

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 002**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/65** (2006.01)

**C07C 259/06** (2006.01)

**A61K 31/435** (2006.01)

**A61K 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11166373 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2388247**

54 Título: **Inhibidores de la histona desacetilasa**

30 Prioridad:

**18.05.2010 US 781979**

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

**01.12.2017**

73 Titular/es:

**TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)  
250 Wu-Hsing Street  
Taipei 11048, TW**

72 Inventor/es:

**WANG, HUI-PO;  
LEE, ON;  
CHENG, YU-WEN;  
WANG, CHUN-LI;  
CHANG, FENG-SHUO y  
HSIAO, CHE-CHIH**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**ES 2 645 002 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la histona desacetilasa

## 5 Estado de la técnica

Las histona desacetilasas (HDAC) son una clase de enzimas que regulan la acetilación de las histonas y, por lo tanto, regulan la expresión génica.

- 10 Se sabe que los inhibidores de HDAC inducen la detención del crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis en células tumorales. Véase, por ejemplo, Lu *et al.*, *J. Med. Chem.* 2005, 48, 5530-5535; Kulp *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 5199-5206; y Ryan *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 3912-3922. También se ha informado que atenúan la inflamación (por ejemplo, mucositis inducida por quimioterapia o radioterapia) mediante la supresión de la expresión de citocinas proinflamatorias. Véase, por ejemplo, I. M. Adcock, *British Journal of Pharmacology*, 2007, 150(7): 839-831; y Y. L. Chung *et al.*, "Carcinogenesis" 2009 30(8): 1387-1397.

En la actualidad, los inhibidores de HDAC están atrayendo gran atención como posibles agentes antineoplásicos y antiinflamatorios.

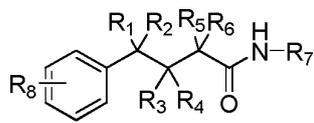
- 20 Tischler *et al*, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2008, 23(4):549-555 (Chemical abstracts service, número de acceso 2008:910747) desvelan compuestos 4-fenilbutíricos como inhibidores de HDAC. La solicitud de patente internacional WO2005/037257 desvela inhibidores de la alanil-amino peptidasa. El documento GB 1 171 670 desvela derivados de ácido 4-aril-3-hidroxi-butírico útiles como agentes antiinflamatorios. Conejo-García *et al*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(18):4004-4009 describen un sistema profarmacológico de hidroxilaminas, basado en la catálisis de las esterasas. Kurz *et al*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, 2(14):2023-2027 desvelan precursores en la síntesis de ácidos alfa-hidroxi-hidroxiácidos. Danieli *et al*, *Chimica e l'Industria*, 1968, 50(5):553-555 (Chemical abstracts service, número de acceso 1968:443375) informa de la síntesis fotoquímica de lactonas. Potapov *et al*, *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, 1982, 18(6):1205-1208 (Chemical abstracts service, número de acceso 1982:544474) desvela la síntesis de ácidos arilalquilhidroxámicos.
- 30 Zhang *et al*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, 18(5):1761-1772, desvelan derivados de ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico como inhibidores de las HDAC. Para terminar, en *ChemMedChem* 2009, 4, 283-290 (Schafer *et al.*), se desvelan ácidos hidroxiácidos que contienen piridilalanina como inhibidores selectivos de HDAC6. Estos compuestos son diferentes de los compuestos de la presente solicitud.

## 35 Explicación de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertos compuestos que contienen amino son inhibidores de las HDAC eficaces y tienen una potente actividad contra la mucositis. Por lo tanto, la presente invención se refiere a compuestos que contienen amino y a su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las

40 HDAC.

En un aspecto, la presente invención presenta compuestos de fórmula (I):



45

Fórmula (I)

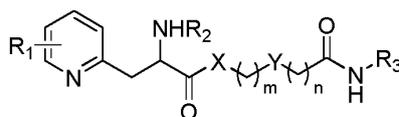
donde cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> es, independientemente, H, alquilo, OH o alcoxi; R<sub>7</sub> es OH, OR u OC(O)R, siendo R alquilo opcionalmente sustituido con halo, arilo, heteroarilo, amino o carboxilo; y R<sub>8</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHC(O)R' o (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OC(O)R', siendo m 0, 1 ó 2 y siendo R' alquilo opcionalmente sustituido con halo, arilo, heteroarilo o carboxilo.

50

En referencia a la Fórmula (I), un subconjunto de los compuestos descritos anteriormente puede tener una o más de las siguientes características: R<sub>7</sub> es OC(O)R, siendo R alquilo sustituido con NH<sub>2</sub> o fenilo; y cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> es H, o cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es H, R<sub>4</sub> es OH, y cada uno de R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> es alquilo.

55

En otro aspecto, en el presente documento, se describen compuestos de fórmula (II):



Fórmula (II)

donde R<sub>1</sub> es H, OH, amino, alcoxi, arilalcoxi (por ejemplo, bencilcoxi), alquilcarboniloxi o alcoxicarboniloxi; R<sub>2</sub> es H, OH, alcoxi, alquilcarbonilo o alcoxicarbonilo; R<sub>3</sub> es OH o fenilo; X es O o NH; Y es fenileno o -CH<sub>2</sub>-; y cada uno de m y n es, independientemente, 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

En referencia a la Fórmula (II), un subconjunto de los compuestos descritos anteriormente puede tener una o más de las siguientes características: X es NH u O (por ejemplo, X es NH), Y es fenileno.

10

El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo monovalente lineal, ramificado o cíclico que contiene, a menos que se indique lo contrario, de 1 a 20 átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>). Los ejemplos de alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *i*-butilo, *t*-butilo o ciclohexilo. Alquilo también puede contener uno o más heteroátomos (tales como O, N, S o Se) y/o uno o más enlaces dobles o triples. El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monovalente monocíclico de 6 átomos de carbonos, bicíclico de 10 átomos de carbonos o tricíclico de 14 átomos carbonos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y antraceno. El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo monovalente monocíclico de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8 a 12 miembros o tricíclico de 11 a 14 miembros que tiene uno o más heteroátomos (tales como O, N, S o Se). Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen piridilo, furilo, imidazolilo, bencimidazolilo, pirimidinilo, tienilo, quinolinilo, indolilo, tetrazol y tiazolilo.

15

20

Los alquilo, arilo y heteroarilo mencionados anteriormente incluyen restos sustituidos y no sustituidos. Los posibles sustituyentes en amino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquenilo, arilo y heteroarilo incluyen, pero sin limitación, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>, cicloalquenilo C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>, heterocicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, heterocicloalquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, amino, alquilamino C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilamino, hidroxilo, halo, oxo (O=), tioxo (S=), tio, sililo, alquilatio C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, ariltio, alquilsulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilsulfonilo, acilamino, aminoacilo, aminotioacilo, amidino, mercapto, amido, tioureido, tiocianato, sulfonamido, guanidina, ureido, ciano, nitro, acilo, tioacilo, aciloxi, carbamido, carbamilo (-C(O)NH<sub>2</sub>), carboxilo (-COOH) y éster carboxílico. Por otra parte, los posibles sustituyentes en alquilo, alquenilo o alquinilo incluyen todos los sustituyentes citados anteriormente a excepción de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>. Cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo y heteroarilo también se pueden condensar entre sí.

25

30

El término "alcoxi" se refiere a un radical -O-alquilo. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi, *n*-propoxi, *iso*-propoxi, *n*-butoxi, *iso*-butoxi, *sec*-butoxi y *terc*-butoxi. El término "amino" se refiere a NH<sub>2</sub>, alquilamino o arilamino. El término "alquilamino" se refiere a un radical -N(R)-alquilo, donde R puede ser H, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo o heteroarilo. El término "arilamino" se refiere a un -N(R)-arilo, donde R puede ser H, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo o heteroarilo.

35

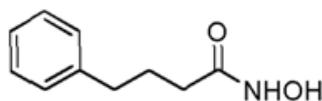
40

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen los propios compuestos, así como sus sales, sus solvatos, si es aplicable. Una sal, por ejemplo, se puede formar entre un anión y un grupo cargado positivamente (por ejemplo, amino) en un compuesto. Los aniones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bisulfato, sulfamato, nitrato, fosfato, citrato, metanosulfonato, trifluoroacetato, glutamato, glucuronato, glutarato, malato, maleato, succinato, fumarato, tartrato, tosilato, salicilato, lactato, naftalenosulfonato y acetato. Asimismo, también puede formarse una sal entre un catión y un grupo cargado negativamente (por ejemplo, carboxilato) en un compuesto de indolil- o indolinil-hidroxamato. Los cationes adecuados incluyen ion sodio, ion potasio, ion magnesio, ion calcio y un catión amonio tal como ion tetrametilamonio. Los compuestos descritos anteriormente también incluyen las sales que contienen átomos de nitrógeno cuaternarios.

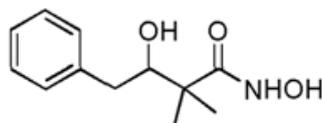
45

50

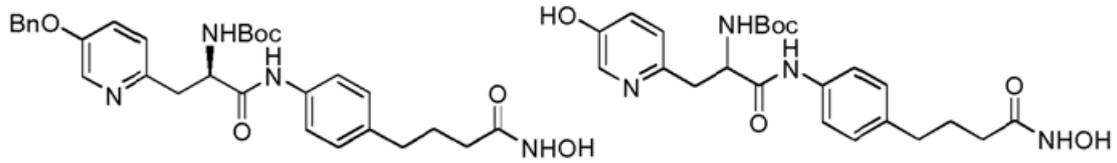
A continuación, se muestran compuestos ilustrativos descritos en el presente documento:



Compuesto 1

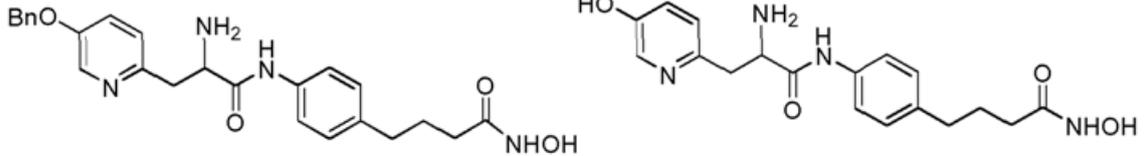


Compuesto 2



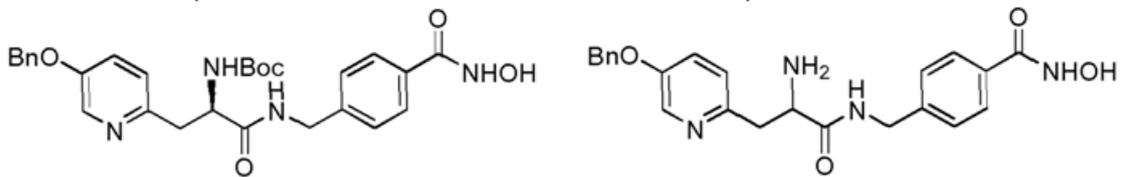
Compuesto 3

Compuesto 4



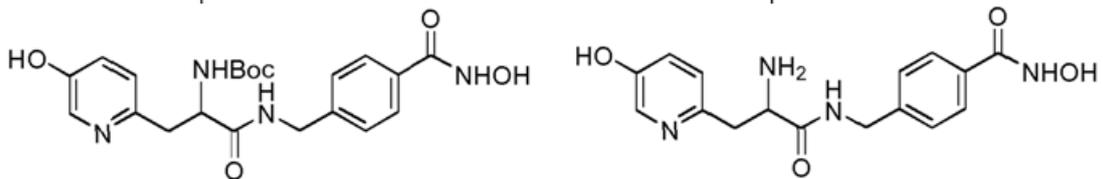
Compuesto 5

Compuesto 6



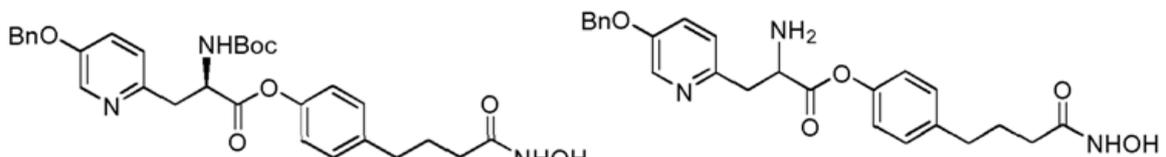
Compuesto 7

Compuesto 8



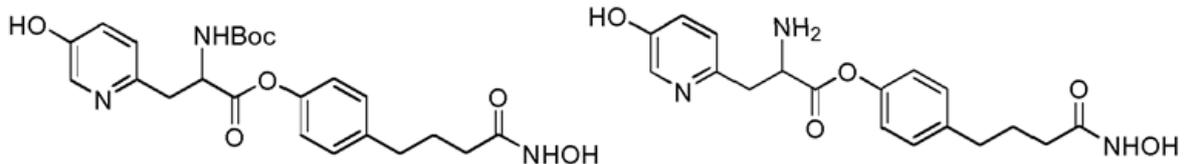
Compuesto 9

Compuesto 10



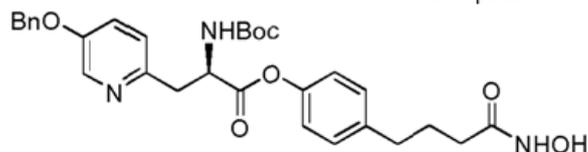
Compuesto 11

Compuesto 12



Compuesto 13

Compuesto 14



Compuesto 15

5 En otro aspecto más, se describe el uso de uno de los compuestos descritos anteriormente en un método de inhibición de la actividad de HDAC mediante la puesta en contacto de una célula con una cantidad eficaz de dicho compuesto. En otro aspecto más, se describe el uso de dichos compuestos en un método de tratamiento de la mucositis o el cáncer mediante la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de uno de los compuestos descritos anteriormente.

También se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que contiene uno o más de estos compuestos para su uso en el tratamiento de la mucositis o del cáncer, así como estos usos terapéuticos y el uso para la fabricación de un medicamento para tratar la mucositis o el cáncer.

## 5 Descripción detallada

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden sintetizar mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, los Compuestos 1-15 descritos anteriormente se pueden preparar modificando el ácido fenilbutírico, la lisina o la azatirosina mediante transformaciones químicas convencionales (incluyendo el uso de grupos protectores), por ejemplo, las descritas en R. Larock, "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 sus ediciones posteriores.

15 Los compuestos así sintetizados pueden purificarse más mediante cromatografía en columna ultrarrápida, cromatografía líquida de alta resolución, cristalización o cualquier otro método adecuado.

Los compuestos mencionados en el presente documento pueden contener un doble enlace no aromático y uno o más centros asimétricos. Así pues, pueden darse en forma de racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales, mezclas diastereoméricas y formas isoméricas *cis* o *trans*. Se contempla la totalidad de dichas formas isoméricas.

También se describen en el presente documento (1) una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (2) un método de tratamiento de la mucositis o del cáncer mediante la administración a un sujeto que necesita este tratamiento de una cantidad eficaz de este compuesto.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a la administración de un compuesto activo a un sujeto que tiene mucositis o cáncer, o que tiene un síntoma o una predisposición hacia el mismo, con el fin de curar, cicatrizar, aliviar, paliar, alterar, remediar, mejorar, afectar al o reducir el riesgo del trastorno, los síntomas o la predisposición hacia la mucositis o el cáncer. La expresión "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad del agente activo que se requiere para conferir el efecto terapéutico pretendido en el sujeto. Las cantidades eficaces pueden variar, según se reconoce por los expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, del uso del excipiente y de la posibilidad de usarse junto con otros agentes.

La mucositis es la inflamación y la ulceración de las membranas mucosas que recubren el tracto digestivo, normalmente como un efecto adverso de la quimioterapia y la radioterapia. Puede ocurrir en la boca o en cualquier lugar a lo largo del tracto gastrointestinal.

El cáncer incluye tanto tumores sólidos como hematológicos de diversos órganos. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen cáncer de páncreas; cáncer de vejiga; cáncer colorrectal; cáncer de mama, incluyendo cáncer de mama metastásico; cáncer de próstata, incluyendo cáncer de próstata andrógeno-dependiente y andrógeno-independiente; cáncer renal, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales metastásico; cáncer hepatocelular; cáncer de pulmón, incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma bronquioloalveolar (BAC) y adenocarcinoma pulmonar; cáncer de ovario, incluyendo, por ejemplo, cáncer epitelial progresivo o cáncer peritoneal primario; cáncer de cuello uterino; cáncer gástrico; cáncer de esófago; cáncer de cabeza y cuello, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de la cabeza y del cuello; melanoma; cáncer neuroendocrino, incluyendo tumores neuroendocrinos metastásicos; tumores cerebrales, incluyendo, por ejemplo, glioma, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma multiforme adulto y astrocitoma anaplásico adulto; cáncer de hueso; y sarcoma de tejido blando. Los ejemplos de malignidad hematológica incluyen la leucemia mieloide aguda (AML); la leucemia mielógena crónica (CML), incluyendo la CML acelerada y la fase blástica de LA CML (CMLBP); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia linfocítica crónica (CLL); enfermedad de Hodgkin (HD); linfoma de no Hodgkin (NHL), incluyendo linfoma folicular y linfoma de células del manto; Linfoma de linfocitos B; linfoma de linfocitos T; mieloma múltiple (MM); macroglobulinemia de Waldenstrom; síndromes mielodisplásicos (MDS), incluyendo anemia refractaria (RA), anemia refractaria con sideroblastos anillados (RARS), anemia refractaria con exceso de blastos (RAEB) y RAEB en transformación (RAEB-T) y síndromes mieloproliferativos.

Para poner en práctica el método descrito en el presente documento, la composición farmacéutica descrita anteriormente se puede administrar por vía oral, parenteral, mediante pulverización por inhalación, por vía tópica, rectal, basal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

Una composición inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosas inyectable estéril, se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la materia usando agentes dispersantes o humectantes adecuados

- (tales como Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y los disolventes aceptables que se pueden emplear están el manitol, el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente, se emplean aceites no volátiles, estériles, como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, así como aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, en especial, en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares.
- 10 Otros tensioactivos comúnmente usados tales como los Tween o Span, u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables también se pueden usar con fines de formulación.
- 15 Una composición para la administración oral puede ser cualquier forma farmacéutica aceptable por vía oral incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, emulsiones, y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para el uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Por lo general, también se añaden agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran por vía oral suspensiones o emulsiones acuosas, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase aceitosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Se puede preparar un aerosol nasal o una composición de inhalación de acuerdo con técnicas bien conocidas en el campo de la formulación farmacéutica. También se puede administrar una composición que contiene uno de los compuestos de la presente invención en forma de supositorios para la administración rectal.

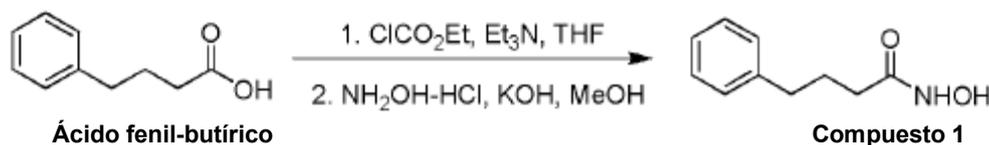
El vehículo de la composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el principio activo de la formulación (y preferentemente, capaz de estabilizarlo) y no dañino para el sujeto que se vaya a tratar. Se pueden utilizar uno o más agentes solubilizantes (por ejemplo, ciclodextrinas) que forman complejos más solubles con los compuestos de la presente invención como vehículos farmacéuticos para el suministro de los compuestos activos. Los ejemplos de otros vehículos incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, laurilsulfato sódico y colorante amarillo de D & C n.º 10.

Se pueden usar ensayos *in vitro* adecuados para evaluar preliminarmente la eficacia de los compuestos de la presente invención en la inhibición de las HDAC. Los compuestos eficaces pueden examinarse además en cuanto a su eficacia en el tratamiento de la mucositis y el cáncer bien *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se puede administrar un compuesto a un animal (por ejemplo, un modelo de ratón) que tenga mucositis o cáncer y luego evaluarse sus efectos terapéuticos. Basándose en los resultados, también se puede determinar un intervalo de dosificación y una vía de administración apropiados.

Los siguientes ejemplos se han de interpretar como meramente ilustrativos y, bajo ningún concepto, como limitantes del resto de la divulgación.

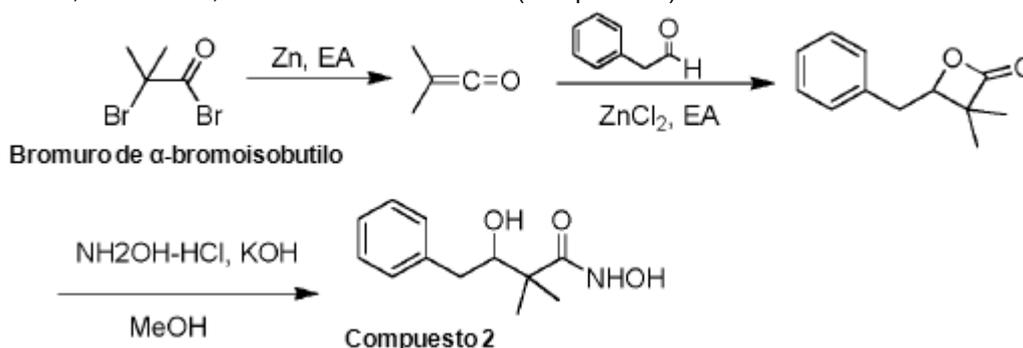
#### Ejemplo 1: Síntesis químicas

1. Síntesis de *N*-hidroxi-4-fenilbutanamida (Compuesto 1; no de acuerdo con la presente invención).



- Se añadió cloroformiato de etilo (7,0 ml, 73,1 mmol) y trietilamina (11,1 ml, 79,2 mmol) a 0°C a una solución de ácido 4-fenilbutírico (10,0 g, 60,9 mmol) en THF anhidro (180 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min. Se separó el sólido por filtración. Se añadió la fracción filtrada a una solución de hidroxilamina metanólica recién preparada (63,0 ml, preparada mediante la adición de 6,34 g o 91,4 mmol de clorhidrato de hidroxilamina a 30,0 ml de una solución metanólica agitada que contenía 5,13 g o 91,4 mmol de KOH a 0 °C durante 15 minutos). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 30 min y se evaporó a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía, dando el Compuesto 1 (6,4 g, 58 %): p.f. >300 °C; RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>): δ 1,98 (*m*, 2H, PhCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONHOH), 2,13 (*t*, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONHOH), 2,64 (*t*, 2H, PhCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONHOH), 7,15 (*d*, 2H, Ar-H), 7,20 (*t*, 2H, Ar-H), 7,28 (*m*, 1H, Ar-H), 8,20 (*a*, 1H, NH).

60

2. Síntesis de *N*,3-dihidroxi-2,2-dimetil-4-fenilbutanamida (Compuesto 2)

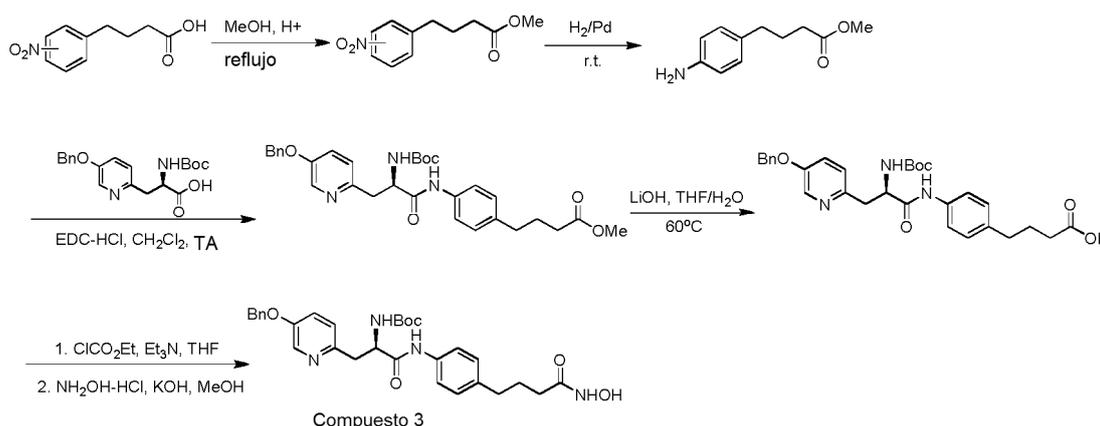
Se añadieron cinc (0,85 g, 16,0 mmol) y acetato de etilo (10,0 ml) a un frasco de Wolff dotado de un aparato de 5 destilación. Se calentó la mezcla se agitó a 40 °C. A esta, se añadió lentamente bromuro de  $\alpha$ -bromoisobutilo (3,45 g, 16,0 mmol). Se recogió 2-metilprop-1-en-1-ona por debajo de 34 °C en forma de un líquido amarillo.

Se disolvieron 2-metilprop-1-en-1-ona (0,04 g, 5,0 mmol) y 2-fenilacetaldehído (0,60 g, 5,0 mmol) en acetato de etilo (3,5 ml), y se agitó a 0 °C bajo nitrógeno. Se añadió rápidamente cloruro de cinc (II) (0,03 g, 0,25 mmol), y la mezcla 10 de reacción se mantuvo a 0 °C durante un corto período y luego a temperatura ambiente durante la noche (controlada mediante TLC). A continuación, se trató la mezcla de reacción a temperatura ambiente con una solución de NaHCO<sub>3</sub> (ac). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron al vacío, y la cristalización en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:hexano = 1:1 dio 4-bencil-3,3-dimetiloxetan-2-ona (0,80 g, 84 %).

15 Se disolvió 4-bencil-3,3-dimetiloxetan-2-ona (0,95 g, 5,0 mmol) en el MeOH (2,0 ml), y se agitó bajo nitrógeno a 0 °C. A esto, se añadió una solución de clorhidrato de hidroxilamina (0,07 g, 10 mmol) e hidróxido de potasio (0,06 g, 10,0 mmol) en MeOH (40,0 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se controló mediante TLC. Se concentró la mezcla de reacción al vacío, dando el Compuesto 2 en bruto (0,86 g, 77 %) en forma de un sólido. p.f.: 95-96 °C; RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400):  $\delta$  1,31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,55 (*dd*, 1H, *J* = 10,0 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,82 (*dd*, 1H, *J* = 1,8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,95 (*dd*, 1H, *J* = 2,1 Hz), 6,36 (*a*, 1H, OH), 7,23-7,25 (*m*, 3H, Ar-H), 7,30-7,33 (*m*, 2H, Ar-H).

3. Síntesis de 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(4-(hidroxilamino)-4-oxobutil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato (*R*)-*terc*-butílico (Compuesto 3)

25



## (i) Síntesis de una mezcla de 4-(4-nitrofenil)butanoato metílico y 4-(2-nitrofenil)butanoato metílico

30 Se sometió a refluxo una mezcla de ácido 4-(*p*-nitrofenil)butírico y ácido 4-(*o*-nitrofenil)butírico (3,22 g, 15,38 mmol) en metanol saturado con HCl (60 ml) durante 12 h (controlado mediante TLC). Tras la evaporación del disolvente, se disolvió el residuo en 50 ml de diclorometano y se lavó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado. Se separó la solución de diclorometano, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío, dando el compuesto del título (3,43 g, 100 %).

35

## (ii) Síntesis de 4-(4-aminofenil)butanoato metílico

Se agitó vigorosamente una mezcla de 4-(4-nitrofenil)butanoato de metilo y de 4-(2-nitrofenil)butanoato de metilo (2,24 g, 10,03 mmol) y 0,2 g de Pd al 10 %/C en 40 ml de metanol bajo aire de hidrógeno. La mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente (controlada mediante TLC) y se filtró a través de Celite. El disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía, dando el compuesto del título (0,80 g, 41 %). RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,89 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,31 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOMe), 2,53 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,58 (*a*, 2H, NH<sub>2</sub>), 3,65 (*s*, 3H, OMe), 6,61 (*d*, 2H, *J* = 3,5 Hz, Ar-H), 6,95 (*d*, 2H, *J* = 3,4 Hz).

10 (iii) Síntesis de 4-(4-(3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanamido)fenil)butanoato (*R*)-metílico

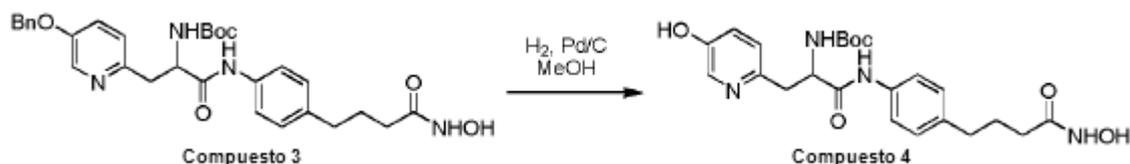
Se agitó una mezcla de 4-(4-aminofenil)butanoato de metilo (1,24 g, 6,42 mmol), ácido 3 (5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoico (2,17 g, 5,84 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,12 g, 5,84 mmol) en 25 ml de diclorometano a temperatura ambiente durante 2 h (controlada mediante TLC). La mezcla se lavó con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. Se purificó el residuo mediante cromatografía (EA:Hex = 1:1), dando el compuesto del título (2,37 g, 74 %), p.f.: 166-167 °C; (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,31 (*s*, 9H, Boc), 1,93 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,30 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOMe), 2,59 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,22 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,66 (*s*, 3H, OMe), 4,43 (*t* 1H CH) 5,13 (*s* 2H OBn), 6,97 (*d*, 2H, *J* = 7,9 Hz, Ar-H), 7,09 (*d*, 1H, *J* = 8,0 Hz, Pyr-H), 7,20~7,48 (*m*, 9H Ar-H), 8,26 (*a*, 1H, NH), 9,91 (*a*, 1H, NH).

20 (iv) Síntesis de ácido (*R*)-4-(4-(3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanamido)fenil)butanoico

Se calentó una mezcla de 4-(4-(3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanamido)fenil)butanoato de metilo (0,59 g, 1,07 mmol) e hidróxido de litio (0,26 g, 10,7 mmol) en 10 ml de THF/H<sub>2</sub>O (1:1) a 60 °C durante 2 h (controlado mediante TLC). Se acidificó la solución a pH = 2 y se extrajo con diclorometano. Se separó el diclorometano, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío, dando 0,51 g del compuesto deseado (90 %). (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,30 (*s*, 9H, Boc), 1,74 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,17 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOMe, *J* = 7,34 Hz), 2,52 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7,55 Hz), 2,92-3,07 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,44 (*m*, 1H CH), 5,13 (*s*, 2H OBn), 7,09 (*d*, 1H, *J* = 8,47 Hz, Ar-H), 7,21 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,52 Hz), 7,31~7,48 (*m*, 9H Ar-H), 8,26 (*a*, 1H, NH), 9,91 (*a*, 1H, OH).

30 (v) Síntesis de 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(4-(hidroxil-amino)-4-oxobutil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato (*R*)-*tert*-butílico (Compuesto 3)

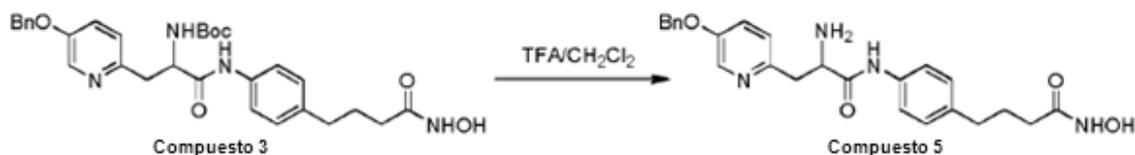
A una solución de ácido 4-(4-(3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanamido)fenil)butanoico en THF anhidro (0,43 g, 0,80 mmol), se añadió clorformiato de etilo (0,1 ml, 0,88 mmol) y trietilamina (0,15 ml, 0,96 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 30 min. Se separó el sólido por filtración y se añadió la fracción filtrada a una solución de MeOH de hidroxilamina, que se había preparado recientemente añadiendo una solución de clorhidrato de hidroxilamina (0,11 g, 1,60 mmol) en MeOH (1,1 ml) a una solución agitada de KOH (0,09 g, 1,60 mmol) en MeOH (0,5 ml) a 0 °C. Tras agitar durante 15 min, se retiró el precipitado y se agitó la fracción filtrada a temperatura ambiente durante 30 min (controlado mediante TLC) y se evaporó al vacío. Se extrajo el residuo con EA/H<sub>2</sub>O y se recristalizó en MeOH/éter, dando el Compuesto 3 (0,3 g, 74 %). p.f.: >300 °C; NMR (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,23 (*s*, 9H, Boc), 1,75 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,93 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONHOH, *J* = 7,0 Hz), 2,51 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 6,5 Hz), 2,95 (*m*, 2H, CH), 4,45 (*m*, 1H, CH), 5,14 (*s*, 2H, OBn), 6,97 (*d*, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,09 (*d*, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,21 (*d*, 1H, *J* = 8,5 Hz, Ar-H), 7,32-7,47 (*m*, 8H, Ar-H), 8,26 (*a*, 1H, NH), 8,62 (*a*, 1H, NH), 9,91 (*a*, 1H, NH), 10,32 (*a*, 1H, OH).

4. Síntesis de *tert*-butil-1-(4-(4-(hidroxil-amino)-4-oxobutil)fenilamino)-3-(5-(hidroxipiridin-2-il)-1-oxopropan-2-ilcarbamato (Compuesto 4)

50

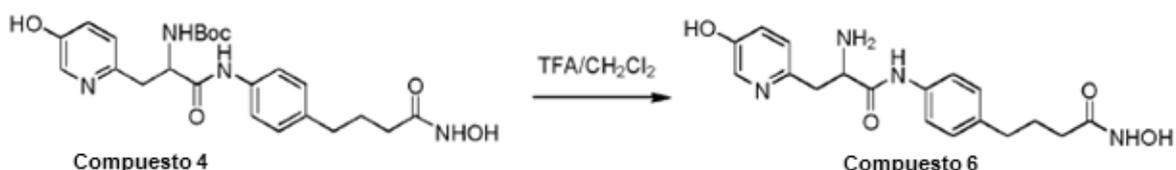
Se agitó vigorosamente una mezcla de 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(4-(hidroxil-amino)-4-oxobutil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *tert*-butílico (0,1 g, 0,19 mmol) y 10 mg of Pd al 10 %/C en 2 ml of bajo H<sub>2</sub> durante 4 h a temperatura ambiente (controlado mediante TLC). Se filtró a través de Celite. Se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía, dando el Compuesto 4 (0,09 g, 89 %). p.f.: 166-167 °C; RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,31 (*s*, 9H, Boc), 1,75 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,93 (*t*, 1H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7,10 Hz), 2,52 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7,10 Hz), 2,94 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,41 (*m*, 1H, CH), 6,94 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 7,99 Hz), 7,05 (*m*, 1H, Ar-H), 7,08 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 7,88 Hz), 7,21 (*m*, 1H, Ar-H), 7,46 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 8,15 Hz), 8,03 (*a*, 1H, NH), 9,88 (*a*, 1H, NH), 10,32 (*a*, 1H,

OH).

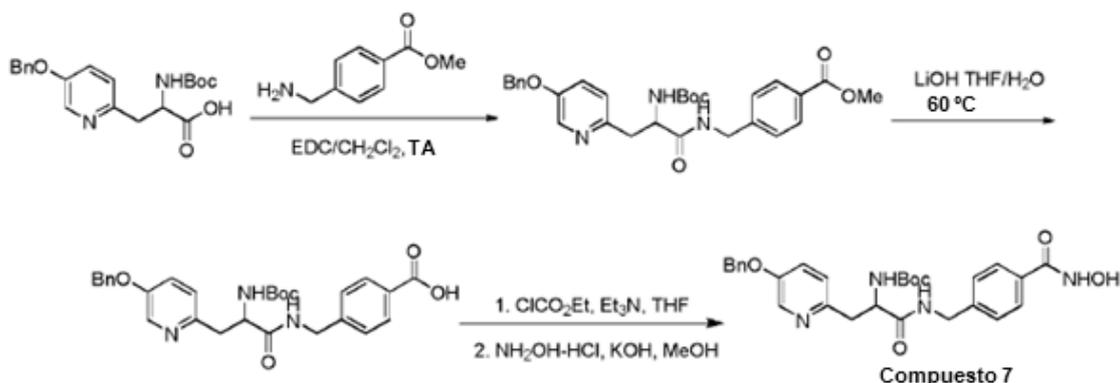
5. Síntesis de 4-(4-(2-amino-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)propanamido)fenil)-*N*-hidroxibutanamida (Compuesto 5)

5

Se disolvió 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(4-(hidroxiamino)-4-oxobutil)-fenilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *t*-butílico (0,1 g, 0,19 mmol) en DCM/TFA (v/v = 1:1) (30 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h (controlado mediante TLC). La solución se evaporó al vacío, dando el Compuesto 5 (0,062 g, 61 %). p.f.: >300 °C; RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,75 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,95 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7,37 Hz), 2,52 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7,55 MHz), 3,16 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,30 (*m*, 1H, CH), 5,16 (*s*, 2H, OBn), 7,13 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 8,06 Hz), 7,24 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,47 Hz), 7,33-8,46 (*m*, 9H, Ar-H), 8,22 (*a*, 2H, NH<sub>2</sub>), 8,30 (*m*, 1H, NH), 8,64 (*a*, 1H, NH), 10,33 (*a*, 1H, OH), 10,36 (*a*, 1H, TFA).

15 6. Síntesis de 4-(4-(2-amino-3-(5-hidroxipiridin-2-il)-propanamido)fenil)-*N*-hidroxibutanamide (Compuesto 6)

Se disolvió 1-(4-(4-(hidroxiamino)-4-oxobutil)fenil-amino)-3-(5-hidroxipiridin-2-il)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *t*-butílico (0,10 g, 0,19 mmol) en 10 ml de TFA y 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se agitó durante 4 h a temperatura ambiente (controlado mediante TLC). Se evaporó el disolvente. Se purificó el residuo mediante cromatografía, dando el Compuesto 6 (0,51 g, 64 %): p.f.: 230 °C profundo; (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,77 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,20 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 7,01 MHz), 2,51 (*t*, 2H, CH<sub>2</sub>, *J* = 8,27 Hz), 3,43 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,48 (*m*, 1H, CH), 7,13 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,19 Hz), 7,26-7,32 (*m*, 4H, Ar-H), 7,51 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,07 Hz), 7,61 (*m*, 1H, Ar-H), 8,39 (*a*, 1H, NH), 8,65 (*a*, 2H, NH<sub>2</sub>), 10,44 (*a*, 1H, OH), 11,04 (*a*, 1H, TFA).

7. Síntesis de 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(hidroxicarbamoyl)bencilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *terc*-butílico (Compuesto 7)

30

(i) Síntesis de 4-((3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)propanamido)metil)benzoato de metilo

Se agitó una mezcla de 4-(aminometil)benzoato de metilo (2 g, 10 mmol), ácido 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)propanoico (1,04 g, 11 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2 g, 10,4 mmol) en 50 ml de diclorometano a temperatura ambiente durante 2 h (controlado mediante TLC). Se extrajo la mezcla con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. Se purificó el residuo mediante cromatografía (EA:Hex = 1:1), dando el compuesto del título (1,5 g, 49 %). RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,31 (*s*, 9H, Boc), 2,90 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,81 (*s*, 3H, OMe), 4,30 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,33 (*m*, 1H, CH), 5,12 (*s*, 2H, OBn), 6,97-7,09 (*d*, 1H, *J* =

3,5 Hz, Ar-H), 7,15 (*d*, 1H, *J* = 8,53 Hz, Ar-H), 7,24~7,46 (*m*, 8H, Ar-H), 7,84 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 8,24 Hz), 8,24 (*a*, 1H, NH), 8,43 (*a*, 1H, NH).

(ii) Síntesis de ácido 4-((3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonil-amino)propanamido)metil)benzoico

5

Se calentó una mezcla de ácido 4-((3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonil-amino)propanamido)metil)benzoico (1,3 g, 2,58 mmol) e hidróxido de litio (0,6 g, 25 mmol) en 50 ml de THF/H<sub>2</sub>O (1:1) a 60 °C durante 4 h (controlado mediante TLC). Se acidificó la solución a pH = 2 y se extrajo con diclorometano. Se evaporó el diclorometano, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío, dando el compuesto del título

10 (0,7 g, 55 %), RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 1,31 (*s*, 9H, Boc) 2,97 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,27 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,33 (*m*, 1H, CH), 5,13 (*s*, 2H, OBn), 6,96 (*d*, 1H, *J* = 8,32 Hz, Ar-H), 7,15-7,18 (*m*, 3H, Ar-H), 7,31~7,39 (*m*, 4H, Ar-H), 7,44 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 7,01 Hz), 7,80 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 7,67 Hz), 8,24 (*a*, 1H, NH), 8,43 (*a*, 1H, NH).

(iii) Síntesis de 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(hidroxicarbamoil)bencilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *tert*-butílico (Compuesto 7)

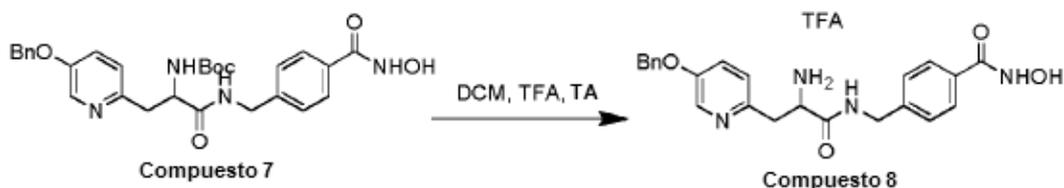
Se añadió ácido 4-((3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonil-amino)propanamido)metil)benzoico (0,65 g, 1,25 mmol) en THF anhidro a cloroformiato de etilo (0,15 ml, 1,5 mmol) y tietilamina (0,21 ml, 1,88 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 30 min. Se retiró el sólido y se añadió la fracción filtrada a una solución de MeOH en

20 hidroxilamina, que se había preparado recientemente mediante la adición de una solución de clorhidrato de hidroxilamina (0,14 g, 2,5 mmol) en MeOH (20 ml) a una solución agitada de KOH (0,11 g, 2,5 mmol) en MeOH (10 ml) a 0 °C. Tras agitar durante 15 min, se retiró el precipitado y se agitó la fracción filtrada a temperatura ambiente durante 30 min (controlado mediante TLC) y se evaporó al vacío. Se extrajo el residuo con EA/H<sub>2</sub>O y se recristalizó en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éter, dando el Compuesto 7 (0,40 g, 61 %): p.f.: 106-108 °C; RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker

25 AVANCE-400): δ 1,30 (*s*, 9H, Boc), 2,91 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,26 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,32 (*m*, 1H, CH), 5,12 (*s*, 2H, OBn), 6,95 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,24 Hz), 7,14-7,21 (*m*, 3H, Ar-H), 7,30-7,44 (*m*, 6H, Ar-H), 7,65 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,38 Hz), 7,8 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,38 Hz), 8,24 (*a*, 1H, NH), 8,45 (*a*, 1H, NH), 9,48 (*a*, 1H, NH), 10,39 (*a*, 1H, OH).

8. Síntesis de ácido 4-((2-amino-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-propanamido)metil)-*N*-hidroxibenzamida-trifluoroacético

30 (Compuesto 8)

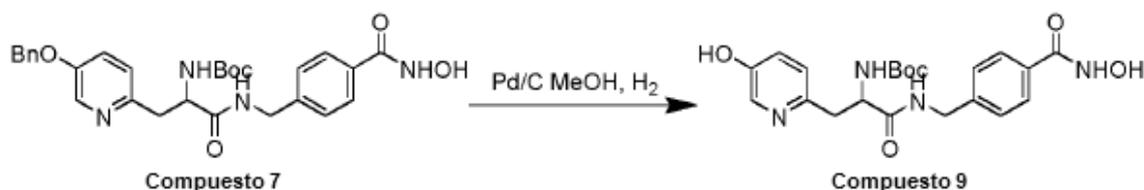


Se disolvió 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(hidroxil-carbamoil)bencilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *t*-butílico

35 (0,26 g, 0,5 mmol) en TFA/DCM (*v/v* = 1:1) (30 ml) y se agitó durante 4 h a temperatura ambiente (controlado mediante TLC). La solución se evaporó con DCM tres veces, dando 0,021 g de HPW101x048 (81 %): p.f.: 151-154 °C; RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400): δ 3,12 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,25 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,40 (*m*, 1H, CH), 5,15 (*s*, 1H, OBn), 7,21 (*m*, 3H, Ar-H), 7,40 (*m*, 7H, Ar-H), 7,67 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,21 Hz), 7,84 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 7,96 Hz), 8,26 (*a*, 2H, NH<sub>2</sub>), 8,27 (*s*, 1H, NH), 8,92 (*a*, 1H, NH), 11,19 (*a*, 1H, OH).

40

9. Síntesis de 1-(4-(hidroxicarbamoil)bencilamino)-3-(5-(hidroxipiridin-2-il)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *tert*-butílico (Compuesto 9)



45

Se agitó vigorosamente una mezcla de 3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-1-(4-(hidroxil-carbamoil)bencilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *t*-butílico (Compuesto 7) (0,26 g, 0,5 mmol) y 26 mg de Pd al 10 %/C en 2 ml de metanol bajo H<sub>2</sub> durante 4 h a temperatura ambiente, y luego se filtró a través de Celite. Se evaporó el disolvente. Se purificó

el residuo mediante cromatografía, dando el Compuesto 9 oleaginoso (0,16 g, 73 %), RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400)  $\delta$  1,28 (s, 9H, Boc), 3,15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,28 (t, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J = 5,12$  Hz), 4,36 (m, 1H, CH), 7,05-7,25 (m, 4H, Ar-H), 7,64-7,84 (m, 3H, Ar-H), 8,23 (a, 1H, NH), 8,51 (a, 1H, NH), 10,18 (a, 1H, NH), 11,16 (a, 1H, OH).

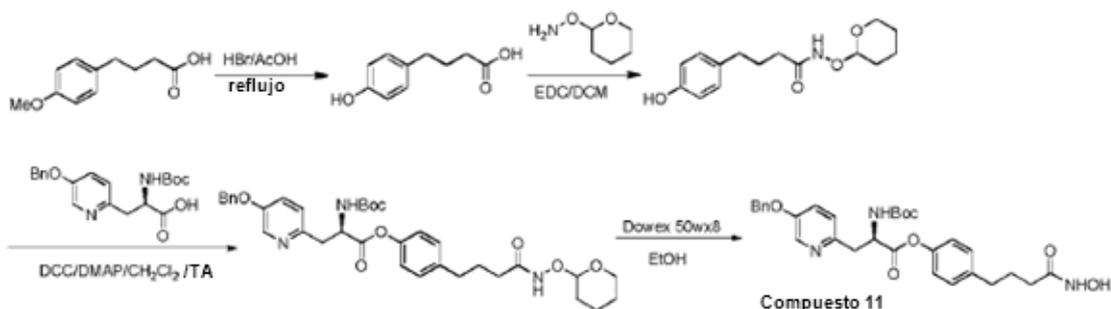
5 10. Síntesis de 4-((2-amino-3-(5-hidroxipiridin-2-il)-propanamido)metil)-*N*-hidroxibenzamida (Compuesto 10)



Se agitó una solución de 1-(4-(hidroxicarbamoyl)benzilamino)-3-(5-hidroxipiridin-2-il)-1-oxopropan-2-ilcarbamato *tert*-butílico (0,10 g, 0,19 mmol) con 1 ml de TFA en 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) durante 4 h a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente (controlado mediante TLC). Se purificó el residuo mediante cromatografía, dando el Compuesto 10 oleaginoso (0,045 g, 71 %), RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400):  $\delta$  3,08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,36 (m, 1H, CH), 7,08-7,28 (m, 4H, Ar-H), 7,62-7,70 (m, 2H, Ar-H), 7,82-7,88 (m, 1H, Ar-H), 8,96 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 9,13 (a, 1H, NH), 9,97 (a, 1H, NH), 11,15 (a, 1H, OH).

15

11. Síntesis de (*R*)-4-(4-(hidroxiamino)-4-oxobutil)fenil-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato (Compuesto 11)



20

(i) Síntesis de ácido 4-(4-hidroxifenil)butanoico

Se mezcló ácido 4-(4-metoxifenil)butanoico (0,97 g, 5 mmol) con HBr (50 ml) y ácido acético glacial (80 ml). Se sometió la mezcla a refluxo durante 12 h (controlado mediante TLC), se vertió en hielo, se agitó durante 1 h y luego se extrajo con DCM. Se evaporó el disolvente al vacío, dando el compuesto del título (0,83 g, 92 %), RMN (400 MHz en CDCl<sub>3</sub>, Bruker AVANCE-400):  $\delta$  1,72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,16 (t, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J = 7,4$  Hz), 2,45 (t, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J = 7,6$  Hz), 6,65 (d, 2H, Ar-H,  $J = 8,3$  Hz), 6,95 (d, 2H, Ar-H,  $J = 8,3$  Hz).

25

(ii) Síntesis de 4-(4-hidroxifenil)-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)butanamida

30

Se agitó una mezcla de ácido 4-(4-hidroxifenil)butanoico (0,90 g, 5 mmol), *O*-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)hidroxilamina (0,59 g, 5 mmol) y clorhidrato de 1-metil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,15 g, 6 mmol) en 50 ml de diclorometano a temperatura ambiente durante 2 h (controlado mediante TLC). Se extrajo la mezcla con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. Se purificó el residuo mediante cromatografía (MeOH:DCM = 1:50), dando el compuesto del título (0,84 g, 65 %), RMN (400 MHz en DMSO, Bruker AVANCE-400):  $\delta$  1,50 (m, 3H, OTHP), 1,71 (m, 3H, OTHP), 1,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,48 (t, 1H,  $J = 5,0$  Hz, OTHP), 3,91 (t, 1H,  $J = 10,0$  Hz, OTHP), 4,80 (s, 1H, OTHP), 6,65 (d, 2H,  $J = 5,0$  Hz, Ar-H), 6,95 (d, 2H,  $J = 10,0$  Hz, Ar-H), 9,10 (s, 1H, NH), 10,87 (s, 1H, OH).

35

(iii) Síntesis de (*2R*)-4-(4-oxo-4-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxiamino)butil)fenil-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato

40

Se añadieron ácido (*R*)-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoico (0,19 g, 0,5 mmol), 4-(4-hidroxifenil)-*N*-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)butanamida (0,14 g, 0,5 mmol) y DMAP (0,06 g, 0,5 mmol) a DCM (10 ml), y se agitó a 0 °C durante 10 min. Se añadió una solución de DCC (0,12 g, 0,6 mmol) en DCM (5 ml) gota a gota a la

45

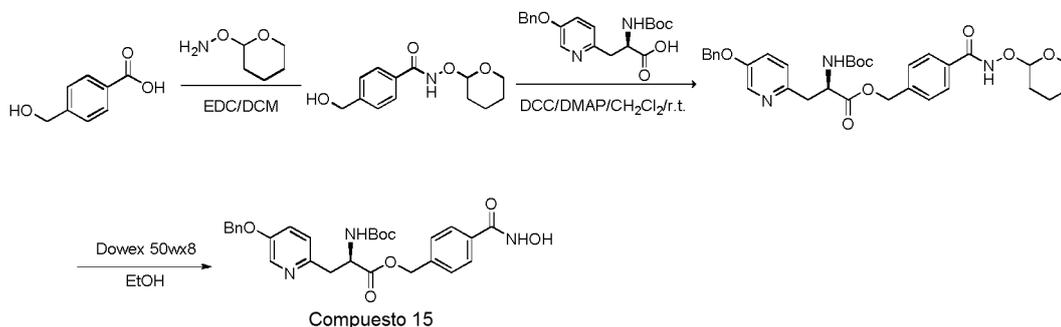
solución mencionada anteriormente. Se agitó la mezcla desde 0 °C a la temperatura ambiente durante 1 h (controlado mediante TLC). Se retiró el sólido blanco y, a continuación, se evaporó la fracción filtrada al vacío. Se añadió acetoacetato de etilo y se volvió a retirar el sólido. La solución se evaporó al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía (EA:Hex = 1:5), dando el compuesto del título.

5

(iv) Síntesis de (*R*)-4-(4-(hidroxiamino)-4-oxobutil)fenil-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato (Compuesto 11)

Se sometió a reflujo una mezcla de (*2R*)-4-(4-oxo-4-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)amino)butil)fenil-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato (0,32 g, 0,5 mmol) y Dowex 50wX8 (0,5 mmol) en etanol (2,5 ml) durante 1 h (controlado mediante TLC). Se retiró el precipitado y se evaporó la fracción filtrada al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía (MeOH:DCM = 1:25), dando el compuesto del título.

12. Síntesis de (*R*)-4-(hidroxicarbamoil)bencil-3-(5-(benciloxi)-piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato (Compuesto 15)



(i) Síntesis de 4-(hidroximetil)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)benzamida

20 Se agitó una mezcla de ácido 4-(hidroximetil)benzoico (0,75 g, 5 mmol), *O*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)hidroxilamina (0,59 g, 5 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,15 g, 6 mmol) en diclorometano (50 ml) a temperatura ambiente durante 2 h (controlado mediante TLC). Se extrajo la mezcla con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. Se purificó el residuo mediante cromatografía (MeOH:DCM = 1:50), dando el compuesto del título (0,88 g, 70 %). RMN (400 MHz en DMSO, Bruker AVANCE-400):  $\delta$  1,52 (*m*, 3H, OTHP), 1,72 (*m*, 3H, OTHP), 3,51 (*m*, 1H, OTHP), 4,04 (*m*, 1H, OTHP), 4,53 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,98 (*s*, 1H, OTHP), 5,28 (*s*, 1H, NH), 7,38 (*d*, 2H, *J* = 10,0 Hz, Ar-H), 7,72 (*d*, 2H, *J* = 5,0 Hz, Ar-H), 11,55 (*s*, 1H, OH).

(ii) Síntesis de (*2R*)-4-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxicarbamoil)bencil-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato

30

Se añadieron ácido (*R*)-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoico (0,19 g, 0,5 mmol), 4-(hidroximetil)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)-benzamida (0,13 g, 0,5 mmol) y DMAP (0,06 g, 0,5 mmol) a DCM (10 ml) agitada a 0 °C durante 10 min. Se disolvió DCC (0,12 g, 0,6 mmol) en DCM (5 ml) y luego se añadió lentamente a la solución mencionada anteriormente. Se agitó la mezcla de 0 °C a la temperatura ambiente durante 1 h (controlado mediante TLC). Se separó por filtración el sólido blanco y luego se evaporó la fracción filtrada al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía (MeOH:DCM = 1:50), dando el compuesto del título (0,18 g, 60 %), RMN (400 MHz en DMSO, Bruker AVANCE-400):  $\delta$  1,32(*s*, 9H, Boc), 1,59(*m*, 3H, OTHP), 1,70(*m*, 3H, OTHP), 3,0(*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,50 (*d*, 1H, *J* = 10,0 Hz, OTHP), 4,04 (*a*, 1H, OTHP), 4,44 (*m*, 1H, CH), 4,98 (*s*, 1H, OTHP), 5,12 (*s*, 4H, OBn y C(O)OCH<sub>2</sub>), 5,54 (*s*, 1H, NH), 5,55 (*s*, 1H, NH), 7,16 (*d*, 1H, *J* = 10,0 Hz, Ar-H), 7,28-7,39 (*m*, 7H, Ar-H), 7,44 (*d*, 2H, *J* = 5,0 Hz, Ar-H), 7,72 (*d*, 2H, *J* = 5,0 Hz, Ar-H), 8,24 (*s*, 1H, Ar-H).

(iii) Síntesis de (*R*)-4-(hidroxicarbamoil)bencil-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato (Compuesto 15)

45 Se sometió a reflujo una mezcla de (*2R*)-4-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxicarbamoil)bencil-3-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoato (0,30 g, 0,5 mmol) y Dowex 50wX8 (0,5 mmol) en etanol (2,5 ml) durante 1 h (controlado mediante TLC). Se retiró el precipitado y se evaporó la fracción filtrada al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía (MeOH:DCM = 1:25), dando el Compuesto 15.

50

## Ejemplo 2: Bioensayos

## 1. Ensayo de inhibición de HDAC

- 5 Se midió la actividad de histona desacetilasa (HDAC) en suspensiones de lisado de HeLa usando un sistema de ensayo fluorescente Fluor de Lys™ (Biomol, Enzo Life Sciences; PA, EE.UU.) con algunas modificaciones como se ha descrito anteriormente (Pflumet *et al.*, 2007). En resumen, se preincubaron lisado de HeLa (1,5 µl) en presencia de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO, 0,2 % v/v) a 30 °C durante 10 minutos, por lo que se añadió sustrato de Fluor de Lys™ (125 µM) a 37 °C bajo agitación durante 45 minutos. Finalmente, se añadió inmediatamente el
- 10 reactivo revelador (95 µl, x 1) a la misma parte alícuota de la mezcla de reacción durante otros 10 minutos. Se controló el grado de formación de sustrato desacetilado mediante un lector de fluorescencia de microplacas (Thermo Varioskan Flash, Thermofisher, MA, EE.UU.) para determinar la intensidad de la fluorescencia (excitación a 360 nm, emisión a 460 nm). Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición de la velocidad de formación de sustrato desacetilado en el intervalo de reacción. Se usó SAHA (10 µM), como HDACi clásico, como control positivo.
- 15 Véase Bieliauskas *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17: 2216-2219.

Se ensayaron los Compuestos 1-8. Todos ellos mostraron actividades inhibitoras de HDAC a la concentración de  $10^{-5}$  M o incluso más baja. Se determinó la inhibición dependiente de la dosis de HDAC para los Compuestos 3, 4 y 7, y los valores SAHA y  $CI_{50}$  se muestran a continuación. El Compuesto 1 es un ejemplo de referencia

20

Tabla 1:  $CI_{50}$  de la inhibición de HDAC

Compuesto	1	3	4	7	SAHA
$CI_{50}$	$1,73 \times 10^{-5}$ M	$3,98 \times 10^{-7}$ M	$4,13 \times 10^{-6}$ M	$1,32 \times 10^{-6}$ M	$3,98 \times 10^{-7}$ M

2. Actividad de cicatrización de heridas *in vitro*

- 25 Se evaluaron las actividades de cicatrización de heridas de los Compuestos 1 y 3 de forma *in vitro* mediante el método proporcionado en Valster *et al.*, *Methods*, 2005, 37, 208-215 y Rodríguez *et al.*, "Methods in Molecular Biology" en *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, vol. 294, Ed by Guan *et al.*, Humana Press Inc.

Se sembraron células IMR90 en una placa de cultivo de seis pocillos y se cultivaron en medio MEM con FBS al 10 % hasta la confluencia en presencia de suero. A continuación, se reemplazó el medio de crecimiento (MEM con FBS al 10 %) con un medio exento de suero (MEM sin FBS). Tras la inanición durante 24 horas, se hicieron heridas mediante raspado usando una punta de pipeta P1000. Las células se trataron con el Compuesto 1 (0, 0,1, 0,5 o 1 mM) o el Compuesto 3 (0, 0,05, 0,5 o 1 µM) durante 24 horas. Se observaron las heridas mediante una microscopía de contraste de fase usando un microscopio invertido. Las imágenes se tomaron en zonas que

30 flaquean las intersecciones de las heridas y las líneas marcadoras a intervalos regulares durante un período de 24 horas. Estas imágenes se analizaron a través de un sistema de formación de imágenes digital usando Image-Pro Plus® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) para determinar la posición de las células migratorias en los bordes de la herida. Se calculó la distancia de migración celular substrayendo la anchura de la herida en cada intervalo de su anchura inicial.

35

40 Los resultados mostraron que tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 3 potenciaron la cicatrización de las heridas.

45 3. Expresión *in vitro* de la proteína COX-2

Para detectar la expresión de la proteína COX-2, se realizó el análisis de transferencia Western de la siguiente manera. En resumen, se recogieron las células IMR90 tratadas con el Compuesto 3, estimuladas por heridas (mediante raspado usando una punta de pipeta P1000) y no estimuladas, y se lisaron en 1x tampón de lisis. Las

50 concentraciones de proteína de estas células lisadas se midieron usando el ensayo de cuantificación Bio-Rad (Bio-Rad Laboratory, CA). Se sometieron extractos de proteínas (20 µg) a electroforesis en SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a membrana de PVDF. El anticuerpo que reconoce COX-2 se obtuvo de Epitomics (Burlingame, CA). El anticuerpo que reconoce β-actina se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). Todos los anticuerpos eran anticuerpos policlonales de conejo excepto para el anticuerpo de β-actina, que era un anticuerpo monoclonal de ratón. Los

55 anticuerpos secundarios eran IgG anti-conejo e IgG anti-ratón (anticuerpos unidos a peroxidasa de rábano picante), respectivamente (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se usaron anticuerpos primarios a una dilución de 1:1.000 y se usaron anticuerpos secundarios a una dilución de 1:5.000 en una solución que contenía BSA al 5 % en TBS-T. Se detectaron proteínas inmunorreactivas usando el kit de detección de luz de quimioluminiscencia (ECL) mejorada (Millipore).

60

Los resultados mostraron que el Compuesto 3 inhibió la expresión de la proteína COX-2 en el intervalo entre 0,05-1,0  $\mu$ M de una manera dependiente de la dosis.

4. Expresión de proteína acetil-H3 *in vitro*

5

También se detectó la expresión de la proteína acetil-H3 mediante análisis de transferencia Western. En resumen, se trataron las células IMR90 con los Compuestos 1-4 y se lisaron de la manera descrita en los apartados 2 y 3. La proteína acetil-H3 se detectó mediante anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios. El anticuerpo policlonal contra la proteína acetil-H3 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo monoclonal que reconoce la  $\beta$ -actina se obtuvo en ICN (Costa Mesa, CA). Los anticuerpos secundarios eran IgG anti-conejo e IgG anti-ratón (anticuerpos unidos a peroxidasa de rábano picante), respectivamente (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Todos los anticuerpos se usaron a una dilución de 1:1.000 en una solución que contenía leche al 5 % en TBS-T. Las proteínas inmunorreactivas se detectaron usando el kit de detección de luz de quimioluminiscencia (ECL) mejorada (Amersham Biosciences).

10

Los resultados mostraron que los Compuestos 1-4 potenciaron la inducción de la proteína acetil-H3 en células IMR90.

15

5. Actividad anti-mucositis *in vivo*

20

Se numeraron veinte hámsteres dorados sirios jóvenes, de 7 a 8 semanas de vida, que pesaban de 90 a 130 g, y se dividieron aleatoriamente en cinco grupos (4 hámsteres por grupo).

25

Se realizó una perforación en la mucosa de la bolsa bucal derecha de cada hámster de los cinco grupos con un punzón de piel el Día 0, produciendo una herida de 6 mm de diámetro. A cuatro grupos se administraron por vía intraperitoneal 5-FU a 20 mg/kg dos veces al día el Día 0, y se usó un grupo como control sin ningún tratamiento. Entre los cuatro grupos tratados con 5-FU, tres recibieron por vía subcutánea el Compuesto 1 a 36, 72 y 144 mg/kg o el Compuesto 3 a 0,5, 5,0 y 50,0 mg/kg una vez al día desde el Día 0 hasta el Día 5. Se examinaron las heridas macroscópica y microscópicamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días después de la perforación. Se registraron los parámetros hematológicos, la bioquímica del suero, las extensiones de la infiltración de las células inflamatorias, el tamaño de las zonas hemorrágicas y la presencia de úlceras y abscesos. Después del Día 6, se anestesiaron todos los hámsteres con isoflurano (2-cloro-2-difluorometoxi-1,1,1-trifluoro-etano) para el análisis macroscópico e histológico y el análisis de transferencia Western.

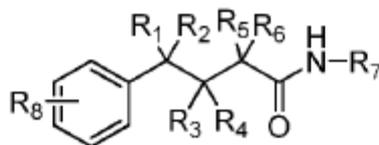
30

35

Los resultados mostraron que tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 3 redujeron la mucositis inducida por 5-FU en las zonas de las heridas de una manera dependiente de la dosis.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente fórmula:

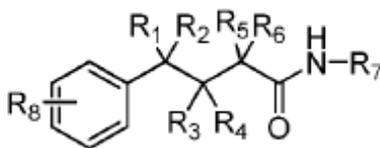


5

donde cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  es, independientemente, H, alquilo, OH o alcoxi;  $R_7$  es OH, OR u  $OC(O)R$ , siendo R alquilo opcionalmente sustituido con halo, arilo, heteroarilo, amino o carboxilo; y  $R_8$  es  $(CH_2)_mNHC(O)R'$  o  $(CH_2)_mOC(O)R'$ , siendo m 0, 1 ó 2, y siendo R' alquilo opcionalmente sustituido con halo, arilo, heteroarilo, amino o carboxilo.

10

2. Un compuesto de la siguiente fórmula:



15

donde cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  es, independientemente, H, alquilo, OH o alcoxi; cada  $R_5$  y  $R_6$  es, independientemente, alquilo;  $R_7$  es OH, OR u  $OC(O)R$ , siendo R alquilo opcionalmente sustituido con halo, arilo, heteroarilo, amino o carboxilo; y  $R_8$  es H.

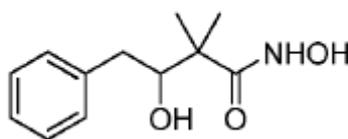
3. El compuesto de la reivindicación 1, donde cada uno de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  es H, y  $R_7$  es OH.

20 4. El compuesto de la reivindicación 1 ó 2, donde cada uno de  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  es H; cada uno de  $R_5$  y  $R_6$  es independientemente alquilo; y  $R_4$  es OH.

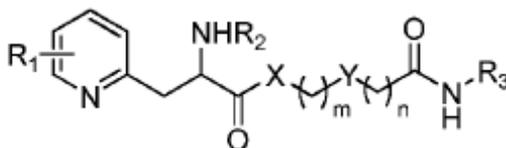
5. El compuesto de la reivindicación 1 ó 2, donde  $R_7$  es  $OC(O)R$ .

25 6. El compuesto de la reivindicación 5, donde R es alquilo sustituido con  $NH_2$  o fenilo.

7. El compuesto de la reivindicación 2, donde el compuesto es:



30 8. Un compuesto de la siguiente fórmula



35

donde  $R_1$  es H, OH, amino, alcoxi, arilalcoxi, alquilcarbonilo o alcocarbonilo;  $R_2$  es H, OH, alcoxi, alquilcarbonilo o alcocarbonilo;  $R_3$  es OH o fenilo; X es O o NH; Y es fenileno o  $-CH_2-$ ; y cada uno de m y n es, independientemente, 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

9. El compuesto de la reivindicación 8, donde X es NH e Y es fenileno.

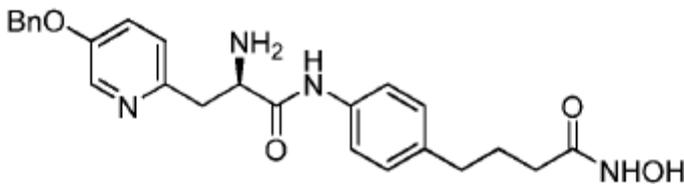
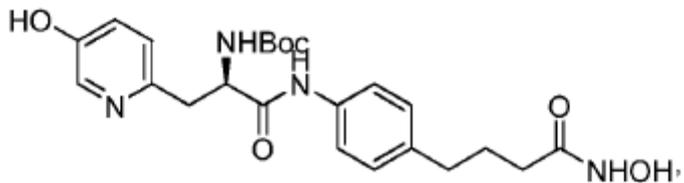
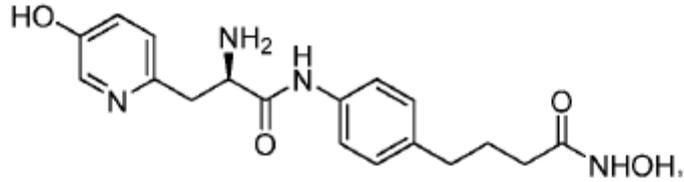
10. El compuesto de la reivindicación 9, donde m es 0 y n es 3.

40 11. El compuesto de la reivindicación 8, donde X es NH e Y es  $-CH_2-$ .

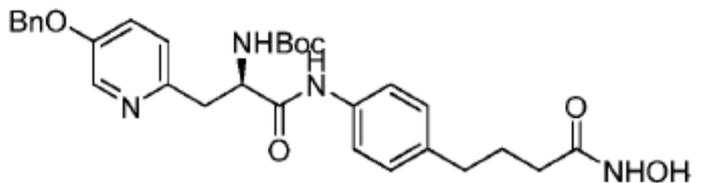
12. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde R<sub>3</sub> es OH.

13. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 8-12, donde R<sub>1</sub> es OH, alcoxi o benciloxi.

5 14. El compuesto de la reivindicación 8, donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos:



10 y



15. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en el tratamiento de la mucositis.

15 16. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para su uso en el tratamiento del cáncer.

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

## Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2005037257 A [0004]
- GB 1171670 A [0004]

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- LU et al. *J. Med. Chem.*, 2005, vol. 48, 5530-5535 [0002]
- KULP et al. *Clin. Cancer Res.*, 2006, vol. 12, 5199-5206 [0002]
- RYAN et al. *J. Clin. Onco.*, 2005, vol. 23, 3912-3922 [0002]
- I. M. ADCOCK. *British Journal of Pharmacology*, 2007, vol. 150 (7), 839-831 [0002]
- Y. L. CHUNG et al. *Carcinogenesis*, 2009, vol. 30 (8), 1387-1397 [0002]
- TISCHLER et al. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 23 (4), 549-555 [0004]
- CONEJO-GARCIA et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, vol. 15 (18), 4004-4009 [0004]
- KURZ et al. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, vol. 2 (14), 2023-2027 [0004]
- DANIELI et al. *Chimica e l'Industria*, 1968, vol. 50 (5), 553-555 [0004]
- POTAPOV et al. *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, 1982, vol. 18 (6), 1205-1208 [0004]
- ZHANG et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, vol. 18 (5), 1761-1772 [0004]
- *ChemMedChem*, 2009, vol. 4, 283-290 [0004]
- R. LAROCK. *Comprehensive Organic Transformations*. VCH Publishers, 1989 [0017]
- T.W. GREENE ; P.G.M. WUTS. *Protective Groups in Organic Synthesis*. John Wiley and Sons, 1999 [0017]
- L. FIESER ; M. FIESER. *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley and Sons, 1994 [0017]
- *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley and Sons, 1995 [0017]
- BIELIAUSKAS et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, vol. 17, 2216-2219 [0067]
- VALSTER et al. *Methods*. 2005, vol. 37, 208-215 [0069]
- *Methods in Molecular Biology*. RODRIGUEZ et al. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*. Humana Press Inc, vol. 294 [0069]