de **intermedio 33**.

g) Preparación del **intermedio 34**



- 10 Se añadió óxido de manganeso (IV) (4,3 g) en porciones a **intermedio 33** (2,2 g, 2,9 mmoles) y tris(2-(2-metoxietoxi)etil)amina (47 mg, 0,145 mmoles) en disolución, a temperatura ambiente, en DCM (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se filtró sobre celita. La celita se lavó con DCM, y el disolvente se evaporó, produciendo 1,84 g de **intermedio 34**.

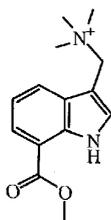
15 h) Preparación del **intermedio 35**



- 20 Se agitaron a temperatura ambiente durante 2 días **intermedio 34** (1,2 g, 1,6 mmoles) en ácido trifluoroacético (1,2 ml), 15,9 mmoles) y DCM (10 ml). Se añadió carbonato de potasio al 10%, y la mezcla se extrajo dos veces con DCM. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para dar 0,8 g de **intermedio 35**, que se usó sin purificación adicional para la etapa siguiente.

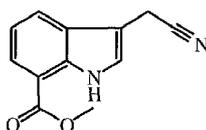
Ejemplo A10

a) Preparación del **intermedio 36**



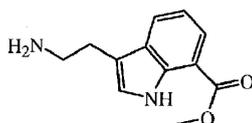
Se añadió yodometano (0,024 moles) a una disolución de éster metílico del ácido 3-[(dimetilamino)metil]-1*H*-indol-7-carboxílico (0,022 moles) en EtOH (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche, después se concentró a vacío hasta sequedad, produciendo 5,6 g (68%) de **intermedio 36**.

5 b) Preparación del **intermedio 37**



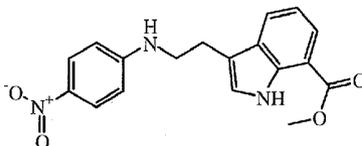
Una mezcla de **intermedio 36** (0,015 moles) y cianuro de sodio (0,019 moles) en DMF (60 ml) se agitó a 100°C durante 2 horas. Se añadió agua. El precipitado se filtró. El filtrado se evaporó, produciendo 3,5 g (100%) de **intermedio 37**.

10 c) Preparación del **intermedio 38**



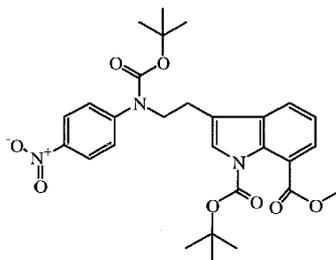
Una mezcla de **intermedio 37** (0,016 moles) y níquel Raney (3 g) en MeOH/NH₃ (50 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente bajo una presión de 3 bares, después se filtró sobre celita. El filtrado se evaporó, produciendo 3,2 g (89%) de **intermedio 38**.

15 d) Preparación del **intermedio 39**

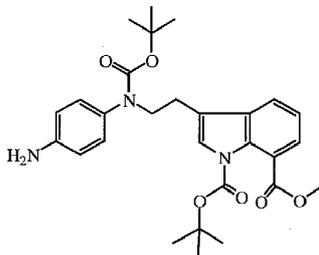


Una mezcla de **intermedio 38** (0,0092 moles), 1-fluoro-4-nitro-benceno (0,01 moles) y diisopropiletilamina (0,023 moles) se agitó a 180°C durante 2 horas. Se añadió agua. La mezcla se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (2,6 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre kromasil (eluyente: ciclohexano/EtOAc 60/40). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 1,4 g (45%) de **intermedio 39**.

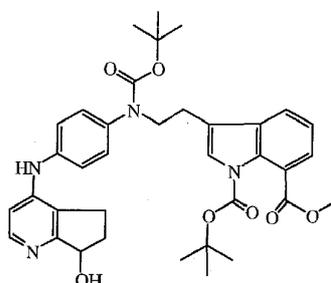
e) Preparación del **intermedio 40**



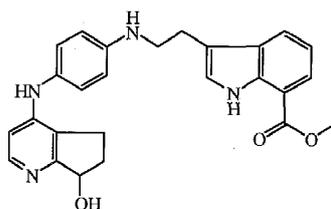
Se añadió anhídrido de terc-butoxicarbonilo (0,015 moles) a temperatura ambiente a una mezcla de **intermedio 39** (0,05 moles) y 4-(dimetilamino)piridina (una cantidad pequeña) en THF (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, se secó (MgSO₄), se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (4 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/EtOAc 60/40). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 3,3 g (82%) de **intermedio 40**.

f) Preparación del **intermedio 41**

5 Una mezcla de **intermedio 40** (0,0061 moles) y níquel Raney (3,3 g) en MeOH (50 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente bajo una presión de 3 bares, después se filtró sobre celita. La celita se lavó con DCM/MeOH (98/2). El filtrado se evaporó. El residuo (2,8 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano/EtOAc 70/30). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 1,3 g (42%) de **intermedio 41**.

g) Preparación del **intermedio 42**

10 Una mezcla de **intermedio 41** (0,0018 moles), 4-cloro-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]piridin-7-ol (0,33 g) y HCl/isopropanol (5 gotas) en acetonitrilo (20 ml) se agitó a 65°C durante 24 horas. Se añadió carbonato de potasio al 10%. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (1,1 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,1). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 0,054 g de **intermedio 42**.

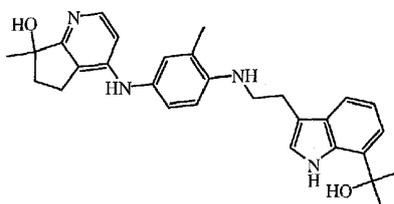
h) Preparación del **intermedio 43**

20 Una mezcla de **intermedio 42** (0,0009 moles) y HCl 3N (0,0039 moles) en acetonitrilo (10 ml) se agitó a 65°C durante 3 horas. Se añadió carbonato de potasio 10%. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (0,4 g, 100%) se cristalizó en éter dietílico/acetonitrilo. El precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 0,3 g de **intermedio 43**, punto de fusión 164°C.

B. Preparación de los compuestos finales

Ejemplo B1

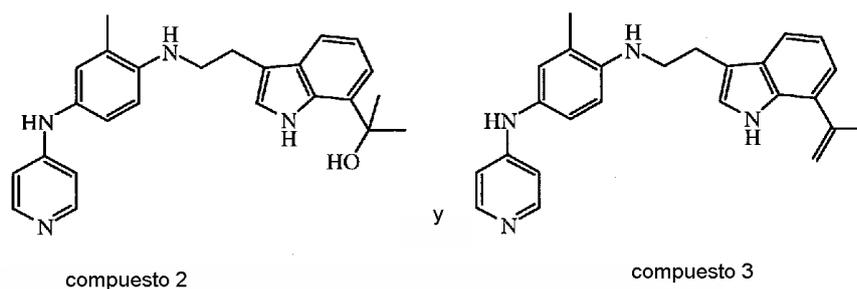
25 Preparación del **compuesto 1**



Se agitaron durante 5 horas a 65°C **intermedio 11** (1,00 g, 3,092 mmoles), **intermedio 2** (0,437 g, 2,381 mmoles), HCl (0,155 ml, 0,618 mmoles) en acetonitrilo (10 ml). La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después se basificó mediante carbonato de potasio (10% en agua) y se extrajo con DCM tres veces. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (1,37 g) se purificó mediante fase normal sobre sílice 5 μm 150 x 30,0 mm). Fase móvil (gradiente desde 0% de NH₄OH, 100% de DCM, 0% de MeOH hasta 0,8% de NH₄OH, 92% de DCM, 8% de MeOH) Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó. El residuo (0,350 g) se recogió en acetonitrilo durante 1 semana a temperatura ambiente. Este producto se cristalizó y se filtró y se secó a vacío, produciendo 300 mg (20,8%) de **compuesto 1**, punto de fusión 209°C.

10 Ejemplo B2

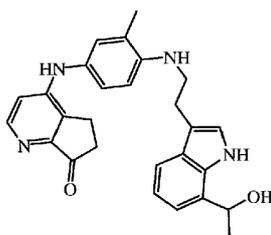
Preparación de los **compuestos 2 y 3**



Una disolución de **intermedio 11** (0,0031 moles), *N,N*-diisopropiletilamina (0,0028 moles), hidrocloreto de 4-bromopiridina (0,0034 moles) en acetonitrilo (20 ml) se calentó a 65°C durante 6 horas. Se añadieron carbonato de potasio 10% y EtOAc. La mezcla de reacción se extrajo, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo (1,3 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0,5). Se recogieron dos fracciones, y el disolvente se evaporó para dar 60 mg de **compuesto 3** y 80 mg de F2. El residuo F2 (80 mg) se purificó mediante cromatografía de fluidos supercríticos (columna AMINO 150 x 21,2 mm) eluyente: MeOH/CO₂ 30/70). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 43 mg de **compuesto 2**.

Ejemplo B3

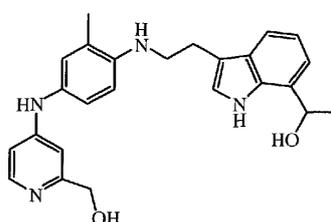
Preparación del **compuesto 4**



Se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos **intermedio 35** (0,8 g, 1,7 mmoles) e hidróxido de sodio 3N (2,57 ml, 2,57 mmoles) en EtOH (22 ml) y THF (10 ml). Se añadieron NH₄Cl al 10% y DCM, y la mezcla se filtró sobre Celita. La capa orgánica se decantó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante fase normal sobre SiOH esférica 10 μm 60 g PharmPrep MERCK). Fase móvil (NH₄OH al 0,1%, 95% de DCM, 5% de MeOH). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 250 mg de **compuesto 4**.

30 Ejemplo B4

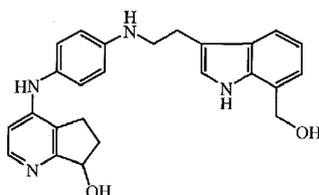
Preparación del **compuesto 5**



Se añadió tetrahidrobórato de sodio (0,69 mmoles) a una disolución de **intermedio 49** (0,46 mmoles) en MeOH (5 ml) a 5°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se añadió agua, la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo (0,14 g) se cristalizó en acetonitrilo, el precipitado se separó por filtración y se secó, produciendo 0,1 g de **compuesto 5**.

Ejemplo B5

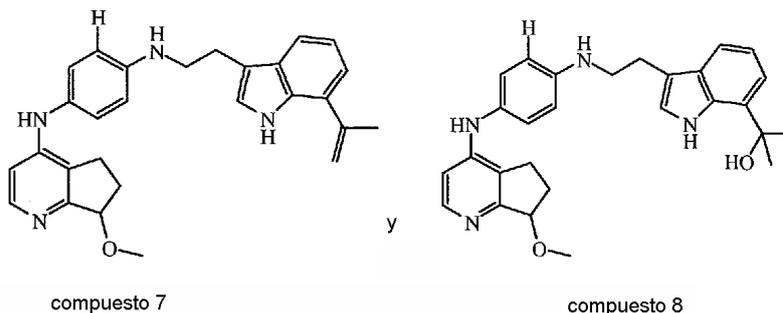
Preparación del **compuesto 6**



Se añadió tetrahidroaluminato de litio (0,0003 moles) en porciones a 5°C a una disolución de **intermedio 43** (0,0002 moles) en THF (4 ml) bajo un caudal de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo (0,18 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre kromasil (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 98/2/0,2 hasta 85/15/1; 3,5 µm). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 0,066 g (70%) de **compuesto 6**.

Ejemplo B6

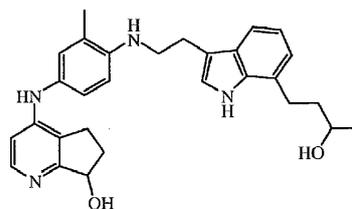
Preparación de los **compuestos 7 y 8**



Se agitaron durante 1 noche a 70°C **intermedio 47** (1,00 g, 3,23 mmoles), **intermedio 4** (0,653 g, 3,55 mmoles), HCl/dioxano (0,242 ml, 0,97 mmoles) en acetonitrilo (15 ml). La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadieron agua y después carbonato de potasio (10% en agua). La mezcla se extrajo tres veces con DCM. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante fase normal sobre gel de sílice (Cartridge 15-40 µm 30 g). Fase móvil (96% de DCM, 4% de MeOH). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 0,092 g (6,5%) de **compuesto 7** y 0,030 g de (2,0%) de **compuesto 8**.

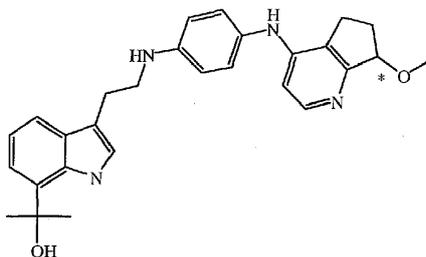
Ejemplo B7

Preparación del **compuesto 9**



Se calentaron a 125°C durante 2 horas **intermedio 27** (0,41 mmoles) y 4-cloro-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]piridin-7-ol (0,46 mmoles). El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente DCM/MeOH/NH₄OH 90/10/0,1). Las fracciones puras se recogieron, y el disolvente se evaporó, produciendo 58 mg de **compuesto 9**.

Ejemplo B8

Preparación de los **compuestos 24 y 25**

Co. n° 24: *S

Co. n° 25: *R

- 5 * significa esteoquímica relativa (la esteoquímica absoluta no se conoce). De esta forma, si el compuesto 24 es el enantiómero S, entonces el compuesto 25 es el enantiómero R, o si el compuesto 24 es el enantiómero R, entonces el compuesto 25 es el enantiómero S

La reacción se llevó a cabo bajo una atmósfera de N₂.

- 10 Una mezcla de **intermedio 47** (11,31 mmoles), intermedio 4 (12,44 mmoles), Pd(dba)₂ (1,13 mmoles) y BINAP (1,13 mmoles) y tBuONa (22,62 mmoles) en tolueno (100 ml) se agitó a reflujo toda la noche. La mezcla se filtró, se lavó con MeOH y se purificó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (columna Synergi 50 * 250 mm, 10 μm; eluyente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético al 0,1%), gradiente de CH₃CN al 15% durante un tiempo de 0 min. hasta CH₃CN al 40% durante un tiempo de 25 min.). La fracción deseada se recogió, y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se extrajo con DCM, se lavó con NaHCO₃ acuoso, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para dar **compuesto 8** (3,8 g, 98% de pureza, 65% de rendimiento), que se separó mediante cromatografía de fluidos supercríticos Chiralcel OJ, 20 μm, 250 mm * 20 mm; CO₂ supercrítico: isopropanol (0,05% de dietilamina), 40:60 v/v, 70 ml/min.) para dar dos fracciones; 1000,79 mg (19%) de **compuesto 24**, punto de fusión 110,5-111,6°C.

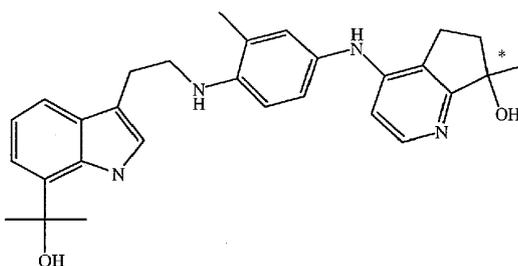
(%ee = 99%, [α]_D²⁰ = + 5,034°, (longitud de onda = 589, 20°C en metanol, concentración 10,33 mg/ml)

y 939,19 mg (18%) de **compuesto 25**, punto de fusión 111,4-113,3°C.

- 20 (%ee = 99%, [α]_D²⁰ = -3,443°, (longitud de onda = 589, 20°C en MeOH, concentración 10,74 mg/ml).

Ejemplo B9

Preparación de compuestos



Co. n° 26: *S

Co. n° 27: *R

- 25 * significa esteoquímica relativa (la esteoquímica absoluta no se conoce). De esta forma, si el compuesto 26 es el enantiómero S, entonces el compuesto 27 es el enantiómero R, o si el compuesto 26 es el enantiómero R, entonces el compuesto 27 es el enantiómero S

La reacción se llevó a cabo bajo una atmósfera de N₂.

- 30 Una mezcla de **intermedio 11** (9,25 mmoles), intermedio 2 (9,25 mmoles), tBuONa (18,5 mmoles), Pd(dba)₂ (0,93 mmoles) y BINAP (0,93 mmoles) en tolueno (40 ml) se calentó hasta reflujo, y se agitó durante 3 horas. La mezcla resultante se enfrió hasta la temperatura ambiente y se filtró. La filtración se evaporó a vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (columna Synergi 50 * 250 mm, 10 μm; eluyente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético al 0,1%) gradiente de CH₃CN al 10% durante un tiempo de 0 min. hasta CH₃CN al 40% durante un tiempo de 25 min.). Las fracciones deseadas se recogieron y se ajustaron a pH>7. El disolvente se

concentró y se extrajo con acetato de etilo (3 veces 100 ml) y las capas orgánicas deseadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el disolvente se evaporó a vacío para dar 2,5 g (57%) de compuesto 1, que se separó mediante cromatografía de fluidos supercríticos (AD 250mm * 20 mm, 20 μm; CO₂ supercrítico: isopropanol (0,05% de dietilamina) 40:60, v/v, 70 ml/min.), para dar 2 fracciones.

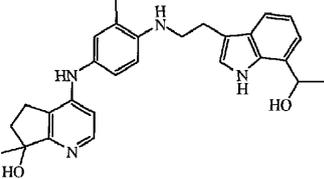
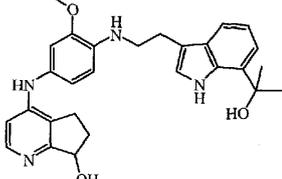
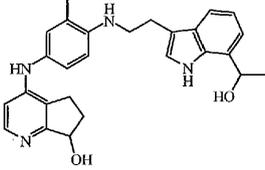
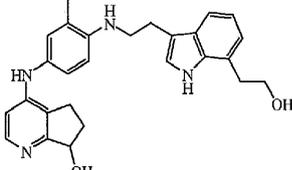
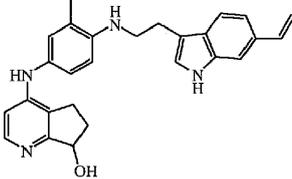
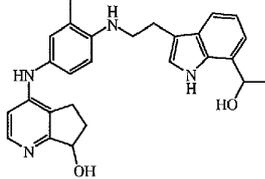
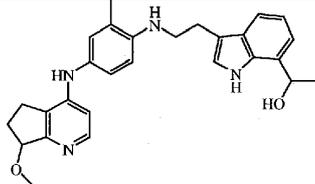
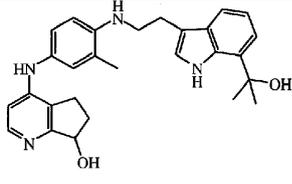
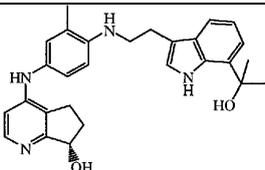
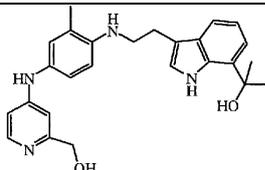
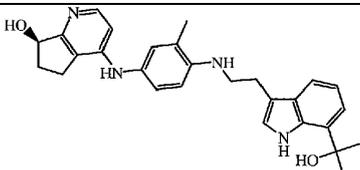
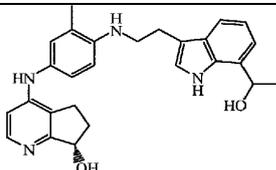
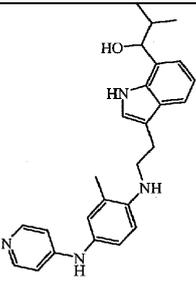
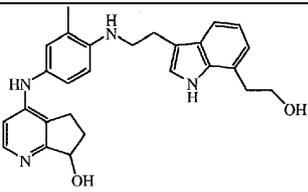
- 5 La fracción 1 (1 g) se purificó adicionalmente mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (columna Synergi 50 * 250 mm, 10 μm; eluyente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético al 0,1%) gradiente de CH₃CN al 10% durante un tiempo de 0 min. hasta CH₃CN al 40% durante un tiempo de 25 min.) para dar 0,88 g (20%) **compuesto n° 26**, punto de fusión 122,3-124°C, (ee = 100%).

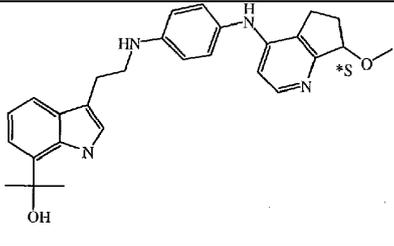
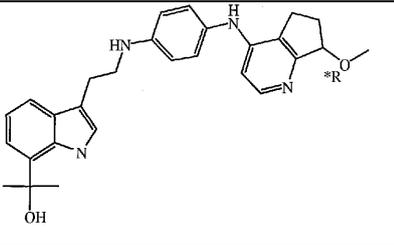
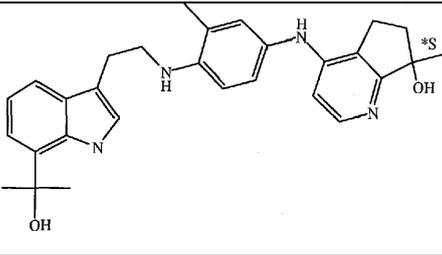
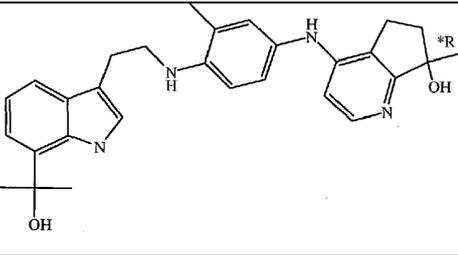
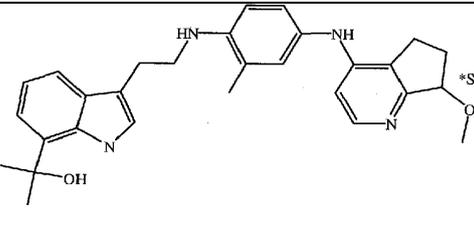
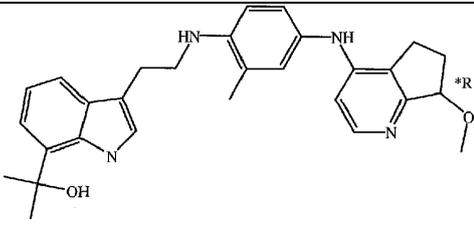
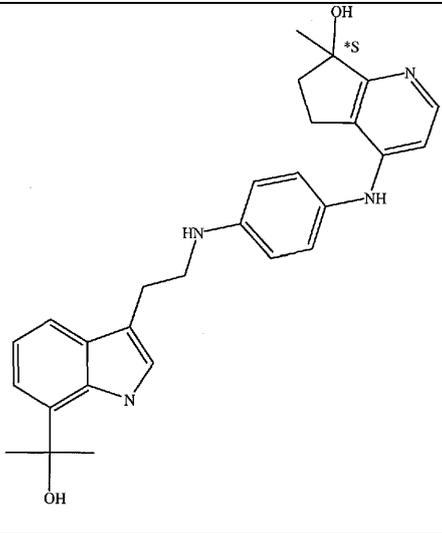
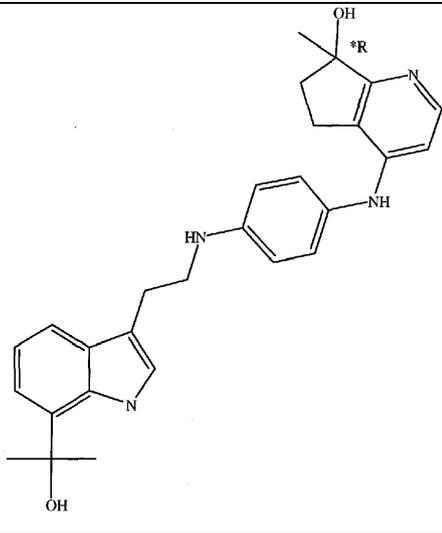
- 10 La fracción 2 (1 g) se purificó adicionalmente mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (columna Synergi 50 * 250mm, 10 μm; eluyente: CH₃CN/H₂O (ácido trifluoroacético al 0,1%) gradiente de CH₃CN al 10% durante un tiempo de 0 min. hasta CH₃CN al 40% durante un tiempo de 25 min.) para dar 0,96 g (22%) de **compuesto 27**, punto de fusión 121,4-122,6°C, (ee = 99%).

La Tabla 1 enumera los compuestos que se prepararon según uno de los Ejemplos anteriores.

Tabla 1

Comp. n° 1; Ej. [B1];	Comp. n° 2; Ej. [B2];
Comp. n° 3; Ej. [B2];	Comp. n° 4; Ej. [B3];
Comp. n° 5; Ej. [B4];	Comp. n° 6; Ej. [B5];
Comp. n° 7; Ej. [B6];	Comp. n° 8; Ej. [B6];
Comp. n° 9; Ej. [B7];	

 <p>Comp. n° 10; Ej. [B1];</p>	 <p>Comp. n° 11; Ej. [B1];</p>
 <p>Comp. n° 12; Ej. [B1];</p>	 <p>Comp. n° 13; Ej. [B1];</p>
 <p>Comp. n° 14; Ej. [B1];</p>	 <p>Comp. n° 15; Ej. [B1];</p>
 <p>Comp. n° 16; Ej. [B1];</p>	 <p>Comp. n° 17; Ej. [B1];</p>
 <p>Comp. n° 18; Ej. [B1];</p>	 <p>Comp. n° 19; Ej. [B1];</p>
 <p>Comp. n° 20; Ej. [B1];</p>	 <p>Comp. n° 21; Ej. [B1];</p>
 <p>Comp. n° 22; Ej. [B2];</p>	 <p>Comp. n° 23; Ej. [B1];</p>

	
<p>Comp. nº 24; Ej. [B8]</p>	<p>Comp. nº 25; Ej. [B8]</p>
	
<p>Comp. nº 26; Ej. [B9]</p>	<p>Comp. nº 27; Ej. [B9]</p>
	
<p>Comp. nº 28; Ej. [B8,9]</p>	<p>Comp. nº 29; Ej. [B8,9]</p>
	
<p>Comp. nº 30; Ej. [B8,9]</p>	<p>Comp. nº 31; Ej. [B8,9]</p>
<p>* significa estereoquímica relativa</p>	

Caracterización de compuestos

Puntos de fusión:

5 Los valores son valores pico o intervalos de fusión, y se obtuvieron con incertidumbres experimentales comúnmente asociadas con este método analítico.

Kofler

Para el compuesto 4, el punto de fusión se obtuvo con un banco caliente de Kofler, que consiste en una placa caliente con gradiente lineal de temperatura, un puntero deslizante y una escala de temperatura en grados Celsius.

WRS-2A

5 Para el compuesto 11, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, el punto de fusión se determinó con un aparato de punto de fusión WRS-2A adquirido de Shanghai Precision and Scientific Instrument Co. Ltd. El punto de fusión se midió con una velocidad de calentamiento lineal de 0,2-5,0°C/minuto. El valor informado es un intervalo de fusión. La temperatura máxima fue 300°C.

DSC

10 Para el compuesto 1, el punto de fusión se determinó con DSC (calorimetría diferencial de barrido). El punto de fusión se midió con un gradiente de temperatura de 10°C/minuto. La temperatura máxima fue 350°C. Los valores son valores pico.

LCMS

Para la caracterización por LCMS de los compuestos de la presente invención, se usaron los siguientes procedimientos.

15 Procedimiento general A

20 La medida por HPLC se efectuó mediante el uso de un sistema Alliance HT 2795 (Waters) que comprende una bomba cuaternaria con desgasificador, un automuestreador, un detector de matriz de diodos (DAD) y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos más adelante, la columna se mantiene a una temperatura de 30°C. El flujo desde la columna se dividió a un espectrómetro de MS. El detector de MS fue configurado con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja capilar fue de 3 kV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 100°C en el LCT (espectrómetro de masas Zspray™ de tiempo de vuelo de Waters. Se usó nitrógeno como gas nebulizador. La adquisición de datos se efectuó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Procedimiento general B

25 La medida de LC se efectuó mediante el uso de un sistema UPLC (cromatografía de líquidos de ultrarrendimiento) Acquity (Waters) que comprende una bomba binaria con desgasificador, un automuestreador, un detector de matriz de diodos (DAD) y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos más adelante, la columna se mantiene a una temperatura de 40°C. El flujo desde la columna se llevó a un espectrómetro de MS. El detector de MS fue configurado con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja capilar era de 3 kV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 130°C en el Quattro (espectrómetro de masa de triple cuadrupolo de Waters). Se usó nitrógeno como gas nebulizador. La adquisición de datos se efectuó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Procedimiento general C

35 La medida por HPLC se efectuó mediante el uso de un módulo Agilent 1100 que comprende una bomba, un detector de matriz de diodos (DAD) (longitud de onda usada 220 nm), un calentador de columna y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos más adelante. El flujo desde la columna se dividió a un Agilent MSD Series G1946C y G1956A. El detector de MS fue configurado con API-ES (ionización por electropulverización a presión atmosférica). Los espectros de masas se adquirieron por barrido de 100 a 1000. El voltaje de la aguja capilar fue 2500 V para el modo de ionización positivo y 3000 V para el modo de ionización negativo. El voltaje de fragmentación fue 50 V. La temperatura del gas secante se mantuvo a 350°C con un caudal de 10 l/min.

Método 1

45 Además del procedimiento general A: Se efectuó HPLC de fase inversa en una columna Xterra-MS C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm) con un caudal de 1,0 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: 100% de 7 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 100% de acetonitrilo) para llevar a cabo una condición de gradiente desde 85% de A, 15% de B (mantener durante 3 minutos) hasta 20% de A, 80% de B en 5 minutos, mantener a 20% de A y 80% de B durante 6 minutos y reequilibrar con las condiciones iniciales durante 3 minutos. Se usó un volumen de inyección de 20 µl. El voltaje del cono fue 20 V para el modo de ionización positivo y 20 V para el modo de ionización negativo. Los espectros de masas se adquirieron por barrido desde 100 hasta 900 en 0,8 segundos usando un retraso entre barridos de 0,08 segundos.

50 Método 2

Además del procedimiento general B: Se efectuó UPLC de fase inversa en una columna Waters Acquity BEH (híbrido de sílice con etilsiloxano en puente) C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) con un caudal de 0,35 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: 95% de 7 mM de acetato de amonio/5% de acetonitrilo; fase móvil B:

100% de acetonitrilo) para llevar a cabo una condición de gradiente desde 90% de A y 10% de B (mantener durante 0,5 minutos) hasta 8% de A y 92% de B en 3,5 minutos, mantener durante 2 min. y volver a las condiciones iniciales en 0,5 min., mantener durante 1,5 minutos. Se usó un volumen de inyección de 2 µl. El voltaje del cono fue 20 V para el modo de ionización positivo y para el negativo. Los espectros de masas se adquirieron por barrido desde 100 hasta 1000 en 0,2 segundos usando un retraso entre barridos de 0,1 segundos.

Método 3

Además del procedimiento general C: Se efectuó HPLC de fase inversa en una columna YMC-Pack ODS-AQ, 50 x 2,0 mm 5 µm con un caudal de 0,8 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: agua con 0,1% de TFA; fase móvil B: acetonitrilo con 0,05% de TFA). En primer lugar, se mantuvo 90% de A y 10% de B durante 0,8 minutos. Luego se aplicó un gradiente hasta 20% de A y 80% de B en 3,7 minutos y se mantuvo durante 3 minutos. Se usaron volúmenes típicos de inyección de 2 µl. La temperatura de la estufa fue 50°C (polaridad de MS: positiva)

Tabla 2: Datos de LCMS y puntos de fusión (tiempo de retención: R_t en minutos), pico de (MH)⁺, el procedimiento de LCMS se refiere al método usado para LCMS.

Comp. nº	LCMS			Puntos de fusión
	R _t	(MH) ⁺	Procedimiento	
1	3,39	471	2	209°C
2	3,35	401	2	
4	3,19	441	2	121°C
5	2,97	417	2	
6	7,47	415	1	
7	3,94	439	2	
8	3,45	457	2	
9	8,51	471	1	
10	3,05	457	2	
11	3,01	473	3	221,0-222,5°C
12	3,07	443	2	
13	3,00	443	2	
14	3,49	425	2	
15	8,22	443	1	
16	3,34	457	2	
17	3,32	457	2	
18	8,68	457	1	
20	8,62	457	1	
21	8,2	443	1	
22	8,95	415	1	
23	2,93	443	3	
24				110,5-111,6°C
25				111,4-113,3°C
26				122,3-124°C

Comp. n°	LCMS			Puntos de fusión
	R _t	(MH) ⁺	Procedimiento	
27				121,4-122,6°C
28				98,3-100°C
29				96,8-99°C
30				111,5-112,3°C
31				112,7-113,6°C

Rotación óptica

5 La rotación óptica se midió mediante el uso de un polarímetro. $[\alpha]_D^{20}$ indica la rotación óptica medida con luz a la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C. La longitud de recorrido de celda es 1 dm. Detrás del valor real, se mencionan la concentración y el disolvente de la disolución usada para medir la rotación óptica.

Tabla 3: Rotación óptica

Comp. n°	$[\alpha]_D^{20}$	concentración	disolvente
18	-37,4°	0,516 % p/v	DMF
20	+36,87°	0,575 % p/v	DMF
21	-39,68°	0,378 % p/v	DMF
24	+5,03°	10,30 mg/ml	MeOH
25	-3,44°	10,70 mg/ml	MeOH
26	-13,74	8,59 mg/ml	cloroformo
27	+11,89	9,00 mg/ml	cloroformo
30	-5,25	4,00 mg/ml	MeOH
31	+7,99	4,00 mg/ml	MeOH
28	-4,90	10,00 mg/ml	MeOH
29	+5,69	9,89 mg/ml	MeOH

C. Ejemplo farmacológico:

10 La capacidad de los presentes compuestos para conservar p53 en las células A2780 se midió mediante el ensayo de inmunosorción ligado a enzima de p53. El ensayo de p53 es un inmunoensayo enzimático de "sándwich" que emplea dos anticuerpos policlonales. Un anticuerpo policlonal, específico para la proteína p53, se inmovilizó sobre la superficie de los pocillos de plástico. Toda la p53 presente en la muestra a ensayar se unirá al anticuerpo de
15 que haya sido retenida por el anticuerpo de captura. El anticuerpo detector, a su vez, se une mediante la estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante. La peroxidasa de rábano picante cataliza la conversión del sustrato cromogénico o-fenilendiamina, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteína p53 unida a la placa. El producto de reacción coloreado se cuantifica mediante el uso de un espectrofotómetro. Se logra la
20 cuantificación mediante la construcción de una curva estándar usando concentraciones conocidas de la proteína p53 etiquetada con HIS recombinante purificada (véase el ejemplo C.1.).

C.1. ELISA de p53

Se cultivaron células A2780 (ATCC) en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), 2 mM de L-glutamina y gentamicina a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂.

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

10 Placas de 96 pocillos EIA/RIA de poliestireno de alta unión (Costar 9018) se recubrieron con el anticuerpo de captura pAb1801 (Abcam ab28-100) a una concentración de 1 µg/ml en amortiguador de recubrimiento (0,1 M de NaHCO₃ pH 8,2), 50 µl por pocillo. El anticuerpo se dejó adherir durante la noche a 4°C. Las placas recubiertas se lavaron una vez con la disolución salina amortiguada con fosfato (PBS)/0,05% de Tween 20 y se añadieron 300 µl de amortiguador de bloqueo (PBS, 1% de albúminas séricas bovinas (BSA)) durante un período de incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Se hicieron diluciones de proteína p53 etiquetada con HIS recombinante purificada, que varían de 3-200 ng/ml, en amortiguador de bloqueo, y se usaron como patrones.

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

30 Para cada experimento, se llevaron a cabo en paralelo controles (que no contienen fármaco) y una incubación de blancos (que no contienen ni células ni fármacos). El valor de los blancos se restó de todos los valores de control y muestra. Para cada muestra, el valor de p53 (en unidades de absorbancia) se expresó como el porcentaje del valor de p53 presente en el control. El porcentaje de conservación superior a 140% se definió como significativo. En la presente, los efectos de los compuestos de ensayo se expresan como la dosis más baja que da al menos 140% del valor para la p53 presente en el control (LAD) (véase la Tabla 4).

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

35 Tabla 4: Resultados de los compuestos estudiados en el protocolo de ELISA de p53 anterior (células A2780)

Comp. nº	LAD de elisa de p53 [microM]
6	1,0
17	0,10
12	0,10
13	1,00
19	0,10
2	0,10
5	0,10
22	3,00
15	0,10
20	0,03
18	0,03
21	1,0

ES 2 639 752 T3

Comp. n°	LAD de elisa de p53 [microM]
9	1,0
11	0,30
14	1,0
4	0,10
10	1,0
7	0,30
8	0,10
16	0,30
23	3,00
1	0,10
27	0,10
24	0,03
25	0,10
31	0,10
26	0,10
30	0,10
29	0,03
28	0,10

C.2 Ensayo de proliferación

5 Las células de cáncer de ovario humano A2780 fueron un gentil obsequio del Dr. T.C. Hamilton (Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, U.S.A.). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal bovino.

Reactivos usados en el ensayo de Alamar Blue

Se adquirió resazurina de Aldrich (Prod. n° 199303). Se adquirió ferrocianuro de potasio, ferricianuro de potasio, KH₂PO₄ y K₂HPO₄ de Sigma (Prod. n° P9387, P8131, P5655 y P8281, respectivamente).

10 Se preparó amortiguador de fosfato de potasio 0,1 M (PPB) como sigue: 2,72 gramos de KH₂PO₄ y 13,86 gramos de K₂HPO₄ se disolvieron en 500 ml de mili-Q H₂O, el pH se ajustó a pH 7,4, y el volumen se llevó a 1 litro con mili-Q H₂O; el amortiguador se esterilizó por filtración y se almacenó a temperatura ambiente. La disolución madre de resazurina (PPB-A) se preparó de forma reciente disolviendo 45 mg de resazurina en 15 ml de PBS. Se prepararon 30 mM de ferricianuro de potasio (PPB-B) disolviendo 0,987 gramos de ferricianuro de potasio en 100 ml de PPB. Se prepararon 30 mM de ferrocianuro de potasio (PPB-C) disolviendo 1,266 gramos de ferrocianuro de potasio en 100 ml de PPB.

15 Se preparó la mezcla de PPB-A, PPB-B y PPB-C al mezclar volúmenes iguales de las disoluciones respectivas. Se preparó la disolución de trabajo de resazurina (denominada en la presente disolución "Alamar Blue") diluyendo dicha mezcla 20x (vol/vol) en PPB y esterilizar por filtración; la disolución Alamar Blue se podría guardar a 4°C durante un máximo de 2 semanas.

20 Procedimiento del ensayo Alamar Blue

Para los experimentos en placas de 384 pocillos, las células se sembraron a una densidad de 5 x 10³ células/ml en placas de cultivo de 384 pocillos Falcon (Life Technologies, Merelbeke, Bélgica), negras con fondo transparente, en 45 µl de medio de cultivo. Las células se dejaron adherir al plástico durante 24 h. El compuesto ensayado se prediluyó (1/50 en medio de cultivo) y se añadieron 5 µl de compuesto prediluido a los pocillos. Después de 4 días

de incubación, se añadieron 10 μ l de la disolución Alamar Blue a cada pocillo, y las células se incubaron durante otras 5 h (A2780) a 37°C. Se midió la intensidad de la fluorescencia para cada pocillo con un lector de fluorescencia de placa (Fluorskan, Labsystems, 540 nm de excitación y 590 nm de emisión)

- 5 Se calculó la actividad antiproliferativa como porcentaje de células que permanecían viables en condiciones tratadas frente al control (células no tratadas). En cada experimento, el resultado para cada condición experimental es la media de 3 pocillos replicados. Cuando sea apropiado, los experimentos se repitieron para establecer curvas completas de respuesta frente a la concentración. Cuando sea apropiado, se calcularon valores IC₅₀ (concentración del fármaco necesaria para reducir el crecimiento celular al 50% del control) mediante el uso de análisis de probitos para datos graduados (Finney, D.J., Probit Analyses, 2ª Ed. Capítulo 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962). En la presente, se expresan los efectos de los compuestos de ensayo como pIC₅₀ (el valor logarítmico negativo de la curva de IC₅₀ (M)) (véase la Tabla 5A).
- 10

Tabla 5A: Resultados de los compuestos ensayados en el protocolo de proliferación celular anterior (células A2780)

Comp. nº	Inhibición de la proliferación de células A2780 pIC ₅₀
6	6,67
17	7,40
12	7,20
13	6,90
19	7,34
2	7,38
5	7,28
22	6,26
15	7,27
20	7,29
18	7,47
21	6,85
9	6,85
11	6,55
14	6,43
4	6,74
10	6,70
7	6,96
8	7,06
16	6,87
23	6,52
1	6,94
27	6,85
24	7,18
31	6,84
26	7,11

Comp. nº	Inhibición de la proliferación de células A2780 pIC ₅₀
30	7,04
29	7,14
28	6,89

Los compuestos también se analizaron de acuerdo con el protocolo anterior, pero usando otras líneas celulares: línea celular de cáncer colorrectal HCT116, línea celular de cáncer pulmonar no microcítico H1299, línea celular de cáncer de próstata humano DU145. Los resultados se dan en la Tabla 5B.

5

Tabla 5B

Comp. nº	Inhibición de la proliferación de células HCT116 pIC ₅₀	Inhibición de la proliferación de células H1299 pIC ₅₀	Inhibición de la proliferación de células DU145 pIC ₅₀
6	5,39	5,03	
17	7,05	6,18	6,17
12	6,06	5,2	
13	5,61	<5	
19		5,46	5,74
2		5,94	6,16
5	6,46	5,23	5,56
22		5,09	5,07
15	6,69	5,82	
20		5,72	5,73
18	7,27	6,38	6,40
21	6,83	6,12	5,22
9	6,02	5,17	5,26
11	6,67	5,81	6,21
14	<5	5,40	5,14
4	6,00	5,43	5,29
10	6,47	5,68	5,65
7	7,00	6,39	6,60
8	7,06		
16	6,68	6,73	5,98
23	5,53	5,61	5
1	6,82	6,06	5,92
27	7,08	5,99	6,00
24	7,42	6,63	6,53
31	6,94	5,84	6,04
26	7,26	6,27	6,18

Comp. n°	Inhibición de la proliferación de células HCT116 pIC ₅₀	Inhibición de la proliferación de células H1299 pIC ₅₀	Inhibición de la proliferación de células DU145 pIC ₅₀
30	7,19	6,02	6,14
29	7,37	6,67	6,58
28	7,11	6,73	6,52

C.3. Ensayo de P450

5 Las proteínas CYP P450 (expresadas en *E. coli*) (3A4, 2D6, 2C9, 1A2 y 2C19) convierten sus sustratos específicos en una molécula fluorescente¹². La molécula fluorescente se mide mediante el uso de un lector de placa fluorescente. Los compuestos que inhiben la reacción enzimática dan como resultado una disminución de la señal fluorescente.

Conversiones mediadas por las isoenzimas respectivas de citocromo P450 expresadas por ADNc

Sustrato	Enzima	Molécula fluorescente
CEC	CYP1A2 →	CHC
MFC	CYP2C9 →	7-HFC
CEC	CYP2C19 →	CHC
AMMC	CYP2D6 →	AHMC
BFC	CYP3A4 →	7-HFC
DBF	CYP3A4 →	Fluoresceína
7-BQ	CYP3A4 →	Quinolol

Abreviaturas

CEC: 7-etoxi-3-cianocumarina; CHC: 3-ciano-7-hidroxycumarina, MFC: 7-metoxi-4-trifluorometilcumarina; 7-HFC: 7-hidroxi-trifluorometilcumarina, CEC: 7-etoxi-3-cianocumarina; CHC: 3-ciano-7-hidroxycumarina, AMMC: 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil]-7-metoxi-4-metilcumarina; AHMC: hidrocloreto de 3-[2-(N,N-dietilamino)etil]-7-hidroxi-4-metilcumarina, BFC: 7-benciloxi-trifluorometilcumarina; DBF: dibencilfluoresceína, 7-BQ: benciloquinolina.

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

	disolución de trabajo		concentración final
G-6-P	8,25 mM	25,10 mg	3,3 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14,29 µl	0,4 U/ml
0.5M MgCl ₂ .6H ₂ O	8,25 mM	165,0 µl	3,3 mM
NADP	3,25 mM	25,59 mg	1,3 mM
disueltos en un amortiguador de fosfato de Na-K 0,1 M		10 ml	

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

Mezcla de cofactores: (para CYP2D6)

	disolución de trabajo		concentración final
G-6-P	1,025 mM	3,12 mg	0,41 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14,29 μ l	0,4 U/ml
0.5M MgCl ₂ .6H ₂ O	1,025 mM	20,5 μ l	0,41 mM
NADP	20,5 μ M	0,161 mg	8,2 μ M
disuélvase en un amortiguador de fosfato de Na-K 0,1 M		10 ml	

Disoluciones de enzimas CYP P450:

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

5

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

Dilución de compuesto e inhibidor de referencia:

10 Los compuestos y los inhibidores de referencia se enviaron al departamento como una disolución 5 mM en DMSO. Una disolución de trabajo de $5 \cdot 10^{-4}$ M se preparó por dilución seriada usando acetonitrilo. La concentración final de compuesto fue 10^{-5} M para el cribado primario, y la concentración final de disolvente fue 2%. Después de un cribado primario a una concentración de 10^{-5} M, se analizaron los valores de IC₅₀ de los inhibidores potentes seleccionados, a un intervalo de concentración de $3 \cdot 10^{-9}$ - 10^{-5} M. En el cribado primario, todos los compuestos se ensayaron por triplicado.

15 Los inhibidores de referencia se analizaron a un intervalo de concentraciones de 10^{-9} - 10^{-4} M.

Inhibidores de referencia:

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

Disoluciones de sustrato:

CEC	(sustrato de CYP1A2)	6,25 μ l de disolución 20 mM de CEC/5 ml volumen total	5 μ M
MFC	(sustrato de CYP2C9)	200 μ l de disolución 25mM de MFC/5 ml volumen total	200 μ M

ES 2 639 752 T3

CEC	(sustrato de CYP2C19)	31.25 µl de disolución 20 mM de CEC/5 ml volumen total	25 µM
AMMC	(sustrato de CYP2D6)	150 µl de disolución 0,5 mM de AMMC/5ml volumen total	3 µM
BFC	(sustrato de CYP3A4)	750 µl de disolución 5 mM de BFC/5ml volumen total	150 µM
DBF	(sustrato de CYP3A4)	12.5 µl de disolución 2 mM DBF/5 ml volumen total	1 µM
7-BQ	(sustrato de CYP3A4)	60 µl de disolución 25 mM de 7-BQ/5 ml volumen total	60 µM

Las disoluciones madre de sustrato se disolvieron en acetonitrilo, y se almacenaron a -20°C. La disolución final de trabajo se disolvió en 0,1 M de amortiguador de fosfato de Na-K pH 7,4, y esta disolución siempre se preparó reciente antes de iniciar el ensayo.

5 Análisis de datos

La preparación de la placa, la relación de datos, el análisis de datos, la convalidación y la aprobación de resultados y la carga de datos se realizaron en forma semiautomática con el software de Lexis-Laplace (Laplace-DLM-RVAM)

Las fórmulas usadas en los cálculos son:

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

10 % de inhibición = 100 - % de actividad

Cuando se calculó, el valor de IC₅₀ se generó automáticamente mediante extrapolación gráfica en RVAM, sobre la base de la intersección con el 50% del eje de control.

Método

15 El ensayo se efectuó en una placa Costar negra de 96 pocillos. Por pocillo, el ensayo comprende: 40 µl de disolución de enzima CYP P450 (en las muestras de control negativo se añadieron 40 µl de 0,1 M de amortiguador de fosfato de Na-K pH 7,4 sin enzima); 40 µl de mezcla de cofactores; 2 µl de compuesto o inhibidor de referencia para las muestras de control negativo, o disolvente para las muestras de control positivo. Después de 5 min. de preincubación a 37°C en una incubadora agitadora, se añadieron 20 µl de disolución de sustrato. Las placas se incubaron a 37°C durante 10 min. (CYP3A4/DBF), 15 min. (CYP1A2), 30 min. (CYP2C9, CYP3A4/BFC y CYP3A4/7-BQ y CYP2C19) y 45 min. (CYP2D6). La reacción se detuvo por adición de 200 µl de acetonitrilo. Para CYP3A4/DBF, la reacción se detuvo por adición de 200 µl de 2 M de NaOH. Para CYP3A4/7-BQ, la reacción se detuvo por adición de 40 µl de Tris/acetonitrilo (1:5) (V:V, seguido de 10 minutos de centrifugación a 2000 rpm. La señal fluorescente fue detectada por un lector fluorescente Victor2 (Wallac) o Fluoroskan (Labsystems). La longitud de onda de excitación y de emisión para las diferentes enzimas y su sustrato específico se mencionan en la Tabla 6.

25 Tabla 6: Longitudes de onda de excitación y de emisión

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

Referencias

[1] Microtiter Plate Assays for Inhibition of Human, Drug-Metabolizing Cytochromes P450

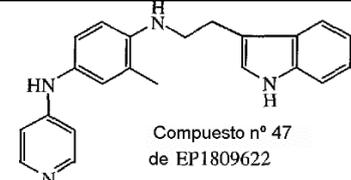
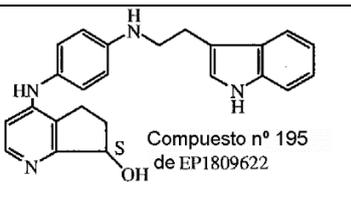
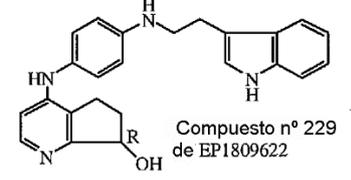
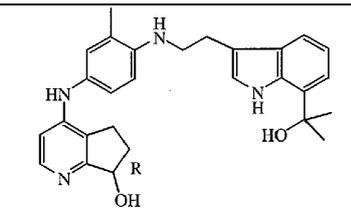
Charles L. Crespi, Vaughn P. Miller, Bruce W. Penman (Gentest) Analytical Biochemistry 248, 188-190 (1997) Article n° AB972145

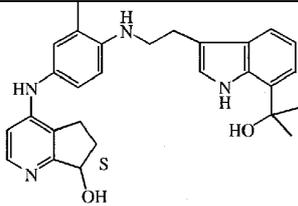
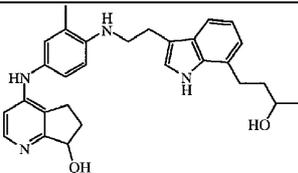
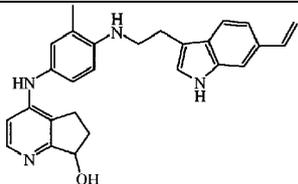
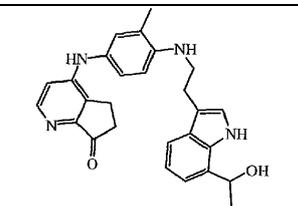
30

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

5 La Tabla 7 proporciona datos para los compuestos de la presente invención (compuestos nº 18, 20, 9, 14 y 4) estudiados en los siete ensayos, comparados con compuestos de la técnica anterior. Tal como se describió con anterioridad, se ensayaron cinco enzimas P450, una de ellas en tres sustratos diferentes (en consecuencia siete ensayos en total). En la Tabla 7 se indica en cuántos de los ensayos de P450 un compuesto mostró actividad inhibidora con $IC_{50} < 1,00E-06$.

Tabla 7: Datos comparativos sobre la inhibición de CYP

compuesto	Efectos sobre P450 IC_{50}
 <p>Compuesto nº 47 de EP1809622</p>	7 veces $< 1,00E-06$
 <p>Compuesto nº 36 de EP1809622</p>	3 veces $< 1,00E-06$
 <p>Compuesto nº 197 de EP1809622</p>	7 veces $< 1,00E-06$
 <p>Compuesto nº 195 de EP1809622</p>	0 veces $< 1,00E-06$
 <p>Compuesto nº 229 de EP1809622</p>	0 veces $< 1,00E-06$
 <p>Compuesto nº 20</p>	0 veces $< 1,00E-06$

compuesto	Efectos sobre P450 IC ₅₀
 <p data-bbox="491 539 671 568">Compuesto nº 18</p>	0 veces < 1,00E-06
 <p data-bbox="491 786 671 815">Compuesto nº 9</p>	0 veces < 1,00E-06
 <p data-bbox="491 1055 671 1084">Compuesto nº 14</p>	1 vez < 1,00E-06
 <p data-bbox="491 1335 671 1364">Compuesto nº 4</p>	0 veces < 1,00E-06

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

El ensayo es una modificación de un procedimiento descrito por Colpaert et al. (1975).³ Se enjaularon ratones NMRI machos (22 ± 3 g) en jaulas de observación Makrolon (L x W x H: 11 x 12 x 17 cm; n = 3 por jaula). Al comienzo de los experimentos, inmediatamente antes de la administración de los compuestos de ensayo, se midió la temperatura corporal inicial de los ratones con una precisión de 0,1°C al insertar la sonda termosensible (1,0 mm de diámetro) de un termómetro eléctrico (Comark) hasta una profundidad constante de 3 cm en el esófago, hasta que se obtuvo una lectura estable. Se midió el diámetro de la pupila del ojo derecho con un microscopio graduado, y se expresó en unidades de 1/24 mm. Quince minutos después de la administración de los compuestos de ensayo, los ratones se expusieron a Ro-4-1284 (10 mg/kg, s.c.). Ro-4-1284 es un inhibidor del transporte de monoamina vesicular (VMAT-2) similar a reserpina, que agota rápidamente las vesículas secretoras.^{3, 4} Quince, 30 y 60 min. después de la exposición, los ratones se puntuaron para la abertura palpebral (0, 1, 2, 3, 4, 5) y actividad locomotora (-1, 0, 1, 2, 3). En el intervalo de 60 min., inmediatamente después de la puntuación del comportamiento manifiesto, se midió nuevamente el diámetro de la pupila del ojo derecho y la temperatura esofágica. Se observaron fenómenos anormales como olfateo intenso, masticación, crianza, hiperemia, piloerección, salivación, temblores, convulsiones y muerte (estos últimos fenómenos también se observaron cuando ocurrieron antes de la administración de Ro-4-1284). Criterios para los efectos inducidos por fármacos: reversión de la ptosis: puntuación de la abertura palpebral >1 a 15, 30 o 60 min. (2,7, 0,5 y 0% de controles positivos falsos, respectivamente; n > 350); inducción de la prostración: puntuación -1 para locomoción a 15, 30 o 60 min. (nunca se observó en los controles); reversión de hipomovilidad: puntuación > 0 para locomoción a 15, 30 y 60 min. (2,2, 0,8 y 0% de controles positivos falsos, respectivamente); reversión de la miosis: diámetro de pupila > 5 unidades a 60 min. (0,8% de positivos falsos); potenciación de la hipotermia: disminución de la temperatura (a lo largo del intervalo de tiempo de 1 h) > 9,0°C (1,4% de positivos falsos); reversión de hipotermia: disminución de la temperatura < 3,0°C (1,8% de positivos falsos).

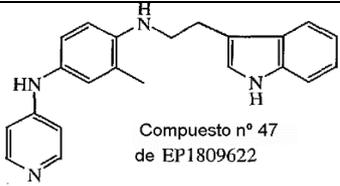
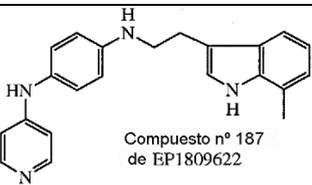
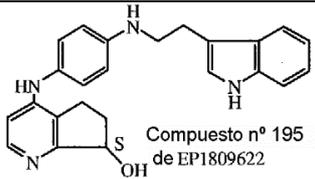
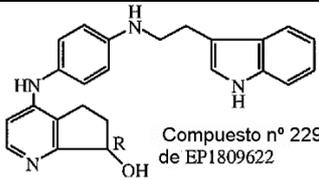
Según el procedimiento estándar, se inyecta R0-4-1284 15 min. después de la administración subcutánea u oral, y las observaciones comienzan 15 min. más tarde. Las dosis se dan inicialmente a 3 animales. Cuando al menos 2 de los 3 animales muestran actividad para al menos una de las observaciones, el compuesto se considera activo. En otros casos, el compuesto se considera inactivo al régimen particular de tiempo-vía-dosis, y se clasifica como terminado.

5

Los compuestos n^{os} 20, 18, 1, 27, 24, 25, 31, 30, 7, 29, 28, 26 y 17 se ensayaron cada uno en 3 animales a una concentración de 80 mg/kg tras la administración oral, y no mostraron actividad en la reversión de miosis, reversión de ptosis, reversión de hipomovilidad. El compuesto 4 se ensayó solamente a 40 mg/kg, y no mostró actividad en la reversión de miosis, reversión de ptosis, reversión de la hipomovilidad.

10 Los compuestos del documento EP 1809622 también se evaluaron en el mismo ensayo, y los resultados se muestran en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8: Datos comparativos

compuesto	efectos secundarios neurológicos inducidos por fármacos
 <p>Compuesto n° 47 de EP1809622</p>	sí
 <p>Compuesto n° 36 de EP1809622</p>	sí
 <p>Compuesto n° 187 de EP1809622</p>	sí
 <p>Compuesto n° 195 de EP1809622</p>	sí
 <p>Compuesto n° 229 de EP1809622</p>	sí

Referencias

15 [3] Colpaert, F.C., Lenaerts, F.M., Niemegeers, C.J.E., Janssen, P.A.J.: "A critical study on Ro-4-1284 antagonism in mice.", Arch. Int. Pharmacodyn. 215 40-90 (1975).

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

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

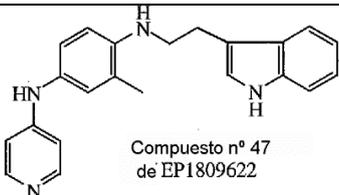
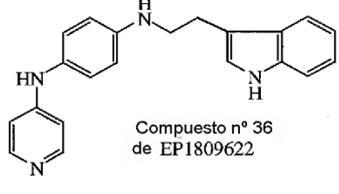
C.5 Ensayo de fijación de voltaje-inhibición de la corriente de K⁺ mediada por HERG en células HEK293

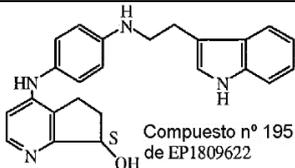
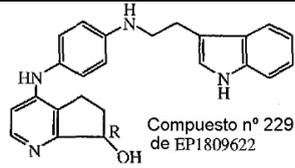
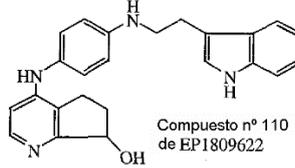
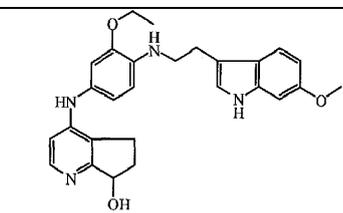
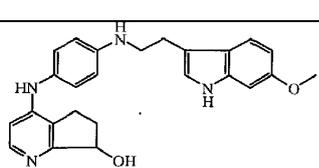
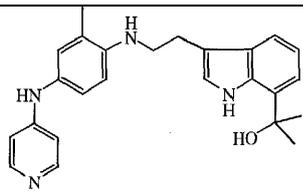
5 Los experimentos se llevaron a cabo usando células HEK293 que expresan de forma estable el canal de potasio HERG. Las células se hicieron crecer a 37°C y 5% de CO₂ en matraces de cultivo en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1% de disolución de L-glutamina-penicilina-estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales (100x), 1% de piruvato sódico (100 mM) y 0,8% de geneticina (50 mg/ml). Antes del uso, las células se subcultivaron en medio MEM en ausencia de 5 ml de L-glutamina-penicilina-estreptomicina. Pare el uso en el sistema de fijación de voltaje automatizado PatchXpress 7000A (Axon Instruments), las células se cosecharon para obtener suspensión celular de células individuales. La disolución extracelular contenía (mM): 150 de NaCl, 4 de KCl, 1 de MgCl₂, 1,8 de CaCl₂, 10 de HEPES, 5 de glucosa (pH 7,4 con NaOH). La disolución de la pipeta contenía (mM): 120 de KCl, 10 de HEPES, 5 de EGTA, 4 de ATP-Mg₂, 2 de MgCl₂, 0,5 de CaCl₂ (pH 7,2 con KOH).

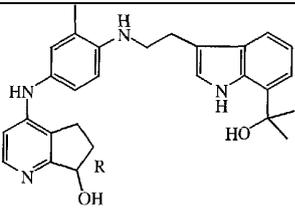
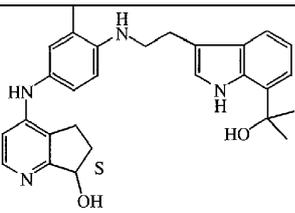
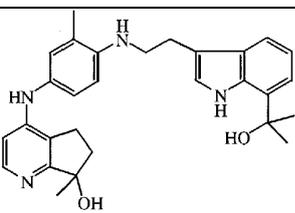
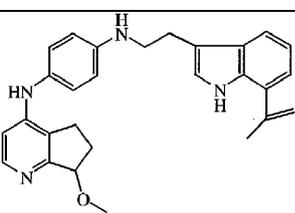
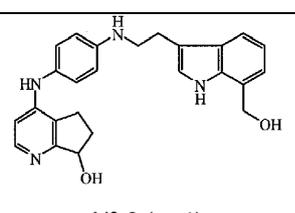
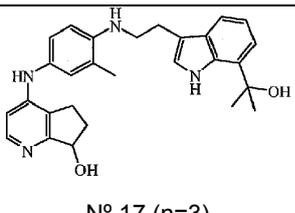
15 Los experimentos de fijación de voltaje se llevaron a cabo en el modo de fijación de voltaje, y las corrientes de células completas se registraron con un ensayo automatizado de fijación de voltaje que utiliza el sistema PatchXpress 7000A (Axon Instruments). Las señales de corriente se amplificaron y se digitalizaron mediante un amplificador Multiclamp, se almacenaron y se analizaron usando el software PatchXpress, DataXpress e Igor 5.0 (Wavemetrics).

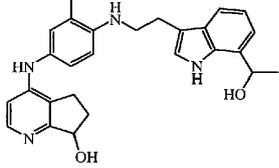
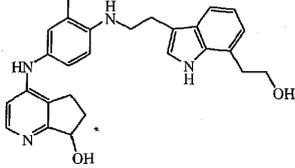
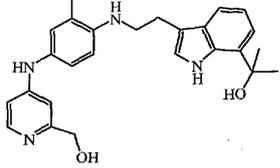
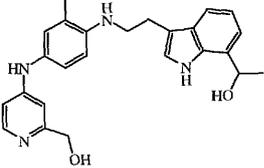
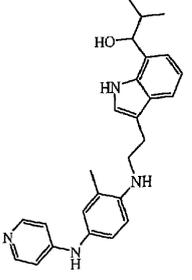
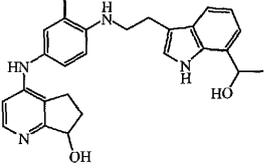
20 El potencial de mantenimiento fue -80 mV. La corriente de HERG (corriente saliente selectiva de K⁺) se determinó como la corriente de cola máxima a -40 mV después de una despolarización de 2 segundos hasta +60 mV. La velocidad de ciclaje de los pulsos fue 15 s. Antes de cada pulso de ensayo, se administró un pulso corto (0,5 s) desde el potencial de mantenimiento hasta -60 mV, para determinar la corriente de fuga (lineal). Después de establecer la configuración de célula completa y un período de estabilidad, se aplicó el vehículo durante 5 minutos, seguido de la sustancia de ensayo mediante concentraciones crecientes de 10⁻⁷ M, 3 x 10⁻⁷ M y 3 x 10⁻⁶ M. Cada concentración de la sustancia de ensayo se aplicó dos veces. El efecto de cada concentración se determinó después de 5 min. como una corriente promedio de 3 pulsos de voltaje secuenciales. Para determinar el grado de bloqueo, la corriente residual se comparó con pretratamiento con vehículo. Los datos (Tabla 9) se presentan como valores medios (± error estándar de la media (SEM), si está disponible) del porcentaje de inhibición en comparación con el control (el control es 100%) (n = número de experimentos).

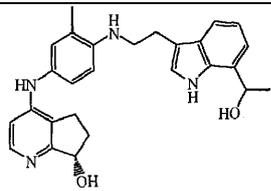
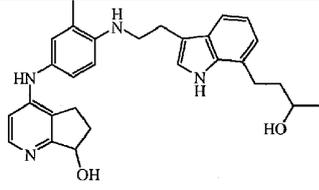
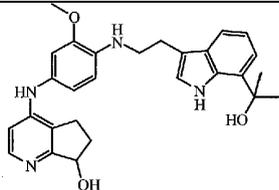
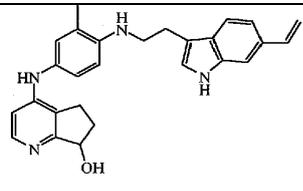
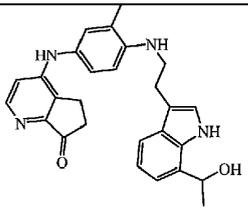
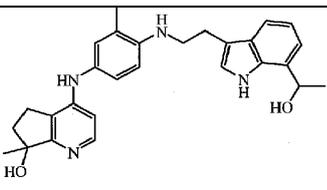
30 Tabla 9: Inhibición de la corriente de K⁺ mediada por HERG en células HEK293

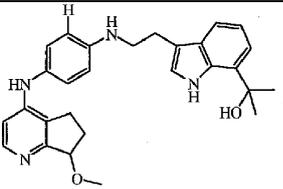
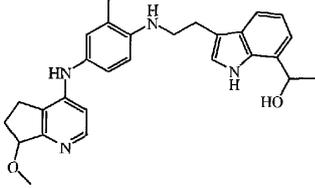
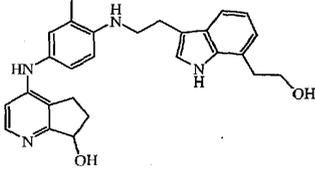
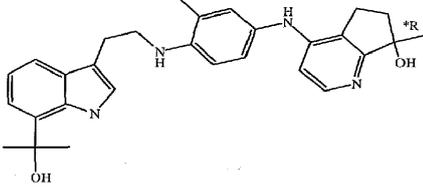
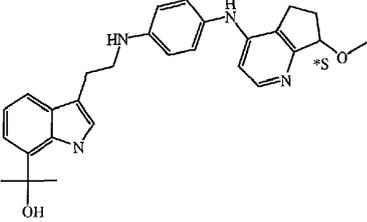
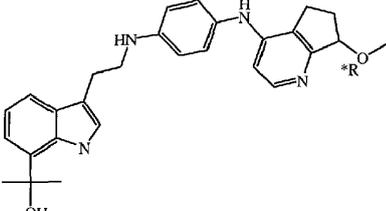
Compuesto	1.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁶ M
 <p>Compuesto n° 47 de EP1809622 (n=3)</p>	76 ± 1,6	58 ± 2,7	13 ± 3,1
 <p>Compuesto n° 36 de EP1809622 (n=3)</p>	68 ± 3,5	41 ± 2,9	5 ± 0,33
 <p>Compuesto n° 187 de EP1809622 (n=3)</p>	68 ± 3,2	36 ± 6,1	5 ± 1

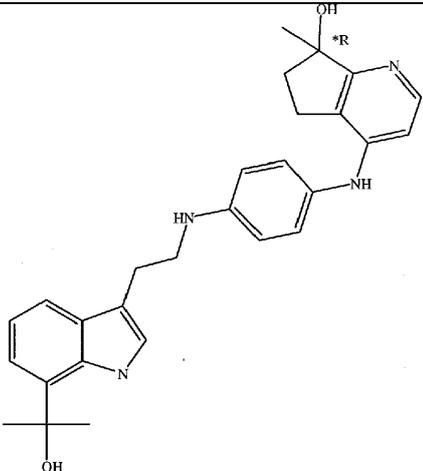
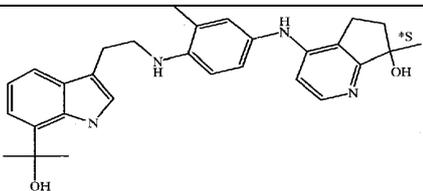
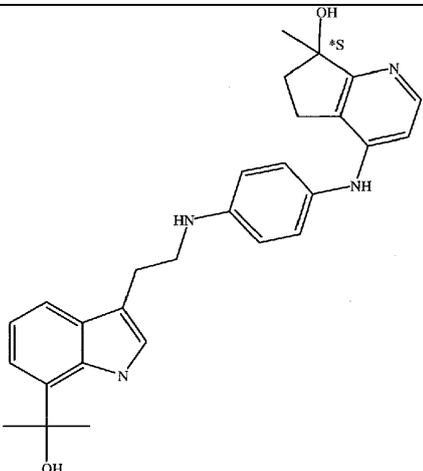
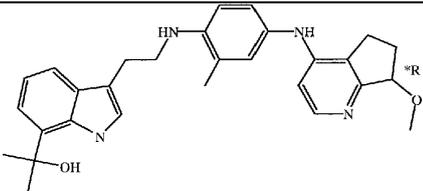
Compuesto	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-6}$ M
 <p>Compuesto n° 195 de EP1809622 (n=3)</p>	80 ± 3,7	65 ± 2	19 ± 0,4
 <p>Compuesto n° 229 de EP1809622 (n=3)</p>	81 ± 4,8	63 ± 5,5	18 ± 1,1
 <p>Compuesto n° 110 de EP1809622 (n=4)</p>	86 ± 4,6	66 ± 5,2	22 ± 4,6
 <p>Compuesto n° 21 de EP1809622 (n=3)</p>	35 ± 8,6	8 ± 3,6	0 ± 0
 <p>Compuesto 112 de EP1809622 (n=3)</p>	74 ± 3,2	46 ± 7,3	6 ± 3,1
 <p>Compuesto 196 de EP1809622 (n=3)</p>	87 ± 0,9	76 ± 1,6	38 ± 3,1
 <p>Compuesto n° 2 (n=3)</p>	89 ± 3,9	75 ± 0,8	18 ± 4,6

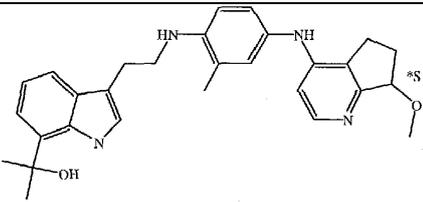
Compuesto	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 <p>Compuesto nº 20 (n=3)</p>	$88 \pm 5,1$	$76 \pm 1,8$	$26 \pm 7,1$
 <p>Compuesto nº 18 (n=3)</p>	$90 \pm 1,8$	$82 \pm 3,8$	$41 \pm 4,3$
 <p>Compuesto nº 1 (n=4)</p>	$86 \pm 2,5$	$82 \pm 1,1$	$69 \pm 5,1$
 <p>Compuesto nº 7 (n=3)</p>	$86 \pm 2,9$	$53 \pm 6,8$	$2 \pm 0,3$
 <p>Nº 6 (n=4)</p>	$89 \pm 2,9$	$87 \pm 4,8$	$69 \pm 3,4$
 <p>Nº 17 (n=3)</p>	$84 \pm 3,9$	$70 \pm 4,7$	$21 \pm 3,3$

Compuesto	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 <p>N°12 (n=6)</p>	$87 \pm 0,9$	$78 \pm 2,8$	$58 \pm 2,9$
 <p>N°13 (n=3)</p>	$91 \pm 2,8$	$85 \pm 4,2$	$75 \pm 1,8$
 <p>N°19 (n=3)</p>	$89 \pm 2,4$	$72 \pm 3,2$	$26 \pm 4,7$
 <p>N°5 (n=3)</p>	$88 \pm 1,9$	$74 \pm 6,1$	$33 \pm 10,5$
 <p>N°22 (n=3)</p>	$76 \pm 5,2$	$49 \pm 7,8$	$9 \pm 2,3$
 <p>N°15 (n=3)</p>	$93 \pm 1,2$	$88 \pm 0,8$	$66 \pm 4,4$

Compuesto	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-7}$ M	$3 \cdot 10^{-6}$ M
 <p>N°21 (n=3)</p>	91 ± 0,9	86 ± 1,8	65 ± 1,2
 <p>N°9 (n=3)</p>	87 ± 2,1	72 ± 3,4	47 ± 3,2
 <p>N°11 (n=3)</p>	90 ± 8,7	80 ± 7,2	43 ± 3,3
 <p>N°14 (n=4)</p>	84 ± 2,1	57 ± 5,4	10 ± 3,8
 <p>N°4 (n=3)</p>	89 ± 4,2	85 ± 1,7	66 ± 3,3
 <p>N°10 (n=3)</p>	82 ± 2,1	72 ± 2,6	62 ± 1,8

Compuesto	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 <p>N°8 (n=3)</p>	93 ± 7,3	83 ± 6,4	25 ± 5,4
 <p>N°16 (n=3)</p>	89 ± 6,0	74 ± 7,9	34 ± 4,4
 <p>N°23 (n=3)</p>	92 ± 1,0	87 ± 2,0	72 ± 0,4
 <p>N°27 (n=3)</p>	90 ± 1,8	75 ± 3,3	53 ± 8,1
 <p>N°24 (n=3)</p>	88 ± 3,2	77 ± 4,2	29 ± 2,9
 <p>N°25 (n=3)</p>	82 ± 1,7	65 ± 2,8	27 ± 2,7

Compuesto	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 <p>N°31 (n=3)</p>	$91 \pm 0,9$	$82 \pm 2,3$	$55 \pm 3,8$
 <p>N°26 (n=3)</p>	$87 \pm 1,7$	$78 \pm 1,8$	$51 \pm 5,9$
 <p>N°30 (n=3)</p>	$98 \pm 1,6$	$93 \pm 6,3$	$80 \pm 7,2$
 <p>N°29 (n=3)</p>	$89 \pm 2,3$	$82 \pm 3,9$	$39 \pm 0,8$

Compuesto	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 <p>N°28 (n=4)</p>	$84 \pm 4,4$	$79 \pm 8,8$	$60 \pm 6,4$

Sorprendentemente, los presentes compuestos muestran excelente actividad *in vitro*, que se combinan con una baja afinidad por las enzimas P450 y ningún efecto neurológico inducido por fármacos *in vivo*, y bajos efectos cardiovasculares.

5 C.6. Efectos antitumorales in vivo

La actividad antitumoral in vivo se puede evaluar como sigue:

Referencia estándar de NCI:

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

10 Modelo animal:

Para estos estudios, se usaron ratones machos inmunodeficientes (atímicos) NMRI (*Nu/Nu*) (20-25 g, obtenidos de Janvier, Francia). El peso inicial fue aproximadamente 23 a 34 g. Todos los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) "de barrera completa", con acceso libre a alimento y agua. Los ratones se enjaularon por grupos en un ciclo de 12 h de luz:oscuridad (las luces a 06:00 h), a una temperatura de 19 a 22°C y 35 a 40% de humedad en jaulas Techniplast tipo 3 IVC. Los ratones se alimentaron con una comida estándar de laboratorio. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las Directivas del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC), y tuvieron que ser aprobados por el comité de ética local. Para un modelo de xenoinjerto de tumor establecido (volumen tumoral ~ 200 mm³), los ratones se distribuyeron aleatoriamente según los volúmenes tumorales, con 5 ratones por grupo de tratamiento.

20 Sistema de ensayo:

La estirpe celular tumoral de glioma U87 humano se obtuvo de una paciente caucásica de 44 años. Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire), en medio DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 2,0 mM de piruvato sódico, 25 unidades/ml de penicilina/25 µg/ml de estreptomina, y 10% de suero fetal bovino. Las células se mantuvieron como cultivos de monocapas celulares, haciéndose pasar dos veces a la semana a 3×10^6 células por matraz T175 usando el siguiente procedimiento. De forma breve, las células se lavaron con PBS (sin Mg²⁺, Ca²⁺), antes de añadir tripsina-EDTA a los matraces de cultivo. Después del desprendimiento de las células, la tripsina-EDTA se inactivó por adición de medio completo. La suspensión celular se transfirió entonces a un tubo Falcon de 50 ml, y se centrifugó durante 3 min. a 1200 rpm. Se aspiró el medio, resuspendiéndose las células en un volumen apropiado de medio completo. Las células se contaron en un hemocitómetro, y su viabilidad se evaluó mediante exclusión con 0,25% de azul de tripán. Entonces se añadió un volumen apropiado de suspensión celular a un nuevo o nuevos matraces de cultivo T175 o a una botella giratoria que contiene medio reciente. Para el crecimiento a gran escala de células tumorales U87, se sembró un número apropiado de botellas giratorias con 0,5 a 1×10^7 células, 1 semana antes de la inoculación de los ratones. El medio se cambió dos veces durante este período, realizándose el último cambio el día antes de la inyección de las células. Las células se recogieron como se describió anteriormente, con la excepción de que, tras la centrifugación, las células se resuspendieron en medio frío (4°C) libre de suero. A los ratones se les inyecta en la región inguinal 1×10^7 células en total en un volumen de 200 µl.

Diseño del estudio:

Se inyectaron células de glioma U87 humano directamente en la región inguinal de los ratones machos NMRI *Nude* (1×10^7 células/200 µl/animal) en el día 0 (D0). El día 7-10 (puede variar debido a la absorción/crecimiento tumoral entre lotes de células), cuando el volumen tumoral hubo alcanzado un promedio aproximado de 200 mm³, los ratones distribuyeron al azar según el volumen tumoral, con 5 ratones por grupo de tratamiento. Los ratones se trataron entonces una vez al día (QD) con vehículo (10% de HP-β-CD) o con vehículo que contiene compuesto de ensayo (20 mg/kg) mediante sonda nasogástrica (p.o.) administrado en un volumen de 10 ml/kg de peso corporal durante 5 días. Las medidas específicas del tumor se realizaron en el día 6 (24 horas después de la 5ª dosis), y

entonces nuevamente en el día 10. Se monitorizó el recrecimiento tumoral (después de que se detuvo la dosificación) de manera que se pudiera registrar el tiempo para alcanzar un volumen de 2000 mm³ (TTR2000). Esto da información adicional sobre la duración de la acción del fármaco sobre el crecimiento tumoral. En general, el tamaño tumoral y los pesos corporales se midieron dos veces a la semana, monitorizándose los ratones diariamente en busca de signos clínicos de toxicidad durante todo el tratamiento. Los signos clínicos de toxicidad incluyeron (pero sin limitarse a) anorexia persistente o deshidratación, postura, moribundo, letargo, hipotermia y/o respiración dificultosa (según las directrices de UKCCCR para el bienestar de animales en neoplasia experimental (The UKCCCR (UK Coordinating Committee on Cancer Research) guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (julio de 1997); y Workman, P. et al. UKCCCR guideline. Br. J. Cancer. 1998, 77: 1-10).

10 Análisis de los datos:

Para cada animal individual, se monitorizaron dos veces a la semana el peso corporal y el tamaño tumoral [usando la fórmula aceptada habitualmente: Volumen Tumoral (mm³) = (a x b²/2); en la que "a" representa la longitud, y "b" representa la anchura del tumor, según se determina mediante medidas con calibre], durante el estudio. Una pérdida de peso corporal sostenida mayor que 15% del peso corporal inicial se consideró como toxicidad clínica, y retirándose el animal del estudio y sacrificándolo. El transcurso de tiempo del crecimiento tumoral se expresa como valores de la mediana, o se puede normalizar con respecto al volumen tumoral inicial en el día de tratamiento comenzado y se puede expresar como media ± error estándar de la media (SEM) (5 animales por grupo). Para tumores preestablecidos, se pueden calcular los volúmenes tumorales relativos para cada ratón (volumen de tumor tratado/volumen tumoral en el día 0) y se pueden expresar como media ± SEM para cada grupo de tratamiento. La significancia estadística se indica mediante los valores de *p* de un lado a partir del análisis de Wilcoxon-Mann-Whitney (prueba de la suma de rangos de Wilcoxon), y *p* < 0,05 se considera como estadísticamente significativo. Las relaciones de tratamiento/control (T/C) se calculan en base a los volúmenes tumorales relativos finales, usando los criterios del NCI en el día 6 y 10 (día 1 = comienzo del tratamiento, una vez que los ratones se han distribuido al azar y se han asignado a los grupos de tratamiento apropiados). El criterio efectivo para relaciones T/C es 42%.

25 Tabla 10: % T/C en el día 6 y en el día 10 tras el comienzo de la dosificación

Comp. nº	% T/C día 6	% T/C día 10
6	105	99
12	64	71
19	57	40
2	14	-0,23
5	103	67
22	40	55
15	53	88
18	9	-3
21	102	95
9	145	113
11	72	79
4	77	129
10	96	71
16	63	64
23	72	95
1	17	8
27	193	22
24	60	1
31	179	1

ES 2 639 752 T3

Comp. nº	% T/C día 6	% T/C día 10
26	354	-11
30	-61	-10
29	-196	-13
28	-280	-10
25	330	-3

D. Ejemplo de composición: comprimidos recubiertos de película

Preparación de núcleo de comprimido

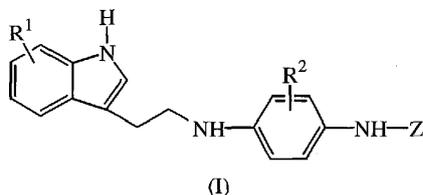
- 5 Se mezcla bien una mezcla de 100 g de un compuesto de la fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón, y después se humidifica con una disolución de 5 g de dodecilsulfato de sodio y 10 g de polivinilpirrolidona en alrededor de 200 ml de agua. La mezcla de polvo húmeda se tamiza, se seca, y se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

Recubrimiento

- 10 A una disolución de 10 g de metilcelulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado se añade una disolución de 5 g de etilcelulosa en 150 ml de diclorometano. Entonces, se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol, se funden 10 g de polietilenglicol y se disuelven en 75 ml de diclorometano. Esta última disolución se añade a la primera, y entonces se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinilpirrolidona y 30 ml de suspensión colorante concentrada, y el conjunto se homogeneiza. Los núcleos de los comprimidos se recubren con la mezcla así obtenida en un aparato de recubrimiento.
- 15

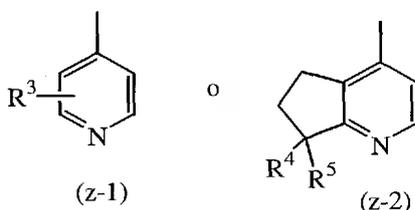
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I)



incluyendo cualquiera de sus formas estereoquímicamente isoméricas, en la que

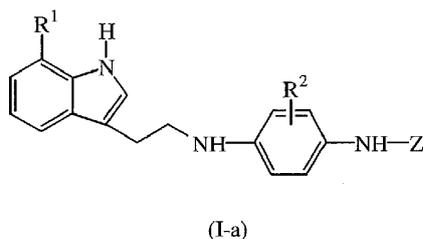
- 5 R^1 es hidroxialquilo de C_{1-6} o alquenilo de C_{2-6} ; con la condición de que el sustituyente R^1 se ubique en la posición 6 o 7 del resto de indol;
 R^2 es hidrógeno o alquilo de C_{1-4} ;
 Z es un radical seleccionado de



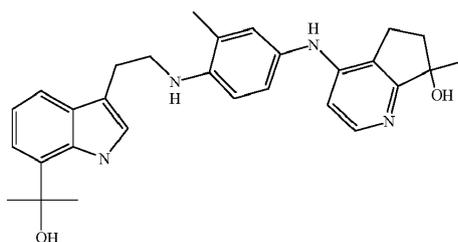
- 10 R^3 es hidrógeno o hidroxialquilo de C_{1-4} ;
 R^4 es hidroxilo o alquilo de C_{1-4} ;
 R^5 es hidrógeno o alquilo de C_{1-4} ; o
 R^4 y R^5 se toman juntos para formar oxo;

una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

- 15 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene la siguiente fórmula



3. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que R^1 es hidroxialquilo de C_{1-4} .
 4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R^2 es alquilo de C_{1-4} .
 5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Z es un radical de fórmula (z-1).
 20 6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Z es un radical de fórmula (z-2).
 7. Un compuesto según la reivindicación 6, en el que R^4 es hidroxilo y R^5 es hidrógeno.
 8. Un compuesto según la reivindicación 6, en el que R^4 es hidroxilo y R^5 es alquilo de C_{1-4} .
 9. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es un enantiómero que tiene la fórmula

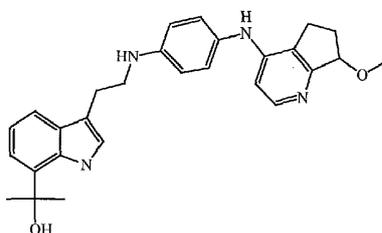


y que tiene una rotación levorrotatoria medida con luz a la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C y una longitud de recorrido de celda de 1 dm en cloroformo a una concentración de 8,59 mg/ml;

o

5 una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

10. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es un enantiómero que tiene la fórmula



y que tiene una rotación dextrorrotatoria medida con luz a la longitud de onda de la línea D de sodio (589 nm) a una temperatura de 20°C y una longitud de recorrido de celda de 1 dm en metanol a una concentración de 10,33 mg/ml;

10 o

una de sus sales farmacéuticamente aceptables o uno de sus solvatos.

11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso como una medicina.

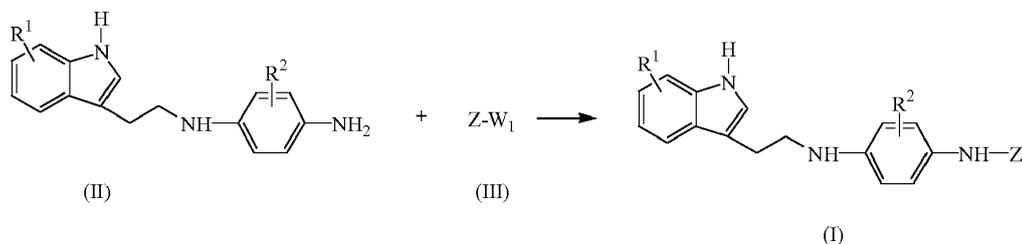
12. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

15 13. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.

14. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en combinación con uno o más agentes anticancerosos.

15. Un procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por

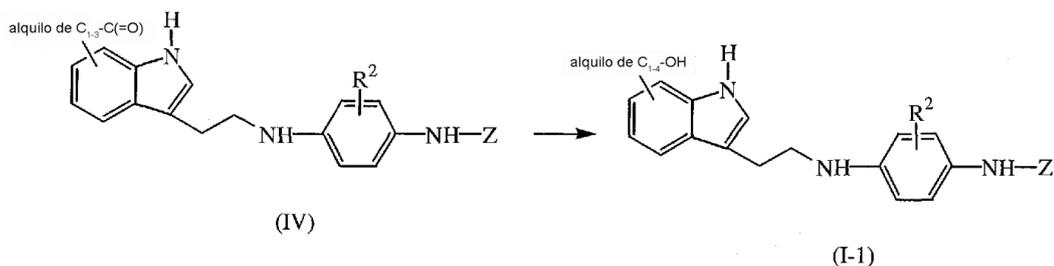
20 a) hacer reaccionar un intermedio de la fórmula (II) con un intermedio de la fórmula (III), en la que W_1 es un grupo saliente apropiado, en un disolvente inerte a la reacción, opcionalmente en presencia de una base apropiada, o hacer reaccionar un intermedio de la fórmula (II) con un intermedio de la fórmula (III), en la que W_1 es un grupo saliente apropiado, en presencia de un catalizador apropiado, un ligando apropiado, una base apropiada, y un disolvente apropiado



25

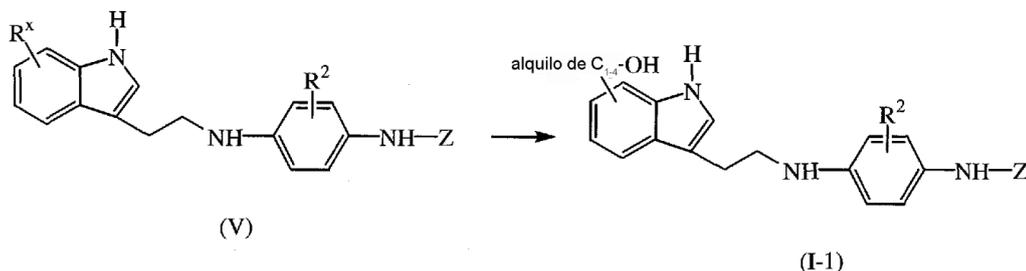
con R^1 , R^2 y Z como se definen en la reivindicación 1;

b) reduciendo el derivado de carbonilo correspondiente de la fórmula (IV) en presencia de un agente reductor apropiado y un disolvente apropiado,



con R² y Z como se definen en la reivindicación 1;

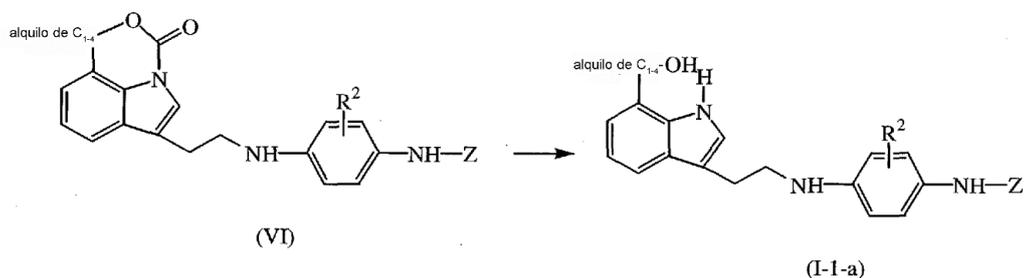
c) reduciendo el derivado de éster correspondiente de la fórmula (V), en la que R^x representa -alquilo de C₁₋₃-C(=O)Oalquilo de C₁₋₄, en presencia de un agente reductor apropiado y un disolvente apropiado,



5

con R² y Z como se definen en la reivindicación 1;

d) hidrolizando un intermedio de la fórmula (VI) con una base apropiada en presencia de un disolvente apropiado,



10

con R² y Z como se definen en la reivindicación 1;

o, si se desea, convertir los compuestos de la fórmula (I) entre sí siguiendo transformaciones conocidas en la técnica, y además, si se desea, convertir los compuestos de la fórmula (I) en una sal de adición de ácidos no tóxica terapéuticamente activa por tratamiento con un ácido, o en una sal de adición de bases no tóxica terapéuticamente activa por tratamiento con una base; o por el contrario, convertir la forma de sal de adición de ácidos en la base libre por tratamiento con álcali, o convertir la sal de adición de bases en el ácido libre por tratamiento con ácido; o, si se desea, preparar formas estereoquímicamente isoméricas o sus solvatos.

15