

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 471**

51 Int. Cl.:

C07D 215/28 (2006.01)

C07D 215/04 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2009 PCT/US2009/005475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10042163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09819542 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2350012**

54 Título: **Compuestos de quinolina como inhibidores de la angiogénesis, metionina aminopeptidasa humana, y SirT1, y procedimientos de tratamiento de trastornos**

30 Prioridad:

06.10.2008 US 102919 P

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

10.11.2017

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 N. Charles Street
Baltimore MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**LIU, JUN, O.;
SHIM, JOONG, SUP;
CHONG, CURTIS, R. y
BHAT, SHRIDHAR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 641 471 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

Compuestos de quinolina como inhibidores de la angiogénesis, metionina aminopeptidasa humana, y SirT1, y procedimientos de tratamiento de trastornos

Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica las ventajas de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º de Serie 61/102.919, presentada el 6 de octubre de 2008.

Antecedentes de la invención

La síntesis de proteínas se inicia con un residuo de metionina en células eucariotas, o una metionina formilada en procariontes, mitocondrias y cloroplastos. Para un gran subconjunto de proteínas, el iniciador metionina se elimina cotraduccionalmente antes de la modificación adicional posterior a la traducción. La eliminación proteolítica de la metionina N-terminal es catalizada por una familia de enzimas conocidas como metionina aminopeptidasas (MetAP). Las funciones de estas enzimas están evolutivamente conservadas y son esenciales, como lo demuestra el fenotipo letal del mutante nulo *map* en las bacterias. Aunque solo un gen MetAP está presente en el genoma de la mayoría, pero no de todos, los procariontes, al menos dos tipos de MetAP, tipo I y tipo II, se conocen en las células eucariotas. En la levadura en germinación *Saccharomyces cerevisiae*, la delección de ScMetAP1 o ScMetAP2 dio como resultado un fenotipo de crecimiento lento en comparación con la cepa de tipo silvestre, mientras que el doble mutante es no viable, indicando las funciones redundantes pero esenciales de ambos tipos de MetAP (Chang, Y. H., y col. (1992) J. Biol. Chem. 267, 8007-8011; Li, X. & Chang, Y. H. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 92, 12357-12361). En los organismos multicelulares, se ha demostrado que MetAP2 es esencial para la proliferación y desarrollo de tejidos específicos (Boxem, M., y col. (2004) FEBS Lett. 576, 245-250; Cutforth, T. & Gaul, U. (1999) Mech. Dev. 82, 23-28).

El MetAP2 humano ha sido identificado como el objetivo primario de la familia de productos naturales de fumagilina que inhiben potentemente la angiogénesis (Griffith, E. C., y col. (1997) Chem. Biol. 4, 461-471; Sin, N., y col. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 6099-6103). Un análogo sintético de fumagilina, TNP-470 con mayor potencia y menor toxicidad, ha entrado en ensayos clínicos para una diversidad de cánceres (Ingber, D., y col. (1990) Nature 348, 555-557; Satchi-Fainaro, R., y col. (2005) Cancer Cell 7, 251-261). Actualmente existen muchas pruebas que apoyan la noción de que HsMetAP2 desempeña un papel importante en la proliferación de células endoteliales y es probable que medie la inhibición de las células endoteliales por fumagilina y análogos relacionados (Griffith, E. C., y col. (1997) Chem. Biol. 4, 461-471; Sin, N., y col. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 6099-6103; Yeh, J. R., y col. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103, 10379-10384).

La angiogénesis puede definirse como el desarrollo de un suministro de sangre a una zona dada de tejido. El desarrollo de un suministro de sangre puede ser parte del desarrollo embrionario normal, representar la revascularización de un lecho de herida, o implicar la estimulación del crecimiento del vaso por células inflamatorias o neoplásicas. A veces la angiogénesis se define como la proliferación de nuevos capilares de los vasos sanguíneos preexistentes. El nuevo crecimiento de tejido blando requiere una nueva vascularización, y el concepto de angiogénesis es un componente clave del crecimiento tisular y, en particular, un punto clave de intervención en el crecimiento de tejido patológico.

La angiogénesis es un proceso fundamental necesario para el desarrollo embrionario, el crecimiento posterior y la reparación tisular. La angiogénesis es un requisito previo para el desarrollo y diferenciación del árbol vascular, así como para una amplia diversidad de procesos fisiológicos fundamentales incluyendo la embriogénesis, el crecimiento somático, la reparación y regeneración de tejidos y órganos, el crecimiento cíclico del cuerpo lúteo y el endometrio y el desarrollo y la diferenciación del sistema nervioso. En el sistema reproductor femenino, la angiogénesis se produce en el folículo durante su desarrollo, en el cuerpo lúteo después de la ovulación y en la placenta para establecer y mantener el embarazo. La angiogénesis se produce adicionalmente como parte de los procesos de reparación del cuerpo, por ejemplo, en la cicatrización de heridas y fracturas.

Se piensa que tanto la angiogénesis controlada como la no controlada avanzan de una manera similar. Las células endoteliales y los pericitos, rodeados por una membrana basal, forman vasos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal por las enzimas liberadas por las células endoteliales y los leucocitos. Las células endoteliales, que recubren el lumen de los vasos sanguíneos, luego sobresalen a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana basal erosionada. Las células migratorias forman un "brote" del vaso sanguíneo parental, donde las células endoteliales sufren mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar bucles capilares, creando nuevos vasos sanguíneos. La creación del nuevo sistema microvascular puede iniciar o exacerbar enfermedades.

La ciencia médica ha reconocido que la angiogénesis es un factor importante en la iniciación y/o proliferación de un gran número de diversas enfermedades. Bajo condiciones fisiológicas normales, los seres humanos y otros animales solo sufren angiogénesis en situaciones muy específicas y restringidas. Por ejemplo, la angiogénesis se observa normalmente en la cicatrización de heridas, el desarrollo fetal y embrionario, y en la formación del cuerpo lúteo, el endometrio y la placenta. Se ha encontrado que el proceso de angiogénesis está alterado en una serie de patologías

y, en muchos casos, el daño patológico asociado con la enfermedad está relacionado con la angiogénesis no controlada. Desde que se presentó por primera vez hace más de treinta años, la hipótesis de que la angiogénesis es necesaria para el crecimiento tumoral y la metástasis ha obtenido un amplio soporte experimental (Folkman, J. (1971) *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186, Hanahan, D. & Folkman, J. (1996) *Cell* 86, 353-364). Por ejemplo, la angiogénesis es un factor en el crecimiento tumoral, ya que un tumor debe estimular continuamente el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares para crecer. La angiogénesis es una parte esencial del crecimiento del cáncer sólido humano, y la angiogénesis anormal está asociada con otras enfermedades tales como artritis reumatoide, la psoriasis, y la retinopatía diabética (Folkman, J. y Klagsbrun, M., *Science* 235:442-447,(1987)). Además del crecimiento tumoral y la metástasis, la angiogénesis también ha estado implicada en artritis reumatoide, retinopatía diabética y degeneración macular, lo que sugiere que la inhibición de la angiogénesis puede ser útil para el tratamiento de estos trastornos (Carmeliet, P. (2003) *Nat. Med.* 9, 653-660).

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, ha estado implicada en la patogénesis de varias enfermedades humanas importantes, incluyendo cáncer, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad. La inhibición de la angiogénesis está emergiendo como una nueva estrategia eficaz para el tratamiento de enfermedades dependientes de la angiogénesis. Una de las clases más potentes de inhibidores de moléculas pequeñas es de la familia de las fumagilinas. Se ha demostrado que la fumagilina, su análogo sintético TNP-470, y la ovalicina se unen específicamente a metionina aminopeptidasa de tipo 2 (MetAP2). En un mecanismo que queda por dilucidarse completamente, la inhibición de MetAP2 por estos pequeños inhibidores de moléculas condujo a la activación transcripcional de p53, que a su vez activa la expresión de p21 que inhibe la ciclina E · Cdk2, lo que explica el bloqueo del ciclo celular por estos inhibidores. Desde la identificación de MetAP2 como la diana para la fumagilina y la ovalicina, se han hecho varios intentos para encontrar inhibidores nuevos y reversibles de esta enzima a través de la modificación estructural de la fumagilina o el cribado de alto rendimiento.

Claramente, el desarrollo y el progreso de muchas enfermedades pueden controlarse controlando el proceso de angiogénesis, y en particular, a través de la inhibición de MetAP. Existe una necesidad de procedimientos y materiales capaces de controlar e inhibir la angiogénesis de una manera fiable. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar compuestos y composiciones farmacéuticas que muestren actividad como inhibidores de la angiogénesis.

Sumario de la Invención

En un aspecto, la invención proporciona nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga.

En una cierta realización, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso como se ha mencionado anteriormente, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de metionina aminopeptidasa de tipo 2.

En otra realización, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso como se ha mencionado anteriormente, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de SirT1.

En otra realización, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con metionina aminopeptidasa, SirT1, angiogénesis o neoplasia en un sujeto, que comprende además un agente terapéutico adicional.

En otra realización, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con metionina aminopeptidasa, SirT1, angiogénesis o neoplasia en un sujeto como se ha mencionado anteriormente, en la que el agente terapéutico es un compuesto inhibidor de metionina aminopeptidasa. En una realización adicional, dicho agente terapéutico adicional es un compuesto inhibidor de SirT1. En otra realización, dicho agente terapéutico adicional es un compuesto anticanceroso.

En otra realización, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga como se ha mencionado anteriormente, para administración oral, tópica, parental, intravenosa o intramuscular.

En otra realización, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga como se ha mencionado anteriormente, en la que el sujeto es un ser humano.

En otra realización, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga como se ha mencionado anteriormente, en la que dicha neoplasia es cáncer de mama. En una realización adicional dicha neoplasia es cáncer de próstata. En otra realización más, dicha neoplasia es cáncer de vejiga. En otra realización más dicha neoplasia es cáncer de riñón.

En una realización adicional, la invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga como se ha mencionado anteriormente, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de la angiogénesis.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efectos de nitroxolina en las actividades de la enzima MetAP y la proliferación celular.

Figura 2. Efectos de la nitroxolina sobre la función in vivo de MetAP-2. **A**, inhibición selectiva de la función de MetAP-2 por nitroxolina en levaduras. Las levaduras de tipo silvestre (WT) y mutantes se trataron con nitroxolina o IV-43 a las concentraciones de 0, 0,2, y 2 nmol en cada disco de papel durante 24 h. TNP-470 se trató en las concentraciones de 0, 0,1, 1 nmol durante 24 h. **B**, Inhibición del procesamiento de metionina N-terminal de 14-3-3 γ en HUVEC por nitroxolina, MetAP2-siRNA, o TNP-470. Las HUVEC se trataron con nitroxolina o TNP-470 durante 24 h y se detectó 14-3-3 γ metionilado N-terminal usando un anticuerpo específico. Para el experimento de desactivación de MetAP2, las HUVEC se transfectaron con diferentes concentraciones de MetAP2-siRNA durante 48 h y se cosecharon para transferencia de western.

Figura 3. Comparación del efecto entre nitroxolina y TNP470 sobre la ruta p53 en HUVEC. **A**, las HUVEC se trataron con inhibidor de MetAP2 para los puntos de tiempo indicados y se realizó la transferencia de Western usando anticuerpos específicos contra cada proteína de interés. Rb (12 %) y Rb (8 %) representan transferencias de Western de Rb después de la realización con el 12 % y el 8 % de SDS-PAGE, respectivamente. **B**, Las HUVEC se trataron con control de vehículo (**C**), nitroxolina 5 μ M (**N**) o TNP-470 10 nM (**T**) para los puntos de tiempo indicados. Las células se analizaron a continuación por transferencia de Western de p53 y p21. Se usó GAPDH como control interno. **C**, Las HUVEC se trataron con control de vehículo (**C**), nitroxolina 5 μ M (**N**) o TNP-470 10 nM (**T**) para los puntos de tiempo indicados. El ARN total se aisló de las células y se analizó por RT-PCR de p53, p21 y GAPDH usando pares de cebadores específicos.

Figura 4. Inducción de senescencia prematura de HUVEC por nitroxolina. **A**, Actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) en HUVEC. Las células se trataron con cada fármaco durante 5 días y se midió la actividad SA- β -gal. Para los ensayos de reversibilidad (denominados nitroxolina-R y ácido valproico-R), las células se trataron con cada fármaco durante 3 días, se lavaron con PBS tres veces y se incubaron con medio recién preparado durante 2 días adicionales. Las imágenes se tomaron como escenas representativas de tres experimentos independientes. **B**, Se cuantificó la inducción de la senescencia de HUVEC contando las células teñidas con SA- β -gal frente a las células totales después de haber sido fotografiadas bajo el microscopio. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes.

Figura 5. La nitroxolina inhibe las actividades de la sirtuina. **A**, Inducción de la acetilación de p53 en la lisina 382 por nitroxolina. Las HUVEC se trataron con nitroxolina (NIT) y otros compuestos durante 6 h o 20 h, y se analizó el estado de acetilación de p53 (K382), α -tubulina e histona-H3 usando anticuerpos específicos. **B**, Efecto de la nitroxolina en las actividades de la sirtuina. Se utilizaron sirtuinas humanas recombinantes y sus sustratos péptidicos fluorogénicos preferidos para el ensayo enzimático como se describe en Materiales y procedimientos. Los valores estimados de CI₅₀ de SirT1, SirT2 y SirT3 fueron 8,5, 35 y >50 μ M, respectivamente. **C**, Inducción bifásica, dependiente de la dosis, de la acetilación de p53 por nitroxolina. Las HUVEC se trataron con diversas concentraciones de nitroxolina durante 20 horas y el estado de acetilación de sustratos de sirtuina endógenos se analizó mediante transferencias de Western. **D**, El nivel de acetilación y la proteína p53 total en cada carril se normalizó por el nivel de α -tubulina. La intensidad de cada banda proteica se cuantificó usando el software ImageJ.

Figura 6. El efecto de la nitroxolina imita la inhibición concurrente de MetAP2 y SirT1 en HUVEC. **A**, Efectos de la nitroxolina sobre el estado de acetilación de diversos sustratos de sirtuina en presencia o ausencia de inhibidor de la histona desacetilasa de clase I. Las HUVEC se trataron con 0, 1, 5 y 20 μ M de nitroxolina con o sin TSA (200 nM) durante 24 h. **B**, Las HUVEC se trataron con 0, 5 y 15 μ M de EX527 con o sin TSA (200 nM) durante 24 h. **C**, La desactivación de SirT1 y MetAP2 imita los efectos de la nitroxolina en la acetilación de p53. Se introdujeron dos oligos de ARNsi diferentes contra el ARNm de SirT1 (ARNsi n.º 1 y n.º 3) en HUVEC usando el reactivo HiperFect y el estado de acetilación de p53 (K382) y la α -tubulina se analizó mediante transferencia de Western. Las HUVEC se transfectaron con oligos de ARNsi designados durante 24 h y se trataron con vehículo o compuestos durante 24 h más. Las células se cosecharon entonces para el análisis por transferencia de Western. **D**, La inhibición farmacológica de SirT1 y MetAP2 imita los efectos de la nitroxolina sobre la acetilación de p53. Las HUVEC se trataron con 0, 0,2 y 2 μ M de EX527 en presencia o ausencia de TNP470 (10 nM) o TSA (200 nM) durante 20 h. El estado de acetilación de p53 (K382) y α -tubulina se analizó mediante transferencia de Western.

Figura 7. La inhibición concurrente de MetAP2 y SirT1 actúa sinérgicamente sobre la proliferación y la senescencia de HUVEC. **A**, Inducción sinérgica de la acetilación de p53 por inhibición concurrente de MetAP2 y SirT1. Las HUVEC se trataron con diversas concentraciones de EX527 con o sin TNP470 10 nM durante 24 h. El nivel de proteína p53 total (**B**) y acetilación (**C**) en cada carril se normalizó por el nivel de α -tubulina. La intensidad de cada banda proteica se cuantificó usando el software ImageJ. **D**, Efectos de TNP470 y EX527 sobre la senescencia de HUVEC. Las HUVEC se trataron con cada compuesto o combinación de fármacos durante 5 días y se realizó la tinción con SA- β -gal como se ha descrito anteriormente. **E**, Inhibición sinérgica de la proliferación de HUVEC por TNP470 y EX527. La sinergia entre dos fármacos se calculó matemáticamente basándose en la ecuación del Índice de Combinación (CI) de Chou-Talalay (CI = 1, efecto aditivo; <1, sinergia, >1, antagonismo). Los valores de CI para la combinación de fármacos se obtuvieron utilizando el software CompuSyn. Fa representa el valor del efecto (1 = 100 % de inhibición). Cada punto de datos indica 1/8 de CI_{50} , 1/4 de CI_{50} , 1/2 de CI_{50} y valores de CI_{50} de dos combinaciones de fármacos. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos independientes.

Figura 8. Efectos de la nitroxolina sobre la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. **A**, Inhibición de la formación de tubos de HUVEC por nitroxolina o combinación de fármacos de MetAP2 e inhibidores de SirT1 *in vitro*. Las HUVEC se pusieron sobre Matrigel pre-solidificado en presencia o ausencia de cada compuesto y se incubaron durante 24 h. Las estructuras tubulares se tiñeron con calceína-AM y se observaron bajo un microscopio fluorescente. **B**, Se cuantificó la longitud total del tubo utilizando el software de análisis de imágenes AngioQuant. **C**, Se realizó ensayo de tapón de Matrigel *in vivo* utilizando ratones sin pelo atímicos hembra. Los ratones (n = 5/grupo) se trataron con vehículo o nitroxolina (60 mg/kg/día) durante 10 días a través de inyección i.p. Los tapones de matrigel se extrajeron a continuación de los ratones y se tiñeron con MAS-Tricromo. Los tapones de Matrigel representativos se mostraron macroscópicamente (**C**) y microscópicamente (**D**). Las puntas de flecha indican vasos sanguíneos llenos de eritrocitos. **E**, Los vasos sanguíneos de los tapones de Matrigel se contaron y se cuantificaron bajo un microscopio de contraste de fase. * $P \leq 0,001$ frente a control de vehículo.

Figura 9. Efectos de la nitroxolina sobre el crecimiento tumoral del xenoinjerto y la angiogénesis. **A**, Las células de cáncer de mama humano HCC1954 se trasplantaron en ratones sin pelo atímicos hembras. Después de que los tumores se hicieran palpables, los ratones se trataron con vehículo o nitroxolina (60 mg/kg) a través de inyección i.p. cada dos días. El volumen tumoral se midió cada tres días como se describe en los Procedimientos. * $P = 0,034$ y # $P = 0,012$ frente a control de vehículo. **B**, Se mostraron los pesos medios de los tumores de ratones tratados con vehículo y con nitroxolina. * $P = 0,036$ frente a control de vehículo. **C**, El nivel de p53 total y el estado de acetilación de p53 (K382) en muestras de tumor procedentes de grupos de control de vehículo y tratados con nitroxolina se muestran mediante transferencia de Western. **D**, Se mostró la tinción inmunohistoquímica (IHC) de CD31 en las secciones de tejido tumoral. MOCK representa la IHC sin anticuerpo primario (CD31). **E**, Se cuantificó el número total de vasos sanguíneos presentes en los datos de IHC contando el número de vasos teñidos por campo. * $P = 0,04$ frente a control de vehículo.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

A continuación se enumeran las definiciones de diversos términos usados para describir la presente invención. Estas definiciones se aplican a los términos tal como se usan a lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que se limiten en casos específicos, individualmente o como parte de un grupo más grande.

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada que contienen, en ciertas realizaciones, entre uno y seis, o uno y ocho átomos de carbono, respectivamente. Los ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero sin limitación, radicales metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, *tert*-butilo, neopentilo, n-hexil heptilo, octilo.

El término "alquenilo", como se usa en el presente documento, representan un grupo monovalente derivado de un resto de hidrocarburo que contiene, en ciertas realizaciones, de dos a seis, o de dos a ocho átomos de carbono que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono. El doble enlace puede o no ser el punto de unión a otro grupo. Los grupos alquenilo incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, heptenilo, octenilo y similares.

El término "alquinilo", como se usa en el presente documento, representan un grupo monovalente derivado de un resto de hidrocarburo que contiene, en ciertas realizaciones, de dos a seis, o de dos a ocho átomos de carbono que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono. El grupo alquinilo puede o no ser el punto de unión a otro grupo. Los grupos alquinilo representativos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, heptinilo, octinilo y similares.

El término "cicloalquilo" o "carbocíclico" se usan indistintamente, y como se usa en el presente documento, representa un grupo monovalente derivado de un compuesto de anillo carbocíclico saturado monocíclico o policíclico. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentilo y ciclooctilo; biciclo [2.2.1]heptilo, y biciclo [2.2.2]octilo. También se contemplan un grupo monovalente derivado de un compuesto de anillo carbocíclico monocíclico o policíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un único átomo de hidrógeno. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero sin limitación,

ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo, y similares.

El término "arilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema anular carbocíclico mono o policíclico que tiene uno o más anillos aromáticos, condensados o no condensados, incluyendo, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares.

- 5 El término "aralquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un residuo alquilo unido a un anillo de arilo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, bencilo, fenetilo y similares.

10 El término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical o sistema anular mono o policíclico (por ejemplo, bi o tricíclico o más) condensado o no condensado, que tiene al menos un anillo aromático, que tiene de cinco a diez átomos en el anillo de los cuales un átomo en el anillo se selecciona entre S, O y N; cero, uno o dos átomos en el anillo son heteroátomos adicionales seleccionados independientemente entre S, O y N; y el resto de átomos en el anillo son carbono. Heteroarilo incluye, pero sin limitación, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isooxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, benzooxazolilo, quinoxalinilo, y similares.

15 El término "heteroaralquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un residuo alquilo unido a un anillo heteroarilo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, piridinilmetilo, pirimidiniletilo y similares.

20 El término "heterocicloalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo no aromático de 3, 4, 5, 6 o 7 miembros o un sistema condensado de un grupo bi o tricíclico, donde (i) cada anillo contiene entre uno y tres heteroátomos seleccionados independientemente entre oxígeno, azufre y nitrógeno, (ii) cada anillo de 5 miembros tiene de 0 a 1 dobles enlaces y cada anillo de 6 miembros tiene de 0 a 2 dobles enlaces, (iii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, (iv) el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, y (v) cualquiera de los anillos anteriores puede estar condensado a un anillo de benceno. Los grupos heterocicloalquilo representativos incluyen, pero sin limitación, [1,3]dioxolano, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, y tetrahidrofurilo.

25 Como se describe en el presente documento, los compuestos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tal como se ilustran en general anteriormente, o como se ilustran por clases, subclases, y especies particulares de la invención. Se apreciará que la expresión "opcionalmente sustituido" se usa de forma intercambiable con la expresión "sustituido o sin sustituir". En general, el término "sustituido", ya esté precedido o no por el término "opcionalmente", se refiere al reemplazo de radicales hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado. A menos que se indique otra cosa, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en cada posición sustituible del grupo, y cuando puede sustituirse más de una posición en cualquier estructura dada con más de un sustituyente seleccionado entre un grupo especificado, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Las expresiones "opcionalmente sustituido", "alquilo opcionalmente sustituido", "opcionalmente sustituido" "alquenilo opcionalmente sustituido", "alquinilo opcionalmente sustituido", "cicloalquilo opcionalmente sustituido", "cicloalquenilo opcionalmente sustituido", "arilo opcionalmente sustituido", "heteroarilo opcionalmente sustituido" "aralquilo opcionalmente sustituido", "heteroaralquilo opcionalmente sustituido", "heterocicloalquilo opcionalmente sustituido" y cualquier otro grupo opcionalmente sustituido como se usa en el presente documento, se refieren a grupos que están sustituidos o sin sustituir por reemplazos independientes de uno, dos, o tres o más de los átomos de hidrógeno en los mismos con sustituyentes que incluyen, pero sin limitación:

40 -F, -Cl, -Br, -I,
-OH, hidroxilo protegido,
-NO₂, -CN,
-NH₂, amino protegido, -NH -alquilo C₁-C₁₂, -NH -alquenilo C₂-C₁₂, -NH -alquenilo C₂-C₁₂, -NH -cicloalquilo C₃-C₁₂,
-NH -arilo, -NH -heteroarilo, -NH - heterocicloalquilo, -dialquilamino, -diarilamino, -diheteroarilamino,
45 -O-alquilo C₁-C₁₂, -O-alquenilo C₂-C₁₂, -O-alquenilo C₂-C₁₂, -O-cicloalquilo C₃-C₁₂, -O-arilo, -O-heteroarilo, -O-heterocicloalquilo,
-C(O)- alquilo C₁-C₁₂, -C(O)- alquenilo C₂-C₁₂, -C(O)- alquenilo C₂-C₁₂, -C(O)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -C(O)-arilo, -C(O)-heteroarilo, -C(O)-heterocicloalquilo,
50 -CONH₂, -CONH- alquilo C₁-C₁₂, -CONH- alquenilo C₂-C₁₂, -CONH- alquenilo C₂-C₁₂, -CONH-cicloalquilo C₃-C₁₂,
-CONH-arilo, -CONH-heteroarilo, -CONH-heterocicloalquilo,
-OCO₂- alquilo C₁-C₁₂, -OCO₂- alquenilo C₂-C₁₂, -OCO₂- alquenilo C₂-C₁₂, -OCO₂-cicloalquilo C₃-C₁₂, -OCO₂-arilo,
-OCO₂-heteroarilo, -OCO₂-heterocicloalquilo, -OCONH₂, -OCONH- alquilo C₁-C₁₂, -OCONH- alquenilo C₂-C₁₂, -OCONH- alquenilo C₂-C₁₂, -OCONH- cicloalquilo C₃-C₁₂, -OCONH- arilo, -OCONH- heteroarilo, -OCONH-heterocicloalquilo,
55 -NHC(O)- alquilo C₁-C₁₂, -NHC(O)-alquenilo C₂-C₁₂, -NHC(O)-alquenilo C₂-C₁₂, -NHC(O)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(O)-arilo, -NHC(O)-heteroarilo, -NHC(O)-heterocicloalquilo, -NHCO₂- alquilo C₁-C₁₂, -NHCO₂- alquenilo C₂-C₁₂, -NHCO₂- alquenilo C₂-C₁₂, -NHCO₂- cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHCO₂- arilo, -NHCO₂- heteroarilo, -NHCO₂- heterocicloalquilo, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NH- alquilo C₁-C₁₂, -NHC(O)NH-alquenilo C₂-C₁₂, -NHC(O)NH-alquenilo C₂-C₁₂, -NHC(O)NH- cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(O)NH-arilo, -NHC(O)NH-heteroarilo, -NHC(O)NH-heterocicloalquilo, NHC(S)NH₂, -NHC(S)NH- alquilo C₁-C₁₂, -NHC(S)NH-alquenilo C₂-C₁₂, -NHC(S)NH-alquenilo

5 C₂-C₁₂, -NHC(S)NH- cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(S)NH-arilo, -NHC(S)NH-heteroarilo, -NHC(S)NH-heterocicloalquilo, -NHC(NH)NH₂, -NHC(NH)NH- alquilo C₁-C₁₂, -NHC(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(NH)NH-arilo, -NHC(NH)NH-heteroarilo, -NHC(NH)NH-heterocicloalquilo, -NHC(NH)-alquilo C₁-C₁₂, -NHC(NH)-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)-alqueno C₂-C₁₂, -NHC(NH)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHC(NH)-arilo, -NHC(NH)-heteroarilo, -NHC(NH)-heterocicloalquilo, -C(NH)NH-alquilo C₁-C₁₂, -C(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -C(NH)NH-alqueno C₂-C₁₂, -C(NH)NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -C(NH)NH-arilo, -C(NH)NH-heteroarilo, -C(NH)NH-heterocicloalquilo, -S(O)-alquilo C₁-C₁₂, -S(O)-alqueno C₂-C₁₂, -S(O)-alqueno C₂-C₁₂, -S(O)-cicloalquilo C₃-C₁₂, -S(O)-arilo, -S(O)-heteroarilo, -S(O)-heterocicloalquilo -SO₂NH₂, -SO₂NH-alquilo C₁-C₁₂, -SO₂NH-alqueno C₂-C₁₂, -SO₂NH-alqueno C₂-C₁₂, -SO₂NH-cicloalquilo C₃-C₁₂, -SO₂NH- arilo, -SO₂NH- heteroarilo, -SO₂NH- heterocicloalquilo, -NHSO₂-alquilo C₁-C₁₂, -NHSO₂-alqueno C₂-C₁₂, -NHSO₂-alqueno C₂-C₁₂, -NHSO₂-cicloalquilo C₃-C₁₂, -NHSO₂-arilo, -NHSO₂-heteroarilo, -NHSO₂-heterocicloalquilo, -CH₂NH₂, -CH₂SO₂CH₃, -arilo, -arilalquilo, -heteroarilo, -heteroarilalquilo, -heterocicloalquilo, -cicloalquilo C₃-C₁₂, poli-alcoxialquilo, polialcoxi, -metoximatoxi, -metoxietoxi, -SH, -S-alquilo C₁-C₁₂, -S-alqueno C₂-C₁₂, -S-alqueno C₂-C₁₂, -S-cicloalquilo C₃-C₁₂, -S-arilo, -S-heteroarilo, -S-heterocicloalquilo, o metiltiometo.

Se entiende que los arilos, heteroarilos, alquilos, y similares pueden estar sustituidos adicionalmente. De acuerdo con la invención, cualquiera de los arilos, arilos sustituidos, heteroarilo y heteroarilos sustituidos descritos en el presente documento, pueden ser cualquier grupo aromático. Los grupos aromáticos pueden estar sustituidos o sin sustituir.

20 Los términos "hal", "halo" y "halógeno", se usan de forma intercambiable, y como se usa en el presente documento, se refieren a un átomo seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un mamífero. Por lo tanto, un sujeto se refiere a, por ejemplo, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, cobayas, y similares. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Cuando el sujeto es un ser humano, el sujeto puede denominarse en el presente documento como un paciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales de los compuestos formados por el procedimiento de la presente invención que son, dentro del ámbito del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y están acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge, y col. describe sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos de la invención, o por separado haciendo reaccionar la función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácidos no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros procedimientos usados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, *p*-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario, y cationes de amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, sulfonato y sulfonato de arilo.

La expresión "cantidad eficaz" se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir concentraciones o cantidades de compuestos de acuerdo con la presente invención que pueden usarse para producir un cambio favorable en la enfermedad o afección tratada, ya sea el cambio una remisión, un descenso del crecimiento o tamaño del cáncer, tumor u otro crecimiento, un resultado fisiológico favorable, incluyendo el aclaramiento de la piel o del tejido, o similares, dependiendo de la enfermedad o afección tratada.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene", "prevención" y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto que no tiene, pero que está en riesgo o es susceptible de desarrollar un trastorno o afección.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados con el mismo. Se apreciará que, aunque no se excluye, tratar un trastorno o afección no requiere que el trastorno, la afección o los síntomas asociados con los mismos sean eliminados completamente.

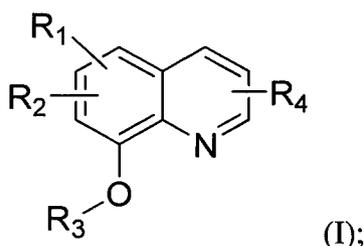
Como se usa en el presente documento, las expresiones "compuesto anti-angiogénico" y "compuesto inhibidor de la angiogénesis" pueden usarse indistintamente. La angiogénesis se usa a lo largo de la memoria descriptiva para describir los procesos biológicos que dan como resultado el desarrollo de vasos sanguíneos o el aumento de la vascularidad del tejido en un organismo. La angiogénesis persistente y no regulada se produce en una multiplicidad de patologías, metástasis tumoral y crecimiento anormal de las células endoteliales y soporta el daño patológico visto en estas afecciones. Las diversas patologías creadas debido a la angiogénesis no regulada se han agrupado como enfermedades angiogénicas dependientes o angiogénicas asociadas. Las terapias dirigidas al control de los procesos angiogénicos podrían conducir a la abrogación o mitigación de estas enfermedades.

El término "tumor" se usa para describir un crecimiento anormal en tejido que se produce cuando la proliferación celular es más rápida que el tejido normal y continúa creciendo después de que cesen los estímulos que inician el nuevo crecimiento. Los tumores generalmente presentan una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido que puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (carcinoma). Los tumores tienden a estar altamente vascularizados.

El término "cáncer" se usa como un término general en el presente documento para describir tumores malignos o carcinoma. Estos tumores malignos pueden invadir tejidos circundantes, pueden metastatizar a varios sitios y es probable que se repitan después de intento de extracción y causar la muerte del paciente a menos que se traten adecuadamente. Como se usa en el presente documento, los términos carcinoma y cáncer están incluidos bajo el término tumor. Los procedimientos de tratamiento de tumores y/o cáncer de acuerdo con la presente invención comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de uno o compuestos de acuerdo con la presente invención.

II. Compuestos de la invención

En un aspecto un compuesto de fórmula I se describe:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

R₁ es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, o SO₃R_A;

R₂ es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, SO₃R_A, o SR_A;

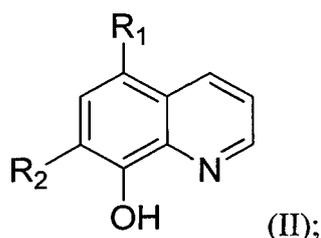
R₄ es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, o SO₃R_A;

R₃ es H, C(O)R_B, C(O)OR_B, C(O)NHR_B, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

cada R_A es independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y

cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, o un arilo opcionalmente sustituido.

Se describe además un compuesto de fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que,

R_1 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, o $SO_3 R_A$;

5 R_2 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

cada R_A es independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y

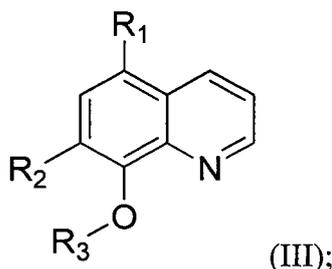
cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, o un arilo opcionalmente sustituido.

10 Además, R_1 se describe como H, nitro, Cl, Br, o $SO_3 H$.

Además, R_2 se describe como H o un alquilo opcionalmente sustituido.

También se desvela que R_2 es metilo que está opcionalmente sustituido con uno o más de fenilo, naftilo, antraceno, fluoreno, indeno, azuleno; piridilo, 1-oxo-piridilo, furano, benzo[1,3]dioxolilo, benzo[1,4]dioxinilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, triazolilo, tiadiazolilo, isoquinolinilo, indazolilo, benzoxazolilo, benzofurilo, indolizínilo, imidazopiridilo, tetrazolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzoxadiazolilo, indolilo, tetrahidroindolilo, azaindolilo, indazolilo, imidazopiridilo, quinazolinilo, purinilo, pirrolo[2,3]pirimidinilo, pirazolo[3,4] pirimidinilo, benzo(b)tienilo; ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, aziridinilo, oxiranilo, azetidínilo, oxetanilo; piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxo pirrolidinilo, 4-piperidonilo, tetrahidropirano, oxazolidinilo, 2-oxo-oxazolidinilo, tetrahidrotioperano, tetrahidrotioperano sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinil sulfóxido, tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolano, tetrahidrofuranilo, o tetrahidrotienilo; cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. Además, R_2 se describe como metilo que está opcionalmente sustituido con uno o más de alquilo, alquenilo, hidroxilo, o $NR_A R_A$.

También se describe un compuesto de fórmula III:



25

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

R_1 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, o $SO_3 R_A$;

30 R_2 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

35 R_3 es $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, $C(O)NHR_B$, un alquilo opcionalmente sustituido, o un alquenilo opcionalmente sustituido;

cada R_A es independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y

cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, o un arilo opcionalmente sustituido.

Además, R_1 se describe como H, nitro, Cl, Br, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo

40 opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, o $SO_3 R_A$.

Además, R_1 se describe como un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido. Además, R_1 se describe como opcionalmente sustituido con uno o más de fenilo, naftilo, antraceno, fluoreno, indeno, azuleno; piridilo, 1-oxo-piridilo, furano, benzo[1,3]dioxolilo, benzo[1,4]dioxinilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, triazolilo, tiadiazolilo, isoquinolinilo, indazolilo, benzoxazolilo, benzofurilo, indolizínilo, imidazopiridilo, tetrazolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzoxadiazolilo, indolilo, tetrahidroindolilo, azaindolilo, indazolilo, imidazopiridilo, quinazolinilo, purinilo, pirrolo[2,3]pirimidinilo, pirazolo[3,4] pirimidinilo, benzo(b)tienilo; ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, aziridinilo, oxiranilo, azetidínilo, oxetanilo; piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-

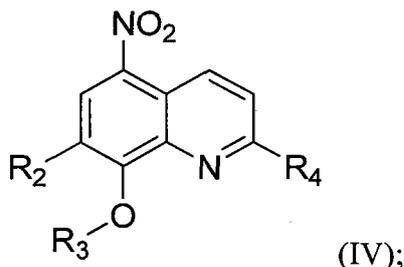
45

oxopiperidinilo, 2-oxo pirrolidinilo, 4-piperidonilo, tetrahidropiranilo, oxazolidinilo, 2-oxo-oxazolidinilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidrotiopiranil sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinil sulfóxido, tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolano, tetrahidrofuranoilo, o tetrahidrotienilo; cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

Adicionalmente, R_2 se describe como H, nitro, Cl, o Br.

- 5 Además, R_3 se describe como $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, $C(O)NHR_B$, un alquilo opcionalmente sustituido o un alquenilo opcionalmente sustituido. En una realización más, R_3 es un etilo opcionalmente sustituido, alilo, o $C(O)NHR_B$, en la que R_B es un fenilo opcionalmente sustituido o alquilo opcionalmente sustituido.

Además se describe un compuesto de fórmula IV:



- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

R_2 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, o $SO_3 R_A$;

- 15 R_4 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, o $SO_3 R_A$;

R_3 es H, $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, $C(O)NHR_B$, un alquilo opcionalmente sustituido, o un alquenilo opcionalmente sustituido;

- 20 cada R_A es independientemente H, o un alquilo opcionalmente sustituido; y

cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, o un arilo opcionalmente sustituido.

Además, R_2 se describe como H o nitro.

Además, R_4 se describe como H o un alquilo opcionalmente sustituido.

Además, R_3 se describe como H, $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, o un alquilo opcionalmente sustituido.

- 25 Ciertos compuestos como se describen en el presente documento pueden existir en una geometría particular, formas isoméricas o estereoisoméricas. Se describen compuestos que incluyen isómeros cis y trans, enantiómeros R y S, racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales, mezclas diastereoméricas, diastereómeros, isómeros (D), isómeros (L), las mezclas racémicas de los mismos, y otras mezclas de los mismos, como dentro del ámbito de la invención. Los compuestos que se describen en el presente documento también
- 30 pueden representarse en múltiples formas tautoméricas (por ejemplo, la alquilación de un sistema de anillo puede dar lugar a alquilación en múltiples sitios). Pueden estar presentes átomos de carbono asimétricos adicionales en un sustituyente tal como un grupo alquilo. Todos estos isómeros enriquecidos, así como sus mezclas racémicas, se describen en el presente documento. Se describen además todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en el presente documento.

- 35 Los compuestos descritos anteriormente se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica, así como por las vías sintéticas desveladas en los ejemplos siguientes.

Los productos químicos utilizados en la ruta de síntesis descrita anteriormente pueden incluir, por ejemplo, disolventes, reactivos, catalizadores y grupos protectores y reactivos del grupo desprotector. Los procedimientos descritos anteriormente también pueden incluir adicionalmente etapas, antes o después de las etapas descritas

40 específicamente en el presente documento, para añadir o eliminar grupos protectores adecuados con el fin de permitir finalmente la síntesis de los compuestos heterocíclicos. Además, las diversas etapas sintéticas pueden realizarse en una secuencia u orden alternativo para dar los compuestos deseados. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de compuestos heterocíclicos aplicables se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, las descritas en R. Larock,

45 Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis,

John Wiley and Sons (1995) y ediciones posteriores de los mismos.

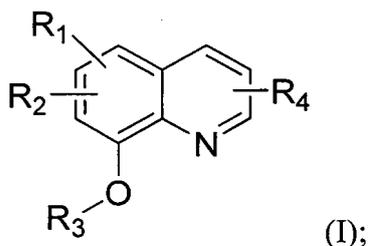
Por consiguiente, los compuestos descritos en el presente documento pueden fabricarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo los de los tratados mencionados anteriormente. Se reconoce por un experto en la técnica que las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, tiempo de reacción, etc.) pueden ajustarse, lo cual es rutinario para un experto en la técnica.

Como puede apreciarse por el experto en la técnica, los procedimientos adicionales de sintetización de los compuestos de las fórmulas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica. Además, las diversas etapas sintéticas pueden realizarse en una secuencia u orden alternativo para dar los compuestos deseados. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos descritos en el presente documento se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, tales como las descritas en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, 2ª Ed., Wiley-VCH Publishers (1999); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1999); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley y Sons (1995), y ediciones posteriores de los mismos.

Los ácidos y bases útiles en los procedimientos del presente documento son conocidos en la técnica. Los catalizadores ácidos son cualquier producto químico ácido, que puede ser inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico, sulfúrico, nítrico, tricloruro de aluminio) u orgánico (por ejemplo, ácido canforsulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido acético, triflato de iterbio) en la naturaleza. Los ácidos son útiles en cantidades catalíticas o estequiométricas para facilitar las reacciones químicas. Las bases son cualquier sustancia química básica, que puede ser inorgánica (por ejemplo, bicarbonato de sodio, hidróxido potásico) u orgánica (por ejemplo, trietilamina, piridina) en la naturaleza. Las bases son útiles en cantidades catalíticas o estequiométricas para facilitar las reacciones químicas. El proceso de conversión se refiere a una o más transformaciones químicas, que pueden realizarse *in situ*, o con aislamiento de compuestos intermedios. Las transformaciones pueden incluir hacer reaccionar los compuestos de partida o intermedios con reactivos adicionales usando técnicas y protocolos conocidos en la técnica, incluyendo los de las referencias citadas en el presente documento. Los intermedios se pueden usar con o sin purificación (por ejemplo, filtración, destilación, cristalización, cromatografía). Otras realizaciones se refieren a los compuestos intermedios delineados en el presente documento, y su uso en los procedimientos (por ejemplo, tratamiento, síntesis) delineados en el presente documento.

III. Procedimientos de tratamiento

En ciertos aspectos, se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con metionina aminopeptidasa o SirT1 en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

R₁ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

R₂ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

R₄ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

R₃ es H, C(O)R_B, C(O)OR_B, C(O)NHR_B, C(O)NR_BR_B, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

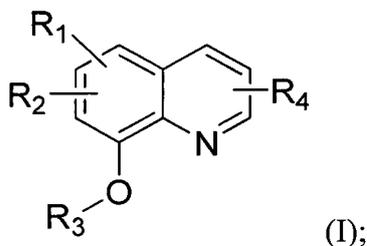
cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; y

5 cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

10 En un aspecto la presente invención se refiere a nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga.

15 En una realización la presente invención proporciona Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de metionina aminopeptidasa de tipo 2.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con metionina aminopeptidasa en un sujeto, en el que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de metionina aminopeptidasa de tipo 2, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I:



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

25 R_1 es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

30 R_2 es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

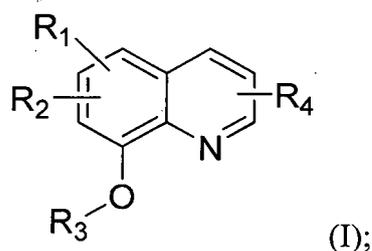
35 R_4 es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

40 R_3 es H, $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, $C(O)NHR_B$, $C(O)NR_B R_B$, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; y

45 cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

En una realización más la presente invención proporciona Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama, y cáncer de vejiga, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de SirT1.

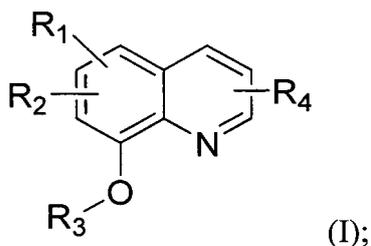
50 Aún en otro aspecto, se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con SirT1 en un sujeto, en el que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de SirT1, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que,

- 5 R₁ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;
- 10 R₂ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;
- 15 R₄ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;
- 20 R₃ es H, C(O)R_B, C(O)OR_B, C(O)NHR_B, C(O)NR_BR_B, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; y cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

- 25 En otros aspectos, se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I:



- 30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que,

- 35 R₁ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;
- 40 R₂ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;
- 45 R₄ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;
- R₃ es H, C(O)R_B, C(O)OR_B, C(O)NHR_B, C(O)NR_BR_B, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un alquinilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

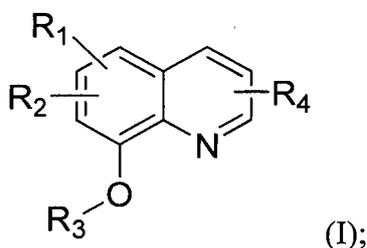
cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; y

5 cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con metionina aminopeptidasa, SirT1, o la angiogénesis se selecciona entre: crecimiento tumoral o de cáncer (neoplasia).

10 En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis es crecimiento tumoral o de cáncer (neoplasia). En una realización más, la enfermedad o trastorno es cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de vejiga, y cáncer renal, ..

En otro aspecto, se describe un procedimiento para inhibir o reducir la metionina aminopeptidasa o SirT1 en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

20 R_1 es H, hidroxil, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

25 R_2 es H, hidroxil, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

30 R_4 es H, hidroxil, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

35 R_3 es H, $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, $C(O)NHR_B$, $C(O)NR_B R_B$, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

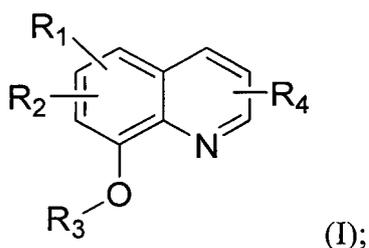
cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; y

cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; en el que dicho compuesto se identifica en un ensayo de cribado.

40 El ensayo de cribado se describe para seleccionarse a partir de un ensayo de enzima MetAP, sincronización de timidina doble, análisis de ciclo celular y transfección de ARNsi, ensayo de incorporación de 3H -timidina, y ensayo de enzima sirtuina. Además, se describe que el ensayo de cribado para seleccionarse de un ensayo de enzima MetAP, ensayo de incorporación de 3H -timidina, y ensayo de enzima sirtuina.

También se describe que el inhibidor tiene una CI_{50} para inhibir la metionina aminopeptidasa de tipo 2 menos de aproximadamente 5 micromolar.

45 En otros aspectos, se describe un procedimiento para inhibir o reducir la angiogénesis en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que,

5 R₁ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

10 R₂ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

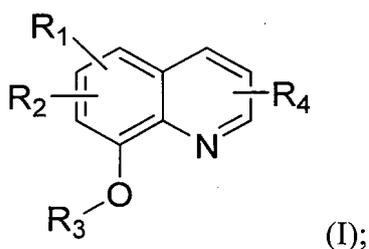
15 R₄ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

20 R₃ es H, C(O)R_B, C(O)OR_B, C(O)NHR_B, C(O)NR_BR_B, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

25 cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; y

cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

25 Aún en otros aspectos, se describe un procedimiento para tratar el crecimiento tumoral, de cáncer, o neoplasia en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I:



30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que,

35 R₁ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

40 R₂ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

45 R₄ es H, hidroxilo, ciano, nitro, azido, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, NR_AR_A, NHR_A, OR_A, SOR_A, SO₂R_A, SO₃R_A, o SR_A;

R₃ es H, C(O)R_B, C(O)OR_B, C(O)NHR_B, C(O)NR_BR_B, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

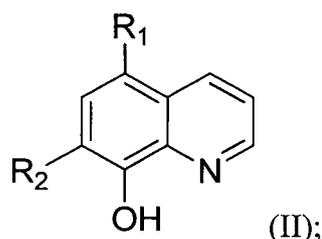
cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido;

y
cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

En una realización, el compuesto nitroxolina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo inhibe la metionina aminopeptidasa de tipo 2 para tratar así el crecimiento tumoral, del cáncer, o neoplasia.

En otra realización, el compuesto nitroxolina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo inhibe SirT1 para tratar así el crecimiento tumoral, del cáncer, o neoplasia.

10 Se describe además un compuesto de fórmula II:



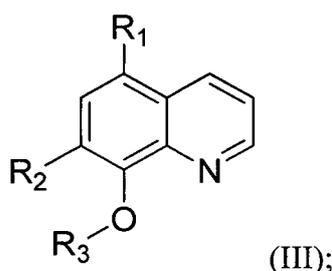
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que,

15 R_1 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

R_2 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ; y

20 cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

También se desvela un compuesto de fórmula III:



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que,

R_1 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

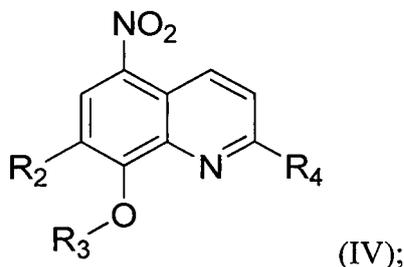
30 R_2 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;

R_3 es $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, $C(O)NHR_B$, $C(O)NR_B R_B$, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

35 cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido; y

40 cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente sustituido.

Además se desvela un compuesto de fórmula IV:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que,

- 5 R_2 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo
opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido,
 $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;
 R_4 es H, nitro, halo, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo opcionalmente sustituido, un arilo
opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido,
10 $NR_A R_A$, NHR_A , OR_A , SOR_A , $SO_2 R_A$, $SO_3 R_A$, o SR_A ;
 R_3 es H, $C(O)R_B$, $C(O)OR_B$, $C(O)NHR_B$, $C(O)NR_B R_B$, un alquilo opcionalmente sustituido, un alquenilo
opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo
opcionalmente sustituido, o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;
cada R_A es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un
15 aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente
sustituido; y
cada R_B es independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un
aralquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocíclico opcionalmente
sustituido.

- 20 En otras realizaciones, la invención proporciona nitroxolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,
para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con metionina aminopeptidasa, SirT1, o la
angiogénesis en un sujeto y que comprende además un agente terapéutico adicional. En una realización más, el
agente terapéutico adicional es un compuesto inhibidor de la angiogénesis. En ciertas realizaciones, el agente
25 terapéutico es un compuesto inhibidor de metionina aminopeptidasa. En otras realizaciones, el agente terapéutico es
un compuesto inhibidor de SirT1. En otras realizaciones, el agente terapéutico adicional es un compuesto contra el
cáncer.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona nitroxolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma
para su uso como se ha descrito anteriormente en la que la etapa de administrar el compuesto comprende
administrar el compuesto por vía oral, tópica, parenteral, intravenosa o intramuscular.

- 30 En una realización más, la etapa de administrar el compuesto comprende administrar el compuesto en una
dosificación de entre aproximadamente 0,1 y 120 mg/kg/día. En ciertas realizaciones, la etapa de administrar el
compuesto comprende administrar el compuesto en una dosificación de menos de aproximadamente 500 mg/día.

En diversas realizaciones de la invención, el sujeto es un ser humano.

- 35 En otros aspectos, la invención proporciona el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para
inhibir la metionina aminopeptidasa de tipo 2 en un paciente, en el que el compuesto es nitroxolina o una sal
farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para inhibir
SirT1 en un paciente, en el que el compuesto es nitroxolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 40 En ciertos aspectos, la invención proporciona el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para
inhibir la angiogénesis en un paciente, en el que el compuesto es nitroxolina o una sal farmacéuticamente aceptable
de la misma.

En ciertos aspectos, la invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso como se ha
definido anteriormente que comprende nitroxolina y un excipiente farmacéuticamente adecuado.

- 45 En otros aspectos, se describe un kit que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I en forma de
dosis unitaria, junto con instrucciones para administrar el compuesto a un sujeto que padece o es susceptible a una
enfermedad relacionada con aminopeptidasa de metionina, relacionada con SirT1 o relacionada con la angiogénesis.

Las enfermedades o trastornos tratados, mejorados o evitados por la presente invención incluyen los siguientes:

neoplasia, neoplasias internas tales como cáncer de ojo u ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de vejiga, tumores benignos y malignos, incluyendo diversos cánceres, tal como renal prostático, y cáncer de riñón.

5 La inhibición de la angiogénesis en el tratamiento o la inversión de la patología o afección es un aspecto importante de la presente invención. Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos para su uso en la inhibición del crecimiento de neoplasia, incluyendo un tumor o cáncer maligno que comprende exponer la neoplasia a una cantidad o concentración inhibidora o terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos desvelados. Este enfoque puede usarse terapéuticamente, en el tratamiento de neoplasias, incluyendo cáncer o en ensayos de comparación tales como ensayos para determinar las actividades de análogos relacionados, así como para determinar la susceptibilidad de un paciente de cáncer a uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención. El tratamiento de neoplasias internas tales como cáncer de ojo u ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de vejiga, entre otros muchos, y neoplasias orales también se contemplan en la presente invención.

15 Los compuestos inhibidores de la angiogénesis de la presente invención se usan para tratar, mejorar o prevenir tumores benignos y malignos, incluyendo diversos cánceres tales como, cervical, colon, vejiga, rectal, mama, renal prostático, ocular. La angiogénesis es prominente en la formación de tumores sólidos y metástasis. Se han encontrado factores angiogénicos asociados con varios tumores sólidos tales como rabdomiosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, y osteosarcoma. Un tumor no puede expandirse sin un suministro de sangre para proporcionar nutrientes y eliminar los desechos celulares. Los tumores en los que la angiogénesis es importante incluyen tumores sólidos y tumores benignos tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma y granulomas piógenos. La prevención de la angiogénesis podría detener el crecimiento de estos tumores y el daño resultante al animal debido a la presencia del tumor.

25 Cabe señalar que la angiogénesis se ha asociado con tumores de origen sanguíneo tales como leucemias, cualquiera de diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las que se produce la proliferación desenfrenada de los glóbulos blancos, generalmente acompañada de anemia, coagulación de la sangre deteriorada y agrandamiento de los ganglios linfáticos, hígado, y bazo. Se cree que la angiogénesis desempeña un papel en las anomalías en la médula ósea que dan lugar a tumores similares a la leucemia.

30 La angiogénesis es importante en dos fases de la metástasis tumoral. La primera fase en la que la estimulación de la angiogénesis es importante es en la vascularización del tumor, que permite que las células tumorales entren en el torrente sanguíneo y circulen por todo el cuerpo. Después de que las células tumorales han dejado el sitio primario y se han instalado en el sitio de metástasis secundario, la angiogénesis debe ocurrir antes de que el nuevo tumor pueda crecer y expandirse. Por lo tanto, la prevención o el control de la angiogénesis podría conducir a la prevención de metástasis de tumores y posiblemente contener el crecimiento neoplásico en el sitio primario.

35 El conocimiento del papel de la angiogénesis en el mantenimiento y la metástasis de tumores ha conducido a un indicador pronóstico del cáncer de mama. La cantidad de neovascularización encontrada en el tumor primario se determinó contando la densidad de microvasos en el área de la neovascularización más intensa en carcinoma invasor de mama. Se encontró un alto nivel de densidad de microvasos correlacionada con la recidiva tumoral. El control de la angiogénesis por medios terapéuticos puede conducir al cese de la recurrencia de los tumores.

40 Una de las enfermedades angiogénicas más frecuentes de la infancia es el hemangioma. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos y regresan sin intervención. En los casos más graves, los tumores avanzan a grandes formas cavernosas e infiltrativas y crean complicaciones clínicas. Las formas sistémicas de hemangiomas, las hemangiomatosis, tienen una alta tasa de mortalidad. Existen hemangiomas resistentes a la terapia que no pueden ser tratados con terapéuticos actualmente en uso.

45 Los presentes compuestos se pueden usar para tratar sujetos incluyendo animales, y en particular, mamíferos, incluyendo seres humanos, como pacientes. Por lo tanto, los seres humanos y otros animales, y en particular, los mamíferos, que padecen enfermedades o trastornos relacionados con hMetAP y/o la angiogénesis, se pueden tratar, mejorar o prevenir mediante la administración al paciente de una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención o su derivado o una sal de los mismos opcionalmente en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, ya sea solo, o junto con otros agentes farmacéuticos conocidos (dependiendo de la enfermedad a tratar). El tratamiento de acuerdo con la presente invención también se puede administrar junto con otras terapias convencionales, por ejemplo, terapia contra el cáncer, tal como tratamiento de radiación o cirugía.

55 Los compuestos de la invención pueden utilizarse junto con al menos un agente terapéutico conocido, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agente. Los ejemplos de agentes terapéuticos conocidos que pueden utilizarse para la terapia de combinación incluyen, pero sin limitación, corticosteroides (por ejemplo, cortisona, prednisona, dexametasona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, ibuprofeno, celecoxib, aspirina, indometicina, naproxeno), agentes alquilantes tales como busulfán, cis-platino, mitomicina C y carboplatino; agentes antimetabólicos tales como colchicina, vinblastina, paclitaxel, y docetaxel; inhibidores de topo I tales como camptotecina y topotecán; inhibidores de topo II tales como doxorubicina y etopósido; antimetabolitos de ARN/ADN

tales como 5 - azacitidina, 5-fluorouracilo y metotrexato; antimetabolitos de ADN tales como 5-fluoro-2'-desoxiuridina, ara-C, hidroxiaurea y tioguanina; anticuerpos tales como Herceptin® y Rituxan®. Otros agentes anticancerosos conocidos que se pueden utilizar para la terapia de combinación incluyen melfalán, clorambucilo, ciclofosamida, ifosfamida, vincristina, mitoguazona, epirrubicina, aclarrubicina, bleomicina, mitoxantrona, eliptinio, fludarabina, octreotida, ácido retinoico, tamoxifeno y alanosina.

IV. Mecanismo de acción

La nitroxolina se identificó como un éxito común de tres cribados independientes de fármacos antiangiogénicos y anticanceroso

Para descubrir fármacos antiangiogénicos y anticancerosos clínicamente factibles, se realizaron tres cribados independientes de fármacos, incluyendo inhibidores de la metionina aminopeptidasa de tipo 2 (MetAP-2) de una biblioteca de ~170.000 productos químicos comerciales, inhibidores del crecimiento de células endoteliales de una biblioteca de ~4.500 fármacos clínicos, y fármacos contra el cáncer de mama de una biblioteca de ~2.300 fármacos aprobados por la FDA. El cribado de MetAP-2 se realizó usando los sistemas de cribado automático de alto rendimiento. Los cribados de inhibidores del crecimiento celular se realizaron a través del procedimiento basado en el ensayo de incorporación de 3H-timidina. Se aisló un gran número de aciertos de cada cribado; es decir, aciertos del cribado de inhibidores endoteliales (Curtis, R. C. y col (2007) ACS Chem. Biol. 2, 263-270), 212 aciertos de cribado de fármacos contra el cáncer de mama, y aciertos de cribado de inhibidor de MetAP-2 (publicados en otro sitio). Curiosamente, un fármaco antibacteriano, la nitroxolina se descubrió como un acierto común de esos tres cribados independientes.

La nitroxolina inhibe la actividad de MetAP-2 y la proliferación de tanto las células endoteliales como de cáncer de mama

Se examinó el efecto de la nitroxolina sobre la actividad de MetAP en presencia de dos cofactores fisiológicos diferentes. La nitroxolina inhibió específicamente la actividad de MetAP-2 en presencia de Mn^{2+} con un valor de CI_{50} de 460 nM (figura 1, Tabla 1, *panel izquierdo*). La nitroxolina también inhibió la actividad de MetAP-2 en presencia de Co^{2+} , pero la potencia fue 25 veces menor que en el caso de Mn^{2+} . La actividad de MetAP-1, sin embargo, no se inhibió en absoluto por la nitroxolina independientemente de la presencia de iones metálicos. Se usaron IV-43 y TNP-470 como compuestos de control positivo para los inhibidores de MetAP-1 y MetAP-2, respectivamente.

El ensayo de proliferación celular se realizó utilizando varios tipos diferentes de células de cáncer de mama, así como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). La nitroxolina inhibió la proliferación de todos los tipos celulares con intervalos de CI_{50} de 2 a 5 μM . Teniendo en cuenta el hecho de que TNP-470 tiene una selectividad endotelial de aproximadamente 1.000 veces sobre otros tipos de líneas celulares de cáncer, la nitroxolina no tiene selectividad celular (figura 1, Tabla 1, *panel derecho*).

La Nitroxolina inhibe la actividad de MetAP-2 in vivo

Para verificar el efecto de la nitroxolina sobre MetAP-2 en el entorno fisiológico, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento de células de levadura mutante. Dado que dos MetAP eucariotas son funcionalmente complementarios entre sí, la levadura puede sobrevivir bajo la deficiencia genética de uno de los isotipos de MetAP. El tratamiento de la levadura de tipo silvestre con nitroxolina o TNP-470 no inhibió el crecimiento de la levadura. El crecimiento del mutante de delección de MetAP-1 (*map1Δ*), sin embargo, se inhibió de forma significativa por nitroxolina o TNP-470. El tratamiento con nitroxolina o TNP-470 no afectó al crecimiento del mutante de delección de MetAP-2 que no tiene su diana análoga, lo que sugiere que MetAP-2 es una diana fisiológica tanto de nitroxolina como de TNP-470 (figura 2A).

Se conoce 14-3-3 γ como un sustrato de MetAP eucariotas y se ha informado que la inhibición de cualquiera de los isotipos de MetAP aumenta la forma metionil N-terminal de la proteína. Como es de esperar, el tratamiento de HUVEC con nitroxolina aumento de forma dependiente de la dosis el 14-3-3 γ metioninilado N-terminal, que se detectó por el anticuerpo específico de N-metionil 14-3-3 γ (figura 2). Para estimar cuánta porción del total de 14-3-3 γ no es procesada por la nitroxolina, se desactivó la expresión de hMetAP2 endógeno usando un ARNsi específico y se analizó el procesamiento de 14-3-3 γ en HUVEC. Una cantidad tan baja como 5 nM de tratamiento con ARNsi de hMetAP2 durante 48 h indujo más del 90 % de desactivación de hMetAP2 como se muestra por la transferencia de Western (figura 2). La forma no procesada de 14-3-3 γ se aumentó significativamente después de la desactivación de hMetAP2. En comparación con ARNsi de hMetAP2, 5 μM de nitroxolina inhibieron el procesamiento de 14-3-3 γ en ~80 %. TNP-470 bloqueó completamente el procesamiento de 14-3-3 γ por hMetAP2 a 10 nM (figura 2). Estos resultados demuestran que la nitroxolina inhibe la actividad de hMetAP2 in vivo. Como la CI_{50} de nitroxolina para la inhibición de hMetAP1 es superior a 50 μM , la inhibición de esta enzima no puede explicar la retención de la metionina N-terminal en 14-3-3 γ .

La nitroxolina activa las rutas de p53 y Rb en HUVEC

Se ha demostrado previamente que el efecto del ciclo celular de TNP-470 está mediado a través de la activación de la ruta de p53, la cual está acompañada por un aumento de p21 y la inhibición de la hiperfosforilación de Rb por el

complejo ciclina E/Cdk2 cinasa (Zhang, Y. y col (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 97, 6427-6432; Yeh, J. R. y col (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 12782-12787). Similar al TNP-470, el tratamiento con nitroxolina también condujo a un aumento del nivel de proteína p53 (figura 3A). En contraste con TNP-470, sin embargo, la nitroxolina no tuvo efecto sobre la expresión de p21 dentro de las 24 h del tratamiento. Además, tanto la nitroxolina como el TNP-470 aumentaron la cantidad total de proteína Rb (mostrada en el 12 % de SDS-PAGE) e inhibieron su hiperfosforilación, dando lugar a la acumulación de Rb hipofosforilado con el tiempo (mostrado en un 8 % de SDS-PAGE). De forma interesante, la exposición prolongada (hasta 72 h) de HUVEC a la nitroxolina indujo un aumento sostenido en el nivel de proteína p53. De forma análoga, el nivel de proteína de p21 se aumentó tras más tiempo de incubación de las células endoteliales con nitroxolina (figura 3). A nivel de ARNm, sin embargo, p53 disminuyó, mientras que p21 se aumentó tras el tratamiento con nitroxolina de una manera dependiente del tiempo (figura 3). Estos datos indican que aunque la nitroxolina redujo la transcripción de p53 tras un tratamiento prolongado, aumentó la estabilidad de la proteína y la actividad transcripcional de p53 en HUVEC.

La nitroxolina induce la senescencia prematura en las células endoteliales.

Las HUVEC que se trataron con nitroxolina, pero no con TNP-470, sufrieron cambios morfológicos similares a los de un pase extendido en cultivo. Se sabe que el cultivo de células endoteliales primarias se convierte en senescente tras pases repetidos en cultivo, un proceso denominado senescencia replicativa. La senescencia también puede ocurrir en respuesta a tensiones agudas, tales como irradiación UV o tratamiento con fármacos quimioterapéuticos, que se conoce como senectud prematura inducida por estrés. A continuación, el cambio morfológico causado por la nitroxolina, que se acompañó de senescencia prematura utilizando un sustrato de β -galactosidasa asociado a senescencia permeable a las células (SA- β -gal) se determinó. El tratamiento de HUVEC con ácido valproico 0,1 mM, un inhibidor conocido de histona desacetilasa usado como control positivo, durante 72 h indujo una senescencia prematura en HUVEC (figura 4A). Similar a ácido valproico, la nitroxolina también indujo la senescencia prematura en HUVEC. A 20 nM, una concentración que es suficiente para inhibir la proliferación de HUVEC, sin embargo, TNP-470 no indujo senescencia prematura. A continuación se probó si la senescencia inducida por la nitroxolina es reversible. Las HUVEC se trataron con nitroxolina durante 72 h y el medio de cultivo que contenía nitroxolina se reemplazó con medio nuevo seguido de incubación durante 48 h adicionales. A juzgar por tinción con SA- β -gal, las HUVEC tratadas con nitroxolina (nitroxolina-R) permanecieron senescentes mientras que las tratadas con ácido valproico (ácido valproico-R) invirtieron su estado de senescencia (figura 4A y B). Estos resultados demuestran que, a diferencia del TNP-470, la nitroxolina indujo senescencia prematura sostenida en HUVEC. Dado que la nitroxolina es citostática en lugar de citotóxica para las células endoteliales, es probable que la activación de p53, p21 e inhibición de la ruta de Rb esté implicada en la inducción de senescencia prematura en las células endoteliales.

La nitroxolina induce la acetilación de p53 a K382 e inhibe la actividad de SirT1.

La familia de sirtuina humana consiste en 7 isoformas (SirT1 a 7) cuyo dominio catalítico es homólogo a la levadura Sir2. Se sabe que cada isoforma de sirtuina humana tiene diferente especificidad de sustrato. Por ejemplo, se sabe que SirT1 desacetila p53 específicamente en la posición K382, mientras que SirT2 se describe como una tubulina desacetilasa. Para ver si la nitroxolina o los compuestos de la invención inducen hiperacetilación de estos sustratos de sirtuina, se trataron HUVEC con diversos compuestos durante un tiempo corto (6 h) o largo (20 h) y se analizó el estado de acetilación de diversos sustratos de sirtuina. En primer lugar, la nitroxolina no cambió el estado de acetilación ni de la tubulina ni de la histona-H3, mientras que el sirtinol (inhibidor de la sirtuina vegetal) y TSA (inhibidor de HDAC de las clases I y II) indujeron hiperacetilación de los sustratos (figura 5A). La nitroxolina, sin embargo, aumentó la acetilación de p53-K382 en HUVEC tratadas durante 20 h. TSA aumentó la acetilación de p53 en un punto de tiempo temprano. A continuación, se realizaron ensayos de sirtuina in vitro basados en la desacetilación de sustratos fluorogénicos por enzimas de sirtuina recombinantes purificadas. La nitroxolina inhibió la actividad SirT1 con un valor CI_{50} de 8 μ M (figura 5B). La inhibición de SirT1 por nitroxolina fue relativamente selectiva sobre SirT2 y SirT3 cuyos los valores de CI_{50} son 43 y >50 μ M, respectivamente. Como se muestra en la figura 6A, la alta concentración de nitroxolina (20 μ M) no aumentó la acetilación de p53. A continuación se examinó el efecto de diversas concentraciones de nitroxolina sobre la acetilación de p53 en HUVEC. De manera interesante, la nitroxolina mostró una inducción bifásica de p53 acetilación con un pico a 4-5 μ M (figura 5C y D). El nivel del propio p53 también se aumentó por la nitroxolina, pero la tasa de aumento fue mucho menor que la de la acetilación.

El efecto de la nitroxolina imita la inhibición concurrente de MetAP2 y SirT1 en HUVEC.

Se sabe que SirT2 es una tubulina desacetilasa (North, B. J. y col (2003) Mol. Cell, 11, 437-444). La inhibición farmacológica de SirT2 aumenta la acetilación de tubulina e histona en presencia de TSA (Lain, S. y col (2008) Cancer Cell, 13, 454-463). Como se muestra en la figura 6A, la nitroxolina en solitario no indujo la acetilación de tubulina o histona-H3 en HUVEC. En presencia de TSA, sin embargo, la nitroxolina a 20 μ M aumentó significativamente la acetilación tanto de la tubulina como de la histona-H3, demostrando que la nitroxolina inhibe la actividad de SirT2 a alta concentración. EX527 como un inhibidor específico conocido de SirT1 indujo levemente la acetilación de p53-K382 en HUVEC. Sin embargo, no aumentó la acetilación de tubulina o histona-H3 incluso en presencia de TSA (figura 6B), lo que confirma que EX527 no inhibe SirT2 a la concentración utilizada en este estudio. El efecto de la inhibición concurrente de MetAP2 y SirT1 sobre la acetilación de p53 en HUVEC se examinó utilizando inhibidores específicos de moléculas pequeñas y ARNsi. Ambos ARNsi contra SirT1 o MetAP2 disminuyeron con éxito la expresión de cada proteína como se confirmó por transferencia de Western. En comparación con el

control, SirT1-siRNA aumentó ligeramente la acetilación de p53 (figura 6C). La inducción de la acetilación de p53 por SirT1-siRNA se aumentó incluso en presencia de TNP470 o MetAP2-siRNA en HUVEC. TSA no aumentó la acetilación de p53 inducida por SirT1-siRNA. Se obtuvieron resultados similares con inhibidores de moléculas pequeñas de SirT1 y MetAP2. EX527 en solitario indujo ligeramente la acetilación de p53 mientras que el co-tratamiento con TNP470 aumentó significativamente la acetilación de p53 en HUVEC (figura 6D). El nivel de proteína de p53 también se aumentó cooperativamente por EX527 y TNP470.

La inhibición concurrente de MetAP2 y SirT1 actúa sinérgicamente sobre la proliferación y la senescencia de HUVEC.

La velocidad de inducción de la acetilación de p53 por la nitroxolina fue mucho mayor que la de EX527, aunque EX527 es un inhibidor altamente potente de SirT1 ($CI_{50} = 38$ nM). Esto se debe probablemente a la inhibición simultánea de SirT1 y MetAP2 por la nitroxolina, ya que la inhibición simultánea de SirT1 y MetAP2 aumentó cooperativamente el nivel de acetilación de p53. Se llevó a cabo un experimento para determinar si la inhibición concurrente de MetAP2 y SirT1 actúa sinérgicamente sobre la proliferación y la senescencia de HUVEC. En primer lugar, HUVEC se trataron con diversas concentraciones de EX527 en presencia o ausencia de TNP470 y la acetilación de p53 se midió por transferencia de Western. Como era de esperar, EX527 y TNP470 indujeron sinérgicamente la acetilación de p53 en HUVEC (figura 7A-C). Al igual que la nitroxolina, la inducción de la acetilación de p53 por EX527 en solitario o EX527 más TNP470 fue dependiente de la dosis, patrón bifásico. Se sabe que la inhibición de SirT1 induce un fenotipo parecido de tipo senescencia prematuro en HUVEC (Ota, H. y col (2007) *J Mol Cell Cardiol.*, 43, 571-579). En este estudio, EX527 en solitario indujo la senescencia prematura en HUVEC, mientras que TNP470 no (figura 7D). El co-tratamiento de HUVEC con EX527 y TNP470 indujo sinérgicamente senescencia prematura en HUVEC según se determinó por tinción con SA- β -Gal. La inhibición concurrente de SirT1 y MetAP2 también mostró una sinergia en la inhibición de la proliferación de HUVEC según se confirmó por el gráfico del Índice de Combinación (CI) (figura 7E). Estos resultados explican por qué la nitroxolina mostró una potencia mucho mayor en la inducción de la acetilación de p53 y la inhibición de la proliferación de HUVEC que EX527 aunque EX527 es un inhibidor mucho más potente de SirT1.

Nitroxolina inhibe la angiogénesis in vitro e in vivo.

Para determinar si la nitroxolina es eficaz para bloquear la angiogénesis, se empleó utilizó por primera vez un ensayo de formación de tubos *in vitro*. Cuando se cultivan en un matrigel tridimensional, las HUVEC forman estructuras tubulares que recuerdan a los vasos. La formación de tubos de HUVEC se inhibió por la nitroxolina de una manera dependiente de la dosis (figura 8A). Anteriormente, se sabe que la inhibición de SirT1 puede suprimir suficientemente la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* (Potente, M. y col (2007) *Genes Dev.*, 21, 2644-2658). No es de extrañar que EX527 (1 μ M) inhibió la formación de tubos (figura 8A). TNP470, sin embargo, no inhibió la formación de tubos a una concentración de 10 nM a la que el compuesto puede inhibir suficientemente la proliferación de HUVEC. TNP470 parece actuar sobre la progresión del ciclo celular G1 en las células endoteliales, inhibiendo así la proliferación celular. Dado que la formación de tubos requiere la diferenciación de células endoteliales pero no la proliferación, es probable que TNP470 no tenga ningún efecto sobre la formación de células endoteliales. Sin embargo, el tratamiento combinado de HUVEC con EX527 y TNP470 inhibió sinérgicamente la formación de tubos de HUVEC (figura 8A y B). Después, se determinó la eficacia de la nitroxolina en el bloqueo de la angiogénesis en un modelo de Matrigel *in vivo*. Matrigel que contenía FGF y VEGF básicos se inyectó por vía subcutánea en ratones, los cuales fueron pretratados con control de vehículo o nitroxolina. Diez días después de la inyección inicial, los tapones de Matrigel se retiraron y los vasos sanguíneos recién invadidos se visualizaron microscópicamente (figura 8C). En comparación con los animales tratados con vehículo, los que se trataron con nitroxolina a 60 mg/kg tuvieron una reducción dramática en la densidad de nuevos vasos sanguíneos (figura 8D y E).

Inhibición del xenoinjerto de cáncer de mama por nitroxolina in vivo.

Habiendo observado un efecto inhibitor claro de la nitroxolina sobre la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*, se examinó su efecto sobre el crecimiento de cáncer de mama en un modelo de xenoinjerto de ratón. Las células de cáncer de mama HCC 1954 se trasplantaron por vía subcutánea en ratones sin pelo y los animales se trataron con vehículo o nitroxolina todos los días a través de inyección i.p. durante un total de 30 días. La nitroxolina bloqueó significativamente el crecimiento de xenoinjertos HCC1954 comenzando el día 15 con una inhibición del 55 % el día 30 (figura 9A y B). Para ver si la nitroxolina afecta a la actividad de SirT1 *in vivo*, se analizó el nivel de proteína y el estado de acetilación de p53 en los tejidos tumorales. Como se muestra en la figura 9C, la nitroxolina indujo significativamente la acetilación de p53 en todos los tejidos tumorales representativos. El nivel de proteína p53 también se aumentó con nitroxolina, lo que sugiere que la nitroxolina inhibió la actividad de SirT1 y MetAP2 *in vivo*. Para evaluar si la inhibición del crecimiento tumoral está acompañada por la inhibición de la angiogénesis, se realizó la tinción inmunohistoquímica de los tejidos tumorales utilizando anticuerpos anti-CD31, un marcador para nuevos vasos sanguíneos. La nitroxolina inhibe fuertemente la angiogénesis asociada al tumor, lo que indica que es capaz de bloquear la angiogénesis inducida por tumores *in vivo* (figura 9D y E).

V. Composiciones farmacéuticas/procedimientos de administración

En un aspecto, la invención proporciona una composición para su uso que comprende un compuesto de la invención

y un agente terapéutico adicional. En una realización, el agente terapéutico adicional es un compuesto inhibidor de metionina aminopeptidasa. En una realización, el agente terapéutico adicional es un compuesto inhibidor de la angiogénesis. En otra realización, el agente terapéutico adicional es un compuesto contra el cáncer.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso que comprende un compuesto de la invención y un excipiente farmacéuticamente adecuado.

La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas para su uso que comprenden una cantidad eficaz de uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención (incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos), opcionalmente junto con un vehículo, excipiente o aditivo farmacéuticamente aceptable.

10 Un "derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster, sal de un éster, u otro derivado de un compuesto de la presente invención que, tras la administración a un receptor, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la presente invención.

15 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, por pulverización por inhalación, rectal, vaginal, o tópica en formulaciones de unidades de dosificación que contienen portadores, adyuvantes, y vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, técnicas de infusión, intraperitoneal, en ojo u ocular, intrabucal, transdérmica, intranasal, en el cerebro, incluyendo intracraneal e intradural, en las articulaciones, incluyendo tobillos, rodillas, caderas, hombros, codos, muñecas, directamente en tumores, y similares, y en forma de supositorio.

20 Los compuestos farmacéuticamente activos de la presente invención pueden procesarse de acuerdo con procedimientos convencionales de farmacia para producir agentes medicinales para administración a pacientes, incluyendo seres humanos y otros mamíferos.

25 Las modificaciones del compuesto activo pueden afectar a la solubilidad, biodisponibilidad y velocidad de metabolismo de la especie activa, proporcionando así control sobre el suministro de la especie activa. Además, las modificaciones pueden afectar a la actividad antiangiogénesis del compuesto, en algunos casos aumentando la actividad sobre el compuesto original. Esto se puede evaluar fácilmente preparando el derivado y ensayando su actividad de acuerdo con procedimientos conocidos y dentro de la capacidad del experto en la técnica.

30 Las composiciones farmacéuticas basadas en estos compuestos químicos comprenden los compuestos descritos anteriormente en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar enfermedades y afecciones que se han descrito en el presente documento, opcionalmente junto con un aditivo, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un experto en la técnica reconocerá que una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención variará con la infección o afección a tratar, su gravedad, el régimen de tratamiento a emplear, la farmacocinética del agente utilizado, así como el paciente (animal o humano) tratado.

35 Para preparar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención se mezcla preferentemente íntimamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las técnicas de combinación farmacéuticas convencionales para producir una dosis. Un vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral, tópica o parenteral, incluyendo geles, cremas, ungüentos, lociones y preparaciones implantables liberadas en el tiempo, entre muchos otros. En la preparación de composiciones farmacéuticas en forma de dosificación oral, puede usarse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales.

40 El compuesto activo se incluye en el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz para la indicación deseada, sin causar efectos tóxicos graves en el paciente tratado.

45 Las composiciones orales incluirán generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Con el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo o su derivado de profármaco puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Pueden incluirse como parte de la composición agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes.

50 Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente dispersante tal como ácido alginico o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saporífero tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener diversos materiales diferentes que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas como cápsulas, obleas o comprimidos conteniendo cada una una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite y como un bolo, etc.

5 Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeado, de manera opcional con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos de compresión pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el principio activo en forma fluida como polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente de superficie activa o dispersante. Los comprimidos moldeables pueden hacerse
10 moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo de los mismos.

Los procedimientos de formulación de tales composiciones de liberación lenta o controlada de principios farmacéuticamente activos, se conocen en la técnica y se describen en varias patentes de Estados Unidos expedidas, algunas de las cuales incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos n.º 3.870.790; 4.226.859; 4.369.172; 4.842.866 y 5.705.190. Los revestimientos pueden usarse para la administración de
15 compuestos al intestino (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 6.638.534, 5.541.171, 5.217.720, y 6.569.457, y referencias citadas en las mismas).

El compuesto activo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo también se puede administrar como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, goma de mascar o similar. Un jarabe puede contener, además
20 de los principios activos, sacarosa o fructosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y aromas.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

Un experto en la técnica reconocerá que además de los comprimidos, se pueden formular otras formas de dosificación para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo. Tales formas de dosificación
35 incluyen, pero sin limitación, cápsulas, granulaciones y cápsulas de gel.

Las suspensiones liposómicas también pueden ser vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones liposómicas pueden prepararse disolviendo lípidos apropiados en un disolvente inorgánico que luego se evapora, dejando detrás una fina película de lípido seco sobre la superficie del recipiente. Después se introduce una solución acuosa del compuesto activo en el recipiente. El recipiente se hace girar luego a mano para liberar el material lipídico de los lados del recipiente y para dispersar los agregados lipídicos, formando de este modo la suspensión liposómica. Otros procedimientos de preparación ya conocidos por los expertos en la materia pueden usarse también en este aspecto de la presente invención.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo y el (los) vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima al principio activo con los vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y, después, si es necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones y composiciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden los ingredientes en una base aromatizada, generalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente a administrar en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica a la piel pueden presentarse como ungüentos, cremas, geles y pastas que comprenden el ingrediente a administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un sistema de administración tópico preferido es un parche transdérmico que contiene el ingrediente a administrar.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

- Las formulaciones adecuadas para la administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administra de la manera en que se administra el rapé, es decir, por inhalación rápida a través de las fosas nasales a partir de un envase con el polvo sujetado cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas, en las que el vehículo es un líquido, para su administración, como por ejemplo, un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.
- Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del principio activo, vehículos tales como se conocen en la técnica como apropiados.
- La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico. Si se administran por vía intravenosa, los vehículos preferidos incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- Para las formulaciones parenterales, el vehículo usualmente comprenderá agua estéril o solución acuosa de cloruro sódico, aunque pueden incluirse otros ingredientes incluyendo los que ayudan a la dispersión. Por supuesto, cuando se va a usar y mantener el agua estéril como estéril, las composiciones y los vehículos también deben esterilizarse. También pueden prepararse suspensiones inyectables, en cuyo caso pueden emplearse vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares.
- Las formulaciones que son adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas y no acuosas para inyección que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en estado liofilizado requiriendo únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.
- La administración del compuesto activo puede variar desde continua (goteo intravenoso) a varias administraciones orales al día (por ejemplo, Q.I.D.) y puede incluir administración oral, tópica, en ojo u ocular, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente potenciador de la penetración), bucal y supositorios, entre otras vías de administración, incluso a través de una vía ocular.
- La aplicación de los agentes terapéuticos en cuestión puede ser local, de manera que se administre en el sitio de interés. Pueden usarse diversas técnicas para proporcionar las composiciones en cuestión en el sitio de interés, tales como inyección, uso de catéteres, trocates, proyectiles, gel plurónico, endoprótesis vasculares, polímeros de liberación de fármaco sostenida u otro dispositivo que proporcione acceso interno. Cuando un órgano o tejido es accesible debido a la retirada del paciente, dicho órgano o tejido puede bañarse en un medio que contiene las composiciones en cuestión, las composiciones en cuestión pueden pintarse sobre el órgano o pueden aplicarse de cualquier manera conveniente.
- El compuesto se puede administrar a través de un dispositivo adecuado para la liberación controlada y sostenida de una composición eficaz para obtener un efecto fisiológico o farmacológico local o sistémico deseado. El procedimiento incluye posicionar el sistema de suministro de fármaco liberado de forma sostenida en un área en la que se desea la liberación del agente y permitir que el agente pase a través del dispositivo hasta el área de tratamiento deseada.
- Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que tengan relación con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para administración oral pueden contener agentes saporíferos.
- En ciertas formas de dosificación farmacéuticas, la forma pro-fármaco de los compuestos puede ser preferida. Un experto en la técnica reconocerá cómo modificar fácilmente los presentes compuestos en formas pro-fármaco para facilitar el suministro de compuestos activos a un sitio dirigido dentro del organismo huésped o paciente. El experto también aprovechará los parámetros farmacocinéticos favorables de las formas pro-fármaco, cuando sea aplicable, en la administración de los presentes compuestos a un sitio diana dentro del organismo huésped o paciente para maximizar el efecto deseado del compuesto.
- Los profármacos preferidos incluyen derivados en los que un grupo que mejora la solubilidad acuosa o el transporte activo a través de la membrana intestinal se añade a la estructura de las fórmulas descritas en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Alexander, J. y col. *Journal of Medicinal Chemistry* 1988, 31.318-322; Bundgaard, H. *Design of Prodrugs*; Elsevier: Amsterdam, 1985; págs. 1-92; Bundgaard, H.; Nielsen, N. M. *Journal of Medicinal Chemistry* 1987, 30, 451-454; Bundgaard, H. *A Textbook of Drug Design and Development*; Harwood Academic Publ.: Suiza 1991; págs. 113-191; Digenis, G. A. y col. *Handbook of Experimental Pharmacology* 1975, 28, 86-112; Friis, G. J.; Bundgaard, H. *A Textbook of Drug Design and Development*; 2 ed.; Overseas Publ.: Amsterdam, 1996; págs. 351-385; Pitman, I. H. *Medicinal Research Reviews* 1981, 1, 189-214. Las formas de profármaco pueden ser

ellas mismas activas, o pueden ser aquellas que, cuando se metabolizan después de la administración, proporcionan el agente terapéutico activo *in vivo*.

Las formas de sal farmacéuticamente aceptables pueden ser la forma química preferida de los compuestos de acuerdo con la presente invención para su inclusión en composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención.

Algunos de los compuestos, en forma de dosificación farmacéutica, se pueden usar como agentes para evitar que una enfermedad o afección se manifieste. En ciertas formas de dosificación farmacéuticas, puede preferirse la forma pro-fármaco de los compuestos de acuerdo con la presente invención. En particular, las formas de profármaco que se basan en grupos éster de C₁ a C₂₀ o grupos amida (preferentemente un hidroxilo, amina libre o grupo de nitrógeno sustituido) que pueden transformarse, por ejemplo, en una amida u otro grupo pueden ser particularmente útiles en este contexto.

Los presentes compuestos o sus derivados, incluyendo las formas de profármacos de estos agentes, pueden proporcionarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, la expresión sales o complejos farmacéuticamente aceptables se refiere a sales o complejos apropiados de los compuestos activos de acuerdo con la presente invención que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y muestran efectos toxicológicos limitados a células normales. Los ejemplos no limitantes de dichas sales son (a) sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, y similares), y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico y ácido poliglutámico, entre otros; (b) sales de adición de bases formadas con cationes metálicos tales como cinc, calcio, sodio, potasio y similares, entre muchos otros.

Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria, sub-dosis diaria, según se ha indicado anteriormente en el presente documento, o una fracción adecuada de las mismas, del ingrediente administrado.

El régimen de dosificación para tratar un trastorno o una enfermedad con los compuestos inhibidores de hMetAP o compuestos inhibidores de la angiogénesis de la presente invención y/o composiciones de la presente invención se basa en una diversidad de factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, la afección médica del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración y el compuesto particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede determinarse rutinariamente usando procedimientos estándar.

Las cantidades y los regímenes de dosificación administrados a un sujeto dependerán de una serie de factores, tales como el modo de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando, el peso corporal del sujeto que se está tratando y el criterio del médico tratante.

La cantidad de compuesto incluido en formulaciones terapéuticamente activas de acuerdo con la presente invención es una cantidad eficaz para tratar la infección o afección. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto preferido en forma de dosificación generalmente varía entre ligeramente menos de aproximadamente 0,025 mg/kg/día a aproximadamente 2,5 g/kg/día, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día del paciente o considerablemente más, dependiendo del compuesto utilizado, de la afección o infección tratada y de la vía de administración, aunque pueden contemplarse excepciones a este intervalo de dosis en la presente invención. En su forma más preferida, los compuestos de acuerdo con la presente invención se administran en cantidades que varían de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día. La dosificación del compuesto dependerá de la afección a tratar, del compuesto particular y de otros factores clínicos tales como el peso y la condición del paciente y la vía de administración del compuesto. Debe apreciarse que la presente invención tiene aplicación tanto para uso humano como veterinario.

El compuesto se administra convenientemente en cualquier forma de dosificación unitaria adecuada, incluyendo, pero sin limitación, una que contiene de 1 a 3000 mg, preferentemente de 5 a 500 mg de principio activo por forma de dosificación unitaria. Una dosificación oral de 10-250 mg es generalmente conveniente.

La concentración de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las tasas de absorción, distribución, inactivación y excreción del fármaco, así como otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Debe observarse que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ser ajustados en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son solo a modo de ejemplo y no pretenden limitar el ámbito o la práctica de la composición reivindicada. El principio activo se puede administrar de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas que se van a administrar a intervalos de tiempo variables.

En ciertas realizaciones, el compuesto se administra una vez al día; en otras realizaciones, el compuesto se administra dos veces al día; aún en otras realizaciones, el compuesto se administra una vez cada dos días, una vez

5 cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, una vez cada siete días, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada dos meses, una vez cada seis meses, o una vez al año. El intervalo de dosificación se puede ajustar de acuerdo a las necesidades de cada paciente. Para intervalos más largos de administración, se pueden usar formulaciones de liberación prolongada o de depósito.

10 Los compuestos de la invención se pueden usar para tratar enfermedades y afecciones que sean agudas, y también pueden usarse para el tratamiento de afecciones crónicas. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se administran durante períodos de tiempo que exceden de dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año, dos años, tres años, cuatro años, o cinco años, diez años o quince años; o, por ejemplo, cualquier intervalo de tiempo en días, meses o años en los que el extremo bajo del intervalo sea cualquier período de tiempo entre 14 días y 15 años y el extremo superior del intervalo sea entre 15 días y 20 años (por ejemplo, 4 semanas y 15 años, 6 meses y 20 años). En algunos casos, puede ser ventajoso que los compuestos de la invención se administren durante el resto de la vida del paciente. En realizaciones preferidas, el paciente se controla para verificar el avance de la enfermedad o trastorno, y la dosis se ajusta en consecuencia.

15 En realizaciones preferidas, el tratamiento de acuerdo con la invención es eficaz durante al menos dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año, dos años, tres años, cuatro años, o cinco años, diez años, quince años, veinte años, o para el resto de la vida del sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I y un excipiente farmacéuticamente adecuado.

20 Aún otros objetos, características, y ventajas concomitantes de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una lectura de la descripción detallada anterior de realizaciones construidas de acuerdo con la misma, tomada conjuntamente con cualquier dibujo adjunto.

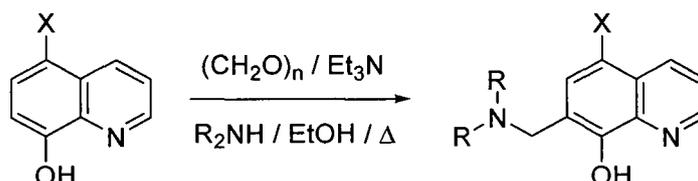
La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos son solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos de la presente invención de ninguna manera.

25 Ejemplos

PROCEDIMIENTOS GENERALES La cromatografía de capa fina se realizó con placas de gel de sílice 60 F-254 recubiertas previamente Merck y se visualizaron usando luz UV a 254 nm, o mediante tinción con yodo, tinción de molibdato de amonio cérico. Se usó gel de Sílice (malla de 200-400, Merck) para cromatografía con chorro de aire. Los reactivos se adquirieron en las compañías Aldrich, Acros, o Lancaster. Los puntos de fusión se registraron en un aparato Mel-Temp II y no se corrigieron. Los datos de RMN se recogieron en una máquina Varian Unity-400 (400 MHz ¹H, 100,6 MHz ¹³C) en el Department of Pharmacology and Molecular Sciences, The Johns Hopkins University. Los espectros de ¹H RMN se obtuvieron en deuteriocloroformo (CDCl₃) con tetrametilsilano (TMS, δ = 0,00 para ¹H) o cloroformo (δ = 7,26 para ¹H), o acetona-d₆ con TMS o acetona (δ = 2,05 para ¹H) como una referencia interna. Los espectros de ¹³C RMN se desacoplaron en protones y estaban en CDCl₃ con TMS (δ = 0,0 para ¹³C) o cloroformo (δ = 77,0 para ¹³C), o acetona-d₆ con TMS o acetona (δ = 0,0 para ¹³C) como una referencia interna. Los desplazamientos químicos se informan en ppm (δ); las multiplicidades están indicadas por s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), m (multiplete), dd (doblete de doblete), dt (doblete de triplete), a (ancho), ap. (aparente) e int. (intercambiable); constantes de acoplamiento, J, se indican en Hertzios (Hz); se proporciona integración; las asignaciones de resonancias individuales se soportan en la mayoría de los casos por los siguientes experimentos de RMN: APT/DEPT, COSY, o HMBC y HMQC. Los datos se presentan en la forma: desplazamiento químico (multiplicidad, constantes de acoplamiento, integración y asignaciones cuando sea relevante). Los espectros de masas de baja resolución se obtuvieron en un instrumento Voyager DE-STR, MALDI-TOF en la instalación de Espectrometría de Masas/Proteómica de AB en la Universidad Johns Hopkins. Las muestras de MALDI se prepararon mezclando gotitas de las soluciones de muestra en cloroformo o metanol y solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en acetona, donde esta última sirvió de matriz. Los datos se presentan en la forma m/z (intensidad relativa a base = 100). Los disolventes utilizados en las reacciones fueron de grado reactivo. Los disolventes utilizados para la extracción y la cromatografía fueron de grado técnico. El quinolinol 1e y el carbamato 4a se adquirieron de ASDI Inc., Delaware. Todas las reacciones no acuosas se realizaron en cristalería secada al horno.

Ejemplo de referencia 1. Procedimiento general para la síntesis de 7-(2-aminometil)-8-hidroxi-quinolinas

50 Las bases de Mannich 2a a 2g se prepararon modificando un procedimiento conocido.



A una solución de 8-hidroxiquinolina (1 mmol) en etanol absoluto (15 ml); se le añadieron trietilamina (1,2 mmol) y

paraformaldehído (1,2 mmol, 36,2 mg) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 12 h y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró. La recristalización del residuo de 1:1 de EtOH-H₂O fue el modo de purificación a menos que se indique otra cosa.

5-Cloro-7-(*N,N*-bis(2-hidroxi-etil)aminometil)-8-hidroxi-quinolina (2a)

- 5 El producto en bruto obtenido después de la evaporación del disolvente de la mezcla de reacción se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice mientras se eluyó con diclorometano y, por lo tanto, se produjo 2a puro como un jarabe de color ámbar (213 mg, 72 %).

Datos analíticos para 2a:

F_r 0,12 (7:3 de hexanos-EtOAc)

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,84 (dd, $J = 4,4, 1,3$ Hz, 1H, H-2), 8,62 (dd, $J = 5,5, 1,3$ Hz, 1H, H-4), 8,12 (dd, $J = 5,5, 4,4$ Hz, 1H, H-3), 7,54 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-7), 7,18 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-6), 4,02 (t a, $J = 6,7$ Hz, 4H, -CH₂-OH), 3,86 (s, 2H, -CH₂-7), 3,12 (int. s a, 3H, -CH₂-OH, 8-OH), 3,05 (t a, $J = 6,8$ Hz, 4H, -N-CH₂-)

MS (MALDI-TOF) m/z : 296 (100)

5-Cloro-7-((*N*-piperidino)metil)-8-hidroxi-quinolina (2b)

- 10 Rendimiento: 265 mg, 96 %

Datos analíticos para 2b:

F_r 0,35 (7:3 de hexanos-EtOAc)

$p.f.$ 92 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,98 (dd, $J = 4,4, 1,0$ Hz, 1H, H-2), 8,51 (dd, $J = 5,6, 1,1$ Hz, 1H, H-4), 7,55 (dd, $J = 5,6, 4,4$ Hz, 1H, H-3), 7,28 (s, 1H, H-6), 3,82 (s, 2H, CH₂-7), 2,63 (s a, 5H, 2',6'-piperidina, OH) 1,72 (m, 4H, 3',5'-piperidina), 1,44 (s a, 2H, 4'-piperidina)

MS (MALDI-TOF) m/z : 277 (100)

7-((*N*-morfolino)metil)-8-hidroxi-quinolina (2c)

Rendimiento: 230 mg, 94%

Datos analíticos para 2c:

F_r 0,30 (7:3 de hexanos-EtOAc)

$p.f.$ 66 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,94 (dd, $J = 3,3, 1,1$ Hz, 1H, H-2), 8,59 (dd, $J = 4,6, 1,1$ Hz, 1H, H-4), 8,12 (dd, $J = 4,6, 1,2$ Hz, 1H, H-5), 7,41 (m, 2H, H-3, H-6), 3,82 (s, 2H, CH₂-7), 3,78 (m, 4H, 2,6-morfolina), 2,62 (s a, 4H, 3,5-morfolina), 1,31 (int. s a, 1H, OH)

MS (MALDI-TOF) m/z : 245

- 15 **5-Cloro-7-((*N*-morfolino)metil)-8-hidroxi-quinolina (2d)**

Rendimiento: 253 mg, 91%

Datos analíticos para 2d:

F_r 0,32 (7:3 de hexanos-EtOAc)

$p.f.$ 128 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,93 (dd, $J = 3,4, 1,1$ Hz, 1H, H-2), 8,52 (dd, $J = 4,5, 1,1$ Hz, 1H, H-4), 7,57 (dd, $J = 4,5, 3,4$ Hz, 1H, H-3), 7,41 (s, 1H, H-6), 3,84 (s, 2H, CH₂-7), 3,79 (m, 4H, 2,6-morfolina), 2,63 (s a, 4H, 3,5-morfolina), 1,30 (int. s a, 1H, OH)

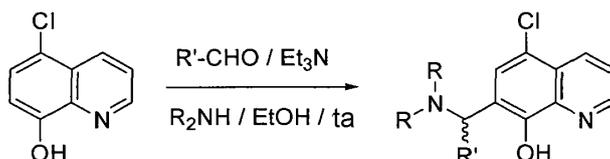
MS (MALDI-TOF) m/z : 279

5-Cloro-7-(1-(4-metilpiperazino)metil)-8-hidroxi-quinolina (2e)

Rendimiento: 244 mg, 83%

Datos analíticos para 2e: F_r 0,18 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 134 °C

 $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, acetona- d_6) δ : 8,90 (dd, $J = 4,0, 1,2$ Hz, 1H, H-2), 8,52 (dd, $J = 8,4, 1,6$ Hz, 1H, H-4), 7,68 (dd, $J = 8,6, 4,2$ Hz, 1H, H-3), 7,64 (s, 1H, H-6), 3,81 (s, 2H, CH_2 -7), 2,84 (int. s a, OH), 2,57 (s a, 4H, piperazina), 2,41 (s a, 4H, piperazina), 2,21 (s, 3H, $N\text{-CH}_3$) MS (MALDI-TOF) m/z : 292**Ejemplo de referencia 2. Procedimiento general para la síntesis de 7-(2-amino-2-arylmetil)-8-hidroxi-quinolinas**

- 5 A una solución de 5-cloro-8-hidroxiquinolina (1 mmol, 180 mg) en etanol absoluto (15 ml); se le añadieron trietilamina (1 mmol) y aldehído aromático (1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se recrystalizó en 1:1 de EtOH- H_2O .

5-Cloro-7-(1-fenil-1-(*N*-morfolino)-metil)-8-hidroxi-quinolina (2f)

Rendimiento: 315 mg, 89%

10 **Datos analíticos para 2f:** F_r 0,35 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 89 °C

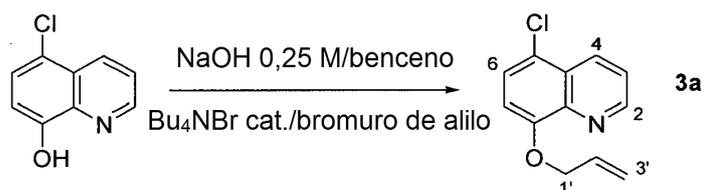
 $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, acetona- d_6) δ : 8,91 (par de dds, $J = 3,4, 1,2$ Hz, 1H, H-2), 8,53 (par de dds, $J = 6,5, 1,4$ Hz, 1H, H-4), 7,71 (par de dds, $J = 6,5, 4,4$ Hz, 1H, H-3), 7,61 (par de ds, $J = 8,0$ Hz, 2H, 2,6-Ph), 7,27 (par de ts, $J = 8,0$ Hz, 2H, 3,5-Ph), 7,15 (d, 1H, 4-Ph), 3,71 (t a, $J = 4,8$ Hz, 2H, 2,6-morfolina), 2,88 (s a, 3H, 2,6-morfolina, OH), 2,85 (s a, 1H, $N\text{-CH(Ph)-}$), 2,47 (s a, 4H, 3,5-morfolina) $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, acetona- d_6) δ : 153,35, 150,43, 149,97, 149,87, 142,38, 139,99, 133,73, 133,54 (C-4), 129,56 y 128,97 (3,5-Ph), 128,54 y 128,20 (2,6-Ph), 127,26 (4-Ph), 125,92, 125,42, 124,00 (C-3), 123,69 (C-2), 120,86, 111,28, 69,09 y 67,55 (2,6-morfolina), 53,51 (3,5-morfolina) 355 (95)**5-Cloro-7-(1-(2-furil)-1-(2-tiazolilamino)-metil)-8-hidroxi-quinolina (2g)**

Rendimiento: 258 mg, 72%

Datos analíticos para 2g: F_r 0,32 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 126 °C

 $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,85 (dd, $J = 4,0, 1,6$ Hz, 1H, H-2), 8,51 (dd, $J = 8,4, 1,6$ Hz, 1H, H-4), 7,69 (s, 1H, H-6), 7,57 (dd, $J = 8,4, 4,4$ Hz, 1H, H-3), 7,41 (dd, $J = 2,8, 0,8$ Hz, 1H, furil-H5), 7,15 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, tiazol-H5), 6,55 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, tiazol-H4), 6,40 (int. s, 1H, -OH), 6,34 (dd, $J = 3,2, 2,0$ Hz, 1H furil-H3), 6,27 (dd, $J = 2,8, 0,8$ Hz, 1H, furil-H4), 1,62 (s a, 1H, -NH-) $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 168,93, 152,62, 149,11, 148,72, 142,47, 138,84, 138,60, 133,13, 126,32, 125,85, 122,53, 121,55, 120,61, 110,42, 107,74, 107,11, 52,02 MS (MALDI-TOF) m/z : 358 (98)**Ejemplo de referencia 3. Síntesis de 8-Aliloxi-5-cloroquinolina (3a):**



5 Una solución de 5-cloro-8-hidroxiquinolina (1 mmol, 180 mg) en NaOH acuoso (0,25 M, 8 ml; 2 mmol) que contenía bromuro de tetrabutilamonio como el catalizador de transferencia de fase (0,1 mmol, 33 mg) se agitó durante 30 min, y se añadieron bromuro de alilo (1 mmol, 85 μ l) y benceno (8 ml) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente a 50 °C durante 14 h. La mezcla de reacción se repartió entre agua (15 ml) y EtOAc (15 ml) después del enfriamiento a temperatura ambiente y la extracción se repitió dos veces. Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con una solución 1 M de NaOH (15 ml) y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando 1:2 de hexanos-éter como eluyente, proporcionando quinolina 3a en forma de un sólido de color pardo claro (170 mg, 64%).

10 Datos analíticos para 3a:

F_r 0,55 (7:3 de hexanos-EtOAc)

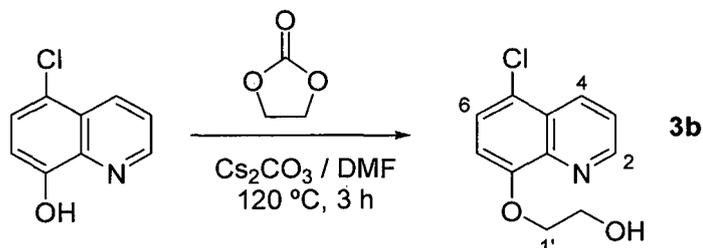
p.f. 49 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 9,04 (dd, $J = 4,4, 1,3$ Hz, 1H, H-2), 8,58 (dd, $J = 5,5, 1,3$ Hz, 1H, H-4), 7,56 (dd, $J = 5,5, 4,4$ Hz, 1H, H-3), 7,54 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-7), 6,99 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-6), 6,31-6,18 (m, 1H, H-2'), 5,48 (dt, $J = 15,2, 3,4$ Hz, 1H, H-3') 5,37 (dt, $J = 9,4, 3,4$ Hz, 1H, H-3'), 4,88 (m, 2H, H-1')

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 149,79, 143,67, 132,92, 132,68, 131,23, 126,27, 125,87, 122,30, 121,98, 118,64 109,07, 69,94 (C-1')

MS (MALDI-TOF) m/z : 220

Síntesis de 8-(2-hidroxiethyl)5-cloroquinolina (3b):



15 Una mezcla de 5-cloro-8-hidroxiquinolina (1 mmol, 180 mg), carbonato de etileno (2 mmol, 180 mg) y Cs_2CO_3 (0,6 mmol, 195 mg) en DMF seca (10 ml) se agitó vigorosamente a 120 °C durante 3 h. Se evaporó DMF a alto vacío y el residuo se disolvió en agua (15 ml), se extrajo dos veces con diclorometano (15 ml), y el residuo que quedó después de la evaporación de diclorometano se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: 4:1 de hexanos-EtOAc). Se obtuvo un sólido de color beige (174 mg, 78%).

Datos analíticos para 3b:

F_r 0,32 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 72 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, acetona- d_6) δ : 8,97 (dd, $J = 3,4, 1,6$ Hz, 1H, H-2), 8,58 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 1H, H-4), 7,73 (dd, $J = 8,8, 4,4$ Hz, 1H, H-3), 7,66 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H-7), 7,26 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-6), 4,96 (s a, int. 1H, OH), 4,28 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H, H-1'), 3,99 (s a, 2H, H-2')

MS (MALDI-TOF) m/z : 224

Ejemplo de referencia 4. Procedimiento general para la síntesis de carbamato de 8-quinolilo

20 Se añadió trietilamina (3 gotas) a una suspensión de 8-hidroxiquinolina (1 mmol) y un isocianato (1 mmol) en éter dietílico (15 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 días a temperatura ambiente y el disolvente se retiró usando un evaporador rotatorio y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente:hexanos o EtOAc al 5 % en hexanos), proporcionando el carbamato de quinolilo respectivo.

5,7-Dicloro-8-quinolil-*N*-(3,5-diclorofenil)-carbamato (4b)

Rendimiento: 233 mg, 58%

Datos analíticos para 4b: F_r 0,64 (7:3 de hexanos-EtOAc) $p.f.$ 148 °C 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 10,56 (s a, 1H, NH); 8,68 (dd, $J = 4,4, 1,6$ Hz, 1H, H-2); 8,52 (dd, $J = 8,8, 1,5$ Hz, 1H, H-4); 7,62 (s, 1H, H-6); 7,59 (dd, $J = 8,8, 4,4$ Hz, 1H, H-3); 7,12 (t ap., $J = 2,0$ Hz, 2H, 2,6-anilina); 7,18 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 4-anilina) ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 154,62, 152,44, 149,81, 140,74, 136,15, 135,53, 132,78, 131,33, 128,56, 126,27, 122,30, 121,98, 121,87, 118,52 MS (MALDI-TOF) m/z : 403**5-Cloro-8-quinolil-*N*-(3,5-diclorofenil)-carbamato (4c)**

5 Rendimiento: 300 mg, 82%

Datos analíticos para 4c: F_r 0,61 (7:3 de hexanos-EtOAc) $p.f.$ 159 °C 1H RMN (400 MHz, Acetona- d_6) δ : 9,88 (s a, 1H, NH), 8,99 (dd, $J = 4,4, 1,6$ Hz, 1H, H-2), 8,65 (dd, $J = 8,6, 1,4$ Hz, 1H, H-4), 7,81 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-7), 7,75 (dd, $J = 8,6, 3,8$ Hz, 1H, H-3), 7,70 (t ap., $J = 2,0$ Hz, 2H, H-2,6-anilina), 7,65 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-6), 7,20 (t ap., $J = 2,0$ Hz, H-4-anilina) ^{13}C RMN (100 MHz, Acetona- d_6) δ : 152,13, 143,35, 142,40, 135,91, 133,61, 128,96, 127,88, 127,34, 124,02, 123,46, 122,85, 117,63 MS (MALDI-TOF) m/z : 367**5,7-Dicloro-8-quinolil-*N*-fenilcarbamato (4d)**

Rendimiento: 253 mg, 76%

Datos analíticos para 4d: F_r 0,66 (7:3 de hexanos-EtOAc) $p.f.$ 136 °C 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,98 (dd, $J = 4,3, 1,2$ Hz, 1H, H-2), 8,59 (dd, $J = 5,8, 1,2$ Hz, 1H, H-4), 7,73 (s, 1H, H-6), 7,58 (dd, $J = 5,5, 3,4$ Hz, 1H, H-3), 7,51 (d ap., $J = 6,1$ Hz, 2H, H-2,6-anilina), 7,44 (s a, 1H, NH), 7,37 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, H-3,5-anilina), 7,16 (t, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-4-anilina) MS (MALDI-TOF) m/z : 33310 **5-Cloro-8-quinolil-*N*-fenilcarbamato (4e)**

Rendimiento: 257 mg, 86%

Datos analíticos para 4e: F_r 0,65 (7:3 de hexanos-EtOAc) $p.f.$ 129 °C 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9,01 (dd, $J = 4,3, 1,2$ Hz, 1H, H-2), 8,59 (dd, $J = 5,8, 1,2$ Hz, 1H, H-4), 7,76 (s a, 1H, NH), 7,63 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, H-7), 7,58 (m, 2H, H-2,6-anilina), 7,54 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, H-6), 7,26 (t, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-3,5-anilina), 7,13 (t, $J = 6,2$ Hz, 1H, H-4-anilina) MS (MALDI-TOF) m/z : 299**5,7-Dicloro-8-quinolil-*N*-(4-fluorofenil)-carbamato (4f)**

Rendimiento: 312 mg, 89%

Datos analíticos para 4f:

F_r 0,68 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 148 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,85 (s a, 1H, NH), 7,71 (dd, $J = 5,1, 3,3$ Hz, 1H, H-2), 7,53 (dd, $J = 5,7, 3,5$ Hz, 1H, H-4), 7,43 (dd, $J = 8,8, 4,8$ Hz, 1H, H-3), 7,35 (s, 1H, H-6), 7,28 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H, H-2,6-anilina), 7,01 (t, $J = 8,8, 2\text{H}$, H-3,5-anilina)

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 161,14 (d), 149,05, 133,93, 131,99, 131,90, 131,16, 129,07, 122,90, 122,82, 118,03, 117,98, 116,12, 115,90

MS (MALDI-TOF) m/z : 351

5-Cloro-8-quinolil-*N*-(3,5-difluorofenil)-carbamato (4 g)

Rendimiento: 188 mg, 56%

5 Datos analíticos para 4g:

F_r 0,67 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 152 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,98 (dd, $J = 4,4, 1,3$ Hz, 1H, H-2); 8,56 (dd, $J = 5,5, 1,3$ Hz, 1H, H-4); 8,32 (s a, 1H, NH); 7,59 (dd, $J = 5,5, 4,4$ Hz, 1H, H-3); 7,53 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-7); 7,41 (d, $J = 6,3$ Hz, 2,6-anilina); 7,01 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-6); 6,42 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, 4-anilina)

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 165,01 (d), 153,11, 151,23, 150,89, 140,31, 139,46, 132,92, 128,45, 126,27, 122,30, 121,98, 112,47, 109,07 y 108,78 (par de ds), 103,02 (t)

MS (MALDI-TOF) m/z : 335

5-Cloro-8-quinolil-*N*-(2-cloroetil)-carbamato (4h)

Rendimiento: 248 mg, 87%

Datos analíticos para 4h:

F_r 0,54 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 138 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, acetona- d_6) δ : 8,92 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, H-2), 8,62 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-4), 7,77-7,69 (m, 2H, H-6,7), 7,54 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-3), 7,37 (s a, 1H, NH), 3,76 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, H-2'), 3,59 (c aparente, $J = 6$ Hz, 2H, H-1')

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, acetona- d_6) δ : 155,02, 151,75, 151,72, 143,61, 128,20, 127,99, 133,50, 127,28, 123,79, 122,69, 44,08, 43,82

MS (MALDI-TOF) m/z : 285

5,7-Dicloro-8-quinolil-*N*-(2-cloroetil)-carbamato (4i)

10 Rendimiento: 233 mg, 73%

Datos analíticos para 4i:

F_r 0,65 (7:3 de hexanos-EtOAc)

p.f. 112 °C

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, acetona- d_6) δ : 9,00 (dd, $J = 4,0, 1,2$ Hz, 1H, H-2), 8,60 (dd, $J = 8,4, 1,1$ Hz, 1H, H-4), 7,88 (s 1H, H-6), 7,75 (dd, $J = 8,4, 4,0$ Hz, 1H, H-3), 7,54 (s a, 1H, NH), 3,76 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H-2'), 3,61 (c ap., $J = 6$ Hz, 2H, H-1')

¹³C RMN (100 MHz, acetona-d₆) δ: 154,29, 152,90, 150,87, 139,78, 133,98, 133,61, 129,00, 127,97, 126,62, 124,08, 44,16, 43,72

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 319

Ejemplo de referencia 5. 2-Metil-5,7-dinitro-8-hidroxi-quinolina (5b)

Se añadió lentamente quinaldina (6,3 mmol, 1 g) en pequeñas porciones a una mezcla de HNO₃ concentrado/H₂SO₄ (10 ml) en un baño de hielo, y después de 2 h, la mezcla se vertió en hielo picado. Se filtró un polvo de color amarillo, se lavó con EtOH caliente, y se cristalizó en nitrobencono.

5 Rendimiento: 1,1 g, 69%

p.f. 260 °C (descomposición)

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,03 (s, 1H, OH), 9,66 (d, *J*_{3,4} = 8,8 Hz, 1H, H-4), 9,21 (s, 1H, H-6), 8,15 (d, *J*_{3,4} = 8,8 Hz, 1H, H-3), 2,94 (s, 3H, Me).

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 242, 249 (M⁺)

5-Nitro-8-terc-butoxicarboniloxiquinolina (5c)

10 Se añadieron DMAP (122 mg, 1,0 mmol) y DIPEA (2 ml, 12 mmol) a temperatura ambiente a una suspensión agitada de nitroxolina (1,9 g, 10 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (2,2 g, 10 mmol) en una mezcla 1:2 de hexanos-DCM (80 ml). La mezcla se agitó durante 14 horas a temperatura ambiente, se filtró usando filtro de papel y el filtrado se concentró al vacío, proporcionando un producto en bruto en forma de un aceite de color amarillento. El producto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: Hexanos/DCM = 7:3).

Rendimiento: 2,7 g, 92%

F_r 0,65 (2:3 de EtOAc/hexanos)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,89 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,91 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, H-2), 8,35 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H-6), 7,57 (dd, *J* = 8,8 Hz y 3,6 Hz, 1H, H-3), 7,45 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-7), 1,52 (s, 9H, t-Bu).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 153,7, 152,1, 151,4, 142,9, 141,12, 132,4, 125,5, 124,6, 122,8, 119,9, 84,1, 27,6

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 296 (M-16+23), 291 (MH⁺), 266, 249, 233 (M-Bu-t)

1-(5-Nitro-quinolin-8-iloxi)-acetato de etilo (5d)

15 Se calentó nitroxolina (1 g, 5,3 mmol) a 60 °C con bromoacetato de etilo (0,6 ml, 5,3 mmol) y carbonato potásico (1 g, 7,3 mmol) en DMSO durante 18 h, se enfrió a ta, se diluyó con agua (30 ml) y se extrajo con una mezcla de 2:3 de EtOAc/Et₂O. El disolvente se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: 1:3 de EtOAc/DCM).

Rendimiento: 980 mg, 67%

F_r 0,38 (2:3 de EtOAc/hexanos)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 9,15 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-4), 9,01 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H, H-2), 8,42 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-6), 7,67 (dd, *J* = 8,8 Hz y 3,5 Hz, 1H, H-3), 6,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-7), 5,03 (s, 2H, O-CH₂-CO), 4,25 (c, *J* = 7,5 Hz, 2H, Et), 1,25 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H, Et).

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 277 (MH⁺), 299 (M+Na⁺)

1-(5-Nitro-quinolin-8-iloxi)-acetamida (5e)

20 La acetamida 5e también se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para fabricar el acetato 5d, excepto que la reacción se realizó en una escala de 1 mmol, y el carbonato potásico se suplantó con carbonato de cesio.

Rendimiento: 193 mg, 78 % Datos analíticos para 5e

F_r 0,31 (2:3 de EtOAc/hexanos)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 9,4 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,81 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H, H-2), 8,55 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-6), 7,68 (dd, *J* = 8,8 Hz y 3,5 Hz, 1H, H-3), 7,51 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-7), 6,8 (s a, 2H, NH₂), 4,2 (s, 2H, O-CH₂-CO).

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 248 (MH⁺), 270 (M+Na⁺)

Síntesis de pivolato de 5-nitro-quinolin-8-ilo (5f)

5 Se añadió cloruro de pivaloilo (250 μ l, 2 mmol) a una mezcla de nitroxolina (380 mg, 2 mmol), DMAP (98 mg, 0,8 mmol), y Et₃N (1,1 ml, 8 mmol) en DCM (20 ml) a ta, y la mezcla se agitó vigorosamente durante 14 h. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ acuoso al 10 % y la capa de DCM se concentró. El residuo en bruto se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (eluyente: Hexanos/DCM = 7:3), proporcionando pivolato 5 g en forma de un sólido de color amarillo.

Rendimiento: 465 mg, 85%

F_r 0,67 (2:3 de EtOAc/hexanos)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,99 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,93 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, H-2), 8,38 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H-6), 7,59 (dd, *J* = 8,8 Hz y 3,6 Hz, 1H, H-3), 7,46 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-7), 1,49 (s, 9H, t-Bu).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 176,99, 153,69, 151,44, 142,92, 141,22, 132,39, 125,54, 124,62, 122,82, 119,95, 39,71, 27,58.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: 295 (M+Na⁺), 249.

Los compuestos de la invención y los datos biológicos relevantes se encuentran en las siguientes tablas.

Tabla 2

Entrada	R ¹	R ²	R ³	hMetAP2		hMetAP1		Selectividad	
				Mn ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	HUVEC	HFF
1a	H	H	-	2	d	d	d	6,2	6,6
1b	Cl	H	-	0,18	d	12,9	d	1,4	11,4
1c	NO ₂	H	-	0,46	11,2	d	d	1,98	13,6
1d	SO ₃ H	H	-	d	d	d	d	d	d
2a	Cl	H	N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	28	d	d	d	10,7	0,8
2b	Cl	H	piperidilo	7,7	d	d	d	13,5	22,6
2c	H	H	morfolinilo	15,2	d	d	d	33,3	9,8
2d	Cl	H	morfolinilo	2,7	d	d	d	5,6	36,3
2e	Cl	H	(4-metil)piperazinilo	3,8	d	d	d	9,6	15
2f	Cl	Ph	morfolinilo	0,33	8	d	14	8,6	19,2
2g	Cl	2-furilo	2-tiazolilo	2,8	d	d	d	2,5	13,5
3a	Cl	H	alilo	d	d	d	d	d	d
3b	Cl	H	CH ₂ CH ₂ OH	d	d	d	d	d	d

Todos los valores de Cl₅₀ son en µM, d = >50 µM

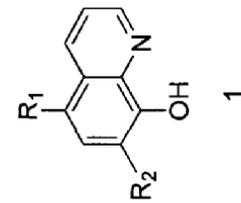
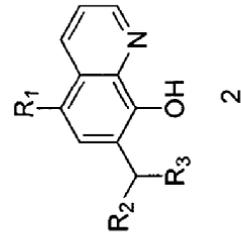
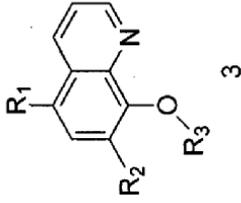


Tabla 3

4

Entrada	R ¹	R ²	R'	hMetAP2		hMetAP1		Selectividad	
				Mn ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	HUVEC	HFF
4a	Cl	Cl	2,4,5-triclorofenilo	2,6	d	d	d	1,3	4,9
4b	Cl	Cl	2,5-diclorofenilo	0,9	d	d	d	0,11	3
4c	Cl	H	2,5-diclorofenilo	0,07	2,2	12,6	d	1,2	8
4d	Cl	Cl	Ph	1,6	d	d	d	2,2	15,3
4e	Cl	H	Ph	0,03	1,9	11,9	d	2,1	8,8
4f	Cl	Cl	4-fluorofenilo	3,1	d	d	d	2,2	37
4g	Cl	H	3,5-difluorofenilo	1,8	45,7	d	>50	2,6	16,1
4h	Cl	H	2-cloroetilo	0,8	d	38,2	d	2,3	8,4
4i	Cl	Cl	2-cloroetilo	0,3	d	d	d	2,4	11,1

Todos los valores de Cl₅₀ son en µM, d = >50 µM

Tabla 4

5

Entrada	R ⁴	R ²	R ³	hMetAP2	hMetAP1	HUVEC
1c	H	H	H	0,46	d	1,98
5b	Me	NO ₂	H			17,31
5c	H	H	CO ₂ C(Me) ₃			0,29
5d	H	H	CH ₂ CO ₂ Et			7,3
5e	H	H	CH ₂ CONH ₂			6,3
5f	H	H	COC(Me) ₃			1,6

Todos los valores de Cl₅₀ son en µM, d = >50 µM; Los ensayos in vitro se realizaron en presencia de iones de metal fisiológicamente pertinentes (es decir Mn²⁺ para hMetAP2 y Co²⁺ para hMetAP1)

Ejemplo 6: Ensayos biológicos

Cultivo celular y cribado de fármacos.

Se cultivaron células HCC1954 en RPMI1640 que contenían FBS al 10 %. Se cultivaron HUVEC usando el kit de balas EGM-2 (Cambrex) según las instrucciones del fabricante. Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada ajustada al 5 % de CO₂. Para el cribado de fármacos, las soluciones madre 10 mM de la Biblioteca de Medicamentos Johns Hopkins se dispusieron en placas de 96 pocillos y se tamizaron a una concentración final de 10 μM. El crecimiento celular se determinó usando un ensayo de incorporación de [³H]-timidina. Se sembraron células (típicamente 5.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos que contenían 0,2 ml de medio de crecimiento y se dejaron adherir durante 24 h. Después, las células se trataron con fármacos durante 24 h. Las células se pulsaron con 1 μCi de [³H]-timidina (MP Biomedicals, 6,7 Ci mmol⁻¹) durante 8 h y se cosecharon, tras el tratamiento con tripsina, sobre filtros de fibra de vidrio (Wallac, Turku, Finlandia), a partir de los cuales se determinaron recuentos de ³H usando un lector de placas Perkin Elmer MicroBeta.

Ensayo enzimático de MetAP.

Se prepararon MetAP1 y MetAP2 humanos recombinantes como se ha descrito previamente (Hu, X. y col (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 18148-18153). Las enzimas MetAP en tampón de ensayo que contenían HEPES 20 mM, KCl 40 mM, y CoCl₂ 10 μM (para MetAP 1) o MnCl₂ (para MetAP2) se incubaron con una solución de sustrato que contenía Met-Pro-pNA a 0,6 mM temperatura ambiente durante 20-30 min. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente por un aumento de la absorbancia a 450 nm.

Ensayo de crecimiento de levadura.

Se usaron la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 (MATa/*ahis3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2*) y sus derivados haploides isogénicos para los mutantes de delección de MetAP1 (*map1Δ*) y MetAP2 (*map2Δ*) para los ensayos de crecimiento de levadura. Los fármacos disueltos en DMSO se colocaron sobre discos de filtro estériles y se secaron antes de los experimentos. Las cepas de levadura que crecen exponencialmente se mezclaron con agar superior y se pusieron en placas de YPD (extracto de levadura al 1 %/peptona al 2 %/glucosa al 2 %). Los discos de filtro se pusieron entonces en las placas de YPD que contenían levaduras y la incubación se continuó durante 48 h a 30 °C.

La construcción y transfección de ARNs.

Los oligonucleótidos de ARNs de MetAP2 y SirT1 se compraron en Qiagen. Las HUVEC que crecían en una placa de 6 pocillos se transfectaron con ARNs de MetAP2 o SirT1 usando reactivo de transfección HiperFect (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 h de transfección, las células se cosecharon y se analizaron para la transferencia de Western.

Transferencia de Western.

Las células se lisaron añadiendo 1 volumen de tampón Laemmli 2x y luego se hirvieron durante 5 min. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las proteínas se detectaron utilizando anticuerpos primarios para p53 (Santa Cruz), met-14-3-3γ (Novus), p21 (Santa Cruz), Rb (Santa Cruz), MetAP2 (Hu, X. y col (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 18148-18153), SirT1 (Santa Cruz), acetil-p53-K382 (Abeam), acetil-tubulina (Sigma), histona-H3 (Santa Cruz), acetil-H3 (Santa Cruz) y α-tubulina (TU-02, Santa Cruz) seguido de la incubación con anticuerpos anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) y quimioluminiscencia mejorada (ECL, Amersham).

Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR).

El ARN total de células se aisló mediante reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se transcribió después inversamente utilizando Superscript III (Invitrogen) y se llevó a cabo el procedimiento de PCR estándar usando conjuntos de cebadores específicos para p53 y p21 como se indica a continuación; 5'-CCCCTCCTGGCCCTGTCATCTTC-3' (directo) y 5'-GCAGCGCCTCACAACCTCCGTCAT-3' (inverso) para p53, 5'-GAGCCGGGATGAGTTGGGAGGAG-3' (directo) y 5'-CAGCCGGCGTTTGGAGTGAGTAA-3' (inverso) para p21. Se usó un análisis RT-PCR de GAPDH como un control interno para la normalización.

Tinción de β-galactosidasa (SA-β-gal) asociada a la senescencia.

Las células en placas de 6 pocillos se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3 %. Después del lavado con PBS, las células se incubaron durante 24 h a 37 °C (sin CO₂, protegidas de la luz) en una solución de tinción de SA-β-gal recién preparada que contenía 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil B-D-galactopiranosido (X-gal), ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM y ácido cítrico 40 mM, titulado con NaH₂PO₄ a pH 6,0. La solución de SA-β-gal se retiró después y las células se lavaron con PBS. Las células teñidas se observaron bajo un microscopio.

Ensayo enzimático Sirtuina.

Los kits de ensayo fluorométricos de sirtuina se obtuvieron a partir de Biomol. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó una unidad de SirT1 por reacción. Para SirT2 y SirT3, se usaron 2

unidades para el ensayo. Se usaron sustratos de Fluor de Lys y NAD⁺ a 25 μM y 100 μM, respectivamente.

Ensayo de formación de tubos de células endoteliales.

5 Las HUVEC se sembraron en una placa de 96 pocillos (2 x 10⁴ células/pocillo) recubierta con Matrigel. Las células se incubaron a continuación durante 16~18 h en una incubadora humidificada al 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células se lavaron cuidadosamente con PBS una vez y después se añadió la solución de Calceína-AM en PBS a una concentración final de 2 μM. Después de la incubación durante 30 minutos adicionales, las células se lavaron cuidadosamente con PBS y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (excitación a 485 nm/emisión a 520 nm). El tubo formado se cuantificó usando AngioQuant v1.33 (The MathWorks).

Ensayo de tapón de Matrigel *in vivo*

10 Se adquirieron ratones sin pelo atímicos hembra (NCR nu/nu, 4-6 semanas de edad) en NCI-Frederick, MD y se trataron de acuerdo con los procedimientos del Johns Hopkins Animal Care and Use Committee. Los ratones de control se trataron con vehículo (DMSO al 5 % en aceite de cacahuete) y el grupo de ensayo se trató con 60 mg/kg de nitroxolina a través de inyección i.p. Los ratones se trataron previamente durante 3 días antes de que se implantaran por vía subcutánea 0,5 ml de Matrigel (BD Biosciences) que contenía 150 ng/ml de VEGF y 200 ng/ml de bFGF. El tratamiento con fármacos se continuó diariamente durante 10 días adicionales. Se sacrificaron los ratones y se cosecharon tapones de Matrigel, se fijaron en formalina neutra tamponada y se procesaron para histología usando tinción con MAS-tricromo. Se fotografió una sección transversal de todo el tapón de Matrigel a x100. Y los vasos sanguíneos llenos de eritrocitos se contaron por campo de una manera ciega.

Xenoinjertos de cáncer de mama.

20 Aproximadamente dos millones de células HCC1954 se inyectaron bilateralmente y por vía subcutánea en ratones sin pelo atímicos hembra (NCR nu/nu, n = 5/grupo). Después de que los tumores se hicieran palpables, los ratones de control se trataron con vehículo (aceite de cacahuete con DMSO al 5 %). El grupo de ensayo se administró i.p. con 60 mg/kg de nitroxolina una vez al día. El volumen del tumor se midió usando un calibrador de vernier y se calculó de acuerdo con la fórmula elipsoide modificada:

25 **Volumen tumoral (mm³) = (eje corto)² x (eje largo) x π/6**

Después de 30 días de tratamiento, los ratones se sacrificaron y los tejidos tumorales se extrajeron para el análisis inmunohistoquímico y las transferencias de Western.

Análisis estadístico.

30 Los resultados se expresan como la media ± error estándar (SE). Se utilizó la prueba t de Student para determinar la significación estadística entre los grupos de control y de prueba. Se consideró estadísticamente significativo un valor P <0,05.

Se han descrito varias realizaciones de la invención. Las realizaciones del presente documento incluyen las recitadas en solitario o en combinación con otras realizaciones definidas en el presente documento. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del ámbito de las siguientes reivindicaciones.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de angiogénesis o neoplasia en una enfermedad o trastorno de un sujeto, en la que dicha enfermedad o trastorno se selecciona de cáncer de riñón, cáncer ocular, cáncer rectal, cáncer de colon, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de vejiga.
2. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de metionina aminopeptidasa de tipo 2.
3. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de SirT1.
- 10 4. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con metionina aminopeptidasa, SirT1, angiogénesis o neoplasia en un sujeto, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un agente terapéutico adicional.
5. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente terapéutico adicional es un compuesto inhibidor de la angiogénesis.
- 15 6. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente terapéutico adicional es un compuesto inhibidor de metionina aminopeptidasa.
7. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente terapéutico adicional es un compuesto inhibidor de SirT1.
- 20 8. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente terapéutico adicional es un compuesto anticanceroso.
9. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para administración oral, tópica, parental, intravenosa o intramuscular.
10. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto es un ser humano.
- 25 11. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha neoplasia es cáncer de mama.
12. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha neoplasia es cáncer de próstata.
- 30 13. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha neoplasia es cáncer de vejiga.
14. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha neoplasia es cáncer de riñón.
15. Nitroxolina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto se identifica como en necesidad de un inhibidor de la angiogénesis.

35

FIG. 1

Tabla 1. Efectos de nitroxolina sobre la actividad enzimática de MetAP y la proliferación celular

Actividad de MetAp			Proliferación celular				
Fármaco	Isotipo	Ión metálico	Cl ₅₀ (μM)	Fármaco	Línea celular	Cl ₅₀ (μM)	Acción
Nitroxolina	MetAP-1	Co ²⁺	>50	Nitroxolina	HUVECs	1,98	Citostática
		Mn ²⁺	>50		HCC1599	2,85	Citostática
	MetAP-2	Co ²⁺	11,20		HCC1937	4,50	Citostática
		Mn ²⁺	0,46		HCC1954	2,96	Citostática
IV-43	MetAP-1	Co ²⁺	1,50	HCC2218	4,23	Citostática	
		Mn ²⁺	>50	MCF-10A	2,15	Citostática	
TNP-470	MetAP-2	Co ²⁺	0,002	IV-43	HUVEC	0,65	Citostática
		Mn ²⁺	0,002	TNP-470	HUVEC	8,5x10 ⁻⁴	Citostática

FIG. 2A

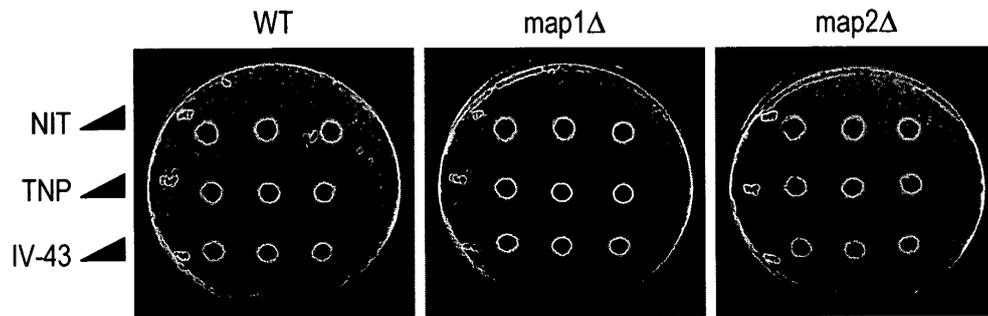


FIG. 2B

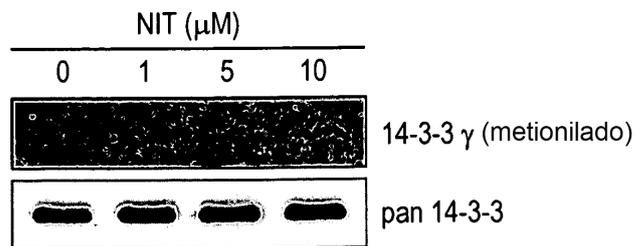


FIG. 3A

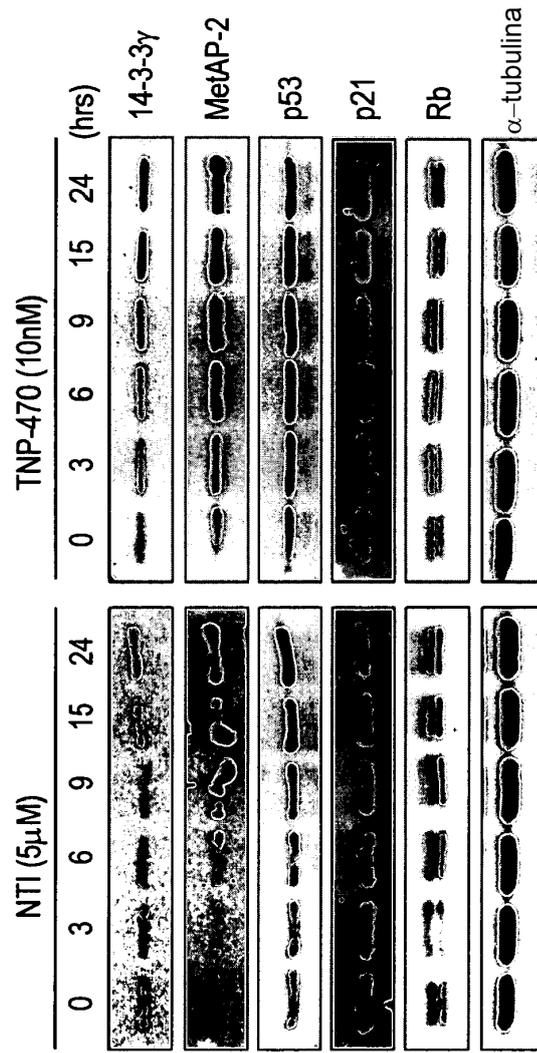


FIG. 3B

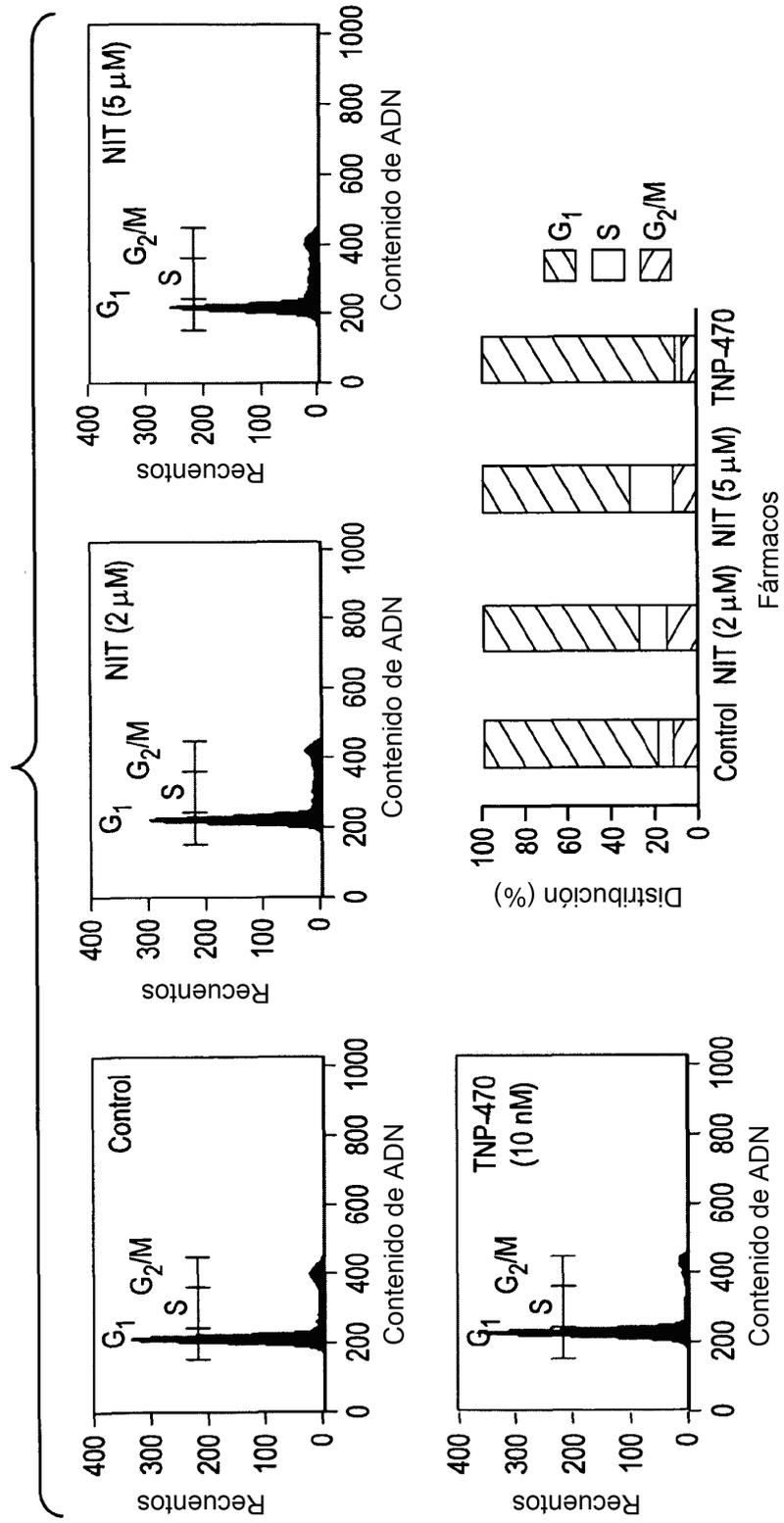


FIG. 4B

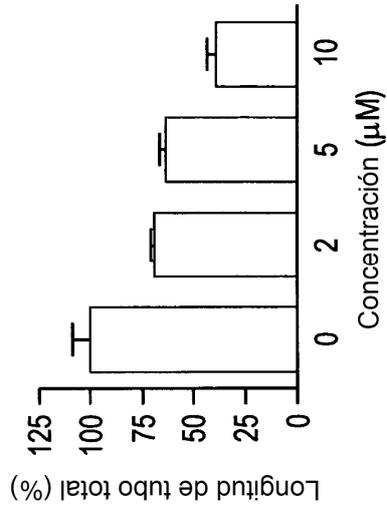


FIG. 4A

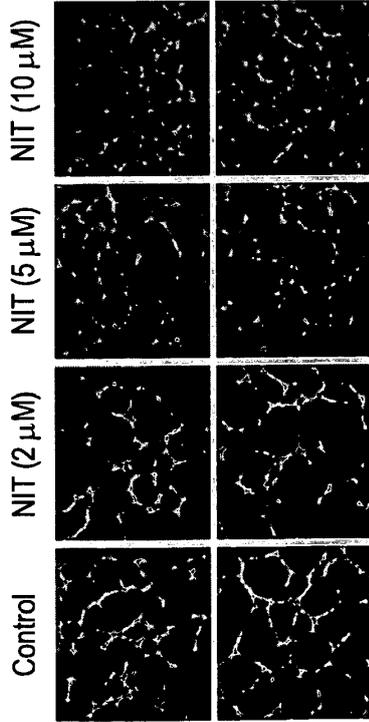


FIG. 4C



FIG. 4D

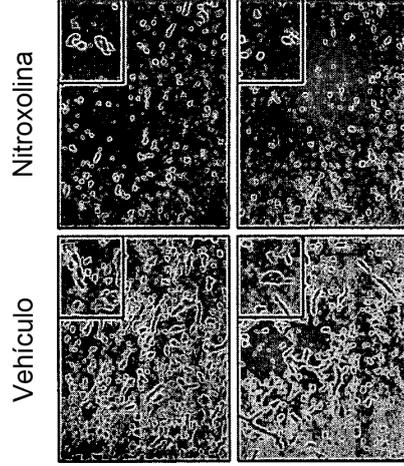


FIG. 5A

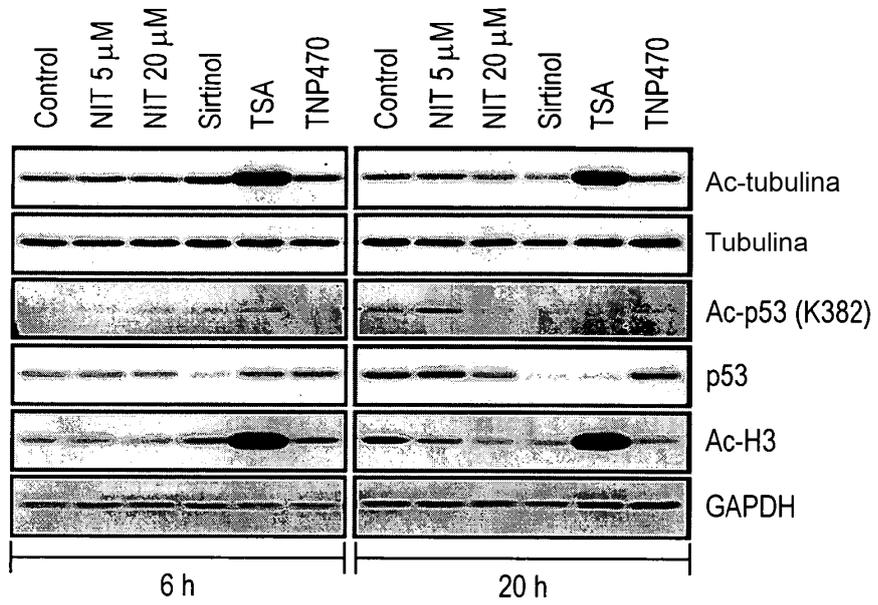


FIG. 5B

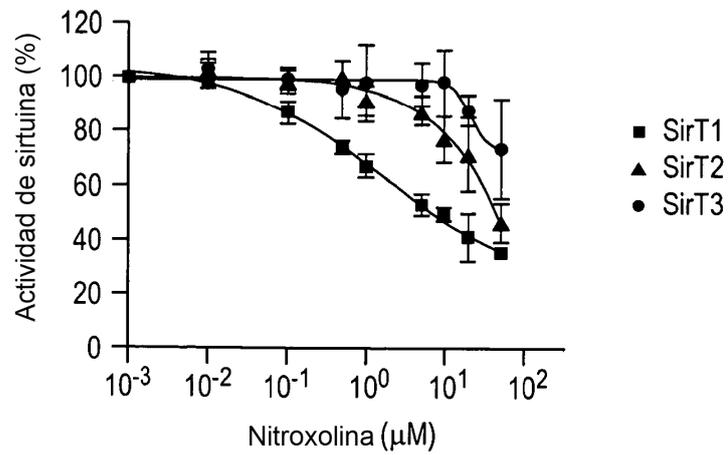


FIG. 5C

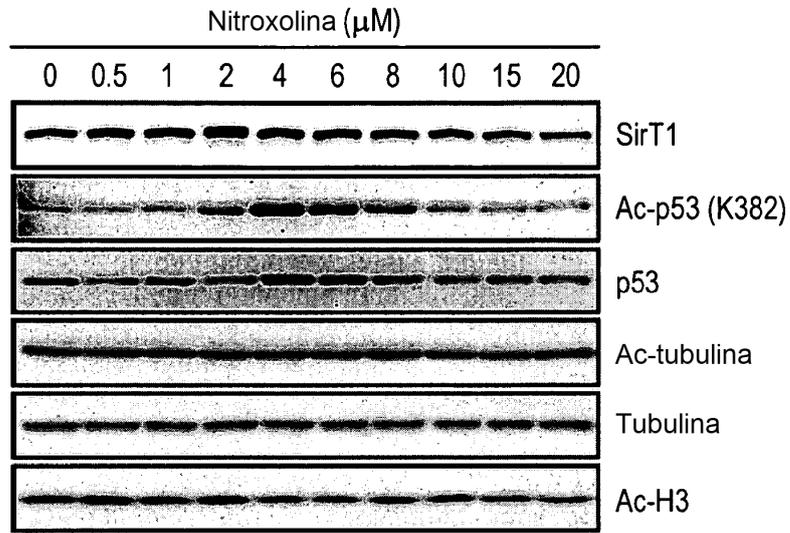
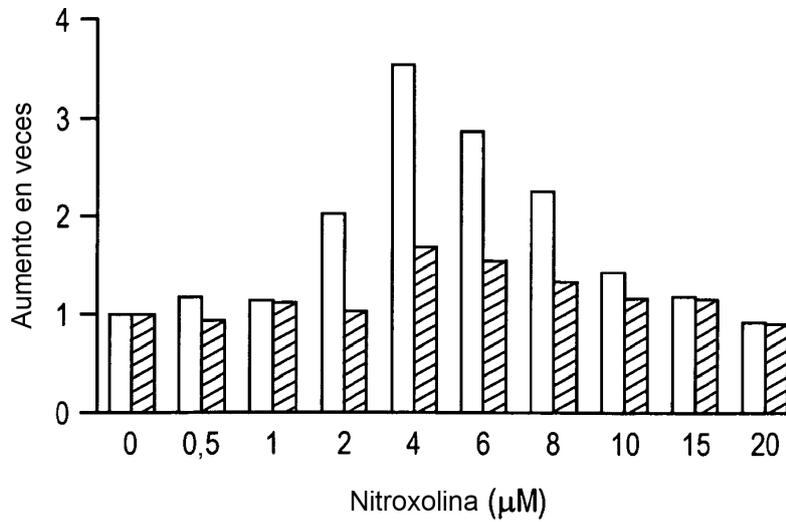


FIG. 5D



□ Ac-p53 (K382)
▨ p53

FIG. 6A

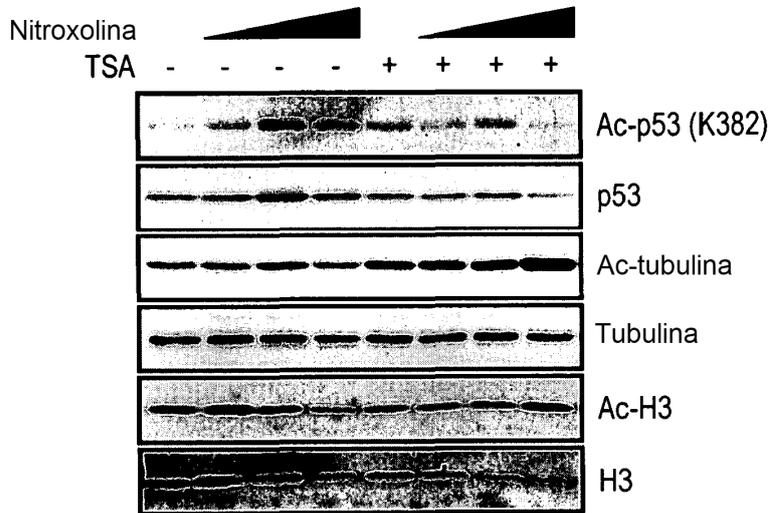


FIG. 6B

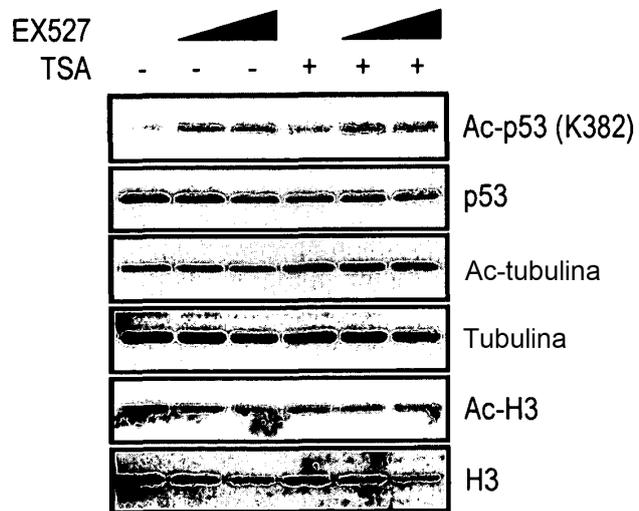


FIG. 6C

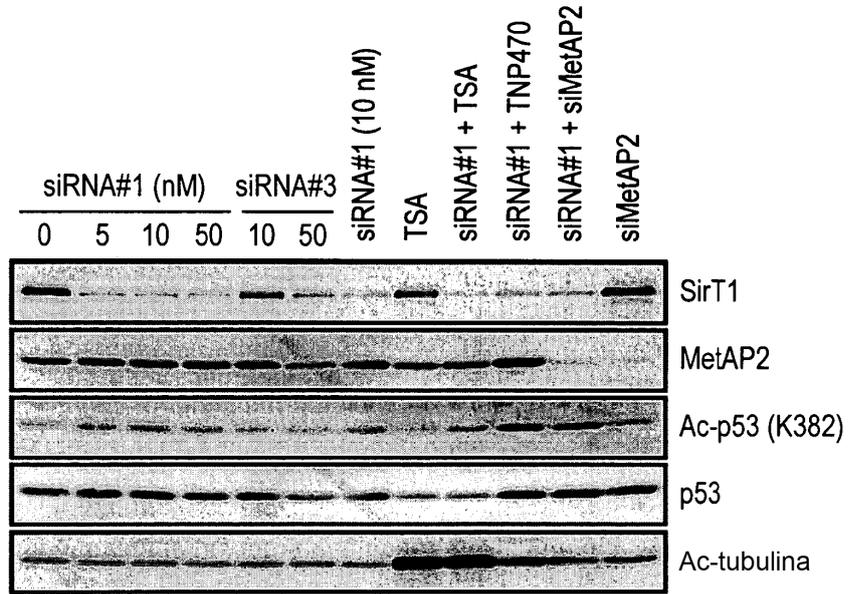


FIG. 6D

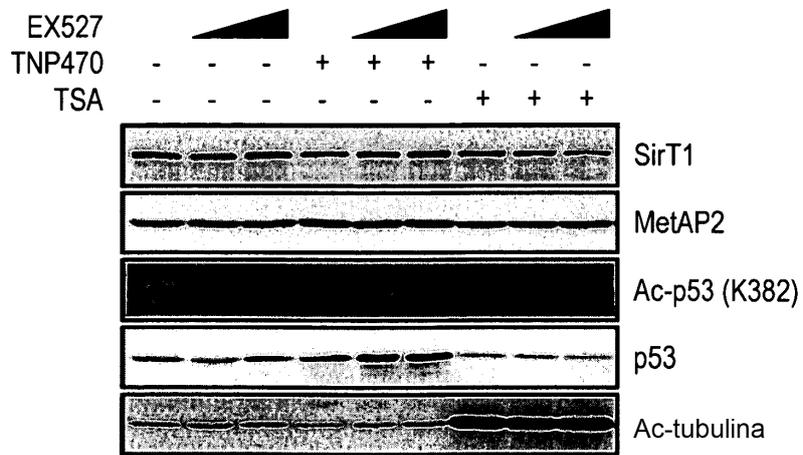


FIG. 7A

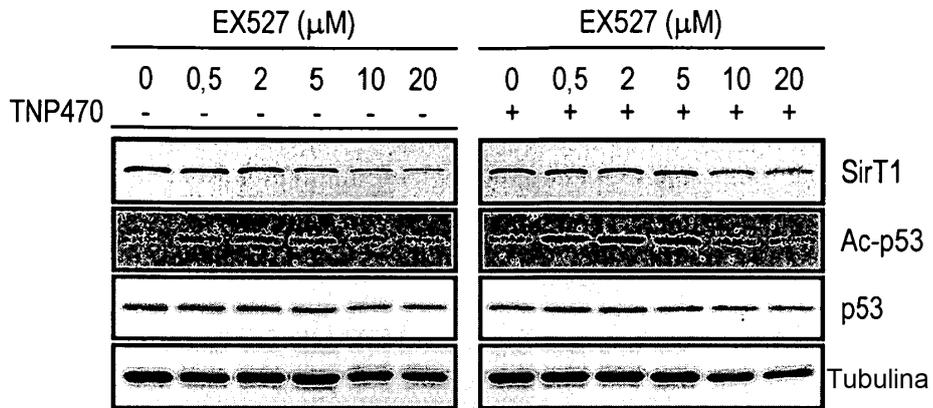


FIG. 7B

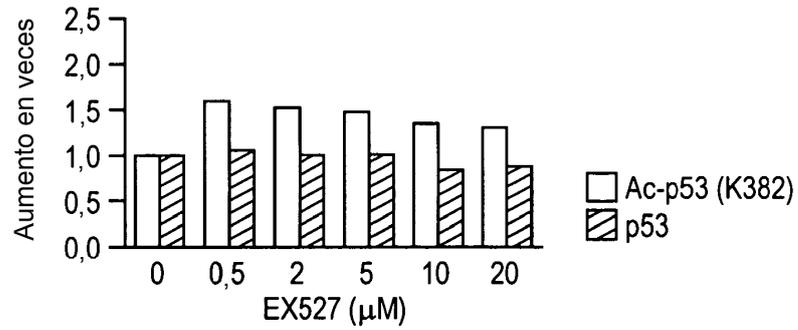


FIG. 7C

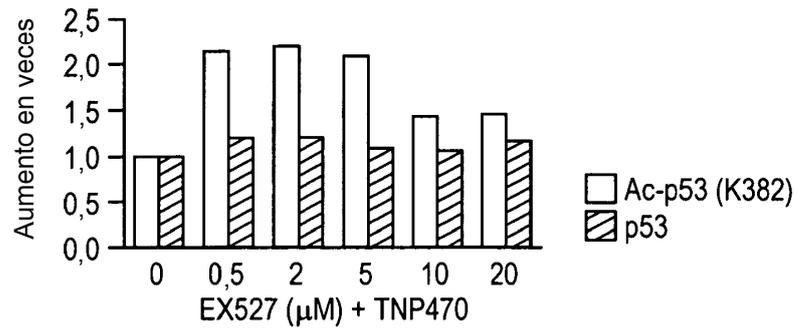


FIG. 7D

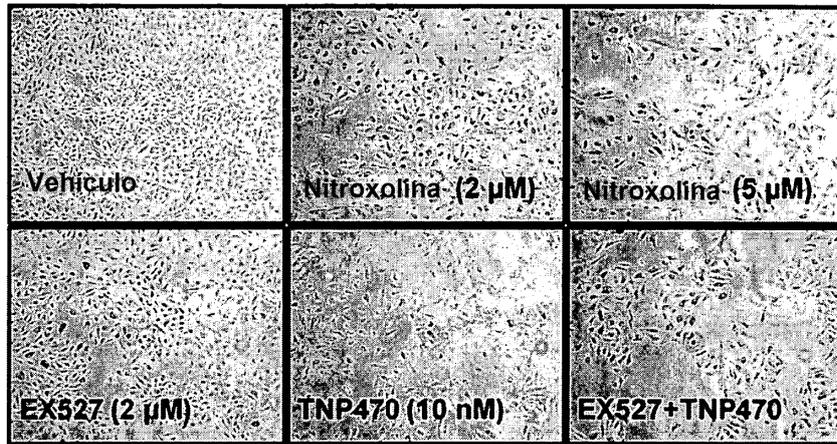


FIG. 7E

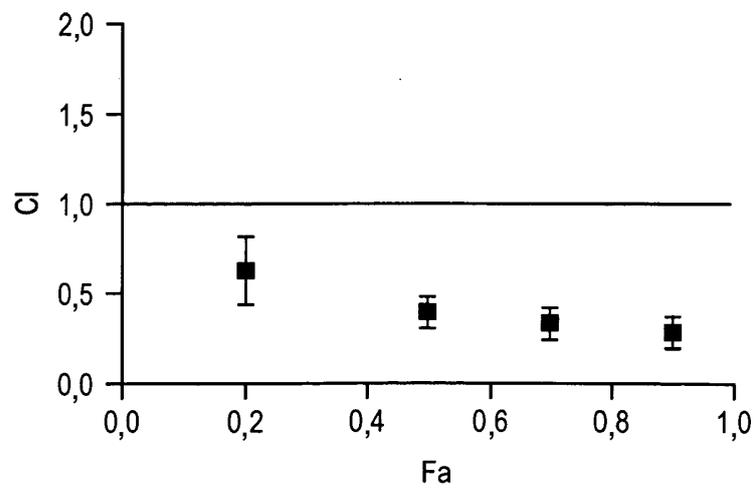


FIG. 8A

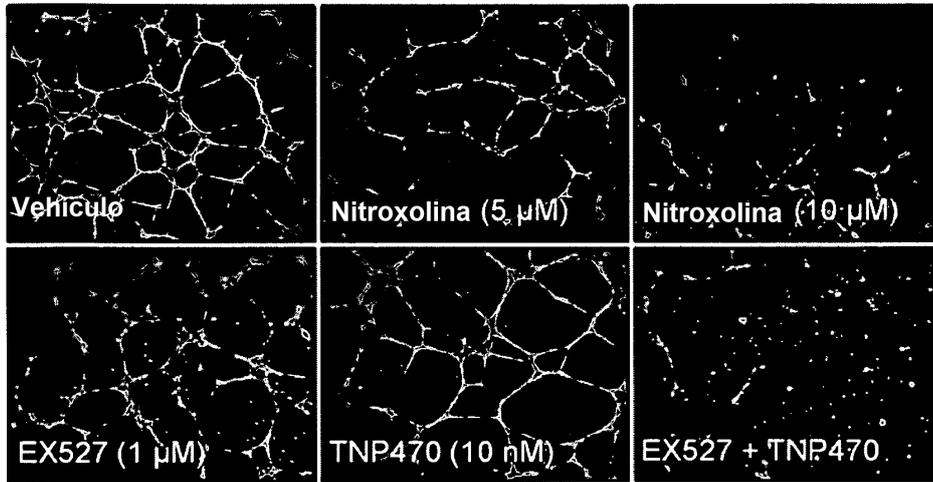


FIG. 8B

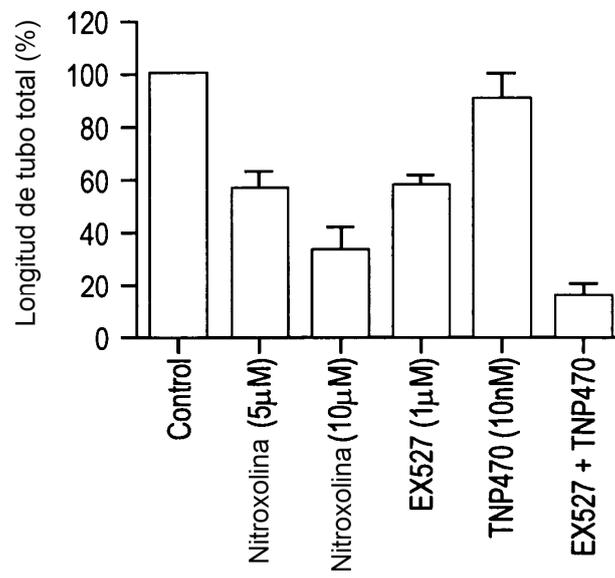


FIG. 8C

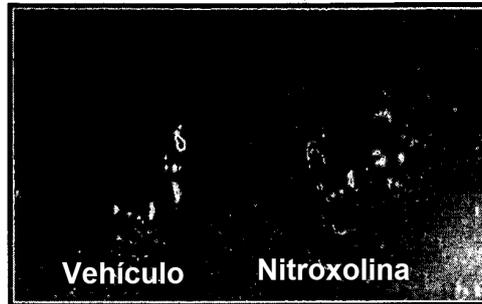


FIG. 8D

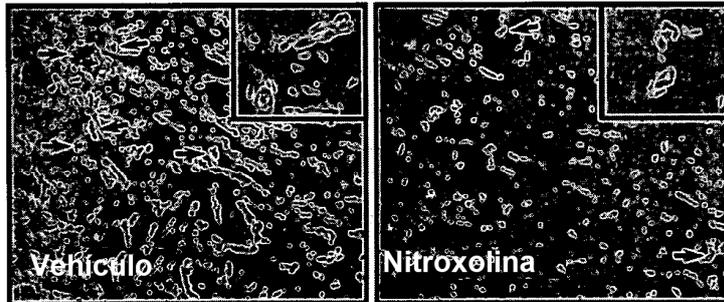


FIG. 8E

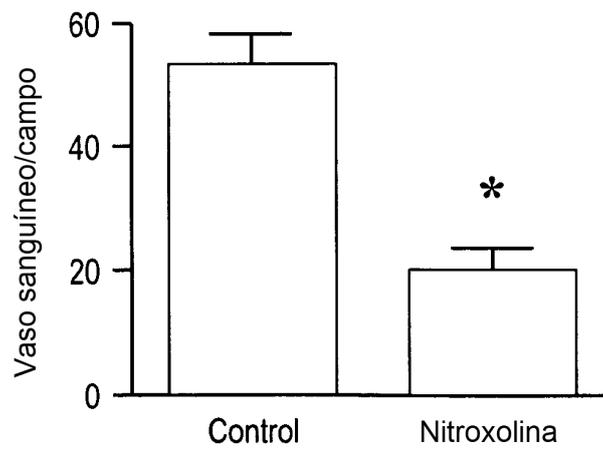


FIG. 9A

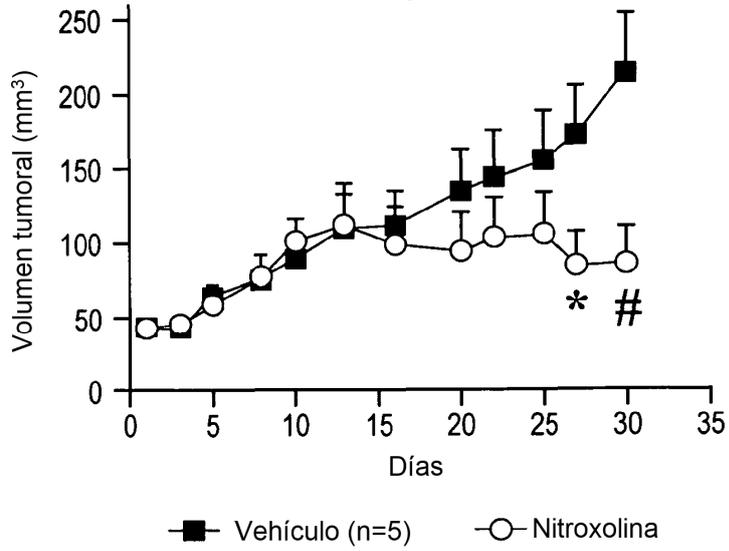


FIG. 9B

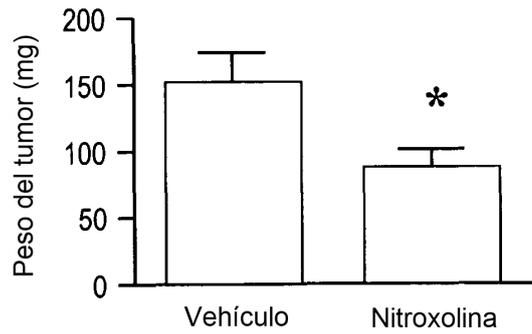


FIG. 9C

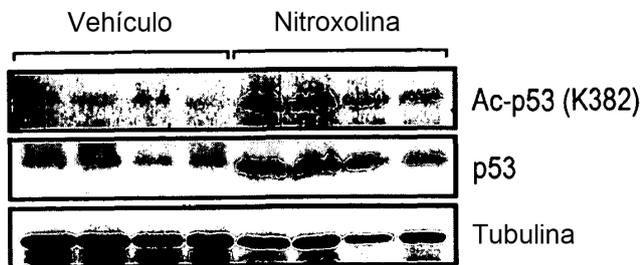


FIG. 9D

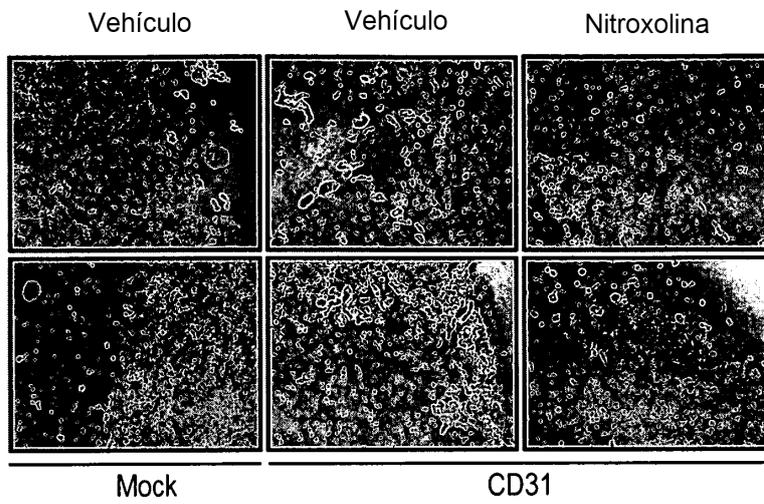


FIG. 9E

