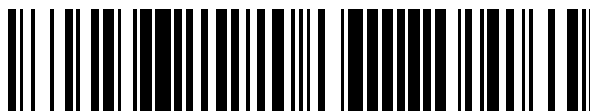


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 637**

51 Int. Cl.:

A61K 31/415 (2006.01) **C07D 417/04** (2006.01)
C07D 233/60 (2006.01)
C07D 403/04 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
C07D 263/32 (2006.01)
C07D 277/24 (2006.01)
C07D 277/42 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2011 PCT/US2011/048980**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12027481**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2011 E 11820603 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2608671**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

24.08.2010 US 376675 P
29.12.2010 WO PCT/US2010/062418

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2019

73 Titular/es:

GTX, INC. (50.0%)
175 Toyota Plaza 7th Floor
Memphis, TN 38103, US y
UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH
FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

DALTON, JAMES T.;
MILLER, DUANE D.;
LI, CHIEN-MING;
AHN, SUNJOO;
LU, YAN;
WANG, ZHAO;
CHEN, JIANJUN;
LI, WEI y
DUKE, CHARLES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 718 637 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 para el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos que tiene actividad anti-cancerígena, métodos de fabricación de estos compuestos, o su uso para tratar el cáncer, tratar tumores resistentes a fármacos, cáncer resistente a fármacos, cáncer metastático, melanoma metastático, melanoma resistente a fármacos, cáncer de próstata y cáncer de próstata resistente a fármacos.

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer es la segunda causa más común de muerte en los Estados Unidos, superado solo por la enfermedad cardíaca. En los Estados Unidos, el cáncer representa 1 de cada 4 muertes. La tasa de supervivencia a 5 años para todos los pacientes de cáncer diagnosticados en 1996-2003 es 66%, más que el 50% en 1975-1977 (*Cancer Facts & Figures American Cancer Society: Atlanta, GA (2008)*). Esta mejora en la supervivencia refleja el progreso en el diagnóstico a una etapa más temprana y las mejoras en el tratamiento. El descubrimiento de agentes anti-cancerígenos altamente eficaces con baja toxicidad es un objetivo principal de la investigación del cáncer.

- 15 Los microtúbulos son filamentos citoesqueléticos que consisten en heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina y están implicados en una amplia gama de funciones celulares, que incluyen el mantenimiento de la forma, transporte de vesículas, motilidad celular y división. La tubulina es el componente estructural principal de los microtúbulos y una diana bien verificada para una variedad de fármacos anti-cancerígenos altamente exitosos. Los compuestos que son capaces de interferir con el equilibrio de microtúbulo-tubulina en las células son efectivos en el tratamiento de cánceres. Los fármacos anti-cancerígenos como taxol y vinblastina que son capaces de interferir con el equilibrio de microtúbulo-tubulina en las células se usan de forma extensiva en la quimioterapia del cáncer. Hay tres clases principales de agentes antimitóticos. Los agentes estabilizadores del microtúbulo, que se unen a microtúbulos totalmente formados y evitan la despolimerización de subunidades de tubulina, están representados por taxanos y epotilones. Las otras dos clases de agentes son agentes desestabilizantes de microtúbulos, que se unen a dímeros de tubulina e inhiben su polimerización en los microtúbulos. Los alcaloides de la vinca tal como vinblastina se unen al sitio de la vinca y representan una de estas clases. La colchicina y los ligantes al sitio de la colchicina interactúan en un sitio distinto en la tubulina y definen la tercera clase de agentes antimitóticos.

- 20 Tanto los taxanos como los alcaloides de vinca se usan ampliamente para tratar cánceres humanos, mientras que ningún ligante al sitio de la colchicina está aprobado actualmente aún para la quimioterapia del cáncer. Sin embargo, los agentes de unión a la colchicina como la combretastatina A-4 (CA-4) y ABT-751 (Figura 19), están actualmente bajo investigación clínica como nuevos agentes quimioterapéuticos potenciales (Luo, Y.; Hradil, V.P.; Frost, D.J.; Rosenberg, S.H.; Gordon, G.B.; Morgan, S.J.; Gagnem, G.D.; Cox, B.F.; Tahir, S.K.; Fox, G.B.; ABT-751, "A novel tubulin-binding agent, decreases tumor perfusion and disrupts tumor vasculature". *Anticancer Drugs* 2009, 20(6), 483-92; Mauer, A.M.; Cohen, E.E.; Ma, P.C.; Kozloff, M.F.; Schwartzberg, L.; Coates, A.I.; Qian, J.; Hagey, A.E.; Gordon, G.B., "A phase II study of ABT-751 in patients with advanced non-small cell lung cancer". *J. Thorac Oncol* 2008, 3(6), 631-6; Rustin, G.J.; Shreeves, G.; Nathan, P.D.; Gaya, A.; Ganesan, T.S.; Wang, D.; Boxall, J.; Poupard, L.; Chaplin, D.J.; Stratford, M.R.; Balkissoon, J.; Zweifel, M., "A Phase Ib trial of CA4P (combretastatin A-4 phosphate), carboplatin, and paclitaxel in patients with advanced cancer" *Br J Cancer* 2010, 102(9), 1355-60).

- 25 Desafortunadamente, los fármacos anti-cancerígenos que interactúan con los microtúbulos en uso clínico comparten dos problemas principales, resistencia y neurotoxicidad. Un mecanismo común de resistencia multifármaco (MDR, por sus siglas en inglés), específicamente el flujo de fármaco mediado por proteína transportadora de casete de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés), limita su eficacia (Green, H.; Rosenberg, P.; Soderkvist, P.; Horvath, G.; Peterson, C.; "beta-Tubulin mutations in ovarian cancer using single strand conformation analysis-risk of false positive results from paraffin embedded tissues". *Cancer Letters* 2006, 236(1), 148-54; Wang, Y.; Cabral, F., "Paclitaxel resistance in cells with reduced beta-tubulin". *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research* 2005, 1744(2), 245-255; Leslie, E.M.; Deeley, R.G.; Cole, S.P.C., "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense". *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005, 204(3), 216-237).

- 30 Las P-glicoproteínas (P-gp, codificadas por el gen MDR1) son miembros importantes de la superfamilia ABC. P-gp evita la acumulación intracelular de muchos fármacos para el cáncer aumentando su eflujo fuera de las células cancerígenas, además de contribuir a las rutas de aclaramiento hepático, renal o intestinal. Los intentos de co-administrar moduladores o inhibidores de P-gp para aumentar la biodisponibilidad celular bloqueando las acciones de P-gp han tenido éxito limitado (Gottesman, M.M.; Pastan, I., "The multidrug transporter, a double-edged sword". *J Biol Chem* 1988, 263(25), 12163-6; Fisher, G.A.; Sikic, B.I., "Clinical studies with modulators of multidrug resistance". *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1995, 9(2), 363-82).

El otro problema principal con los taxanos, como con muchos productos naturales biológicamente activos, es su lipofilidad y falta de solubilidad en sistemas acuosos. Esto lleva al uso de emulgentes como Cremophor EL y

Tween 80 en preparados clínicos. Un número de efectos biológicos relacionados con estos vehículos de formulación de fármaco se han descrito, incluyendo reacciones de hipersensibilidad aguda y neuropatías periféricas (Hennenfent, K.L.; Govindan, R., "Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?" *Ann Oncol* 2006, 17(5), 735-49; ten Tije, A.J.; Verweij, J.; Loos, W.J.; Sparreboom, A., "Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy". *Clin Pharmacokinet* 2003, 42(7), 665-85).

En comparación con los compuestos que unen el sitio de unión de paclitaxel o alcaloide de vinca, los agentes de unión a colchicina normalmente muestran estructuras relativamente sencillas. Por consiguiente proporcionan una mejor oportunidad para la biodisponibilidad oral por medio de la optimización estructural para mejorar los parámetros de solubilidad y farmacocinética (PK). Además, muchos de estos fármacos parecen sortear la MDR mediada por P-gp. Por lo tanto, estos nuevos compuestos dirigidos al sitio de unión de colchicina son muy prometedores como agentes terapéuticos, particularmente porque han mejorado la solubilidad acuosa y superan la MDR mediada por P-gp.

El cáncer de próstata es uno de los cánceres no cutáneos diagnosticados más frecuentemente entre hombres en EE.UU. y es la segunda causa más común de muertes por cáncer con más de 180.000 nuevos casos y casi 29.000 muertes esperadas este año. Los pacientes con cáncer de próstata avanzado experimentan terapia de supresión androgénica (ADT, por sus siglas en inglés), típicamente o bien mediante agonistas hormonales de liberación de hormona luteinizante (LHRH) o mediante orquiectomía bilateral. La terapia de supresión androgénica no solo reduce la testosterona, sino que los niveles de estrógeno también son menores ya que el estrógeno se deriva de la aromatización de testosterona, cuyos niveles se disminuyen por ADT. La deficiencia de estrógenos inducida por la terapia de supresión androgénica provoca significativos efectos secundarios que incluyen sofocos, ginecomastia y mastalgia, pérdida ósea, disminuciones en la calidad y resistencia ósea, osteoporosis y fracturas que ponen en peligro la vida, cambios lipídicos adversos y mayor enfermedad cardiovascular e infarto de miocardio, y depresión y otros cambios de humor.

El acetato de leuprolida (Lupron®) es un análogo nonapéptido sintético de la hormona de liberación de gonadotropina que se da de forma natural (GnRH o LHRH). El acetato de leuprolida es un superagonista de LHRH que eventualmente suprime la secreción de LH por la pituitaria. El acetato de leuprolida actúa como un potente inhibidor de la secreción de gonadotropina, dando por resultado la supresión de la esteroidogénesis ovárica y testicular. En los humanos, la administración de acetato de leuprolida da por resultado un aumento inicial en los niveles circulantes de hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH), llevando a un aumento temporal en los niveles de los esteroides gonadales (testosterona y dihidrotestosterona en hombres, y estrona y estradiol en mujeres pre-menopáusicas). Sin embargo, la administración continua de acetato de leuprolida da por resultado niveles disminuidos de LH y FSH. En los hombres, la testosterona se reduce a niveles de castrado (por debajo de 50 ng/dL). En las mujeres pre-menopáusicas, los estrógenos se reducen a niveles post-menopáusicos. La testosterona es un estímulo conocido para las células cancerígenas de la próstata. Suprimir la secreción de testosterona o inhibir las acciones de la testosterona es por consiguiente un componente necesario de la terapia para el cáncer de próstata. El acetato de leuprolida puede usarse para la supresión de LH, que es la reducción y disminución de testosterona en suero a niveles de castrado para tratar el cáncer de próstata.

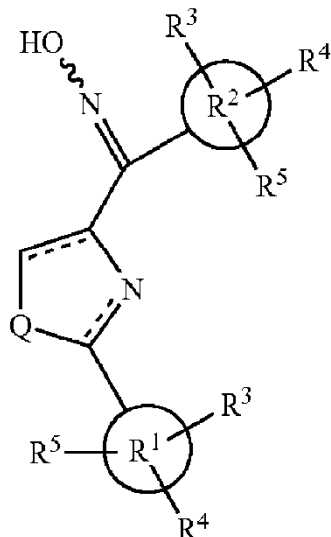
El melanoma maligno es la forma más peligrosa de cáncer de piel, representando aproximadamente el 75% de muertes por cáncer de piel. La incidencia del melanoma está creciendo constantemente en las poblaciones occidentales. El número de casos se ha doblado en los últimos 20 años. Alrededor de 160.000 nuevos casos de melanoma se diagnostican en el mundo cada año, y es más frecuente en hombres y caucásicos. Según un informe de la OMS, aproximadamente 48.000 muertes relacionadas con el melanoma se dan en el mundo por año.

Actualmente no hay una forma efectiva para tratar el melanoma metastático. Es altamente resistente a la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia actual. El melanoma metastático tiene un pronóstico muy pobre, con una tasa media de supervivencia de 6 meses y una tasa de supervivencia a los 5 años de menos del 5%. En los últimos 30 años, la dacarbazina (DTIC) es el único fármaco aprobado con la FDA para el melanoma metastático. Sin embargo, proporciona solo menos del 5% de la remisión completa en los pacientes. En años recientes, se han hecho grandes esfuerzos en la lucha contra el melanoma metastático. Ni las combinaciones de DTIC con otros fármacos de quimioterapia (p.ej., cisplatina, vinblastina y carmustina) ni la adición de interferona- α 2b a DTIC han mostrado una ventaja en la supervivencia sobre el tratamiento de DTIC solo. Más recientemente, los ensayos clínicos con anticuerpos y vacunas para tratar el melanoma metastático también fallaron en demostrar una eficacia satisfactoria.

Las células de melanoma tienen bajos niveles de apoptosis espontánea *in vivo* en comparación con otros tipos de células tumorales, y son relativamente resistentes a la apoptosis inducida por fármaco *in vitro*. El papel natural de los melanocitos es proteger los órganos internos de la luz UV, un potente agente de daño de ADN. Por lo tanto, no es sorprendente que las células de melanoma puedan tener unos sistemas de reparación de daño de ADN especiales y propiedades de supervivencia mejoradas. Además, recientes estudios mostraron que, durante la progresión del melanoma, adquieren alteraciones genéticas complejas que llevan a la hiperactivación de bombas de eflujo, enzimas de desintoxicación, y una alteración multifactorial de las rutas de supervivencia y apoptótica. Se ha propuesto que todo esto media en el fenotipo resistente a multifármaco (MDR) del melanoma. Con la incidencia subiendo rápidamente de esta enfermedad y la alta resistencia a los agentes terapéuticos actuales, el desarrollo de fármacos

más efectivos para el melanoma avanzado y otros tipos de cánceres que pueden sortear de forma efectiva la MDR proporcionarán beneficios significativos a los pacientes de cáncer.

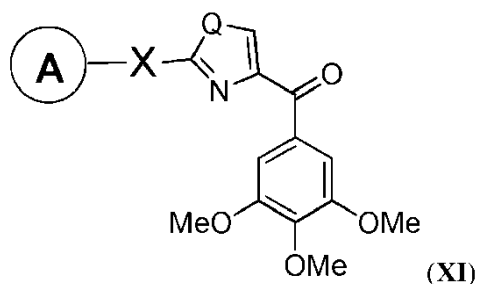
La Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2009/0326020 A1 describe compuestos de fórmula VIII (VIII)



- 5 En los que Q es S, N u O, y su uso en el tratamiento del cáncer.

Compendio de la invención

En una realización, esta invención se dirige a un compuesto representado por la estructura de fórmula XI:



En el que

- 10 X es NH;

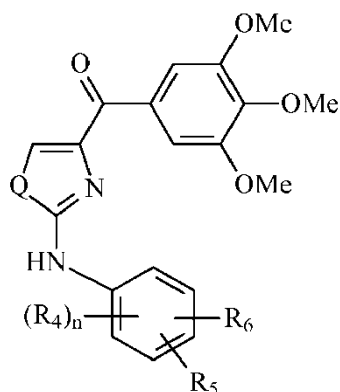
Q es S; y

A es un anillo de fenilo o indolilo sustituido o no sustituido;

- 15 En el que dicho anillo A está opcionalmente sustituido por 1-5 sustituyentes que son independientemente O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF₃, CN, -CH₂CN, NH₂, hidroxilo, -(CH₂)_iNHCH₃, -(CH₂)_iNH₂, -(CH₂)_iN(CH₃)₂, -OC(O)CF₃, alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, -OCH₂Ph, -NHCO-alquilo, COOH, -C(O)Ph, C(O)O-alquilo, C(O)H, -C(O)NH₂ o NO₂; e

i es un número entero entre 0-5.

En una realización, esta invención se dirige a un compuesto representado por la estructura de fórmula VIII:



(VIII)

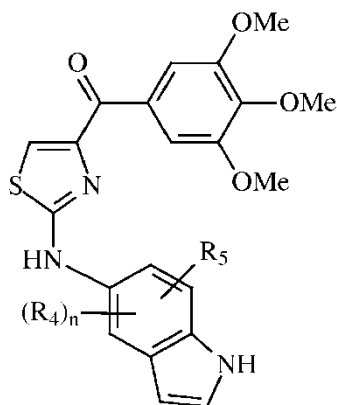
R₄, R₅ y R₆ son independientemente hidrógeno, O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF₃, CN, -CH₂CN, NH₂, hidroxilo, -(CH₂)_iNHCH₃, -(CH₂)_iNH₂, -(CH₂)_iN(CH₃)₂, -OC(O)CF₃, alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, -OCH₂Ph, -NHCO-alquilo, COOH, -C(O)Ph, C(O)O-alquilo, C(O)H, -C(O)NH₂ o NO₂;

5 Q es S;

i es un número entero entre 0-5; y

n es un número entero entre 1-3.

En una realización, esta invención se dirige a un compuesto representado por la estructura de fórmula XI(c):



XI(c)

10 En el que R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno, O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF₃, CN, -CH₂CN, NH₂, hidroxilo, -(CH₂)_iNHCH₃, -(CH₂)_iNH₂, -(CH₂)_iN(CH₃)₂, -OC(O)CF₃, alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, -OCH₂Ph, -NHCO-alquilo, COOH, -C(O)Ph, C(O)O-alquilo, C(O)H, -C(O)NH₂ o NO₂;

i es un número entero de 0-5; y

15 n es un número entero entre 1-4.

En otra realización, esta invención se dirige a los siguientes compuestos: (2-(fenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5a), (2-(*p*-tolilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5b), (2-(*p*-fluorofenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5c) y (2-(4-clorofenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5d).

20 En otra realización, el compuesto de esta invención es su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, o combinaciones de los mismos.

En una realización, esta invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de esta invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En una realización esta invención se dirige a un compuesto de esta invención para usar en (a) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición del cáncer; (b) tratar un tumor o tumores resistentes al fármaco; y (c) destruir una célula cancerígena. En otra realización el cáncer se selecciona del grupo

que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de piel, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, leucemia, cáncer renal, cáncer del SNC y combinaciones de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

5 El tema considerado como la invención está particularmente apuntado y distintamente reivindicado en la parte final de la memoria. La invención, sin embargo, tanto respecto a la organización como al método de operación, junto con objetos, características y ventajas de los mismos, pueden entenderse mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se lee con los dibujos de acompañamiento en que:

10 La Figura 1 representa la síntesis de las distintas plantillas del anillo B: oxazol. Reactivos y condiciones: (a) MeOH, CH₃COCl, 83%; (b) etiléster de ácido benzimidico, CH₂Cl₂, Et₃N, 96%; (c) LiOH, MeOH, H₂O, 65%; (d) EDCI, HOBT, NMM, CH₃OCH₃NH·HCl, 61%; (e) bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio, THF, 48%-71%; (f) CBrCl₃, DBU, CH₂Cl₂, 56%.

15 La Figura 2 representa la síntesis de las distintas plantillas de anillo B. Reactivos y condiciones: (a) EDCI, HOBT, NMM, CH₃OCH₃NH·HCl, CH₂Cl₂, 51-95%; (b) bromuro de 3,4,5-trimetoxifenil-magnesio, THF, 48-78%; (c) LAH, -78°C, THF, 85%; (d) reactivo de Dess-Martin, CH₂Cl₂, 81%; (e) EDCI, HOBT, NMM, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, CH₂Cl₂, 58%.

20 La Figura 3 representa el esquema sintético de compuestos de referencia. Reactivos y condiciones: (a) MeOH/tampón fosfato pH=6,4, TA; (b) EDCI, HOBT, NMM, HNCH₃OCH₃; (c) CBrCl₃, DBU, CH₂Cl₂; (d) bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio, THF; (e) yoduro de isopropiltrifenilfosfonio, *n*-BuLi, THF; (f) LAH, THF; (g) para 2e-cis y 2e-trans, NH₂OH·HCl, C₂H₅OH, H₂O, NaOH; para 2g y 2h, NH₂OMe·HCl, piridina; (h) TsCl, NaH, Al₂O₃ básico; (i) NH₂NH₂·xH₂O, CH₂Cl₂, *t*-BuOH; (j) cianometilfosfonato de dietilo, *n*-BuLi, THF; (k) bis-trimetilsililcarbodiimida, TiCl₄, CH₂Cl₂; (l) EDCI, HOBT, Et₃N, 3,4,5-trimetoxianilina, CH₂Cl₂.

25 La Figura 4 representa el esquema sintético de compuestos de referencia. Reactivos y condiciones: (a) bromo, EtOH; (b) benzotioamida, EtOH, reflujo; (c) EDCI, HOBT, NMM, HNCH₃OCH₃, CH₂Cl₂; (d) CBrCl₃, DBU, CH₂Cl₂; (e) LAH, THF; (f) 5-(bromometil)-1,2,3-trimetoxibenceno, Ph₃P, THF; (g) *n*-BuLi, THF; (h) (1) HCl, H₂O; (2) NaNO₂, H₂O, 0°C; (i) xantano de etil-potasio; (j) KOH/EtOH; (k) H₂O, HCl; (l) 5-yodo-1,2,3-trimetoxibenceno, CuI, *t*-BuONa; (m) 2 equiv o 1 equiv *m*-CPBA, CH₂Cl₂; (n) 3,4,5-trimetoxianilina, NEt₃, DMF.

30 La Figura 5 representa el esquema sintético de compuestos de referencia. Reactivos y condiciones: (a) L-cisteína, EtOH, 65°C; (b) EDCI, HOBT, NMM, HNCH₃OCH₃, CH₂Cl₂; (c) TBDMSCl, imidazol, THF; (d) bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilo, BuLi, THF; (e) TBAF, THF; (f) SOCl₂, Et₂O; (g) NH₃, MeOH; (h) POCl₃; (i) PhSO₂Cl, Bu₄NHSO₄, tolueno, NaOH al 50%; (j) NaOH 1 N, EtOH, reflujo; (k) Boc₂O, NaOH 1 N, 1,4-dioxano; (l) CBrCl₃, DBU, CH₂Cl₂; (m) HCl 4 N en 1,4-dioxano; (n) NaH, DMF, MeI; (o) HCHO, NaBH₃CN, Et₃N.

La Figura 6 representa el esquema sintético de compuestos de esta invención. Reactivos y condiciones: (a) EtOH, 65°C; (b) NaOH, C₂H₅OH, reflujo; (c) EDCI, HOBT, NMM, HNCH₃OCH₃, CH₂Cl₂; (d) bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilo, BuLi, THF; (e) HCl 2 N en 1,4-dioxano.

35 La Figura 7 representa un esquema sintético para la preparación de compuestos de Aril-Benzoil-Imidazol (ABI) como compuestos de referencia. Reactivos y condiciones: (a) *t*-BuOH, I₂, etilendiamina, K₂CO₃, reflujo; (b) PhI (OAc)₂, K₂CO₃, DMSO; (c) DBU, CBrCl₃, DMF; (d) NaH, PhSO₂Cl, THF, 0°C -TA; (e) *t*-BuLi, cloruro de benzoilo sustituido, THF, -78°C; (f) Bu₄NF, THF, TA.

40 La Figura 8 representa un esquema sintético para la preparación de compuestos de Aril-Benzoil-Imidazol (ABI) como compuestos de referencia. Reactivos y condiciones: (a) NH₄OH, oxalaldehído, etanol, TA; (b) NaH, PhSO₂Cl, THF, 0°C - TA; (c) *t*-BuLi, cloruro de benzoilo sustituido, THF, -78°C; (d) Bu₄NF, THF, TA; (e) BBr₃, CH₂Cl₂; (f) c-HCl, AcOH, reflujo.

La Figura 9 representa un esquema sintético para la preparación de compuestos Arilo-Benzoil-Imidazol (ABI) como compuestos de referencia. Reactivos y condiciones: (a) NaH, cloruro de benzoilo sustituido, THF.

45 La Figura 10 representa el esquema sintético de compuestos 12dc, 12fc, 12daa, 12dab, 12cba, (a) AlCl₃, THF, reflujo; (b) NaH, CH₃I para 12dab y 12cba y BnBr para 12daa, THF, reflujo.

La Figura 11 representa el esquema sintético de compuestos 11gaa, 12la. (a) NH₄OH, etanol, glioxal, TA; (b) NaH, PhSO₂Cl sustituido, THF, 0°C - TA; (c) *t*-BuLi (1,7 M en pentano), cloruro de benzoilo sustituido, THF, -78°C; (d) Bu₄NF, TA.

50 La Figura 12 representa el esquema sintético del compuesto 15xaa y 12xa. (a) 1. KOH, etanol; 2. PhSO₂Cl, acetona; (b) NH₄OH, glioxal, etanol, TA; (c) NaH, PhSO₂Cl, THF, 0°C - TA; (d) *t*-BuLi (1,7 M en pentano), cloruro de benzoilo, THF, -78°C; (e) NaOH, etanol, H₂O, reflujo.

La Figura 13 representa un esquema sintético de 17ya. (a) 1. KOH, etanol, 2. PhSO₂Cl, acetona, TA; (b) NH₄OH, glioxal, etanol, TA; (c) NaH, PhSO₂Cl, THF, 0°C – TA; (d) *t*-BuLi (1,7 M en pentano), cloruro de benzoilo, THF, -78°C; (e) NaOH, etanol, H₂O, reflujo.

La Figura 14 representa el esquema sintético de 12fa. (a) NH₄OH, oxalaldehído, etanol, TA; (b) NaH, PhSO₂Cl, THF, 0°C – TA; (c) *t*-BuLi, cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo, THF, -78°C; (d) Bu₄NF, THF, TA.

La Figura 15 representa un esquema sintético del compuesto 55.

La Figura 16 representa un esquema sintético de compuestos basados en isoquinolina y quinolina. La Figura 16A representa el esquema sintético de derivados de isoquinolina. Reactivos y condiciones: a) ácido arilborónico (1 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (0,01 equiv.), K₂CO₃, H₂O, DMF, 5 h; b) ácido arilborónico (2,4 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (0,04 equiv.), K₂CO₃, H₂O, DMF, 16 h; c) ácido arilborónico (1,2 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (0,04 equiv.), K₂CO₃, H₂O, DMF, 16 h. La Figura 16B representa el esquema sintético de compuestos 41 y 44. Reactivos y condiciones: a) cloruro de *p*-fluorobencenosulfonilo, piridina, piridina, 80°C, 3 h; b) ácido 5-indolborónico (1,2 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (0,02 equiv.), K₂CO₃, H₂O, DMF, 16 h. La Figura 16C representa el esquema sintético del derivado de isoquinolina 6d. La Figura 16D representa el esquema sintético del derivado de isoquinolina 6c. La Figura 16E representa el esquema sintético del derivado de isoquinolina 6b.

La Figura 17 representa una curva de solubilidad estándar para el compuesto ABI 12ga (disuelto en acetonitrilo). El eje X es la cantidad de compuesto y el eje Y es el área del pico m/z.

La Figura 18 representa la solubilidad acuosa medida para los compuestos de anti-tubulina 1h, 1c, 66a, 2r-HCl, 5a y 5c.

La Figura 19 representa las estructuras de inhibidores de tubulina del sitio de unión de colchicina.

La Figura 20 representa la capacidad de compuestos de anti-tubulina 1h, 1c, 2j, 66a y 5a para inhibir la polimerización de tubulina *in vitro* (Figura 20a) y 5c (Figura 20b), y la unión de 5Hc al sitio de colchicina (Figura 20c).

La Figura 21 representa curvas de respuesta a la dosis de compuestos de 2-aril-4-benzoil-imidazol (ABI) en comparación con otros fármacos anti-cancerígenos y compuestos en la línea celular de melanoma resistente a multifármaco (célula MDR) y la línea celular parental sensible correspondiente (célula de melanoma normal). La gran distancia entre las dos curvas para paclitaxel, vinblastina y colchicina indica que eran sustratos para P-glicoproteína (P-gp). Las dos curvas que se solapan de cada compuesto ABI indican que los compuestos ABI no eran sustratos para P-gp y superaron la resistencia a multifármaco.

La Figura 22 presenta el efecto de los compuestos ABI en la polimerización de la tubulina *in vitro*. La tubulina (0,4 mg/ensayo) se expuso a compuestos ABI 10 µM (vehículo de control, DMSO al 5%). La absorbancia a 340 nm se monitorizó a 37°C cada minuto durante 15 min y se demostró que los compuestos ABI 12da, 12db y 12cb inhibieron la polimerización de tubulina *in vitro*.

La Figura 23 representa el ensayo de formación de colonia de melanoma B16-F1 en agar blando que mostró que los compuestos ABI inhibieron la formación de la colonia en una manera dependiente de la concentración. La Figura 23A representa dibujos representativos de control y cada compuesto probado (12cb, 12da y 12fb) a 100 nM. El diámetro de cada pocillo era 35 mm. La Figura 23B representa una representación cuantificada de los resultados del ensayo para cada compuesto probado (12cb, 12da y 12fb). El valor P se calculó por comparación con el control usando la prueba t de Student mediante el programa GraphPad Prism. Columnas, media de tres réplicas; barras, DE.

La Figura 24 representa el estudio *in vivo* de compuestos ABI. La Figura 24A representa la actividad *in vivo* de 12cb frente a tumores de melanoma B16-F1 en ratones C57/BL. La Figura 24B representa la actividad *in vivo* de 12fb frente al melanoma B16-F1 en ratones C57BL/6 y ratones desnudos SHO. Los resultados mostraron que 12fb inhibió el crecimiento del tumor de melanoma de una manera dependiente de la dosis. Los ratones C57BL/6 portan aloinjerto de melanoma B16-F1 (n=5 por grupo). Cada ratón recibió 0,5x10⁶ células por inyección s.c. en el flanco. Se comenzaron tratamientos diarios i.p. de 30 µL cuando el tamaño del tumor alcanzó ~100 mm³. La Figura 24C representa la actividad *in vivo* de 12fb frente a un xenoinjerto de melanoma humano A375. Los ratones desnudos SHO portan un xenoinjerto de melanoma humano A375 (n=5 por grupo). Cada ratón recibió 2,5x10⁶ células por inyección s.c. en el flanco. Se comenzaron tratamientos diarios i.p. de 30 µL cuando el tamaño del tumor alcanzó ~150 mm³. Control, solo disolución de vehículo; puntos, media; barras, DE. DTIC, (5-(3,3-dimetil-1-triacenil)-imidazol-4-carboxamida, dacarbazina.

La Figura 25 representa un ensayo de unión de colchicina competitivo. La Figura 25A representa un ensayo de proximidad de centelleo de unión en competición con [³H]-colchicina que mostró que 12cb se unió de forma competitiva al sitio de unión de la colchicina de la tubulina. La Figura 25B representa gráficos representativos del análisis del ciclo celular usando citometría de flujo que mostró que los compuestos ABI (ejemplos mostrados para 12da y 12fb) detuvieron las células A375 en la fase G2/M después de incubación de 24 h. El efecto y potencia fueron similares a las de colchicina. La Figura 25C muestra representaciones gráficas cuantificadas de análisis de ciclo

celular. Todos los compuestos probados (ejemplos mostrados para 12cb, 12da y 12fb) detuvieron las células A375 en la fase G2/M de una manera dependiente de la dosis. ABI 12da mostraron mayor potencia que la de la colchicina. La Figura 25D representa un análisis de ciclo celular usando citometría de flujo de células A375 después de incubarse con 12cb, 12da y 12fb a concentraciones diferentes durante 24 h. La colchicina detuvo la mayoría de las células en la fase G2/M partiendo de 50 nM. 12cb, 12da y 12fb también detuvieron la mayoría de las células en la fase G2/M partiendo de 200, 50 y 200 nM respectivamente.

La Figura 26 representa el efecto de 17ya y 55 en la polimerización de la tubulina. Los compuestos 17ya y 55 se unen al sitio de unión de la colchicina en la tubulina, e inhiben la polimerización de tubulina. Figura 26A, unión de masa competitiva. La tubulina (1 mg/mL) y la colchicina (1,2 μ M) se incubaron con varias concentraciones de podofiltoxina, vinblastina, compuestos 17ya y 55. N = 3; media \pm DE. La podofiltoxina y la vinblastina se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Figura 26B, efecto en la polimerización de tubulina. La tubulina (0,4 mg) se expuso a compuestos de ensayo (5 μ M). Se usó la colchicina como control positivo. Figura 26C y 26D, capacidad de 17ya y 55 para mejorar la formación del complejo de ADN-Histona citoplasmático (apoptosis) a 24 h en células PC-3 (C) y PC-3/TxR (D) (N = 3); media \pm DE. Se usó docetaxel como control positivo.

La Figura 27 representa la eficacia anti-cancerígena *in vivo*. Figura 27A, los ratones desnudos que portan tumores PC-3 se trataron con docetaxel (i.v., 10 o 20 mg/kg) en el día 1 y 9. (N = 5-6). Barras, EE. Figura 27B, ratones desnudos que portan tumores PC-3/TxR se trataron con docetaxel (i.v., 10 o 20 mg/kg) en el día 1 y 9, los tratamientos con compuesto 17ya (p.o., 6,7 mg/kg) una vez al día, cinco días a la semana (N = 4-5). Barras, EE. Figura 27C, ratones desnudos que portan tumores PC-3/TxR se trataron con compuesto 17ya (PO, 3,3 mg/kg) dos veces al día durante cuatro días en la primera semana, y después se dosificaron una vez al día, cinco días a la semana durante 2-4 semanas (N = 7), con tratamientos del compuesto 55 (p.o., 10 o 30 mg/kg) dos veces al día, cinco días a la semana durante cuatro semanas (N = 7). Barras, EE. Figura 27D, ratones desnudos que portan tumores PC-3/TxR se trataron con compuesto 17ya (PO, 10 mg/kg) tres veces a la semana durante cuatro semanas (N = 5). Barras, EE.

La Figura 28 representa que los compuestos 1h, 2k y 2l inhiben la polimerización de tubulina por medio de la unión al sitio de unión de la colchicina en la tubulina. (Figura 28A) Estructuras de 1h (-H), 2k (-F) y 2l (-OH). (Figura 28B) Efecto de los compuestos en la polimerización de la tubulina. La tubulina (0,4 mg) se expuso a los compuestos 1h, 2k y 2l (10 μ M). La absorbancia a 340 nm se monitorizó cada min durante 15 min. (Figura 28C) Capacidad de 1h para competir por los sitios de unión de colchicina, vinblastina y paclitaxel en tubulina usando el ensayo de unión competitiva por espectrometría de masas (n = 3); barras, DE.

La Figura 29 representa que los compuestos 1h, 2k y 2l detuvieron las células en fase G2/M e indujeron la apoptosis. (Figura 29A) Gráficos representativos de análisis de ciclo celular después del tratamiento con compuestos durante 24 h en células PC-3 y A375. (Figura 29B) Los cambios en la proporción de G2/M inducidos por 1h, 2k y 2l en células PC-3 y A375 después del tratamiento de 24 h. (Figura 29C) Capacidad de 1h, 2k y 2l para mejorar la formación del complejo de ADN-Histona citoplasmático en 24 h (n = 3); barras, DE. Se usaron colchicina y vinblastina como controles positivos.

La Figura 30 representa estudios farmacocinéticos de 1h, 2k y 2l administrados i.p. en ratones y ratas. (Figura 30A) Curva de concentración-tiempo de compuestos SMART en ratones ICR (n = 3); barras, DE. Los compuestos SMART se administraron 15 mg/kg i.v. mediante inyección en la vena de la cola. (Figura 30B) Curva de concentración-tiempo de 1h y 2k en ratas SD (n = 4); barras, DE. Las ratas de Spague-Dawley se dosificaron con 2,5 mg/kg i.v. con la formulación DMSO/PEG300 (1/4).

La Figura 31 presenta eficacia anti-cancerígena *in vivo* (administrado i.p.) y neurotoxicidad de compuestos SMART en ratones. (Figura 31A) Eficacia de los compuestos SMART para tumor de próstata PC-3 xenoinjertado en ratones desnudos (n = 6-8). (Figura 31B) Eficacia de vinblastina para el tumor de próstata PC-3 xenoinjertado en ratones desnudos (n = 8). Esto sirvió como el control positivo. (Figura 31C) La eficacia *in vivo* de 1h y 2k en ratones desnudos que portan xenoinjertos de melanoma A375 (n = 10). Los ratones desnudos se inocularon con $2,5 \times 10^6$ células de PC-3 o A375 y se dosificaron i.p. diariamente (compuestos SMART) y q2d (vinblastina) después de la formación del tumor (150-200 mm³). Cada punto representa el volumen tumoral medio para animales en cada grupo. (Figura 31D) Neurotoxicidad *in vivo* (prueba de rotarod) de 1h en ratones ICR (n = 7 u 8). 1h (5 y 15 mg/kg), vinblastina (0,5 mg/kg) y vehículo se dieron i.p. diariamente, y se usó la vinblastina como el control positivo. La dosificación se paró el día 31. *, $p < 0,05$. Barras, EE.

La Figura 32 representa el modelado molecular de los compuestos ABI que tienen como objetivo la tubulina en el sitio de unión de la colchicina. Las Figuras 32A y 32B representan el modelado molecular de compuesto 12cb y 11cb, respectivamente.

La Figura 33 representa imágenes microscópicas de microtúbulos marcados con inmunofluorescencia en células de melanoma WM-164, que mostraron que la modalidad de microtúbulo se cambió dramáticamente después del tratamiento con compuesto durante 18 h. Esto proporciona prueba visual de que los compuestos ABI tienen como objetivo la tubulina e interrumpen la formación de microtúbulos funcionales.

La Figura 34 representa la eficacia y la tolerabilidad de 6b y 6c en modelos de xenoinjerto después de la inyección i.p. Figura 34A. Los xenoinjertos PC-3 se trataron con vehículo (qd), 6b (40 mg/kg, qd), o 6c (40 mg/kg, qd) durante 3 semanas. Los vehículos de dosificación estaban compuestos de Captex200 al 20% en Tween80. Los volúmenes tumorales (mm³) se representaron frente al tiempo y son las medias \pm DE de ocho animales. Los volúmenes tumorales se mostraron en el panel izquierdo y los pesos corporales se mostraron en el panel derecho. Figura 34B. El tamaño del hígado (g) de cada ratón desnudo se midió después de 3 semanas de tratamiento. Figura 34C. El número de glóbulos blancos se contó en la sangre completa recogida del animal después de 3 semanas de tratamiento.

Figura 35 – El compuesto 17ya mostró una potente inhibición de crecimiento celular endotelial. La inhibición del crecimiento celular de doxorubicina (Figura 35A) y compuesto 17ya (Figura 35B) se investigó en varias líneas celulares mediante el estudio SRB. Las definiciones HUVEC-activo y HUVEC-inactivo representan cultivos celulares endoteliales suplementados con factor de crecimiento y privados de factor de crecimiento, respectivamente.

Figura 36- Interrupción de capilar preformado por 17ya. Se dejó que las células HUVEC cargadas en Matrigel hicieran tubos durante 16 h y el compuesto de prueba se trató a los tubos preformados. El número de tubos (A, B y C) y nodos (D, E y F) se contaron hasta 25 h después del tratamiento de fármaco. Los paneles A y D son condiciones en presencia de CA4, los paneles B y E son condiciones en presencia de doxorubicina y los paneles C y F son condiciones en presencia de 17ya.

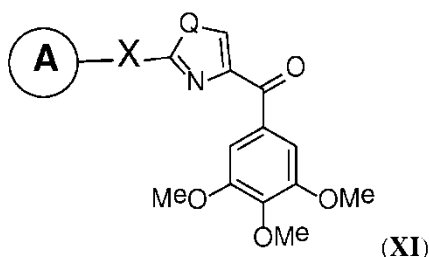
Figura 37- Inhibición de la formación capilar endotelial e interrupción de capilares preformados. La inhibición de formación capilar (●) y la interrupción de capilar preformado (○) se compararon en el estudio *in vitro* usando células HUVEC después de 15 h de tratamiento de CA4 (A y D), DOX (B y E) y 17ya (C y F). La flecha muestra el valor de CI₅₀ de cada compuesto en la inhibición del crecimiento de células HUVEC.

Figura 38- 17ya y 55 aumentaron la permeabilidad de las monocapas de células endoteliales. Las monocapas HUVEC confluentes se expusieron al compuesto de ensayo. La pérdida de dextrano conjugado con FITC a través de la monocapa se evaluó mediante medidas de fluorescencia relativa a $\lambda = 485$ nm de excitación y $\lambda = 530$ nm de emisión en un receptor para determinar cambios en la permeabilidad de la monocapa después de la exposición.

Se apreciará que por simplicidad y claridad de ilustración, los elementos mostrados en las figuras no se han dibujado necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos pueden estar exageradas respecto a otros elementos por claridad. Además, donde se considere apropiado, los números de referencia pueden repetirse entre las figuras para indicar elementos correspondientes o análogos.

Descripción detallada de la invención

Esta descripción está dirigida a un compuesto representado mediante la estructura de la fórmula XI:



En el que

X es NH;

Q es S; y

A es un anillo fenilo o indolilo sustituido o no sustituido; e

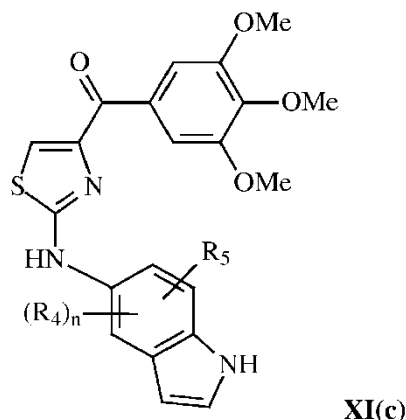
i es un número entero de 0-5;

o su sal, hidrato o tautómero farmacéuticamente aceptable.

En una realización, A del compuesto de Fórmula XI es Ph. En otra realización, A del compuesto de Fórmula XI es Ph sustituido. En otra realización, la sustitución es 4-F. En otra realización, la sustitución es 4-Me. Ejemplos no limitantes de los compuestos de Fórmula XI se seleccionan de: (2-(fenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5a), (2-(*p*-tolilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5b), (2-(*p*-fluorofenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5c), (2-(4-clorofenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5d), sal de hidrocloreto de (2-(fenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5Ha), sal de hidrocloreto de (2-(*p*-tolilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5Hb), sal de hidrocloreto de (2-(*p*-

fluorofenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5Hc), sal de hidrocloreto de (2-(4-clorofenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5Hd).

En una realización, esta invención está dirigida a un compuesto representado por la estructura de fórmula XI(c):



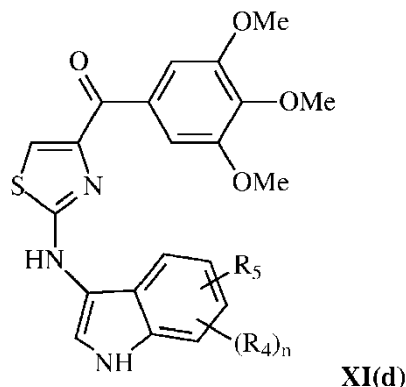
- 5 En el que R_4 y R_5 son independientemente hidrógeno, O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF_3 , CN, $-CH_2CN$, NH_2 , hidroxilo, $-(CH_2)_iNHCH_3$, $-(CH_2)_iNH_2$, $-(CH_2)_iN(CH_3)_2$, $-OC(O)CF_3$, alquilo C_1 - C_5 lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, $-OCH_2Ph$, $-NHCO$ -alquilo, $COOH$, $-C(O)Ph$, $C(O)O$ -alquilo, $C(O)H$, $-C(O)NH_2$ o NO_2 ;

i es un número entero de 0-5; y

- 10 n es un número entero entre 1-4;

o su sal, hidrato o tautómero farmacéuticamente aceptable.

En una realización, esta invención está dirigida a un compuesto representado por la estructura de fórmula XI(d):



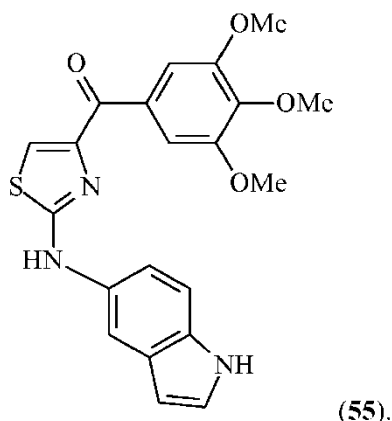
- 15 En el que R_4 y R_5 son independientemente hidrógeno, O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF_3 , CN, $-CH_2CN$, NH_2 , hidroxilo, $-(CH_2)_iNHCH_3$, $-(CH_2)_iNH_2$, $-(CH_2)_iN(CH_3)_2$, $-OC(O)CF_3$, alquilo C_1 - C_5 lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, $-OCH_2Ph$, $-NHCO$ -alquilo, $COOH$, $-C(O)Ph$, $C(O)O$ -alquilo, $C(O)H$, $-C(O)NH_2$ o NO_2 ;

i es un número entero de 0-5; y

n es un número entero entre 1-4;

- 20 o su sal, hidrato o tautómero farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, un compuesto de fórmula XI se representa por la estructura de compuesto 55:



Se entiende bien que en las estructuras presentadas en esta invención en las que el átomo de nitrógeno tiene menos de 3 enlaces, los átomos de H están presentes para completar la valencia del nitrógeno.

5 En una realización, el grupo A es fenilo sustituido o no sustituido. En otra realización, el grupo A es fenilo sustituido por Cl, F o metilo. En una realización, el grupo A incluye grupos indolilo sustituidos o no sustituidos; lo más preferiblemente, 3-indolilo y 5-indolilo sustituidos y no sustituidos.

10 En una realización, el grupo A de fórmula XI puede estar sustituido o no sustituido. Por consiguiente, aunque los grupos ejemplares enumerados en el párrafo precedente están no sustituidos, se apreciaría por los expertos en la técnica que estos grupos pueden estar sustituidos por uno o más, dos o más, tres o más, e incluso hasta cinco sustituyentes (distintos de hidrógeno).

15 En una realización, los grupos A más preferidos están sustituidos por 3,4,5-trimetoxifenilo. En otra realización los grupos A están sustituidos por alcoxi. En otra realización los grupos A están sustituidos por metoxi. En otra realización los grupos A están sustituidos por alquilo. En otra realización los grupos A están sustituidos por metilo. En otra realización los grupos A están sustituidos por halógeno. En otra realización, los grupos A están sustituidos por F. En otra realización, los grupos A están sustituidos por Cl. En otra realización, los anillos A están sustituidos por Br.

20 Los sustituyentes de estos grupos A de fórmula XI se seleccionan independientemente del grupo de hidrógeno (p.ej., sin sustitución en una posición particular), hidroxilo, un hidrocarburo C₁ a C₁₀ alifático, de cadena lineal o ramificada, alcoxi, haloalcoxi, ariloxi, nitro, ciano, alquil-CN, halo (p.ej., F, Cl, Br, I), haloalquilo, dihaloalquilo, trihaloalquilo, COOH, C(O)Ph, C(O)-alquilo, C(O)O-alquilo, C(O)H, C(O)NH₂, -OC(O)CF₃, OCH₂Ph, amino, aminoalquilo, alquilamino, mesilamino, dialquilamino, arilamino, amido, NHC(O)-alquilo, urea, alquil-urea, alquilamido (p.ej., acetamida), haloalquilamido, arilamido, arilo, y cicloalquilo C₅ a C₇, arilalquilo y combinaciones de los mismos. Pueden estar presentes sustituyentes sencillos en las posiciones *orto*, *meta* o *para*. Cuando están presentes dos o más sustituyentes, uno de ellos está preferiblemente, aunque no necesariamente, en la posición *para*.

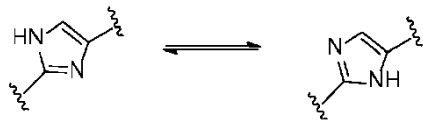
25 En una realización, R₄, R₅ y R₆ de fórmula VIII, XI(c) o XI(d) son independientemente hidrógeno. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente O-alquilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente O-haloalquilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente F. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente Cl. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente Br. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente I. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente haloalquilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente CF₃. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente CN. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -CH₂CN. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente NH₂. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente hidroxilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -(CH₂)_iNHCH₃. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -(CH₂)_iNH₂. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -(CH₂)_iN(CH₃)₂. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -OC(O)CF₃. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente haloalquilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente alquilamino. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente aminoalquilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -OCH₂Ph. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -NHCO-alquilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente COOH. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -C(O)Ph. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente C(O)O-alquilo. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente C(O)H. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente -C(O)NH₂. En otra realización, R₄, R₅ y R₆ son independientemente NO₂.

45 Como se usa en la presente memoria, "sistemas de anillo sencillo, condensado o múltiple, arilo o anillo (hetero)cíclico" puede ser cualquier anillo, que incluye aunque no está limitado a fenilo, bifenilo, trifenilo, naftilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, ciclodienilo, fluoreno, adamantano, etc.

- “N-Heterociclos saturados o insaturados” puede ser cualquier heterociclo que contiene N, que incluye aunque no está limitado a aza- y diaza-cicloalquilos tal como aziridinilo, azetidínilo, diazatidinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo y azocanilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, tetrazinilo, pirrolizínilo, indolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, indazolilo, quinolizínilo, cinolinilo, quinololinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, etc.
- “O-Heterociclos saturados o insaturados” puede ser cualquier heterociclo que contenga O que incluye aunque no está limitado a oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, dioxanilo, furanilo, pirilio, benzofuranilo, benzodioxolilo, etc.
- “S-Heterociclos saturados o insaturados” puede ser cualquier heterociclo que contiene S, que incluye aunque no está limitado a tiranilo, tietanilo, tetrahidrotiofenilo, ditiolanilo, tetrahidrotiopiranilo, tiofenilo, tiepinilo, tianftenilo, etc.
- “Heterociclos mixtos saturados o insaturados” puede ser cualquier heterociclo que contenga dos o más S-, N- u O-heteroátomos, que incluyen aunque no están limitados a oxatolanilo, morfolinilo, tiofanilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, etc.
- Como se usa en la presente memoria, “hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada” se refiere tanto a grupos alquilenos que contienen un carbono sencillo y hasta un límite superior definido, además de grupos alquéniles y grupos alquíniles que contienen dos carbonos hasta el límite superior, tanto estén presentes los carbonos en una cadena sencilla como una cadena ramificada. A menos que se identifique específicamente, un hidrocarburo puede incluir hasta aproximadamente 30 carbonos, o hasta aproximadamente 20 hidrocarburos, o hasta aproximadamente 10 hidrocarburos. Los grupos alquéniles y alquíniles pueden estar monoinsaturados o poliinsaturados. En otra realización, un alquilo incluye carbonos C₁-C₆. En otra realización, un alquilo incluye carbonos C₁-C₈. En otra realización, un alquilo incluye carbonos C₁-C₁₀. En otra realización, un alquilo es uno de C₁-C₁₂ carbonos. En otra realización, un alquilo es uno de C₁-C₅ carbonos.
- Como se usa en la presente memoria, el término “alquilo” puede ser cualquier grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que contiene hasta aproximadamente 30 carbonos a menos que se especifique otra cosa. En otra realización, un alquilo incluye C₁-C₆ carbonos. En otra realización, un alquilo incluye C₁-C₈ carbonos. En otra realización, un alquilo incluye C₁-C₁₀ carbonos. En otra realización, un alquilo es uno de C₁-C₁₂ carbonos. En otra realización, un alquilo es uno de C₁-C₂₀ carbonos. En otra realización, el grupo alquilo cíclico tiene 3-8 carbonos. En otra realización, el alquilo ramificado es un alquilo sustituido por cadenas laterales alquilo de 1 a 5 carbonos.
- Grupos alquilo preferidos son metilo, etilo y propilo.
- Como se usa en la presente memoria, el término “arilo” se refiere a cualquier anillo aromático que está directamente unido a otro grupo. Los grupos arilo ejemplares incluyen, sin limitación, fenilo, tolilo, xililo, furanilo, naftilo, piridinilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, triazinilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiofenilo, pirrolilo, fenilmetilo, feniletilo, fenilamino, fenilamido, etc.
- Como se usa en la presente memoria, el término “aminoalquilo” se refiere a un grupo amino sustituido por un grupo alquilo como se define anteriormente. Aminoalquilo se refiere a monoalquilamino, dialquilamino o trialquilamino. Ejemplos no limitantes de grupos aminoalquilo son -N(Me)₂, -NHMe, -NH₃.
- Un grupo “haloalquilo” se refiere, en otra realización, a un grupo alquilo como se define anteriormente, que está sustituido por uno o más átomos de halógeno, p.ej., por F, Cl, Br o I. Ejemplos no limitantes de grupos haloalquilo son CF₃, CF₂CF₃, CH₂CF₃.
- En una realización, esta invención proporciona un compuesto de esta invención o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, N-óxido o cristal, o combinaciones de los mismos. En otra realización, esta invención proporciona una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de esta invención. En otra realización, esta invención proporciona un producto farmacéutico del compuesto de esta invención. En otra realización, esta invención proporciona un tautómero del compuesto de esta invención. En otra realización, esta invención proporciona un hidrato del compuesto de esta invención. En otra realización, esta invención proporciona un N-óxido del compuesto de esta invención. En otra realización, esta invención proporciona un cristal del compuesto de esta invención. En otra realización, esta invención proporciona una composición que comprende un compuesto de esta invención, como se describe en la presente memoria, o, en otra realización, una combinación de una sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, N-óxido o cristal, del compuesto de esta invención.
- Los compuestos de la presente invención pueden estar también en la forma de un hidrato, que significa que el compuesto incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unido por fuerzas intermoleculares no covalentes.
- Los compuestos de la presente invención pueden existir en forma de uno o más de los tautómeros posibles y dependiendo de las condiciones particulares puede ser posible separar alguno o todos los tautómeros en entidades

individuales o distintas. Se va a entender que todos los posibles tautómeros, que incluyen todos los tautómeros enol y ceto adicionales. Por ejemplo los siguientes tautómeros, aunque no limitados a estos, están incluidos.

Tautomerización del anillo imidazol



La invención incluye "sales farmacéuticamente aceptables" de los compuestos de esta invención, que pueden producirse por reacción de un compuesto de esta invención con un ácido o una base. Ciertos compuestos, particularmente los que poseen grupos ácidos o básicos, pueden también estar en forma de una sal, preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable. El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de las bases libres o ácidos libres, que no son biológicamente o de otra forma indeseables. Las sales se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tal como ácido acético, ácido propionico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxílico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido *p*-toluensulfónico, ácido salicílico, *N*-acetilcisteína y similares. Otras sales se conocen por los expertos en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para el uso de acuerdo con la presente invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de aminas de compuestos de esta invención puede prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. En una realización, ejemplos de sales inorgánicas de aminas son bisulfatos, boratos, bromuros, cloruros, hemisulfatos, hidrobromatos, hidrocloatos, 2-hidroxietilsulfonatos (hidroxietanosulfonatos), yodatos, yoduros, isotonatos, nitratos, persulfatos, fosfato, sulfatos, sulfamatos, sulfanilatos, ácidos sulfónicos (alquilsulfonatos, arilsulfonatos, alquilsulfonatos sustituidos con halógeno, arilsulfonatos sustituidos con halógeno), sulfonatos y tiocianatos.

En una realización, ejemplos de sales orgánicas de aminas pueden seleccionarse de clases alifática, cicloalifática, aromática, aralifática, heterocíclica, carboxilica y sulfónica de ácidos orgánicos, ejemplos de los cuales son acetatos, argininas, aspartatos, ascorbatos, adipatos, antranilatos, algenatos, alcano-carboxilatos, alcano-carboxilatos sustituidos, alginatos, bencenosulfonatos, benzoatos, bisulfatos, butiratos, bicarbonatos, bitartratos, citratos, canforatos, canforsulfonatos, ciclohexilsulfamatos, ciclopentanopropionatos, edetatos de calcio, camsilatos, carbonatos, clavulanatos, cinamatos, dicarboxilatos, digluconatos, dodecilsulfonatos, dihidrocloruros, decanoatos, enantuatatos, etanosulfonatos, edetatos, edisilatos, estolatos, esilatos, fumaratos, formiatos, fluoruros, galacturonatos, gluconatos, glutamatos, glicolatos, glucorato, glucoheptanoatos, glicerofosfatos, gluceptatos, glicolilarsanilatos, glutaratos, glutamatos, heptanoatos, hexanoatos, hidroximaleatos, ácidos hidroxicarboxílicos, hexilresorcinatos, hidroxibenzoatos, hidroxinaftoatos, hidrofluoratos, lactatos, lactobionatos, lauratos, malatos, maleatos, metiltenbis(beta-oxinaftoato), malonatos, mandelatos, mesilatos, metanosulfonatos, metilbromuros, metilnitratos, metilsulfonatos, maleatos de monopotasio, mucatos, monocarboxilatos, naftalenosulfonatos, 2-naftalenosulfonatos, nicotinatos, nitratos, napsilatos, *N*-metilglucaminas, oxalatos, octanoatos, oleatos, pamoatos, fenilacetatos, picratos, fenilbenzoatos, pivalatos, propionatos, ftalatos, fenilacetato, pectinatos, fenilpropionatos, palmitatos, pantotenatos, poligalacturatos, piruvatos, quínatos, salicilatos, succinatos, estearatos, sulfanilato, subacetatos, tartratos, teofilinaacetatos, *p*-toluensulfonatos (tosilatos), trifluoroacetatos, tereftalatos tannatos, teoclates, trihaloacetatos, trietoduro, tricarboxilatos, undecanoatos y valeratos.

En una realización, los ejemplos de sales inorgánicas de ácidos carboxílicos o hidroxilos pueden seleccionarse de amonio, metales alcalinos que incluyen litio, sodio, potasio, cesio; metales alcalinotérreos que incluyen calcio, magnesio, aluminio; zinc, bario, colinas, amonios cuaternarios.

En otra realización, se pueden seleccionar ejemplos de sales orgánicas de ácidos carboxílicos o hidroxilo de arginina, aminas orgánicas que incluyen aminas orgánicas alifáticas, aminas orgánicas alicíclicas, aminas orgánicas aromáticas, benzatinas, *t*-butilaminas, benetaminas (*N*-bencilfenetilamina), dicitclohexilaminas, dimetilaminas, dietanolaminas, etaolaminas, etilendiaminas, hidrabaminas, imidazoles, lisinas, metilaminas, meglaminas, *N*-metil-*D*-glucaminas, *N,N'*-dibenciletilendiaminas, nicotinamidas, aminas orgánicas, ornitinas, piridinas, picolinas, piperazinas, procaina, tris(hidroximetil)metilaminas, trietilaminas, trietanolaminas, trimetilaminas, trometaminas y ureas.

En una realización, las sales pueden formarse por medios convencionales, tal como haciendo reaccionar la forma de base libre o ácido libre del producto con uno o más equivalentes del ácido o base apropiado en un disolvente o medio en que la sal es insoluble o en un disolvente tal como agua, que se elimina al vacío o secando por congelación o intercambiando los iones de una sal existente por otro ión o resina de intercambio iónico adecuada.

También se describe en la presente memoria un proceso para la preparación de los compuestos de esta invención. En una realización, se prepara el aril-imidazol haciendo reaccionar un benzaldehído sustituido de forma apropiada con etilendiamina para construir el anillo imidazolina, seguido por oxidación de la imidazolina mediante un agente oxidante al imidazol correspondiente. En otra realización el agente oxidante es diacetoxiyodobenceno,

bromotriclorometano y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), sistema de carbono-O₂ o sistema de paladio-carbono. En otra realización, el aril-imidazol se prepara haciendo reaccionar un benzaldehído sustituido de forma apropiada con etilendiamina en presencia de yodo y carbonato de potasio para construir el anillo de imidazolina, seguido por oxidación del anillo de imidazolina catalizado por diacetoxiyodobenceno, bromotriclorometano y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), sistema de carbono-O₂ o sistema de paladio-carbono al imidazol correspondiente. En otra realización, el aril-imidazol se prepara haciendo reaccionar un benzaldehído sustituido de forma apropiada con etilendiamina en presencia de yodo y carbonato de potasio para construir el anillo imidazolina, seguido por oxidación del anillo de imidazolina catalizada por bromotriclorometano y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) al imidazol correspondiente. En una realización, el aril-imidazol se prepara haciendo reaccionar el benzaldehído apropiado en etanol con oxalaldehído e hidróxido de amonio para construir el sistema anular de imidazol.

Como se describe en la presente memoria puede prepararse un compuesto de aril-benzoil-imidazol protegiendo el aril-imidazol seguido por acoplamiento con un cloruro de benzoilo sustituido de forma apropiada, seguido por la eliminación del grupo protector. En otra realización, el grupo protector es un grupo fenilsulfonilo, ftalimida, dicarbonato de di-*terc*-butilo (Boc), fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), benciloxycarbonil (Cbz) o monometoxitritilo (MMT). En otra realización, el aril-imidazol está protegido con fenilsulfonilo para dar aril-imidazol protegido por *N*-sulfonilo. En otra realización, el compuesto de aril-imidazol protegido se prepara haciendo reaccionar el aril-imidazol con cloruro de fenilsulfonilo e hidruro sódico en THF. En otra realización, el aril-imidazol protegido se prepara según las Figuras 7 y 8.

Como se describe en la presente memoria, el aril-imidazol protegido puede acoplarse con un cloruro de benzoilo sustituido de forma apropiada para obtener un aril-benzoilimidazol protegido. En otra realización, el aril-imidazol está acoplado con un cloruro de benzoilo sustituido de forma apropiada en presencia de *terc*-butil-litio para obtener aril-fenilsulfonilo (2-aril-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)metanona. En otra realización, el (2-aril-1-fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)metanona se prepara según las Figuras 7 y 8 etapas e y c, respectivamente.

Como se describe en la presente memoria, puede prepararse un aril-benzoil-imidazol eliminando el grupo protector del aril-benzoil-imidazol. En otra realización, la eliminación del grupo protector depende del grupo protector usado y puede eliminarse en condiciones conocidas que se conocen en la técnica. En otra realización, el grupo protector fenilsulfonilo se elimina por fluoruro de tetrabutilamonio en THF. En otra realización, el fenilsulfonilo se elimina según las Figuras 7 y 8.

En una realización, los compuestos de referencia se preparan según las Figuras 1, 2 y 5.

En otra realización, los compuestos de fórmula XI se preparan según la Figura 6.

En otra realización, los compuestos de referencia se preparan según la Figura 12. En otra realización, los compuestos de referencia se preparan según la Figura 13. En otra realización, los compuestos de referencia se preparan según la Figura 14. En otra realización, los compuestos de fórmula XI y XIc se preparan según la Figura 15.

Composición farmacéutica

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto según los aspectos de la presente invención. La composición farmacéutica puede contener uno o más de los compuestos identificados anteriormente de la presente invención. Típicamente, la composición farmacéutica de la presente invención incluirá un compuesto de la presente invención o su sal farmacéuticamente aceptable, además de un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier adyuvante, vehículo, excipiente o estabilizador adecuado, y puede estar en forma sólida o líquida tal como comprimidos, cápsulas, polvos, disoluciones, suspensiones o emulsiones.

Típicamente, la composición contendrá de aproximadamente 0,01 a 99 por ciento, preferiblemente de aproximadamente 20 a 75 por ciento de compuesto(s) activo(s), junto con los adyuvantes, vehículos y/o excipientes. Aunque las necesidades individuales pueden variar, la determinación de intervalos óptimos de cantidades efectivas de cada componente está dentro de las capacidades de la técnica. Las dosificaciones típicas comprenden aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones preferidas comprenden aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones más preferidas comprenden aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. El régimen de tratamiento para la administración de los compuestos de la presente invención puede además determinarse fácilmente por los expertos en la técnica. Es decir, la frecuencia de administración y tamaño de la dosis puede establecerse por optimización rutinaria, preferiblemente mientras se minimiza cualquier efecto secundario.

Las formas de dosificación unitaria sólida pueden ser del tipo convencional. La forma sólida puede ser una cápsula y similares, tal como un tipo de gelatina ordinaria que contiene los compuestos de la presente invención y un vehículo, por ejemplo, lubricantes y cargas inertes tal como, lactosa, sacarosa o almidón de maíz. En otra realización, estos compuestos se tabulan con bases de comprimido convencionales, tal como lactosa, sacarosa o almidón de maíz en combinación con ligantes tipo acacia, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes, tal como almidón de maíz, almidón de patata o ácido alginico, y un lubricante, tipo ácido estearico o estearato de magnesio.

Los comprimidos, cápsulas y similares pueden contener también un ligante tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata ácido alginico; un lubricante tal como estearato de magnesio, y un agente edulcorante tal como una sacarosa, lactosa, o sacarina. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un ácido graso.

Varios materiales distintos pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con shellac, azúcar u ambos. Un jarabe puede contener, además del ingrediente activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un tinte, un aromatizante tal como aroma de cereza o naranja.

Para la administración terapéutica oral, estos compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y similares. Dichas composiciones y preparados deberían contener al menos 0,1% de compuesto activo. El porcentaje del compuesto en estas composiciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2% a aproximadamente 60% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones útiles terapéuticamente es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones preferidas según la presente invención se preparan de manera que una unidad de dosificación oral contiene entre aproximadamente 1 mg y 800 mg de compuesto activo.

Los compuestos activos de la presente invención pueden administrarse de forma oral, por ejemplo, con un diluyente inerte, o con un vehículo comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con la comida de la dieta.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma sería estéril y sería fluido hasta el punto en que exista jeringabilidad fácil. Sería estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y se conservaría frente a la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p.ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

Los compuestos o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden también administrarse en dosificaciones inyectables por disolución o suspensión de estos materiales en un diluyente fisiológicamente aceptable con un adyuvante, vehículo o excipiente farmacéutico. Dichos adyuvantes, vehículos y/o excipientes incluyen, aunque no están limitados a, líquidos estériles, así como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros componentes farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables. Los aceites ilustrativos son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y disolución de azúcar relacionada, y glicoles, tal como propilenglicol o polietilenglicol, son vehículos líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables.

Estos compuestos activos pueden también administrarse de forma parenteral. Las disoluciones o suspensiones de estos compuestos activos pueden prepararse en agua mezclados de forma adecuada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden además prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. Los aceites ilustrativos son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y disolución de azúcar relacionada, y glicoles tal como, propilenglicol o polietilenglicol, son vehículos líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Para usar como aerosoles, los compuestos de la presente invención en disolución o suspensión pueden empaquetarse en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes hidrocarbonados tipo propano, butano o isobutano con adyuvantes convencionales. Los materiales de la presente invención puede también administrarse en una forma no presurizada tal como en un nebulizador o atomizador.

En una realización, los compuestos de esta invención se administran en combinación con un agente anti-cancerígeno. En una realización, el agente anti-cancerígeno es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se usan para el diagnóstico, monitorización, o tratamiento del cáncer. En una realización, los anticuerpos monoclonales reaccionan frente a antígenos específicos en las células cancerígenas. En una realización, el anticuerpo monoclonal actúa como un antagonista del receptor de la célula cancerígena. En una realización, los anticuerpos monoclonales mejoran la respuesta inmune del paciente. En una realización, los

anticuerpos monoclonales actúan frente a los factores de crecimiento celular, bloqueando así el crecimiento de la célula cancerígena. En una realización, los anticuerpos monoclonales anti-cancerígenos están conjugados o unidos a fármacos anti-cancerígenos, radioisótopos, otros modificadores de respuesta biológica, otras toxinas, o una combinación de los mismos. En una realización, los anticuerpos monoclonales anti-cancerígenos se conjugan o se unen a un compuesto de esta invención como se describe anteriormente.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento del cáncer en un sujeto que necesita el tratamiento para el cáncer.

Cuando se administran los compuestos de la presente invención, pueden administrarse sistémicamente o, de forma alternativa, pueden administrarse directamente a un sitio específico donde las células cancerígenas o células precancerígenas están presentes. Por consiguiente, la administración puede conseguirse de cualquier manera efectiva para la distribución de los compuestos o las composiciones farmacéuticas a las células cancerígenas o células precancerígenas. Los modos ejemplares de administración incluyen, sin limitación, administrar los compuestos o composiciones de forma oral, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por instilación intranasal, por instilación intracavidad o intravesicular, intraocular, intraarterial, intralesional o por aplicación a membranas mucosas, tal como, las de la nariz, garganta, y tubos bronquiales.

Actividad biológica

En una realización, la invención proporciona compuestos y composiciones, que incluyen cualquier realización descrita en la presente memoria, para usar en cualquiera de los usos médicos de esta invención. En una realización, el uso de un compuesto de esta invención o una composición que comprende al mismo, tendrá utilidad en la inhibición, supresión, mejora o estimulación de una respuesta deseada en un sujeto, como se entenderá por un experto en la técnica. En otra realización, las composiciones pueden comprender además ingredientes activos adicionales, cuya actividad es útil para la aplicación particular para la que el compuesto de esta invención se está administrando.

En una realización, esta invención se dirige a un compuesto de esta invención para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo de desarrollo o inhibición del cáncer en un sujeto que sufre de cáncer.

La resistencia al fármaco es la causa principal del fallo de la quimioterapia para el cáncer. Un colaborador principal a la resistencia multifármaco es la sobreexpresión de P-glucoproteína (P-gp). Esta proteína es una proteína transportadora clínicamente importante que pertenece a la familia de casete de unión a ATP de transportadores de la membrana celular. Puede bombear sustratos que incluyen fármacos anticancerígenos fuera de las células tumorales a través de un mecanismo dependiente de ATP.

En una realización, esta invención proporciona compuestos de la invención y/o una sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato o *N*-óxido de dicho compuesto, o cualquier combinación de los mismos para usar en: a) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición de tumores resistentes a los fármacos; b) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición del cáncer metastático; c) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición del cáncer resistente al fármaco; d) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición de un cáncer resistente al fármaco en el que el cáncer es melanoma; e) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición de un cáncer resistente al fármaco en el que el cáncer es cáncer de próstata; f) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición de melanoma metastático; g) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición de cáncer de próstata; h) tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición del cáncer en un sujeto, en el que el sujeto ha sido tratado anteriormente con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica.

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición del cáncer, cáncer metastático, tumores resistentes al fármaco, cáncer resistente al fármaco y diversas formas de cáncer. En una realización preferida el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de piel (p.ej., melanoma), cáncer de pulmón, cáncer de colon, leucemia, linfoma, cabeza y cuello, pancreático, esofágico, cáncer renal o cáncer del SNC (p.ej., glioma, glioblastoma). El tratamiento de estos diferentes cánceres está soportado por los Ejemplos en la presente memoria. Además, en base a su modo de acción considerado como inhibidores de tubulina, se cree que otras formas de cáncer serán asimismo tratables o prevenibles tras la administración de los compuestos o composiciones de la presente invención a un paciente. Los compuestos preferidos de la presente invención son selectivamente disruptivos para las células cancerígenas, provocando la ablación de células cancerígenas pero no preferiblemente células normales. Significativamente, el daño a células normales se minimiza porque las células cancerígenas son susceptibles de alteración a concentraciones mucho menores de los compuestos de la presente invención.

En algunas realizaciones, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente invención, o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, cristal, *N*-óxido, hidrato o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición del cáncer en un sujeto. En otra realización, el cáncer es carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, tumor cerebral, tumor del bulbo raquídeo, cáncer de mama, glioma, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, ependimoma, meduloblastoma, neuroectodérmico primitivo supratentorial, tumores pineales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, tumor carcinoide, carcinoma, cáncer del cuello del útero, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central (SNC), cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer del conducto biliar extrahepático, familia de tumores de Ewing (Pnet), tumor de célula germinal extracraneal, cáncer de ojo, melanoma intraocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor de célula germinal, tumor trofoblástico gestacional, extragonadal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hipofaríngeo, carcinoma de células de islote, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, cáncer de cavidad oral, cáncer hepático, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma de células pequeñas, linfoma relacionado con SIDA, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma de células T cutáneo, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma escamoso metastático, mieloma múltiple, neoplasmas de células plasmáticas, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer epitelial del ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático exocrino, carcinoma de células de islote, cáncer del seno paranasal y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de feocromocitoma, cáncer de pituitaria, neoplasma de célula plasmática, cáncer de próstata, rhabdomyosarcoma, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de glándulas salivares, síndrome de Sezary, cáncer de piel, linfoma de células T cutáneo, cáncer de piel, sarcoma de Kaposi, cáncer de piel, melanoma, cáncer del intestino delgado, sarcoma del tejido blando, sarcoma del tejido blando, cáncer de testículo, timoma maligno, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma, cáncer inusual de la infancia, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, tumor de Wilms, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización el sujeto ha sido tratado previamente con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica.

En algunas realizaciones, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, cristal, *N*-óxido, hidrato o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de gravedad, reducción del riesgo o inhibición de un cáncer metastático en un sujeto. En otra realización, el cáncer es carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, tumor cerebral, tumor del bulbo raquídeo, cáncer de mama, glioma, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, ependimoma, meduloblastoma, neuroectodérmico primitivo supratentorial, tumores pineales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, tumor carcinoide, carcinoma, cáncer del cuello de útero, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central (SNC), cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer del conducto biliar extrahepático, familia de tumores de Ewing (Pnet), tumor de célula germinal extracraneal, cáncer de ojo, melanoma intraocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, extragonadal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hipofaríngeo, carcinoma de célula del islote, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, cáncer de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma de células pequeñas, linfoma relacionado con SIDA, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma de células T cutáneo, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma escamoso metastático, mieloma múltiple, neoplasmas de células plasmáticas, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer del epitelio del ovario, tumor de la célula germinal del ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático exocrino, carcinoma de células del islote, cáncer del seno paranasal y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de feocromocitoma, cáncer de pituitaria, neoplasma de las células plasmáticas, cáncer de próstata, rhabdomyosarcoma, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de las glándulas salivares, síndrome de Sezary, cáncer de piel, linfoma de células T cutáneo, cáncer de piel, sarcoma de Kaposi, cáncer de piel, melanoma, cáncer del intestino delgado, sarcoma del tejido blando, sarcoma del tejido blando, cáncer de testículo, timoma maligno, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma, cáncer inusual de la infancia, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, tumor de Wilms o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, cristal, *N*-óxido, hidrato o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición de un cáncer resistente al fármaco o cáncer resistente en un sujeto. En otra realización, el cáncer es carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, tumor cerebral, tumor del bulbo raquídeo, cáncer de mama, glioma, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, ependimoma, meduloblastoma, neuroectodérmica primitiva supratentorial, tumores pineales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, tumor carcinoide, carcinoma, cáncer del cuello de útero, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central (SNC), cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer del conducto biliar extrahepático, familia de tumores de Ewing (Pnet), tumor de células germinales extracraneales, cáncer de ojo, melanoma intraocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, extragonadal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hipofaríngeo, carcinoma de células del islote, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, cáncer de la cavidad oral,

cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma de células pequeñas, linfoma relacionado con SIDA, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma de células T cutáneas, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma escamosa metastática, mieloma múltiple, neoplasmas de células plasmáticas, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer del epitelio del ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático exocrino, carcinoma de células del islote, cáncer del seno paranasal y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de feocromocitoma, cáncer de pituitaria, neoplasma de células plasmáticas, cáncer de próstata, rabdomiosarcoma, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de glándulas salivares, síndrome de Sezary, cáncer de piel, linfoma de células T cutáneo, cáncer de piel, sarcoma de Kaposi, cáncer de piel, melanoma, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, sarcoma de tejido blando, cáncer de testículo, timoma, cáncer tiroideo maligno, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma, cáncer inusual de la infancia, cáncer de vagina, cáncer de la vulva, tumor de Wilms o cualquier combinación de los mismos.

En una realización “cáncer metastático se refiere a un cáncer que se extiende (metastatizado) desde su sitio original a otro área del cuerpo. Virtualmente todos los cánceres tienen el potencial de extenderse. Si el desarrollo de la metástasis depende de la interacción compleja de muchos factores de células tumorales, que incluyen el tipo de cáncer, el grado de madurez (diferenciación) de las células tumorales, la situación y cuanto tiempo ha estado presente el cáncer, además de otros factores entendidos de forma incompleta. Las metástasis se extienden de tres formas – por extensión local desde el tumor a los tejidos circundantes, a través de la corriente sanguínea a sitios distantes o a través del sistema linfático a nódulos linfáticos vecinos o distantes. Cada clase de cáncer puede tener una ruta típica de difusión. Al tumor se le nombra por el sitio primario (ej., el cáncer de mama que se ha extendido al cerebro se llama cáncer de mama metastático al cerebro).

En una realización “cáncer resistente al fármaco” se refiere a células cancerígenas que adquieren resistencia a la quimioterapia. Las células cancerígenas pueden adquirir resistencia a la quimioterapia mediante una gama de mecanismos, que incluyen la mutación o sobreexpresión de la diana del fármaco, inactivación del fármaco, o eliminación del fármaco de la célula. Los tumores que se repiten después de una respuesta inicial a la quimioterapia pueden ser resistentes a múltiples fármacos (que son resistentes a multifármacos). En una vista convencional de la resistencia al fármaco, una o varias células en la población tumoral adquieren cambios genéticos que dan resistencia al fármaco. Por consiguiente, las razones para la resistencia al fármaco, entre otros, son: a) algunas de las células que no se matan por quimioterapia mutan (cambian) y se vuelven resistentes al fármaco. Una vez que se multiplican, puede haber más células resistentes que células que son sensibles a la quimioterapia; b) amplificación génica. Una célula cancerígena puede producir cientos de copias de un gen particular. Este gen desencadena una sobreproducción de proteína que deja al fármaco anticancerígeno ineficaz; c) las células cancerígenas pueden bombear el fármaco fuera de las células tan rápido como entran usando una molécula denominada p-glucoproteína; d) las células cancerígenas pueden dejar de meter los fármacos porque la proteína que transporta el fármaco a través de la pared celular para de funcionar; e) las células cancerígenas pueden aprender como reparar las roturas de ADN provocadas por algunos fármacos anticancerígenos; f) las células cancerígenas pueden desarrollar un mecanismo que inactiva el fármaco. Un colaborador principal a la resistencia multifármaco es la sobreexpresión de P-glucoproteína (P-gp). Esta proteína es una proteína transportadora clínicamente importante que pertenece a la familia de casete de unión a ATP de transportadores de la membrana celular. Puede bombear sustratos que incluyen fármacos anticancerígenos fuera de las células tumorales a través de un mecanismo dependiente de ATP. Por consiguiente, la resistencia a los agentes anticancerígenos usados en quimioterapia es la causa principal de fallo de tratamiento en los trastornos malignos, provocando que los tumores se vuelvan resistentes. La resistencia a los fármacos es la causa principal de fallo de la quimioterapia para el cáncer.

En una realización “cáncer resistente” se refiere a cáncer resistente a fármacos como se describe antes en la presente memoria. En otra realización “cáncer resistente” se refiere a células cancerígenas que adquieren resistencia a cualquier tratamiento tal como quimioterapia, radioterapia o terapia biológica.

En una realización, esta descripción está dirigida al tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición del cáncer en un sujeto, en el que el sujeto se ha tratado previamente con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica.

En una realización “quimioterapia” se refiere al tratamiento químico para el cáncer tal como fármacos que matan células cancerígenas directamente. Dichos fármacos se denominan fármacos “anti-cancerígenos” o “antineoplásicos”. La terapia actual usa más de 100 fármacos para tratar el cáncer. Para curar un cáncer específico. La quimioterapia se usa para controlar el crecimiento tumoral cuando la cura no es posible; reducir los tumores antes de la cirugía o terapia de radiación; aliviar los síntomas (tal como dolor); y destruir células cancerígenas microscópicas que pueden estar presentes después de que se elimina el tumor conocido por cirugía (denominada terapia adyuvante). La terapia adyuvante se da para prevenir una posible reaparición del cáncer.

En una realización, “radioterapia” se refiere a rayos X de alta energía y rayos similares (tal como electrones) para tratar la enfermedad. Mucha gente con cáncer tendrá radioterapia como parte de su tratamiento. Este puede darse o bien como radioterapia externa desde el exterior del cuerpo usando rayos X o desde dentro del cuerpo como

radioterapia interna. La radioterapia funciona destruyendo las células cancerígenas en el área tratada. Aunque las células normales pueden dañarse también por la radioterapia, pueden normalmente repararse a sí mismas. El tratamiento de radioterapia puede curar algunos cánceres y puede también reducir la posibilidad de que un cáncer vuelva después de la cirugía. Puede usarse para reducir los síntomas del cáncer.

- 5 En una realización "terapia biológica" se refiere a sustancias que se dan de forma natural en el cuerpo para destruir células cancerígenas. Hay varios tipos de tratamiento que incluye: anticuerpos monoclonales, inhibidores del crecimiento del cáncer, vacunas y terapia génica. La terapia biológica se conoce también como inmunoterapia.

10 En una realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido o cualquier combinación de los mismos, o una composición que comprende lo mismo, para usar en el tratamiento de un sujeto que sufre de cáncer de próstata, cáncer de próstata metastático, cáncer de mama resistente o cáncer de próstata resistente a fármacos. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.

15 En una realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido o cualquier combinación de los mismos, o una composición que comprende lo mismo, para usar en la supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de próstata, cáncer de próstata metastático, cáncer de próstata resistente o cáncer de próstata resistente al fármaco en un sujeto. En otra realización, el compuesto es compuesto 55.

20 En una realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido o cualquier combinación de los mismos, o una composición que comprende lo mismo, para usar en el tratamiento de un sujeto que sufre de cáncer de mama, cáncer de mama metastático, cáncer de mama resistente o cáncer de mama resistente al fármaco. En otra realización, el sujeto es un hombre o una mujer. En otra realización, el compuesto es compuesto 55.

25 En una realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido o cualquier combinación de los mismos, o una composición que comprende lo mismo, para usar en la supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión, o inhibición del cáncer de mama, cáncer de mama metastático, cáncer de mama resistente o cáncer de mama resistente al fármaco en un sujeto. En otra realización, el compuesto es compuesto 55.

30 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de ovario, cáncer de ovario metastático, cáncer de ovario resistente o cáncer de ovario resistente al fármaco en un sujeto. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.

35 En una realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención o su sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido o cualquier combinación de los mismos, o una composición que comprende al mismo, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición de melanoma, melanoma metastático, melanoma resistente o melanoma resistente al fármaco en un sujeto. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.

40 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de pulmón, cáncer de pulmón metastático, cáncer de pulmón resistente o cáncer de pulmón resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.

45 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación del mismo, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas metastático, cáncer de pulmón de células pequeñas resistente o cáncer de pulmón de células pequeñas resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.

50 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de colon, cáncer de colon metastático, cáncer de colon resistente o cáncer de colon resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.

55 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier

combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de leucemia, leucemia metastática, leucemia resistente o leucemia resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.

- 5 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de linfoma, linfoma metastático, linfoma o linfoma resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.
- 10 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cabeza y cuello metastático, cáncer de cabeza y cuello resistente o cáncer de cabeza y cuello resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.
- 15 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de páncreas, cáncer de páncreas metastático, cáncer de páncreas resistente o cáncer de páncreas resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.
- 20 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de esófago, cáncer de esófago metastático, cáncer de esófago resistente o cáncer de esófago resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.
- 25 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal, , o cualquier combinación de los mismos, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, retraso de la progresión o inhibición de cáncer renal, cáncer renal metastático, cáncer renal resistente o cáncer renal resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.
- 30 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, *N*-óxido, cristal, , o cualquier combinación del mismo, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo farmacéuticamente aceptable, retraso de la progresión o inhibición de cáncer de SNC, cáncer de SNC metastático, cáncer de SNC resistente o cáncer de SNC resistente al fármaco. En otra realización, el compuesto es el compuesto 55.
- 35 En algunas realizaciones, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se describe en la presente memoria, o sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, tautómero, cristal, *N*-óxido, hidrato o cualquier combinación del mismo, para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición de tumor o tumores cancerígeno(s) resistente(s) al fármaco en un sujeto. En otra realización, el cáncer es carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, tumor cerebral, tumor del bulbo raquídeo, cáncer de mama,
- 40 glioma, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, ependimoma, meduloblastoma, neuroectodérmico primitivo supratentorial, tumores pineales, glioma hipotalámico, cáncer de mama, tumor carcinoide, carcinoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central (SNC), cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer del conducto biliar extrahepático, familia de tumores de Ewing (Pnet), tumor de células germinales extracraneales, cáncer de ojo, melanoma intraocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor de células
- 45 germinales, tumor trofoblástico gestacional, extragonadal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hipofaríngeo, carcinoma de células de islote, cáncer de laringe, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, cáncer de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma de células pequeñas, linfoma relacionado con SIDA, linfoma del sistema nervioso central (primaria), linfoma de célula T cutánea, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de
- 50 Merkel, carcinoma escamosa metastática, mieloma múltiple, neoplasmas de células plasmáticas, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de epitelio de ovario, tumor de célula germinal de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer de páncreas, cáncer pancreático exocrino, carcinoma de las células del islote, cáncer del seno paranasal y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de feocromocitoma, cáncer
- 55 de pituitaria, neoplasma de células plasmáticas, cáncer de próstata, rabdomiosarcoma, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de glándulas salivares, síndrome de Sezary, cáncer de piel, linfoma de células T cutáneo, cáncer de piel, sarcoma de Kaposi, cáncer de piel, melanoma, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, sarcoma de tejido blando, cáncer de testículos, timoma maligna, cáncer de tiroides maligno, cáncer de uretra, cáncer uterino, sarcoma, cancer inusual de infancia, cáncer vaginal, cáncer de vulva, tumor de Wilms o
- 60 cualquier combinación de los mismos. En otra realización el compuesto es compuesto 55.

En otra realización, el tumor es tumor de cáncer de próstata. En otra realización, el tumor es tumor de cáncer de ovario. En otra realización, el tumor es un tumor de melanoma. En otra realización, el tumor es un tumor melanoma resistente a multifármaco (MDR).

5 En una realización, esta invención está dirigida a un método de destrucción de una célula cancerígena *ex vivo* que comprende: proporcionar un compuesto de esta invención y poner en contacto la célula cancerígena con el compuesto bajo condiciones efectivas para destruir la célula cancerígena contactada. Según varias realizaciones de destrucción de las células cancerígenas, las células a destruir están situadas *ex vivo* (es decir, en cultivo). En otra realización, el compuesto es compuesto 55.

10 En otra realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de piel, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, leucemia, cáncer renal, cáncer de SNC y combinaciones de los mismos.

Un aspecto aún adicional de la presente invención se refiere a un compuesto de la invención para usar en el tratamiento o prevención de una condición cancerígena administrando una cantidad efectiva del compuesto a un paciente de una manera efectiva para tratar o prevenir una condición cancerígena.

15 Según una realización, el paciente a tratar se caracteriza por la presencia de una condición precancerígena, y la administración del compuesto es efectiva para prevenir el desarrollo de la condición precancerígena en la condición cancerígena. Esto puede darse destruyendo la célula precancerígena ante de o de forma simultánea con su desarrollo adicional en un estado cancerígeno.

20 Según otra realización, el paciente a tratar se caracteriza por la presencia de una condición cancerígena, y la administración del compuesto es efectiva o para provocar la regresión de la condición cancerígena o para inhibir el crecimiento de la condición cancerígena, es decir, parando su crecimiento completamente o reduciendo su velocidad de crecimiento. Esto preferiblemente se da destruyendo las células cancerígenas, a pesar de su posición en el cuerpo del paciente. Es decir, si las células cancerígenas se sitúan en un sitio de tumor primario o si las células cancerígenas han metastatizado y creado tumores secundarios en el cuerpo del paciente.

25 Como se usa en la presente memoria, sujeto o paciente se refiere a cualquier paciente mamífero, que incluye sin limitación, humanos y otros primates, perros, gatos, caballos, vacas, ovejas, cerdos, ratas, ratones y otros roedores. En una realización, el sujeto es macho. En otra realización, el sujeto es hembra. En algunas realizaciones, los compuestos como se describen en la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento o bien machos o hembras.

30 Cuando se administran los compuestos de la presente invención, pueden administrarse sistémicamente o, de forma alternativa, pueden administrarse directamente a un sitio específico donde las células cancerígenas o células precancerígenas están presentes. Por consiguiente, la administración pueden conseguirse de cualquier manera efectiva para la distribución de los compuestos o las composiciones farmacéuticas a las células cancerígenas o células precancerígenas. Modos ejemplares de administración incluyen, sin limitación, administrar los compuestos o composiciones de forma oral, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por instilación intranasal, por instilación intracavitaria o intravesicular, intraocular, intraarterial, intralesional, o mediante aplicación a membranas mucosas, tal como, las de nariz, garganta y tubos bronquiales.

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento o prevención de varias formas de cáncer, particularmente cáncer de próstata, cáncer de mama, ovario, cáncer de piel (p.ej., melanoma), cáncer de pulmón, 40 cáncer de colon, leucemia, cáncer renal, y cáncer de SNC (p.ej., glioma, glioblastoma). Tratamiento de estos diferentes cánceres está soportado por los ejemplos en la presente memoria. Además, en base a su modo pensado de acción como inhibidores de tubulina, se cree que otras formas de cáncer serán tratables asimismo o previsibles tras la administración de los compuestos o composiciones de la presente invención a un paciente. Los compuestos preferidos de la presente invención son selectivamente disruptivos para las células cancerígenas, provocando la ablación de las células cancerígenas aunque preferiblemente no de las células normales. De forma significativa, el 45 daño a las células normales se minimiza porque las células cancerígenas son susceptibles de alteración a concentraciones mucho menores de los compuestos de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento, reducción de la gravedad, reducción del riesgo, o inhibición de cáncer, cáncer metastático, cáncer resistente o cáncer resistente a fármacos. En otra 50 realización, el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, ovario, cáncer de piel (p.ej., melanoma), cáncer de pulmón, cáncer de colon, leucemia, linfoma, cabeza y cuello, pancreático, esofágico, cáncer renal o cáncer del SNC. El tratamiento de estos diferentes cánceres está soportado por los Ejemplos en la presente memoria. Además, en base a su modo creído de acción como inhibidores de tubulina, se cree que otras formas de cáncer serán asimismo tratables o previsibles tras la administración de los compuestos o composiciones de la presente invención a un 55 paciente. Los compuestos preferidos de la presente invención son selectivamente disruptivos para las células cancerígenas, provocando la ablación de células cancerígenas aunque preferiblemente no de células normales. De forma significativa, se minimiza el daño a células normales porque las células cancerígenas son susceptibles de

interrupción a concentraciones mucho menores de los compuestos de la presente invención. En otra realización, el compuesto es compuesto 55.

En una realización, el compuesto se administra en combinación con otro agente anti-cancerígeno.

5 Cuando los compuestos o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran para tratar, suprimir, reducir la gravedad, reducir el riesgo o inhibir una condición cancerígena, la composición farmacéutica puede contener también, o puede administrarse en conjunto con, otros agentes terapéuticos o régimen de tratamiento actualmente conocido o desarrollado en adelante para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Ejemplos de otros agentes terapéuticos o régimen de tratamiento incluyen, sin limitación, terapia de radiación, inmunoterapia, quimioterapia, intervención quirúrgica y combinaciones de los mismos.

10 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención. En el grado de que los siguientes ejemplos no se relacionan con un compuesto de fórmula XI como se reivindica, son ejemplos comparativos.

Ejemplos

15 Los ejemplos presentados a continuación son por propósitos ilustrativos y no pretenden limitar, de ninguna forma, el alcance de la presente invención.

Materiales y métodos:

General. Todos los reactivos se compraron de Sigma-Aldrich Chemical Co., Fisher Scientific (Pittsburgh, PA), AK Scientific (Mountain View, CA), Oakwood Products (West Columbia, SC), etc. y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones sensibles a la humedad se realizaron en una atmósfera de argón. ABT-751 se preparó según los métodos presentados por Yoshino et al.²⁶ Se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) rutinaria en Unipatlos con dorso de aluminio (Analtech, Newark, DE). Se midieron puntos de fusión con el aparato de punto de fusión Fisher-Johns (no corregido). Los espectros RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker AX 300 (Billerica, MA) o espectrómetro Varian Inova-500 (Vernon Hills, Illinois). Los desplazamiento químico se presentan como partes por millón (ppm) respecto a TMS en CDCl₃. El dato espectral de masas se recogió en un instrumento de electropulverización/trampa de iones Bruker ESQUIRE en modos iónicos positivo y negativo. Los análisis elementales se realizaron por Atlantic Microlab Inc.

30 Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad de cáncer de próstata y melanoma. Todas las líneas celulares se obtuvieron de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.), mientras que los suministros de cultivo celular se compraron de Cellgro Mediatech (Herndon, VA, EE.UU.). Se examinó la actividad antiproliferativa de nuestros compuestos anti-tubulina en cuatro líneas celulares del cáncer de próstata humana (LNCaP, DU 145, PC-3, y PPC-1) y dos líneas celulares de melanoma humano (A375 y WM-164). La línea celular de ovario humano OVCAR-8 y su línea celular resistente que sobre-expresa P-gp (NCI/ADR-RES) se usaron como modelos MDR. Ambas líneas celulares de ovario se obtuvieron de los Institutos Nacionales del Cáncer (NCI). Todas las líneas celulares de cáncer de próstata y cáncer de ovario se cultivaron en RPMI 1640, suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%. Las células de melanoma se cultivaron en DMEM, suplementadas con FBS al 5%, mezcla de antibiótico/antimicótico al 1% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EE.UU.) e insulina bovina (5 µg/mL; Sigma-Aldrich). El potencial citotóxico de los compuestos de anti-tubulina se evaluó usando el ensayo de sulforodamina B (SRB) después de 96 h de tratamiento.

40 Solubilidad acuosa. La solubilidad de fármacos se determinó por Placa de filtro de solubilidad Multiscreen (Millipore Corporate, Billerica, MA) acoplado con LC-MS/MS. Brevemente, se cargaron 198 µL de tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4) en una placa de 96 pocillos, y se dispensaron 2 µL de compuestos de prueba 10 mM (en DMSO) y se mezclaron con agitación suave (200-300 rpm) durante 1,5 h a TA (N = 3). La placa se centrifugó a 800g durante 5 min, y el filtrado se usó para determinar su concentración y solubilidad del compuesto de prueba por LC-MS/MS como se describe a continuación.

45 Estudio farmacocinético. Se compraron ratas de Sprague-Dawley hembras (n = 3 o 4; 254 ± 4 g) de Harlan Inc. (Indianápolis, IN). Se compraron catéteres de vena yugular torácica de rata de Braintree Scientific Inc. (Braintree, MA). A la llegada a las instalaciones para animales, los animales se aclimataron durante 3 días en una habitación controlada por temperatura (20-22°C) con un ciclo luz/oscuridad de 12 h antes de cualquier tratamiento. El compuesto 1h se administró de forma intravenosa (i.v.) en los catéteres de la vena yugular a una dosis de 2,5 mg/kg (en DMSO/PEG300, 2/8), mientras que 5Ha y 5Hc se dosificaron a 5 mg/kg (en DMSO/PEG300, 1/9). Un volumen igual de solución salina heparinizada se inyectó para sustituir la sangre eliminada, y las muestras de sangre (250 µL) se recogieron por medio de los catéteres de la vena yugular a 10, 20, 30 min y 1, 2, 4, 8, 12, 24 h. Los compuestos 1h, 5Ha y 5Hc se dieron (p.o.) por alimentación forzada oral a 10 mg/kg (en Tween80/DMSO/H₂O, 2/1/7). Todas las muestras de sangre (250 µL) después de la administración oral se recogieron por medio de catéteres en la vena yugular a 30, 60, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min y 8, 12, 24 h. Las jeringas y viales heparinizados se prepararon antes de la recogida de sangre. Las muestras de plasma se prepararon centrifugando

las muestras de sangre a 8.000 g durante 5 min. Todas las muestras de plasma se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta que se analizaron.

Los analitos se extrajeron de 100 µL de plasma con 200 µL de acetonitrilo que contenían 200 nM de patrón interno ((3,5-dimetoxifenil)(2-fenil-1H-imidazol-4-il)metanona). Las muestras se mezclaron cuidadosamente, se centrifugaron y el extracto orgánico se transfirió al automuestreador para el análisis de LC-MS/MS. El modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), barrido m/z 356 → 188 (compuesto 1h), m/z 371 → 203 (compuesto 5Ha), m/z 389 → 221 (compuesto 5Hc) y m/z 309 → 171 (el patrón interno), se usó para obtener las señales más sensibles. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron usando análisis no compartimental (WinNonlin, Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

10 Método analítico. Se inyectó la disolución de muestra (10 µL) en un sistema HPLC serie Agilent (Agilent 1100 Series Agilent 1100 Chemstation, Agilent Technology Co, Ltd). Todos los analitos se separaron en una columna C18 de diámetro estrecho (Alltech Alltima HP, 2,1x100 mm, 3 µm, Fisher, Fair Lawn, NJ). Se usaron dos modos de gradiente. El modo gradiente se usó para alcanzar la separación de los analitos usando mezclas de fase móvil A [ACN/H₂O (5%/95%, v/v) que contiene 0,1% de ácido fórmico] y fase móvil B [ACN/H₂O (95%/5%, v/v) que contiene 0,1% de ácido fórmico] a un caudal de 300 µL/min. La fase móvil A se usó al 15% de 0 a 1 minuto seguido por un gradiente programado de forma lineal a 100% de fase móvil B en 6 min, 100% de fase móvil B se mantuvo durante 0,5 min antes de una rápida rampa a 15% de fase móvil A. La fase móvil A se continuó durante otros 12 min hacia el final del análisis.

20 Ensayo de polimerización de tubulina *in vitro*. Se mezcló tubulina de cerebro bovino (0,4 mg, >97% puro) (Cytoskeleton, Denver, CO) con 10 µM de los compuestos de prueba y se incubaron en 100 µL de tampón de tubulina general (PIPES 80 mM, MgCl₂ 2,0 mM, EGTA 0,5 mM y GTP 1 mM) a pH 6,9. La absorbancia de longitud de onda a 340 nm se monitorizó cada 1 min durante 20 min por el Lector de Microplacas SYNERGY 4 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). El espectrofotómetro se ajustó a 37°C durante la polimerización de tubulina.

25 Un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo, API Qtrap 4000™ (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canadá), que operaba con una fuente de TurbolonSpray se usó. El voltaje de la aguja de pulverización se ajustó a 5 kV durante el modo positivo. El gas de cortina se ajustó a 10; el Gas 1 y gas 2 se ajustaron a 50. El gas de Disociación asistida por colisión (CAD) en el medio y la temperatura de la sonda calentadora de la fuente a 500°C. La adquisición de datos y el procesamiento cuantitativo se consiguieron usando el programa Analyst™, Ver. 1.4.1 (Applied biosystems).

30 La pureza de los compuestos finales se probó por medio de RP-HPLC en un sistema de HPLC Waters 2695 instalado con un Detector de la serie de fotodiodos. Se realizaron dos métodos de RP-HPLC usando una columna C18 5 µM Supelco Ascentis™ (250 x 4,6 mm) a temperatura ambiente, y un caudal de 0,7 mL/min. HPLC1: Gradiente: Disolvente A (agua) y Disolvente B (metanol): 0-20 min 40-100% de B (gradiente lineal), 20-27 min 100% de B. HPLC2: Gradiente: Disolvente A (agua) y Disolvente B (metanol): 0-15 min 40-100% de B (gradiente lineal), 15-25 min 100% de B. Detección UV a 254 nm.

Los compuestos de esta invención y otros compuestos de referencia se prepararon según las Figuras 1-17.

Ejemplo de referencia 1

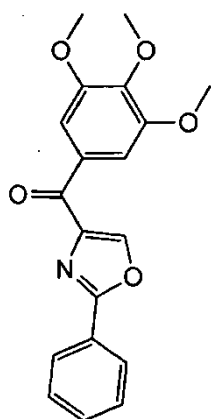
Síntesis de compuestos variantes de a

Anillo B

40 Los compuestos variantes de anillo B se sintetizaron según las Figuras 1 y 2.

Anillo B oxazol:

Síntesis de (2-fenil-oxazol-4-il)-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-metanona (36a) (Figura 1):

**(36a)**

Metiléster de ácido (2*R*)-2-fenil-4,5-dihidro-oxazol-4-carboxílico (32a). Se añadió cloruro de acetilo (6,8 mL) en gotas a metanol enfriado con hielo (30 mL). Después de la adición de *L*-serina (0,48 mmoles), la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente (TA) y se agitó toda la noche. La evaporación del disolvente dio sólido blanco de sal de HCl de metil éster de ácido (2*R*)-3-hidroxi-2-metil-propionico, que se usó sin purificación en la siguiente etapa. Se añadió trietilamina (11 mL, 72,3 mmoles) lentamente a una disolución de hidrocloreto de benzimidato de etilo (11,6 g, 62,8 mmoles) en CH₂Cl₂ (150 mL). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min y se añadió la sal de HCl de metiléster de ácido (2*R*)-3-hidroxi-2-metil-propionico (13,5 g, 79,6 mmoles) por porción. La mezcla resultante se agitó durante 48 h y se concentró a presión reducida. El compuesto 32a se separó de la columna rápida como un aceite amarillo (12,3 g, 95,9%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,99-7,38 (m, 5H), 4,97 (dd, 1H, J = 7,8 Hz, J = 10,5 Hz), 4,70 (t, 1H, J = 8,7 Hz), 4,62 (dd, 1H, J = 8,7 Hz, J = 10,5 Hz), 3,82 (s, 3H); MS (ESI) m/z 206,1 (M+H)⁺.

Ácido (2*R*)-2-fenil-4,5-dihidro-oxazol-4-carboxílico (33a). A una disolución enfriada con hielo de 32a en MeOH/H₂O se añadió LiOH (2,5 equiv.) con agitación. La mezcla se dejó calentar a TA en 1 h, se concentró al vacío, y el sólido blanco se disolvió en H₂O y se aciduló con HCl 1 N a pH 2,0 y se extrajo con MgSO₄, se filtró y se concentró en vacío para proporcionar el ácido 33a como un sólido blanco (95,8%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,98 (d, 2H), 7,57-7,42 (m, 3H), 5,04 (dd, 1H, J = 7,8 Hz, J = 10,8 Hz), 4,80 (t, 1H, J = 8,7 Hz), 4,70 (dd, 1H, J = 9,0 Hz, J = 10,8 Hz); MS (ESI) m/z 191,9 (M+H)⁺, 189,7 (M-H)⁻; 145,8 (M-COOH)⁻.

Metoximetilamida de ácido (2*R*)-2-fenil-4,5-dihidro-oxazol-4-carboxílico (34a). A una mezcla de 33a (5 mmoles), EDCI (6 mmoles), HOBT (5 mmoles) y Et₃N (5 mmoles) en CH₂Cl₂ (50 mL) se añadió HNCH₃OCH₃ (5 mmoles) y la agitación continuó a TA durante 6-8 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (100 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto 34a, que se purificó por cromatografía de columna como un sólido blanco (61,0%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,98-7,36 (m, 5H), 7,57-7,42 (m, 3H), 5,35 (br, t, 1H), 4,81 (br, t, 1H), 4,52 (dd, 1H, J = 8,7 Hz, J = 10,2 Hz), 3,90 (s, 3H), 3,27 (s, 3H); MS (ESI) m/z 257,0 (M+H)⁺.

(2*R*)-(2-Fenil-4,5-dihidro-oxazol-4-il)-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-metanona (35a). A una disolución de *n*-BuLi (1,6 M, 0,713 mL) en 8 mL de THF se añadió una disolución de 3,4,5-trimetoxibromobenceno (1,09 mmoles) en 3 mL de THF a -78°C. La mezcla se dejó agitar durante 2 h y se cargó una disolución de amida de Weinreb 34a (1,14 mmoles) en 3 mL de THF. La temperatura se dejó aumentar a TA y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro 35a como un sólido blanco (47,9%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,97-7,94 (m, 2H), 7,62 (s, 2H), 7,54-7,37 (m, 3H), 5,61 (q, 1H, J = 7,5 Hz, 9,9 Hz), 5,12 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 4,57 (q, 1H, J = 7,8 Hz, 9,9 Hz), 3,96 (s, 6H), 3,95 (s, 3H); MS (ESI) m/z 364,1 (M+Na)⁺, 340,1 (M-H)⁻.

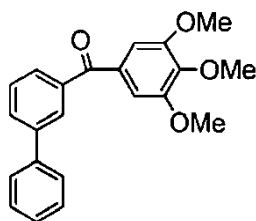
(2-Fenil-oxazol-4-il)-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-metanona (36a). Se agitó una mezcla de 35a (1,48 mmoles), CBrCl₃ (2,59 mmoles) y DBU (2,97 mmoles) en CH₂Cl₂ (20 mL) toda la noche. La mezcla de reacción se absorbió en gel de sílice y se purificó por cromatografía de columna para dar 36a puro como se deseaba (61,6%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,37 (s, 1H), 8,14-8,12 (m, 2H), 7,74 (s, 2H), 7,52-7,49 (m, 3H), 3,97 (s, 9H); MS (ESI) m/z 362,1 (M+Na)⁺.

Variantes del anillo B de benceno, pirimidina, piridina, furano, tiofeno, tiazol, pirazol y piperidina (Figura 2): se obtuvieron variantes del anillo B (1a-1d, 1k) de sus correspondientes ácidos (37a-37d, 37k). El compuesto 1f con tiofeno en la posición del anillo B no puede separarse de la mezcla de 1f y un sub-producto de acoplamiento al reactivo de Grignard 3,4,5,3',4',5'-hexametoxibifenilo usando columna rápida. Así que se usó un método alternativo para preparar 1f: la amida Weinreb 38f se convirtió en su correspondiente aldehído que se hizo reaccionar después con bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio para proporcionar el alcohol 40f, que puede separarse fácilmente de 3,4,5,3',4',5'-hexametoxibifenilo usando cromatografía de columna rápida. La oxidación con dicromato de piridinio (PDC) o DMSO no proporcionó 1f a partir del alcohol secundario 40f con buenos rendimientos. Pero usando reactivo de peryodinano de Dess-Martin como oxidante se formó con éxito el compuesto cetona deseado 1f. 1e y 1i se

prepararon a partir de alcoholes 40e y 40i usando un método similar. El compuesto 1g se obtuvo por medio de una reacción de acoplamiento a partir de piperidina 41g y ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.

Anillo B de benceno:

Síntesis de bifeníl-3-il(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1a) (Figura 2)



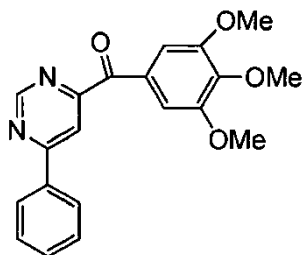
(1a)

N-Metoxi-*N*-metilbifenil-3-carboxamida (38a). A una mezcla de 37a (5 mmoles), EDCI (6 mmoles), HOBt (5 mmoles) y NMM (11 mmoles) en CH₂Cl₂ (50 mL) se añadió sal HNCH₃OCH₃HCl (5 mmoles) y la agitación continuó a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (100 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un aceite incoloro, que se usó para la siguiente etapa (58,4%). MS (ESI) m/z 264,0 (M+Na)⁺.

Bifenil-3-il(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1a). A una disolución de 38a (Figura 2) (0,174 g, 0,72 mmoles) en 5 mL de THF se añadió una disolución de THF de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 1,08 mmoles) a 0°C. La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para ar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro 1a como sólido blanco (43,8%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,02 (t, 1H), 7,84-7,74 (m, 2H), 7,64-7,38 (m, 6H), 7,11 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,88 (s, 6H); MS (ESI) m/z 371,1 (M+Na)⁺.

Anillo B de pirimidina:

Síntesis de (6-fenilpirimidin-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1b) (Figura 2)



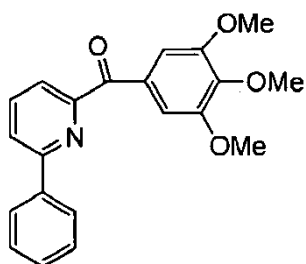
(1b)

N-Metoxi-*N*-metil-6-fenilpirimidina-4-carboxamida (38b). A una mezcla de 37b (5 mmoles), EDCI (6 mmoles), HOBt (5 mmoles) y NMM (11 mmoles) en CH₂Cl₂ (50 mL) se añadió sal de HNCH₃OCH₃HCl y la agitación continuó a TA durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (100 mL) y secuencialmente se lavó con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro 38b como un sólido amarillo (62,3%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 9,28 (s, 1H), 8,14-8,06 (m, 2H), 7,96 (br, s, 1H), 7,54-7,50 (m, 3H), 5,35 (br, t, 1H), 4,81 (br, t, 1H), 4,52 (dd, 1H, J = 8,7 Hz, J = 10,2 Hz), 3,79 (s, 3H), 3,42 (s, 3H); MS (ESI) m/z 266,0 (M+Na)⁺.

(6-Fenilpirimidin-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1b). A una disolución de 38b (0,243 g, 1 mmoles) en 5 mL de THF se añadió una disolución de THF de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 5,6 mL, 1,4 mmoles) a 0°C. La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro 1b (52,3%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 9,40 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 8,29 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 8,22-8,18, 7,57-7,54 (m, 5H), 7,46 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,91 (s, 6H); MS (ESI) m/z 351,1 (M+H)⁺.

Anillo B de piridina:

Síntesis de (6-fenilpiridin-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1c) (Figura 2)



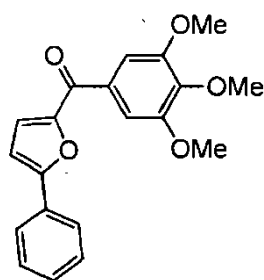
(1c)

N-Metoxi-*N*-metil-6-fenilpicolinamida (38c). A una mezcla de 37c (1,77 mmoles), EDCI (2,12 mmoles) HOBt (1,86 mmoles) y NMM (3,54 mmoles) en CH₂Cl₂ (20 mL) se añadió sal de HNCH₃OCH₃Cl (1,86 mmoles) y la agitación continuó a TA durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (40 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto 38c puro como un aceite incolor (51,2%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,02 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 7,86-7,81 (m, 2H), 7,55 (br, 1H), 7,48 (t, 2H), 7,44-7,41 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,44 (s, br, 3H); MS (ESI) m/z 265,0 (M+Na)⁺.

(6-Fenilpiridin-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1c). A una disolución de 38c (0,210 g, 0,86 mmoles) en 5 mL de THF se añadió a disolución de THF de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 3,5 mL, 1,73 mmoles) a 0°C. La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con agua, se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener 1c puro como cristales de aguja blancos (78%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,10 (d, br, 2H), 8,02-8,00 (m, 1H), 7,97-7,96 (m, 2H), 7,66 (s, 2H), 7,49-7,43 (m, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,89 (s, 6H); MS (ESI) m/z 372,6 (M+Na)⁺.

Anillo B de furano:

Síntesis de (5-fenilfuran-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1d) (Figura 2)



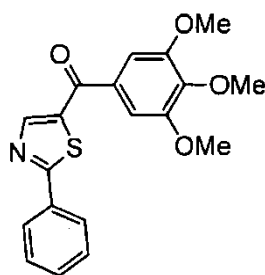
(1d)

N-Metoxi-*N*-metil-5-fenilfuran-2-carboxamida (38d). A una mezcla de 37d (10 mmoles), EDCI (12 mmoles), HOBt (11 mmoles) y NMM (21 mmoles) en CH₂Cl₂ (200 mL) se añadió sal HNCH₃OCH₃HCl (10,5 mmoles) y la agitación continuó a TA durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (200 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto 38d. (95,2%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,82 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 7,46-7,43 (t, 2H), 7,37-7,34 (m, 1H), 7,25 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 6,78 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 3,86 (s, 3H), 3,41 (s, 3H); MS (ESI) m/z 254,1 (M+Na)⁺.

(5-Fenilfuran-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1d). A una disolución de 38d (0,231 g, 1 mmoles) en 5 mL de THF se añadió una disolución de THF de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 4,0 mL, 2 mmoles) a 0°C. La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con agua, se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto 1d puro como cristales blancos (35,5%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,85-7,82 (m, 1H), 7,48-7,36 (m, 4H), 7,35 (s, 2H), 7,25 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 6,86 (d, 1H, J = 4,2 Hz), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 6H); MS (ESI) m/z 339,1 (M+H)⁺.

Anillo B de tiazol:

Síntesis de (2-feniltiazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1e) (Figura 2)



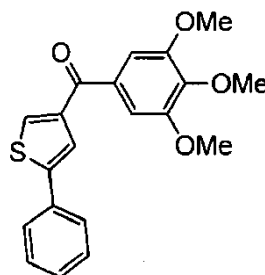
(1e)

(2-Feniltiazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (40e). A una disolución de 2-feniltiazol-5-carbaldehído 38e (0,567 g, 3 mmoles) en 15 mL de THF se añadió una disolución de THF de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 6,5 mL, 3,25 mmoles) a 0°C. La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto 40e puro (72,9%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,90 (m, 2H), 7,64 (s, 1H), 7,41 (m, 3H), 6,69 (s, br, 2H), 6,04 (s, 1H), 3,86 (s, 6H), 3,85 (s, 3H), 1,57 (d, 1H, J = 5,5 Hz); MS (ESI) m/z 358,1 (M+Na)⁺.

(2-Feniltiazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1e). A una disolución de 40e (0,357 g, 1 mmoles) en 40 mL de CH₂Cl₂ anhidro se añadió reactivo de Dess-Martin (0,848 g, 2 mmoles). La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con disolución de Na₂S₂O₃ saturado, se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para dar compuesto 1e puro (80,1%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,33 (s, 1H), 8,04 (m, 2H), 7,51 (m, 3H), 7,18 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,93 (s, 6H); MS (ESI) m/z 378,1 (M+H)⁺.

Anillo B de tiofeno:

Síntesis de(5-feniltiofen-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1f) (Figura 2)



(1f)

N-Metoxi-*N*-metil-5-feniltiofeno-3-carboxamida (38f). A una mezcla de 37f (2,5 mmoles), EDCI (2,9 mmoles), HOBT (2,6 mmoles) y NMM (5,3 mmoles) en CH₂Cl₂ (30 mL) se añadió sal de HNCH₃OCH₃HCl (2,6 mmoles) y la agitación continuó a TA durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (20 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto 38f puro. (90,8%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,28 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 7,69 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 7,64 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 7,44 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 7,35-7,32 (m, 1H), 6,78 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 3,86 (s, 3H), 3,41 (s, 3H); MS (ESI) m/z 270,0 (M+Na)⁺.

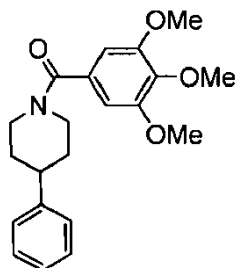
(5-Feniltiofen-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (40f). A -78°C, a una disolución de 38f (2,5 mmoles) en 5 mL de THF bajo la protección de argón se añadió una disolución de LiAlH₄ en THF (1N, 1,42 mL) y la agitación continuó a 1 h a -20°C. La mezcla de reacción se puso en un baño de hielo y se desactivó mediante disolución de H₂SO₄ al 20%, se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y se purificó por cromatografía de columna para dar 5-feniltiofeno-3-carbaldehído (no se muestra) (84,8%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 9,98 (s, 1H), 8,04 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 7,86 (br, 1H), 7,61-7,58 (br, 2H), 7,47-7,33 (m, 3H), 7,35-7,32 (m, 1H), 6,78 (d, 1H, J = 4,0 Hz); MS (ESI) m/z 210,9 (M+Na)⁺. A una disolución de 5-feniltiofeno-3-carbaldehído (0,195 g, 1,04 mmoles) en 5 mL de THF se añadió una disolución de THF de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 2,3 mL, 1,14 mmoles) a 0°C. La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro 40f. (70,5%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,55-7,52 (m, 2H), 7,40-7,35 (m, 3H), 7,30 (br, 1H), 7,20 (br, 1H), 6,72 (s, 2H), 6,01 (d, 1H, J = 3,9 Hz), 3,86 (s, 6H), 3,85 (s, 3H), 2,42 (d, 1H, J = 3,9 Hz); MS (ESI) m/z 339,1 (M-OH)⁺.

(5-Feniltiofen-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1f). A una disolución de 40f (0,260 g, 0,73 mmoles) en 20 mL de CH₂Cl₂ anhidro se añadió reactivo de Dess-Martin (0,465 g, 1,36 mmoles). La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con disolución de Na₂S₂O₃ saturada, se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para dar

compuesto 1f puro como cristales amarillos claros (60,9%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,97 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz), 7,82 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz), 7,59-7,57 (m, 2H), 7,45-7,34 (m, 3H), 7,19 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,93 (s, 6H); MS (ESI) m/z 355,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anillo B de piperidina

Síntesis de (4-fenilpiperidin-1-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1g) (Figura 2)

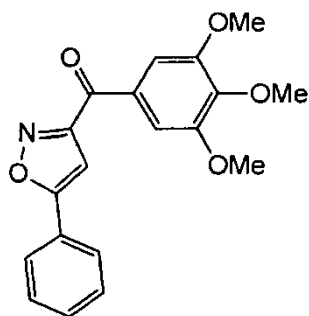


(1g)

(4-Fenilpiperidin-1-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1g). A una mezcla de 4-fenilpiperidina 41g (5 mmoles), EDCI (6 mmoles), HOBT (5,5 mmoles) y NMM (6 mmoles) en CH_2Cl_2 (50 mL) se añadió ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (5,3 mmoles) y la agitación continuó a TA durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO_3 saturado, salmuera y se secó sobre MgSO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro 1g. (57,9%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,35-7,21 (m, 5H), 6,66 (s, 2H), 4,84 (br, 1H), 3,95 (br, 1H), 3,88 (s, 6H), 3,86 (s, 3H), 3,20-2,87 (br, 2H), 2,85-2,74 (tt, 1H, $J = 3,6$ Hz, $J = 15,6$ Hz), 1,92 (br, 2H), 1,70 (br, 2H), MS (ESI) m/z 378,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Anillo B de isoxazol:

Síntesis de (5-fenilisoxazol-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1i) (Figura 2)



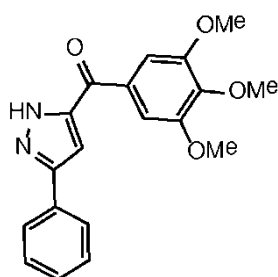
(1i)

(5-Fenilisoxazol-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (40i). A una disolución de 5-fenilisoxazol-3-carbaldehído 38i (0,365 g, 2,1 mmoles) en 15 mL de THF se añadió a disolución de THF de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 5,5 mL, 2,74 mmoles) a 0°C . La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con NH_4Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto 40i puro como un sólido blanco. (48,8%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,78-7,77 (m, 2H), 7,48-7,46 (m, 3H), 6,74 (s, 2H), 6,45 (s, 1H), 5,98 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz), 3,89 (s, 6H), 3,86 (s, 3H), 2,77 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz); MS (ESI) m/z 364,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

(5-Fenilisoxazol-3-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1i). A una disolución de 40i (0,110 g, 0,73 mmoles) en 8 mL de CH_2Cl_2 anhidro se añadió reactivo de Dess-Martin (0,274 g, 0,645 mmoles). La mezcla se dejó agitar durante 30 min y se desactivó con disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturado, se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para dar el compuesto puro 1i (70,1%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,87-7,85 (m, 2H), 7,72 (s, 2H), 7,53-7,49 (m, 3H), 7,05 (s, 1H), 7,82 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz), 3,97 (s, 3H), 3,96 (s, 6H); MS (ESI) m/z 362,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Anillo B de pirazol:

Síntesis de (3-fenil-1H-pirazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1k) (Figura 2)



(1k)

(3-Fenil-1*H*-pirazol-5-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (1k) se preparó usando el mismo método que se usó para el compuesto 1c a partir de ácido 3-fenil-1*H*-pirazol-5-carboxílico. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ 10,97 (br, 1H), 7,77 (s, br, 2H), 7,48-7,38 (m, 5H), 7,14 (s, br, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 6H), MS (ESI) m/z 361,1 (M+Na)⁺, 337,0 (M-H)⁻.

5 Ejemplo de referencia 2

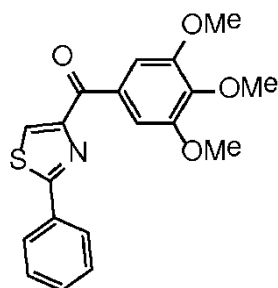
Síntesis de compuestos que tienen diferentes conectores Y

Los compuestos relacionados poseen diferentes conectores Y. Dichos compuestos, con diferentes conectores Y, se sintetizaron según las Figuras 3 y 4.

El compuesto 1h se sintetizó a partir de ácido 2-fenil-4,5-dihidro-tiazol-4-carboxílico 42a a través de tres etapas descritas antes (Lu, Y.; Wang, Z.; Li, C.M.; Chen, J.; Dalton, J.T.; Li, W.; Miller, D.D., *Synthesis, in vitro* structure-activity relationship, and *in vivo* studies of 2-arylthiazolidine-4-carboxylic acid amides as anticancer agents. *Bioorg Med Chem* 2010, 18 (2), 477-95). 1h se convirtió a isómeros de oxima 2e-cis,trans y 2f-cis,trans tras la reacción con hidroxilaminas, NH₂OH o NH₂OCH₃. Las asignaciones se hicieron en la base de datos químicos y espectrales como se describe debajo. Una reorganización de Beckmann mejorada produjo fácilmente las amidas reorganizadas 2g y 2h a partir de los dos estereoisómeros geométricos 2e-cis y 2e-trans por medio de su reacción con cloruro de tosilo y posteriormente columna de óxido de aluminio básico. Los derivados de hidrazida 2d-cis y 2d-trans se prepararon mezclando 1h con hidrato de hidrazina en etanol y poniendo en reflujo durante 24 h. Los acrilonitrilos 2c-trans,cis se obtuvieron a partir de la reacción Wittig de 1h con cianometilfosfonato de dietilo. Se preparó cianoimina 2j usando el procedimiento como se describe en Cuccia (Cuccia, S.J.; Fleming, L.B.; France, D.J., A novel and efficient synthesis of 4-phenyl-2-chloropyrimidines from acetophenone cyanoimines. *Synthetic Communications* 2002, 32, (19), 3011-3018). El grupo carbonilo en el compuesto 1h se redujo también a un alcohol secundario 2b o se convirtió a un alqueno (2a) como se ilustra en la Figura 3.

Los intentos por eliminar el grupo carbonilo entre anillos B y C en 1h, dieron por resultado la formación de compuesto 2i como se muestra en la Figura 4. La introducción de dobles enlaces *cis*- y *trans*- en la posición carbonilo formaron compuestos (3a y 3b), que se sintetizaron a partir de la reacción Wittig con 2-feniltiazol-4-carbaldehído. El compuesto sulfuro 4a, sulfona 4b y sulfóxido 4c se prepararon usando 3-aminobifenilo como material de partida a través de una reacción de Sandmeyer inicial para dar carbonoditioato 52a, seguido por reacción de acoplamiento catalizado por CuI y oxidación de *m*-CPBA. El compuesto 4d unido a sulfonamida se preparó a partir de la reacción de cloruro de 3-bifenilsulfonilo con 3,4,5-trimetoxianilina en presencia de N₂ en DMF.

Síntesis de (2-fenil-tiazol-4-il)-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-metanona (1h) [Figura 3]

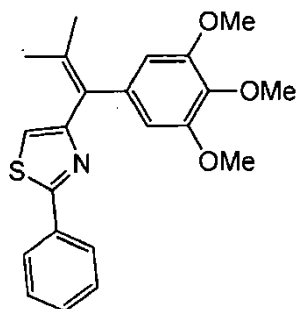


(1h)

(2-Fenil-tiazol-4-il)-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-metanona (1h). Una mezcla de ácido 2-fenil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico (5 mmoles), EDCI (6 mmoles) y HOBT (5 mmoles) en CH₂Cl₂ (50 mL) se agitó durante 10 min. A esta disolución, se añadieron NMM (5 mmoles) y HNCH₃OCH₃ (5 mmoles) y la agitación continuó a TA durante 6-8 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (100 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener metoximetilamida de ácido 2-fenil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico. Una disolución de metoximetilamida de ácido 2-fenil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico (1 equiv) en CH₂Cl₂ se enfrió a 0°C, y

se añadió DBU destilado (2 equiv). Después se introdujo en gotas bromotriclorometano (1,7 equiv) por medio de jeringa durante 10 min. Las mezclas de reacción se dejaron calentar a TA y se agitaron toda la noche. Tras lavar con NH₄Cl acuoso saturado (2x50 mL), la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron en MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida como se necesite proporcionando metoximetilamida de ácido 2-fenil-tiazol-4-carboxílico (73,6%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (s, 1H), 7,99-7,96 (m, 2H), 7,47-7,44 (m, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,49 (s, 3H). MS (ESI) m/z 271,0 (M+Na)⁺. A una disolución de bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5 N, 3 mL) en 2 mL de THF se cargó una disolución de metoximetilamida de ácido 2-fenil-tiazol-4-carboxílico (1 mmol) en 3 mL de THF a 0°C. Las mezclas se agitaron durante 30 min hasta que las amidas desaparecieron en las placas de TLC. La mezcla de reacción se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto 1h puro. Rendimiento: 27,3%. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (s, 1H), 8,03 (q, 2H), 7,80 (s, 2H), 7,49-7,47 (m, 3H), 3,96 (s, 6H), 3,97 (s, 3H). MS (ESI) m/z 378,1 (M+Na)⁺.

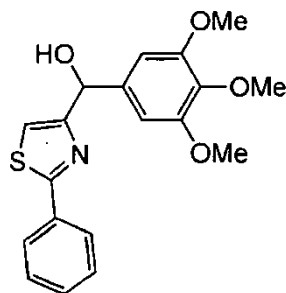
Síntesis de 4-(2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-enil)-2-feniltiazol (2a) [Figura 3]



(2a)

4-(2-Metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-1-enil)-2-feniltiazol (2a) [Figura 3]. A -78°C, a una disolución de 223 mg de yoduro de isopropiltrifenilfosfonio (0,52 mmoles) en 5 mL de THF se añadieron en gotas 0,4 mL de *n*-BuLi 1,6 N en hexano bajo protección de Ar₂. Y la mezcla se agitó a 0°C durante 40 min. Una disolución de 140 mg (0,39 mmoles) de 1h en 5 mL de THF se añadió en gotas a 0°C, y la mezcla se agitó durante 1 h a TA. La mezcla de reacción se trató con disolución de NH₄Cl saturado. Después de un tratamiento convencional, la cromatografía de columna (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo) dio el compuesto 2a (86 mg, 57,3%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,98-7,97 (m, 2H), 7,45-7,40 (m, 3H), 6,77 (s, 1H), 6,48 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,82 (s, 6H), 2,15 (s, 3H), 1,81 (s, 3H). MS (ESI) m/z 404,1 (M+Na)⁺.

Síntesis de (2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (2b) [Figura 3]



(2b):

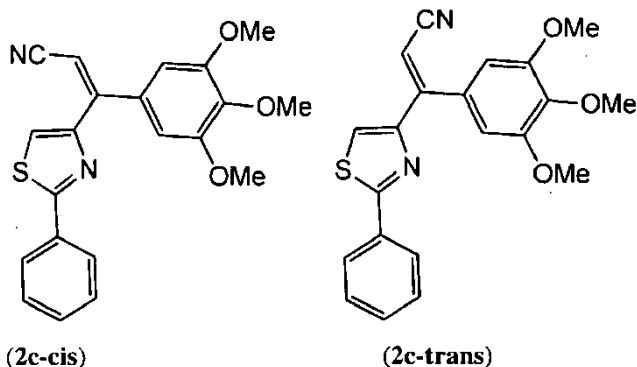
Ácido 2-fenil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico (42a). Se combinó benzonitrilo (40 mmoles) con *L*-cisteína (45 mmoles) en 100 mL de 1:1 de MeOH/disolución de tampón fosfato pH 6,4. La reacción se agitó a 40°C durante 3 días. El precipitado se eliminó por filtración, y se eliminó MeOH usando evaporación rotatoria. A la disolución restante se añadió HCl 1M para ajustar a pH = 2 a 0°C. El precipitado resultante se filtró para proporcionar un sólido blanco de ácido 2-fenil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico 42a, que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación.

2-Feniltiazol-4-carbaldehído (42b). A -78°C, a una disolución de metoximetilamida de ácido 2-fenil-tiazol-4-carboxílico (1 equiv) en THF se añadió LiAlH₄ (1 equiv, 1 N en THF) y se agitó durante 1 h a -20°C. La mezcla de reacción se puso en un baño de hielo y se desactivó mediante disolución de H₂SO₄ al 20%, se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y se purificó por cromatografía de columna para proporcionar 42b (45,8%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 10,1 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,02-8,00 (m, 2H), 7,50-7,48 (m, 3H). MS (ESI) m/z 244,1 (M+Na+MeOH)⁺.

(2-Feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanol (2b) [Figura 3]. A 0°C, a una disolución de 104 mg de 42b (0,55 mmoles, 1 eq.) en 6 mL de THF se añadió bromuro de 3,4,5-trimetoxifenilmagnesio (0,5N en THF, 2,9 mL). Las mezclas se agitaron durante 30 min hasta que el aldehído desapareció en las placas de TLC. La mezcla de reacción

se desactivó con NH_4Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener compuesto (2b) puro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,95-7,92 (m, 2H), 7,44-7,43 (m, 4H), 6,97 (s, 1H), 6,76 (s, 2H), 5,93 (d, 1H, J = 3,6 Hz), 3,86 (s, 9H). MS (ESI) m/z 402,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

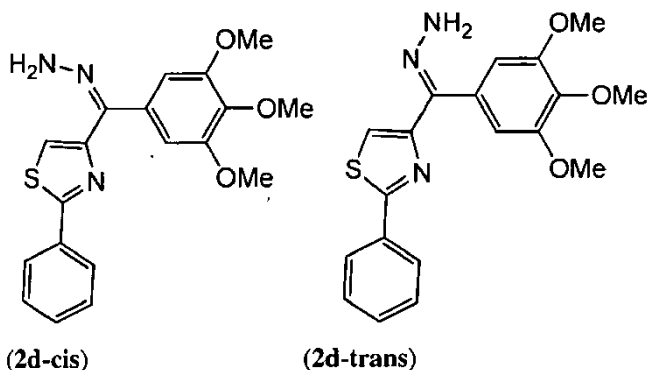
- 5 Síntesis de (Z)-3-(2-feniltiazol-4-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilonitrilo (2c-trans) y (E)-3-(2-feniltiazol-4-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilonitrilo (2c-cis) [Figura 3]



- 10 (Z)-3-(2-Feniltiazol-4-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilonitrilo (2c-trans). A una disolución de 0,4 mL de *n*-BuLi 2,5 N en hexano y 10 mL de THF se añadió en gotas una disolución de 177 mg (1 mmol) de cianometilfosfonato de dietilo en 5 mL de THF a 0°C en Ar_2 . El baño de hielo se eliminó, y la mezcla se agitó a 25°C durante 40 min. Una disolución de 200 mg (0,56 mmoles) de 1h en 10 mL de THF se añadió en gotas a 0°C, y la mezcla se agitó durante 1 h a TA. La mezcla de reacción se trató con disolución de NH_4Cl saturado. Después de un tratamiento convencional, la cromatografía de columna (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo) dio compuestos 2c-trans (83 mg) y 2c-cis (76 mg). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,01-7,99 (m, 2H), 7,44-7,40 (m, 3H), 7,21 (s, 1H), 6,74 (s, 2H), 6,67 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,89 (s, 6H). MS (ESI) m/z 401,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.
- 15

(E)-3-(2-Feniltiazol-4-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilonitrilo (2c-cis). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,07-8,05 (m, 2H), 7,49-7,46 (m, 4H), 6,66 (s, 2H), 5,64 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,86 (s, 6H). MS (ESI) m/z 401,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

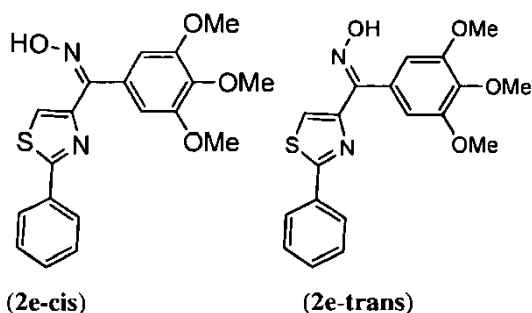
Síntesis de (Z)-4-(hidrazono(3,4,5-trimetoxifenil)metil)-2-feniltiazol (2d-cis) y (E)-4-(hidrazono(3,4,5-trimetoxifenil)metil)-2-feniltiazol (2d-trans) [Figura 3]



- 20 (Z)-4-(hidrazono(3,4,5-trimetoxifenil)metil)-2-feniltiazol (2d-cis). A una mezcla de 1h (230 mg, 0,65 mmoles) en 3 mL de CH_2Cl_2 y 3 mL de etanol se añadió hidrato de hidrazina (2 mL). Después la mezcla se puso a reflujo durante toda la noche. Después de completar la reacción, el residuo se absorbió en gel de sílice y se purificó por cromatografía de columna para dar compuestos 2d-cis (80 mg) y 2d-trans (56 mg). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,01-7,98 (m, 2H), 7,49-7,46 (m, 5H), 7,33 (s, 1H), 6,82 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,85 (s, 6H). MS (ESI) m/z 370,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.
- 25

(E)-4-(hidrazono(3,4,5-trimetoxifenil)metil)-2-feniltiazol (2d-trans). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,04-8,01 (m, 2H), 7,44-7,40 (m, 3H), 6,95 (s, 1H), 6,65 (s, 2H), 5,62 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,87 (s, 6H). MS (ESI) m/z 370,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

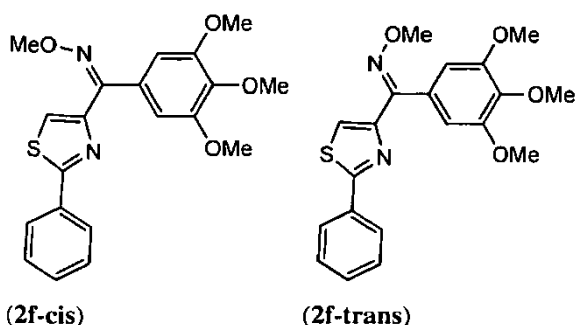
Síntesis de oxima de (Z)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2e-cis) y oxima de (E)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2e-trans) [Figura 3]



Oxima de (Z)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2e-cis). A una suspensión de 1h (210 mg, 0,59 mmoles) en 10 mL de etanol se añadió una disolución acuosa (2 mL) de hidrocloreto de hidroxilamina (127 mg, 1,83 mmoles). Después 2 mL de NaOH 1N se añadieron en gotas a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó a 55°C durante 3 h. Después de completar la reacción, el residuo se absorbió en gel de sílice y se purificó en cromatografía de columna para dar compuestos 2e-cis (85 mg) y 2e-trans (50 mg). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,95 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,91-7,89 (m, 2H), 7,50-7,44 (br, 3H), 6,85 (s, 2H), 3,73 (s, 6H), 3,70 (s, 3H). MS (ESI) m/z 393,1 (M+Na)⁺; 368,9 (M-H)⁻.

Oxima de (E)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2e-trans). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,49 (s, 1H), 7,92-7,89 (m, 2H), 7,64 (s, 1H), 7,51-7,49 (m, 3H), 7,34 (s, 1H), 6,75 (s, 2H), 3,75 (s, 6H), 3,72 (s, 3H). MS (ESI) m/z 393,1 (M+Na)⁺; 368,9 (M-H)⁻.

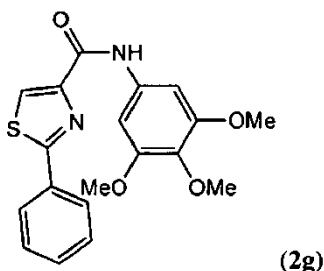
Síntesis de O-metiloxima de (Z)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2f-cis) y O-metiloxima de (E)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2f-trans) [Figura 3]



O-metiloxima de (Z)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2f-cis). A una suspensión de 1h (110 mg, 0,59 mmoles) en 10 mL de piridina se añadió hidrocloreto de O-metilhidroxilamina (52 mg, 0,63 mmoles) y la mezcla se agitó a 60°C durante la noche. La reacción se desactivó con disolución de HCl 1N, se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para dar compuestos puros 2f-cis (41 mg) y 2f-trans (33 mg). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,13 (s, 1H), 7,96-7,94 (m, 2H), 7,45-7,44 (m, 3H), 6,94 (s, 2H), 4,13 (s, 3H), 3,91 (s, 6H), 3,88 (s, 3H). MS (ESI) m/z 407,2 (M+Na)⁺.

O-metiloxima de (E)-(2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2f-trans). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,00-7,98 (m, 2H), 7,44-7,43 (m, 3H), 7,28 (s, 1H), 6,70 (s, 2H), 4,08 (s, 3H), 3,91 (s, 6H), 3,85 (s, 3H). MS (ESI) m/z 407,0 (M+Na)⁺.

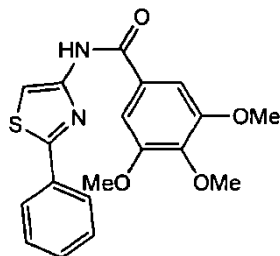
Síntesis de 2-fenil-N-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazol-4-carboxamida (2g) [Figura 3]



2-Fenil-N-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazol-4-carboxamida (2g). A una disolución de 2e-cis (21 mg, 0,06 mmoles) en 5 mL de CH₂Cl₂ se añadió cloruro de *p*-toluensulfonilo (23 mg, 0,12 mmoles) y NaH (5 mg, 60% en aceite mineral ligero). Después la mezcla de reacción se agitó durante 20 min. Después de completar la reacción, el residuo se absorbió

en gel de sílice y se purificó por cromatografía de columna de Al_2O_3 para dar compuesto 2g (15 mg). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 9,22 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,02-7,99 (m, 2H), 7,52-7,50 (m, 3H), 7,07 (s, 2H), 3,92 (s, 6H), 3,85 (s, 3H). MS (ESI) m/z 371,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

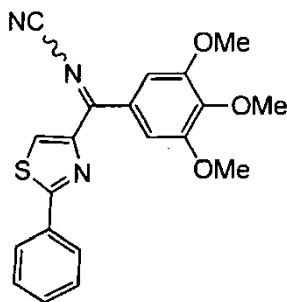
Síntesis de 3,4,5-trimetoxi-*N*-(2-feniltiazol-4-il)benzamida (2h) [Figura 3]



(2h)

3,4,5-Trimetoxi-*N*-(2-feniltiazol-4-il)benzamida (2h). A una disolución de 2e-trans (26 mg, 0,07 mmoles) en 5 mL de CH_2Cl_2 se añadió cloruro de *p*-toluensulfonilo (27 mg, 0,14 mmoles) y NaH (5 mg, 60% en aceite mineral ligero). Después la mezcla de reacción se agitó durante 20 min. Después de completar la reacción, el residuo se absorbió en gel de sílice y se purificó por cromatografía de columna Al_2O_3 para dar el compuesto 2h (15 mg). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,88 (s, 1H), 7,94-7,91 (m, 2H), 7,83 (s, 1H), 7,48-7,46 (m, 3H), 7,18 (s, 2H), 3,97 (s, 6H), 3,94 (s, 3H). MS (ESI) m/z 393,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

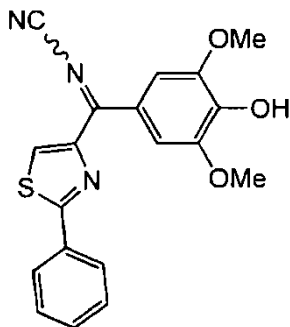
Síntesis de *N*-((2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metilen)cianamida (2j) [Figura 3]



(2j)

N-((2-feniltiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metilen)cianamida (2j). Se disolvieron 100 mg de 1h (0,28 mmoles, 1 eq.) en 10 mL de cloruro de metileno. Se añadió tetracloruro de titanio en cloruro de metileno (1,0 N, 0,7 mL, 2,5 eq.) en gotas a 0°C y se agitó durante 30 min. Se añadió bis-trimetilsililcarbodiimida (2,4 eq.) en 2 mL de cloruro de metileno y la reacción se agitó toda la noche protegida del aire y la humedad. La reacción se trató con mezcla de hielo-agua seguido por la extracción con cloruro de metileno. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró a través de celite y se concentró para dar las cianoiminas de acetofenona en bruto que se purificaron por columna rápida como isómeros con una relación de 3:7. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,72 (br, 0,3H), 8,63 (s, 0,7 H), 8,09-8,07 (m, 1,4H), 7,99 (br, 0,6H), 7,58-7,56 (br, 3H), 7,26 (s, 1,4H), 7,18 (s, 0,6H), 3,84, 3,83 (s, s, 6H), 3,82 (s, 3H). MS (ESI) m/z 402,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

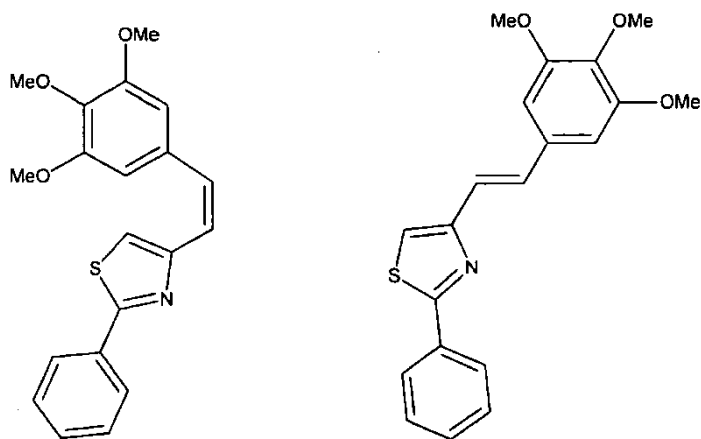
Síntesis de *N*-((4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)(2-feniltiazol-4-il)metilen)cianamida (32).



(32)

N-((4-Hidroxi-3,5-dimetoxifenil)(2-feniltiazol-4-il)metileno)cianamida (32) se obtuvo como un subproducto de la síntesis de 2j. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,23 (s, 1H), 8,02 (m, 2H), 7,92 (s, 2H), 7,55 (m, 3H), 6,02 (s, 1H), 3,99 (s, 6H). MS (ESI) m/z 364,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Síntesis de (*Z*)-2-fenil-4-(3,4,5-trimetoxiestiril)tiazol (3a) y (*E*)-2-fenil-4-(3,4,5-trimetoxiestiril)tiazol (3b) [Figura 4]



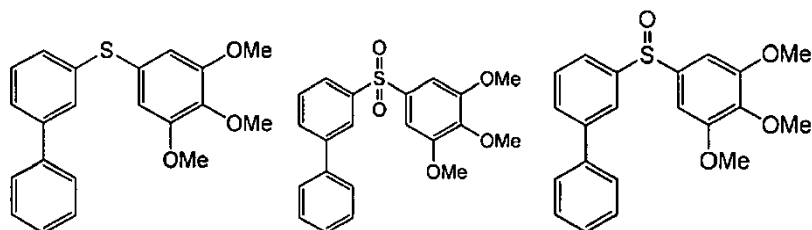
(3a)

(3b)

(Z)-2-Fenil-4-(3,4,5-trimetoxiestiril)tiazol (3a). Se añadió trifenilfosfina (3,41 g, 13 mmoles) a una disolución de 5-(bromometil)-1,2,3-trimetoxibenceno (2,61 g, 10 mmoles) en THF seco (30 mL). La mezcla se puso a reflujo con agitación durante 6 h. El sólido blanco resultante se filtró y se lavó con éter/hexano para proporcionar el producto bromuro de 3,4,5-trimetoxibenciltrifenilfosfonio en 96,4% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,77-7,73, 7,65-7,61 (m, 15H), 6,44 (d, 2H, $J = 1,5$ Hz), 5,37 (d, 2H, $J = 14$ Hz), 3,76 (s, 3H), 3,51 (d, 6H); MS (ESI) m/z 443,1 ($\text{M}-\text{Br}$) $^+$. A -78°C , se añadió $n\text{-BuLi}$ (0,42 mL, 2,5 N en hexano) a una disolución de bromuro de 3,4,5-trimetoxibenciltrifenilfosfonio (500 mg, 0,96 mmoles) en 10 mL de THF. Después de agitar a TA durante 2 h, se cargó aldehído 42b (109 mg, 0,58 mmoles) en 3 mL de THF y se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se trató con disolución de NH_4Cl saturado. Después de un tratamiento convencional, la cromatografía de columna (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo) dio compuestos 3a (57 mg) y 3b (99 mg). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,90-7,89 (m, 2H), 7,42-7,40 (m, 3H), 7,07 (s, 1H), 6,71 (s, 2H), 6,66 (s, 1H), 3,87 (s, 6H), 3,75 (s, 3H); MS (ESI) m/z 376,1 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

(E)-2-Fenil-4-(3,4,5-trimetoxiestiril)tiazol (3b). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,03-8,01 (m, 2H), 7,52 (d, 1H, $J = 16$ Hz), 7,47-7,44 (m, 3H), 7,16 (s, 1H), 7,05 (d, 1H, $J = 16$ Hz), 6,79 (s, 2H), 3,92 (s, 6H), 3,88 (s, 3H). MS (ESI) m/z 354,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Síntesis de bifenil-3-il(3,4,5-trimetoxifenil)sulfano (4a), 3-(3,4,5-trimetoxifenilsulfonyl)bifenilo (4b) y 3-(3,4,5-trimetoxifenilsulfinil)bifenilo (4c) [Figura 4]



(4a)

(4b)

(4c)

Carbonoditioato de S-bifenil-3-il O-etilo (52a). A una disolución de 1 equiv. de bifenil-3-amina (1 g, 5,92 mmoles) en agua (7,3 mL) a 0°C se añadió ácido clorhídrico concentrado (1 mL). Una disolución fría de 1,1 equiv. de nitrito sódico (450 mg, 6,5 mmoles) en agua (3 mL) se añadió lentamente y se agitó durante 15 min. La disolución de diazonio fría se añadió lentamente a una disolución de 1,3 equiv. de etilxantano de potasio (1,16 g, 1,3 mmoles) en agua (1,3 mL) a 45°C . La mezcla de reacción se agitó durante unos 30 min adicionales a 45°C y después se enfrió a TA. La mezcla de reacción se extrajo con dietiléter (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con disolución de NaOH 1N (100 mL), agua (3 x 50 mL), salmuera (50 mL), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a presión reducida. El xantano en bruto 52a resultante se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. MS (ESI) m/z 275,0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

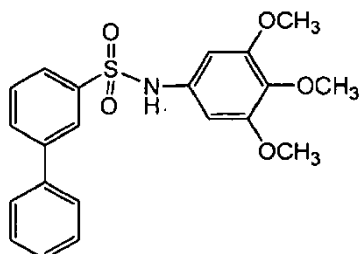
Bifenil-3-il(3,4,5-trimetoxifenil)sulfano (4a). A una disolución de 52a (1,1 g, compuesto en bruto) en etanol (8 mL) se añadió hidróxido de potasio (2,1 g, 12 mL) y se calentó a reflujo durante toda la noche. La disolución se enfrió a TA y el etanol se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en agua y se lavó con dietiléter (10 mL). La fase acuosa se aciduló con HCl 2 N y se extrajo con dietiléter (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con agua (50 mL), salmuera (50 mL), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se evaporaron a presión reducida para

proporcionar 0,85 g (77,3%) de producto de bifenil-3-tiol en bruto (total, 3 etapas). En un matraz de fondo redondo, agitado magnéticamente, se pusieron 0,1 g (1,04 mmoles) de *tert*-butóxido sódico y 83 mg de yoduro de cobre (0,43 mmoles). Después de sellar el recipiente de reacción, se inyectaron 0,13 g (0,71 mmoles) de 4-metoxibencenotiol y 0,19 g (0,65 mmoles) de 5-yodo-1,2,3-trimetoxibenceno en 3,0 mL de tolueno a través del septo. La mezcla de reacción se calentó toda la noche a 110°C. La purificación se realizó por cromatografía rápida, y se obtuvo un sólido amorfo (40% de rendimiento). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,54-7,52 (m, 3H), 7,44-7,41 (m, 3H), 7,37-7,33 (m, 2H), 7,23 (s, br, 1H), 6,69 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,80 (s, 6H). MS (ESI) m/z 353,2 (M+H)⁺.

3-(3,4,5-Trimetoxifenilsulfonil)bifenilo (4b). A una disolución de 60 mg (0,17 mmoles) de compuesto 4a y 5 mL de diclorometano se añadieron muy lentamente 2 equiv. de *m*-CPBA durante 3 h. La formación de sulfóxido se monitorizó por cromatografía de capa fina. La purificación se realizó con una columna cromatográfica rápida, y se obtuvo un polvo amorfo de (4b) (73% de rendimiento). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,14 (br, 1H), 7,89 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,59-7,56 (m, 3H), 7,49-7,39 (m, 3H), 7,19 (s, 2H), 3,89 (s, 6H), 3,87 (s, 3H). MS (ESI) m/z 385,0 (M+Na)⁺.

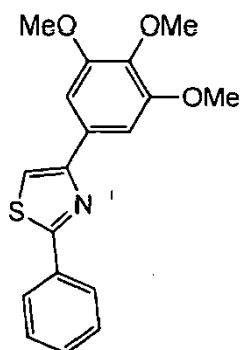
3-(3,4,5-Trimetoxifenilsulfenil)bifenilo (4c). A 0°C, a una disolución de 500 mg (1,42 mmoles) de compuesto (4a) y 5 mL de diclorometano se añadió muy lentamente 1 equiv. de *m*-CPBA durante 3 h. La formación de sulfóxido se monitorizó por cromatografía de capa fina. La purificación se realizó con una columna cromatográfica rápida, y un polvo amorfo de (4c) se obtuvo (87% de rendimiento). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,92 (br, 1H), 7,71 (d, 2H), 7,62-7,60 (m, 3H), 7,58-7,40 (m, 4H), 6,94 (s, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,74 (s, 6H). MS (ESI) m/z 369,1 (M+H)⁺.

Síntesis de *N*-(3,4,5-trimetoxifenil)bifenil-3-sulfonamida (4d) [Figura 4]



N-(3,4,5-Trimetoxifenil)bifenil-3-sulfonamida (4d). Una mezcla de 65 mg de cloruro de bifenil-3-sulfonilo (0,25 mmoles), 44 mg de 3,4,5-trimetoxianilina (0,24 mmoles), y 0,3 mmoles de trietilamina en 5 mL de DMF se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se trató con agua y se extrajo con acetato de etilo. Después de un tratamiento convencional, la cromatografía de columna (gel de sílice, éter de petróleo/acetato de etilo) dio 88 mg de compuestos (4d) (91,7%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,96 (t, 1H, 1,8 Hz), 7,81-7,74 (m, 2H), 7,57-7,40 (m, 6H), 6,33 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,80 (s, 6H). MS (ESI) m/z 422,1 (M+Na)⁺.

2-Fenil-4-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazol (2i) [Figura 4]



2-Fenil-4-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazol (2i). Se añadió bromo (160 mg, 1 mmol) en gotas a una disolución agitada de una 1-(3,4,5-trimetoxifenil)etanol (210 mg, 1 mmol) en etanol (30 mL) y la disolución se agitó a 0°C durante 1 h y después se vertió en agua para formar un precipitado. Este se recrystalizó del etanol para dar bromoacetofenona (70%) y se usó directamente para la siguiente etapa. Una mezcla de bromoacetofenona (288 mg, 1 mmol) y benzotioamida (137 mg, 1 mmol) en etanol se puso a reflujo durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó con columna rápida para dar 2i (167 mg, 51,1%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,05-8,03 (m, 2H), 7,48-7,44 (m, 3H), 7,41 (s, 1H), 7,22 (s, 2H), 3,97 (s, 6H), 3,89 (s, 3H). MS (ESI) m/z 350,1 (M+Na)⁺.

Ejemplo de referencia 3

Síntesis de compuestos de metoxibenzoiltiazol que tiene diferentes anillos "A" y anillo "A" sustituido

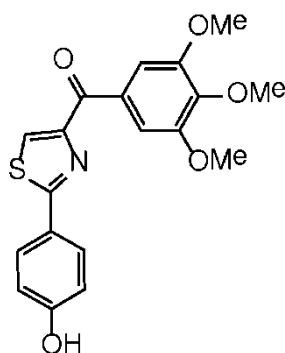
Los compuestos de esta descripción poseen diferentes anillos A sustituidos o no sustituidos tal como fenilo o indolilo. Dichos compuestos se sintetizaron según las Figuras 5 y 6.

Se introdujeron hidroxilo y aminometilo en la posición *para* del anillo A de fenilo, además el fenilo se sustituyó con anillos de 5-indolilo y 2-indolilo. Las amidas de Weinreb 57a, 61a, 65a y 67a se prepararon por el procedimiento presentado en la Figura 5 usando nitrilos de arilo como materiales de partida. Se preparó 2-ciano-indol 60a según un procedimiento estándar (Pletnev, A.A.; Tian, Q.; Larock, R.C., Carbopalladation of nitriles: synthesis of 2,3-diaryllindenones and polycyclic aromatic ketones by the Pd-catalyzed annulation of alkynes and bicyclic akenes by 2-iodoarenenitriles. *J Org Chem* 2002, 67(26), 9276-87). Las protecciones de los grupos hidroxilo (TBDMSCl), indolilo (PhSO₂Cl) y amino (Boc₂O) se usaron en los preparados. La desprotección de TBDMS y la oxidación a partir de tiazolina (58a) a tiazol (2l) tuvo lugar en una etapa usando disolución TBAF/THF. Esta oxidación de tiazolina-tiazol tiene lugar espontáneamente en la reacción de la amida de Weinreb de tiazolina y el reactivo de Grignard. El mismo fenómeno se observa durante la preparación de los compuestos de indol 62a y 66a.

El compuesto 62a se separó como un compuesto de tiazol puro después de la reacción con 3,4,5-trimetoxifenillitio sin la necesidad de oxidación adicional. El compuesto 66a se obtuvo eliminando los grupos protectores de fenilsulfonilo en disolución de NaOH etanol caliente. Se obtuvieron *para*-OH y NH₂ en el anillo A de 2l y 2r por reacciones de Grignard similares procedentes de amidas de Weinreb 58a y 68a. El compuesto 2r se convirtió adicionalmente a la sal HCl (2r-HCl) y la sal de HCl de monometilamina 2s-HCl usando condiciones de NaH/Mel y dimetilamina 2u bajo condiciones de HCHO/NaBH₃CN.

Anillo A sustituido:

Síntesis de (2-(4-hidroxifenil)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2l) [Figura 5]



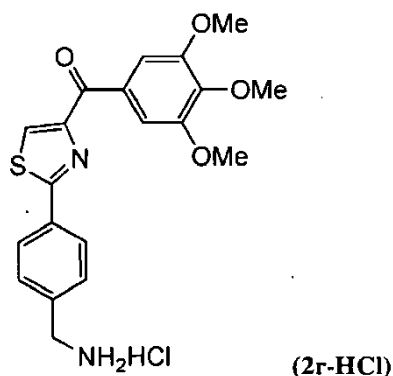
(2l)

(*R*)-2-(4-Hidroxifenil)-*N*-metoxi-*N*-metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida (57a) se sintetizó usando el mismo método como se usa para 38d. Rendimiento cuantitativo. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,56 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 6,84 (br, 1H), 6,73 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 5,64 (t, br, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,30 (s, 3H). MS (ESI) m/z 289,0 (M+Na)⁺, 264,9 (M-H)⁻.

(*R*)-(2-(4-(*tert*-Butildimetilsililoxi)fenil)-4,5-dihidrotiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (58a) se sintetizó usando el mismo método como se usa para (35a)-véase el Ejemplo 1. 67,0% de rendimiento. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,73 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 7,61 (s, 2H), 6,83 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 5,95 (dd, 1H, J = 8,1 Hz, 9,0 Hz), 4,09 (dd, 1H, J = 7,8 Hz, 11,1 Hz), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 6H), 3,55 (dd, 1H, J = 9,3 Hz, 11,1 Hz), 0,97 (s, 9H), 0,19 (s, 6H). MS (ESI) m/z 510,4 (M+Na)⁺, 486,0 (M-H)⁻.

(2-(4-Hidroxifenil)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2l). A 0°C, a una disolución de 58a (0,2 mmoles) en 5 mL de CH₂Cl₂ se añadió una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio en THF (1 N, 0,6 mmoles) y se agitó a TA durante alrededor de 14 h hasta que la reacción se finalizó mediante monitorización por TLC. 67,0% de rendimiento. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10,1 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,85 (d, 2H, J = 8,50 Hz), 7,62 (s, 2H), 6,91 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 3,86 (s, 6H), 3,79 (s, 3H). MS (ESI) m/z 394,1 (M+Na)⁺, 369,9 (M-H)⁻.

Hidrocloreto de (2-(4-(aminometil)fenil)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2r o 2r-HCl) [Figura 5]

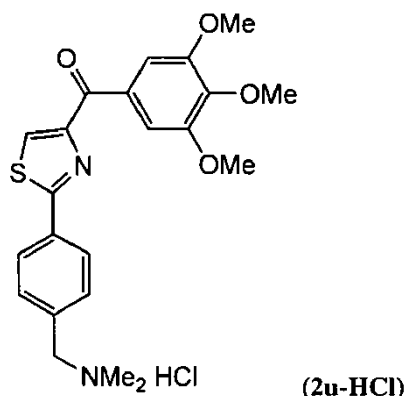


4-(4-(Metoxi(metil)carbamoil)-4,5-dihidrotiazol-2-il)bencilcarbamoato de (*R*)-*terc*-butilo (67a). Se suspendieron 4-(aminometil)benzonitrilo (25,09 g, 0,149 moles) y *L*-cisteína (18,1 g, 0,149 moles) en 500 mL de MeOH y disoluciones tampón a pH 6,4 (1:1) y se agitaron durante 3 días a TA. Se añadió trietilamina (30 mL) a la mezcla y se añadió Boc₂O (68 g, 0,31 moles) a esta mezcla y se agitó durante 2 h. Los disolventes se eliminaron y se filtraron para dar sólido blanco ácido (*R*)-2-(4-((*terc*-butoxicarbonilamino)metil)fenil)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico (38,4 g, 76,8%). Se obtuvo el compuesto 67a a partir de este ácido siguiendo el mismo método como se usa para 38d. Rendimiento: 84,4%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,75-7,77 (d, 2H, J = 7,5 Hz), 7,27-7,26 (d, 2H, J = 7,5 Hz), 7,23 (s, 1H), 5,62 (br, 1H), 4,87 (br, 1H), 4,30 (br, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,78 (t, J = 10,0 Hz, 1H), 3,48-3,4 (m, 1H), 3,25 (s, 3H), 1,42 (s, 9H). MS (ESI) m/z 402,1 (M+Na)⁺, 378,0 (M-H)⁻.

4-(4-(3,4,5-Trimetoxibenzoil)thiazol-2-il)bencilcarbamoato de *terc*-butilo (68a). Una mezcla de 67a (2,5 mmoles), CBrCl₃ (3,2 mmoles) y DBU (5,0 mmoles) en CH₂Cl₂ (20 mL) se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se absorbió en gel de sílice y se purificó por cromatografía de columna para dar un intermedio de amida de Weinreb de tiazol. A una disolución de bromuro de (3,4,5-trimetoxifenil)magnesio (0,5 M, 5,5 mL) en THF se añadió una disolución del intermedio de amida de Weinreb de tiazol (1,83 mmoles) en 10 mL de THF a 0°C y se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro como un sólido amarillo claro (32,3%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,27 (s, 1H), 7,98 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,78 (s, 2H), 7,39 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,27-7,26 (d, 2H, J = 7,5 Hz), 7,23 (s, 1H), 4,93 (br, 1H), 4,37 (br, d, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 6H), 1,47 (s, 9H); MS (ESI) m/z 507,1 (M+Na)⁺.

Hidrocloreto de (2-(4-(aminometil)fenil)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2r o 2r-HCl). A 0°C, se añadió a una disolución de 68a (200 mg) en 10 mL de CH₂Cl₂ una disolución de HCl en 1,4-dioxano (4 N, 2 mL) y se agitó a TA durante 4 h. El precipitado (2r) se filtró y se lavó con dietiléter. Rendimiento: 81,3%. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,68 (s, 1H), 8,38 (br, 3H), 8,10 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,66 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,62 (s, 2H), 4,11 (s, 2H), 3,87 (s, 6H), 3,80 (s, 3H). MS (ESI) m/z 385,1 (M+H)⁺.

Hidrocloreto de (2-(4-((dimetilamino)metil)fenil)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2u o 2u-HCl) [Figura 5]

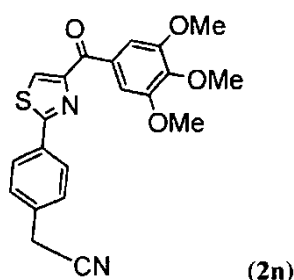


Metil(4-(4-(3,4,5-trimetoxibenzoil)thiazol-2-il)bencil)carbamoato de *terc*-butilo (71a). A 0°C, a una disolución de compuesto 68a (100 mg, 0,2 mmoles) en 5 mL de DMF se añadió hidruro sódico (10 mg, 0,2 mmoles), después se añadió yodometano (77 mg, 0,4 mmoles) a la mezcla de reacción y se agitó a TA toda la noche. La mezcla se desactivó con una disolución de NaHCO₃ saturado, se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener compuesto 71a puro. Rendimiento: 61,3%. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,30 (s, 1H), 8,02 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,82 (s, 2H), 7,36 (br, 2H), 4,50 (s, 2H), 4,00 (s, 3H), 3,98 (s, 6H), 2,90 (d, br, 3H), 1,50 (s, 9H). MS (ESI) m/z 521,2 (M+Na)⁺, 496,9 (M-H)⁻.

Hidrocioruro de (2-(4-((metilamino)metil)fenil)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2s o 2s-HCl). A 0°C, a una disolución de 71a (60 mg) en 5 mL de CH₂Cl₂ se añadió una disolución de HCl en 1,4-dioxano (4 N, 2 mL) y se agitó a TA durante toda la noche. El precipitado (2s-HCl) se filtró y se lavó con dietiléter. Rendimiento: 81,3%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,0 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,05 (d, 2H, J = 6,0 Hz), 7,74 (s, 2H), 7,72 (d, 2H, J = 6,0 Hz), 4,15 (s, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,96 (s, 6H), 2,61 (s, 3H). MS (ESI) m/z 399,1 (M+H)⁺.

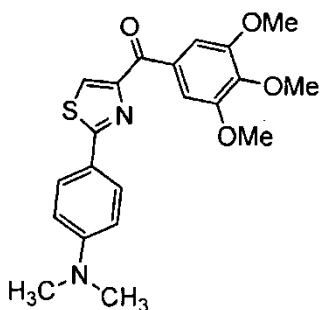
Hidrocioruro de (2-(4-((dimetilamino)metil)fenil)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2u o 2u-HCl). A una disolución de 2r (53 mg, 0,14 mmoles) en 5 mL de CH₂Cl₂ se añadió disolución de formaldehído (37% en H₂O, 340 mg, 4,2 mmoles) y cianoborohidruro sódico (34 mg, 0,55 mmoles), la mezcla de reacción se absorbió en gel de sílice y la base libre se purificó después de columna rápida (41 mg, 70,9%). A 0°C, a una disolución de base libre (41 mg) en 5 mL de CH₂Cl₂ se añadió una disolución de HCl en 1,4-dioxano (4 N, 2 mL) y se agitó a TA durante toda la noche. El precipitado (2u) se filtró y se lavó con dietiléter. Rendimiento: 71,3%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 13,0 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,13 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 7,82 (d, 2H, J = 7,5 Hz), 7,75 (s, 2H), 4,24 (s, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,97 (s, 6H), 2,83 (s, 6H). MS (ESI) m/z 413,1 (M+H)⁺.

2-(4-(4-(3,4,5-Trimetoxibenzoil)tiazol-2-il)fenil)acetonitrilo (2n)



2-(4-(4-(3,4,5-Trimetoxibenzoil)tiazol-2-il)fenil)acetonitrilo (2n) se preparó usando el mismo método como se usó en el compuesto 1h a partir de tereftalonitrilo y cisteína. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,30 (s, 1H), 8,04 (d, 2H), 7,76 (s, 2H), 7,46 (d, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,95 (s, 6H), 3,83 (s, 2H).

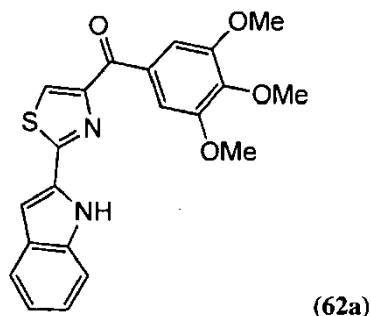
Síntesis de (2-(4-(dimetilamino)fenil)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2o)



(2-(4-(Dimetilamino)fenil)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (2o) se preparó usando el mismo método que se usó del compuesto 1h a partir de 4-(dimetilamino)benzonitrilo y cisteína. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,12 (s, 1H), 7,88 (d, 2H), 7,80 (s, 2H), 6,73 (d, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 6H), 3,05 (s, 6H); MS (ESI) m/z 421,1 (M+Na)⁺.

Anillo A de indolilo

Síntesis de (2-(1H-indol-2-il)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (62a) [Figura 5]

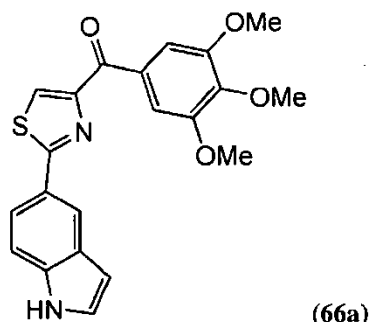


1*H*-Indol-2-carbonitrilo (60a). A una disolución enfriada de ácido indol-2-carboxílico (2,0 g, 12,4 mmoles) en 60 mL de Et₂O anhidro se añadieron 1,9 mL de SOCl₂ (26 mmoles). Después de agitar durante 40 min a TA, el éter se eliminó a presión reducida a una temperatura que no excedía de 35°C. El cloruro de acilo obtenido se disolvió en 40 mL de Et₂O anhidro y la disolución resultante se añadió inmediatamente a una disolución agitada de amoníaco líquido en 80 mL de Et₂O. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 24 h. El disolvente se evaporó entonces a presión reducida, y la indol-2-carboxamida blanca se cristalizó a partir de EtOH acuoso al 50% y se secó al aire, después de lo cual se disolvió en POCl₃ y se calentó a reflujo durante 5 min. La disolución enfriada se vertió en hielo picado y NH₄OH acuoso para mantener un pH básico. La mezcla acuosa se extrajo con Et₂O, los extractos se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron. El indol-2-carbonitrilo 60a marrón (63,3% de rendimiento total desde ácido indol-2-carboxílico) se obtuvo. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,56 (br, s, 1H), 7,68 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,43-7,34 (m, 2H), 7,24-7,21 (m, 2H). MS (ESI) m/z 144,0 (M+H)⁺, 140,8 (M-H)⁻.

(*R*)-2-(1*H*-indol-2-il)-*N*-metoxi-*N*-metil-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida (61a) se sintetizó usando el mismo método como se usa de 38d. 67,1% de rendimiento. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,06 (s, br, 1H), 7,64 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,36-7,24 (m, 2H), 7,12 (dt, 1H, J = 8,1 Hz, 1,2 Hz), 6,95 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 5,60 (t, br, 1H, J = 8,7 Hz), 3,86 (s, 3H), 3,78 (t, 1H, J = 10,2 Hz), 3,58 (dd, 1H, J = 9,0 Hz, 10,2 Hz), 3,30 (s, 3H). MS (ESI) m/z 312,1 (M+Na)⁺, 287,9 (M-H)⁻.

(2-(1*H*-Indol-2-il)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (62a) se sintetizó a partir de 61a usando el mismo método como se usó para 35a. 45,8% de rendimiento. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,26 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,66 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,46 (s, 2H), 7,42 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,29 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,16 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,10 (s, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,93 (s, 6H). MS (ESI) m/z 417,1 (M+Na)⁺, 392,9 (M-H)⁻.

Síntesis de (2-(1*H*-indol-5-il)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (66a) [Figura 5]

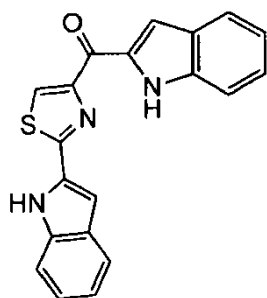


Ácido (*R*)-2-(1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol-5-il)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico (64a). Se sintetizó ácido (*R*)-2-(1*H*-indol-5-il)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico 63a usando el mismo método como se usó para 42a a partir de 1*H*-indol-5-carbonitrilo y se usó sin purificación adicional. A una disolución de agitación vigorosa de 63a (1 mmol) y sulfato de hidrógeno y tetrabutilamonio (0,15 mmoles) en tolueno (10 mL) a 0°C se añadió hidróxido sódico acuoso al 50% (10 mL) y cloruro de sulfonilo (2 mmoles). La disolución resultante se agitó a TA durante 6 h. Después se añadió HCl 1N para acidular la mezcla a pH=2 y se extrajo con CH₂Cl₂, la fase orgánica se separó y se secó (MgSO₄); después se evaporó hasta sequedad para proporcionar 64a, que se usaron en etapas posteriores sin purificación adicional.

(*R*)-*N*-metoxi-*N*-metil-2-(1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol-5-il)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxamida (65a) se preparó a partir de 64a con el mismo método como se usó para 38d. 57,1% de rendimiento. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,92 (m, 2H), 7,77 (m, 3H), 7,51 (d, 1H, J = 3,0 Hz), 7,46 (t, 1H), 7,35 (t, 1H), 6,61 (d, 1H), 5,58 (br, t, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,73 (t, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,21 (s, 3H). MS (ESI) m/z 452,1 (M+Na)⁺.

(2-(1*H*-indol-5-il)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (66a). A una disolución de *n*-BuLi (1,6 M, 1,7 mL) en 8 mL de THF se añadió una disolución de 3,4,5-trimetoxibromobenceno (2,47 mmoles) en 3 mL de THF a -78°C. La mezcla se dejó agitar durante 2 h y se cargó una disolución de amida de Weinreb 65a (1,24 mmoles) en 3 mL de THF. La temperatura se dejó aumentar a TA y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar un producto en bruto, que se puso a reflujo en NaOH 1 N en 5 mL de disolución de etanol para obtener el compuesto 66a desprotegido y se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro como un sólido amarillo claro (36,3%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,36 (br, s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,92, 7,89 (dd, 1H, J = 1,8, 2,7 Hz), 7,46 (d, 1H), 7,62 (s, 2H, J = 8,7 Hz), 7,29 (t, 1H, J = 2,7 Hz), 6,64 (br, 1H), 3,97 (s, 6H), 3,97 (s, 3H); MS (ESI) m/z 417,1 (M+Na)⁺, 392,9 (M-H)⁻.

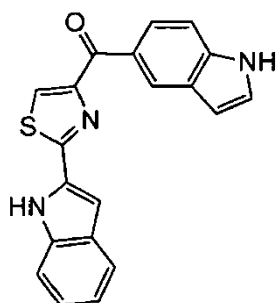
Síntesis de (2-(1*H*-indol-2-il)tiazol-4-il)(1*H*-indol-2-il)metanona (8).



(8)

(2-(1*H*-Indol-2-il)thiazol-4-il)(1*H*-indol-2-il)metanona (8) se preparó usando el método similar como se usó del compuesto 1h a partir de ácido 2-(1*H*-indol-2-il)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico y cisteína. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 9,39 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,03 (dd, 1H), 7,66 (d, 1H), 7,51 (d, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,29 (d, 1H), 7,15 (t, 1H), 7,09 (d, 1H), 6,72 (s, 1H). MS (ESI) m/z 366,1 (M+Na)⁺, 341,9 (M-H)⁻.

Síntesis de (2-(1*H*-indol-2-il)thiazol-4-il)(1*H*-indol-5-il)metanona (21).



(21)

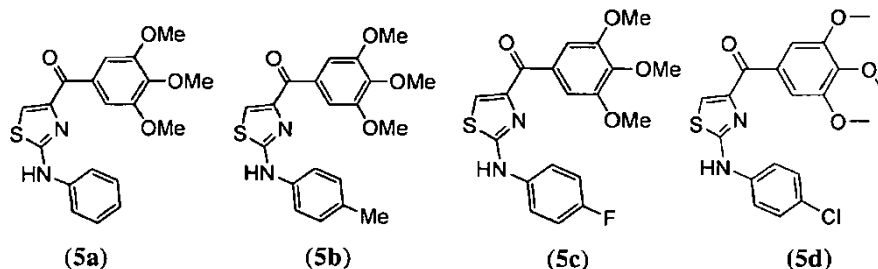
(2-(1*H*-Indol-2-il)thiazol-4-il)(1*H*-indol-5-il)metanona (21) se preparó usando el método similar como se usa del compuesto 1h a partir de ácido 2-(1*H*-indol-2-il)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico y cisteína. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 9,60 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,83 (dd, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,53-7,49 (m, 2H), 7,41 (t, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,21-7,18 (m, 2H), 7,13 (s, 1H). MS (ESI) m/z 366,1 (M+Na)⁺, 341,9 (M-H)⁻.

Ejemplo 4

Síntesis de compuestos de esta invención que tienen un conector de nitrógeno (X=NH)

Para mejorar la biodisponibilidad, se introdujo un conector NH entre los anillos de fenilo A y tiazol B. Esta nueva serie de compuestos se sintetizó como se muestra en la Figura 6. La reacción de etiléster de ácido 3-bromo-2-oxopropanoico y ariltiurea en etanol a 65°C produjo ácidos 2-(arilamino)-tiazol-4-carboxílicos 73a-d con altos rendimientos. Estos ácidos se convirtieron a amidas de Weinreb 74a-d, seguido por reacciones con 3,4,5-trimetoxifenil-litio que proporcionó bases libres unidas a anilina 5a-d, que puede convertirse en sales de HCl 5Ha-d.

Síntesis de derivados de (2-(fenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5a-d) y su sal de HCl [Figura 6]

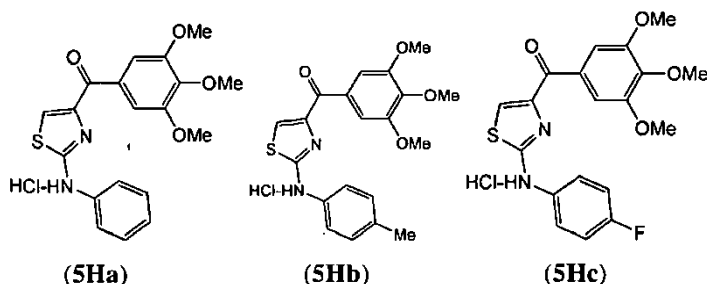


(5a)

(5b)

(5c)

(5d)



Procedimiento general para la síntesis de ácidos 2-(arilamino)tiazol-4-carboxílicos (37a-d). Se disolvieron *N*-ariltiourea (0,01 moles) y bromopiruvato de etilo (0,011 moles) en 3 mL de etanol y se mantuvo a reflujo durante 2 h. La reacción se enfrió, se recogieron los 2-(fenilamino sustituido)tiazol-4-carboxilatos de etilo cristalinos por filtración y se lavaron con etanol. Poner a reflujo la mezcla de ésteres de etilo con la disolución de NaOH-etanol dio los compuestos finales 73a-d que se usaron directamente en las siguientes etapas.

N-Metoxi-*N*-metil-2-(arilamino)tiazol-4-carboxamidas (74a-d) se sintetizaron usando el mismo método que se usó para 38d (véase el Ejemplo 1, Figura 2).

N-Metoxi-*N*-metil-2-(fenilamino)tiazol-4-carboxamida (74a). 90,2% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,39 (s, 2H), 7,38 (br, 1H), 7,36-7,33 (m, br, 4H), 7,09 (t, br, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,43 (s, 3H), 2,33 (s, 3H). MS (ESI) m/z 286,0 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

N-Metoxi-*N*-metil-2-(*p*-tolilamino)tiazol-4-carboxamida (74b). 93,3% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,35 (s, 1H), 7,31 (br, 1H), 7,22 (d, 2H), 7,16 (d, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,42 (s, 3H), 2,33 (s, 3H). MS (ESI) m/z 278,0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2-(4-Fluorofenilamino)-*N*-metoxi-*N*-metiltiazol-4-carboxamida (74c). 89,7% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,36 (s, 1H), 7,36-7,31 (m, 2H), 7,07-7,04 (m, 6H), 3,76 (s, 3H), 3,42 (s, 3H). MS (ESI) m/z 282,0 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 280,8 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

2-(4-Clorofenilamino)-*N*-metoxi-*N*-metiltiazol-4-carboxamida (74d). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,66 (s, br, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,34 (d, 2H), 7,29 (d, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,42 (s, 3H). MS: 295,8 ($\text{M}-1$) $^-$; 320,0 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Procedimiento general para la síntesis de (2-(arilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanonas (5a-d). A -78°C , a una disolución de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno (1,235 g, 5,0 mmoles) en 30 mL de THF se cargó *n*-BuLi en hexano (2,5 N, 2,4 mL, 6 mmoles) en protección de Ar_2 y se agitó durante 10 min. Se añadió la amida de Weinreb 74a-d (1 mmol) en 10 mL de THF al reactivo de litio y se dejó agitar a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se desactivó con NH_4Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto (5a-d) puro.

(2-(Fenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5a). 33,3% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,4 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,68 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,31 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 6,98 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 3,83 (s, 6H), 3,78 (s, 3H). MS (ESI) m/z 393,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 368,9 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

(2-(*p*-Tolilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5b). 40,6% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,48 (s, 1H), 7,47 (s, 2H), 7,30 (br, 1H), 7,27 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,17 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 3,93 (s, 3H), 3,90 (s, 6H), 2,34 (s, 3H). MS (ESI) m/z 385,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 382,9 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

(2-(*p*-Fluorofenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5c). 39,6% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,52 (br, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,45 (s, 2H), 7,40-7,37 (q, 2H, $J = 4,5$ Hz), 7,08-7,04 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 3,93 (s, 3H), 3,89 (s, 6H). MS (ESI) m/z 389,3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 386,9 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

(2-((4-Clorofenil)amino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5d) se preparó usando el mismo método como se usó para 5a a partir de 1-(4-clorofenil)tourea y bromopiruvato de etilo. Punto de fusión: $165-166^\circ\text{C}$. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,60 (s, br, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,47 (s, 2H), 7,38 (d, 2H), 7,31 (d, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,89 (s, 6H). MS: 402,9 ($\text{M}-1$) $^-$; 427,0 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Procedimiento general para la síntesis de sales de hidrocloreto (5Ha-c). A 0°C , a una disolución de compuesto 5a-c (0,1 mmoles) en 5 mL de CH_2Cl_2 se añadió una disolución de HCl en 1,4-dioxano (4 N, 2 mL) y se agitó a TA durante toda la noche. Los precipitados 5Ha-c se recogieron y se lavaron con dietiléter.

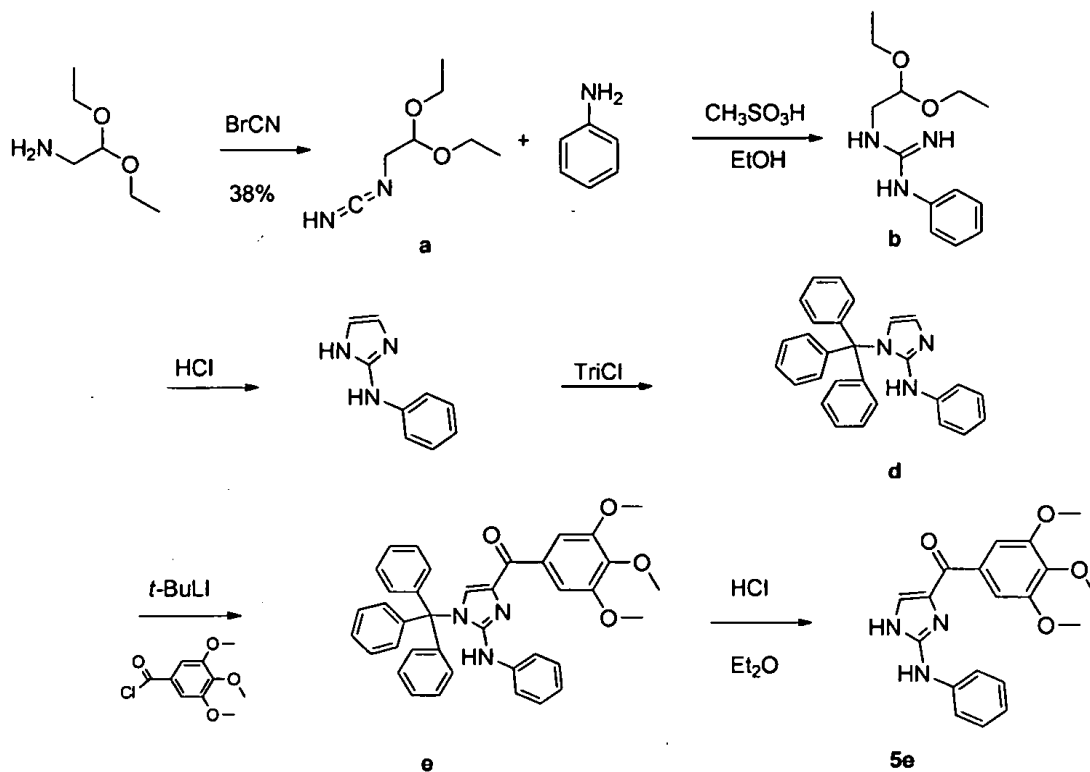
Sal de hidrocloreto de (2-(fenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5Ha). 91,6% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,9 (br, 1H), 7,49-7,46 (m, 2H), 7,42-7,40 (m, 2H), 7,37-7,34 (m, br, 2H), 7,11 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,92 (s, 6H). MS (ESI) m/z 389,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Sal de hidrocloreto de (2-(*p*-tolilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5Hb). 39,6% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,30-7,25 (m, br, 5H), 7,12 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,92 (s, 6H), 2,38 (s, 3H). MS (ESI) m/z 389,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

5 Sal de hidrocloreto de (2-(*p*-fluorofenilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5Hc). 89,3% de rendimiento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 10,55 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,72-7,69 (q, 2H, $J = 4,5$ Hz), 7,50 (s, 2H), 7,18-7,15 (t, 2H, $J = 8,5$ Hz), 4,30 (br, 1H), 3,82 (s, 6H), 3,78 (s, 3H). MS (ESI) m/z 389,3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

El siguiente compuesto (5e) es un ejemplo de referencia.

Síntesis de (2-(fenilamino)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5e)



10 Esquema 1: preparación del compuesto 5e.

2,2-Dietoxi-*N*-(iminometilen)etanamina (a). Una disolución de dietilacetal de aminoacetaldehído (5,32 g, 40 mmoles) en éter (20 mL) se añadió a una suspensión de CNBr (4,22 g, 40 mmoles) en hexano (20 mL) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA toda la noche. El sólido se eliminó por filtración y se lavó con éter. El filtrado combinado se concentró. La cromatografía rápida del residuo concentrado proporcionó 2,82 g (45%) de la *N*-(2,2-dietoxietil)carbodiimida (a). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): 4,58 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,85 (br s, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,16 ($J = 5,5$ Hz, 2H), 1,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). MS: 156,8 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$; 180,9 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

1-(2,2-Dietoxietil)-3-fenilguanidina (b). Se disolvió anilina (1,66 g, 17,8 mmoles) en etanol (25 mL), y *N*-(2,2-dietoxietil)carbodiimida (a), (2,82 g, 17,8 mmoles), se añadió en gotas. Después se añadió ácido metanosulfónico (1,71 g, 17,8 mmoles), y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción se vertió en NaOH (0,5 M) y se extrajo con CH_2Cl_2 . El secado y la concentración proporcionó un producto que se sometió a cromatografía rápida para dar el intermedio guanidina (b) (3,3 g, 73,8%). ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,27-6,90 (m, 5H), 4,55 (t, 1H), 3,76-3,70 (m, 2H), 3,60-3,54 (m, 2H), 3,35-3,34 (d, 2H), 1,22 (pent, 6H). MS: 249,8 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$; 252,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

25 *N*-Fenil-1*H*-imidazol-2-amina (c). La guanidina (b) se disolvió en HCl (5 mL, 6 M) a 0°C y después se agitó durante 2 h. Después de consumirse el material de partida, se añadió NaOH (25%) hasta que se formó precipitado. Esta mezcla se agitó durante 30 min. La reacción se vertió entonces en NaOH (0,5 M), se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó y se concentró. La cromatografía rápida proporcionó (c) (0,95 g, 50%). ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,58 (s, br, 1H), 7,34-6,74 (m, 5H), 6,68 (s, 2H), 6,62 (br, 2H), 3,82 (s, 6H), 3,73 (s, 3H). MS: 157,6 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$; 160,0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

30 *N*-Fenil-1-tritil-1*H*-imidazol-2-amina (d). Se añadió cloruro de tritilo (2,79 g, 10 mmoles) a una disolución enfriada con hielo de fenilaminoimidazol (c) (1,59 g, 10 mmoles) y trietilamina (1,01 g, 10 mmoles) en dicloruro de metileno (50 mL). La mezcla de reacción se dejó calentar a TA y se agitó toda la noche. La mezcla se diluyó con dicloruro de

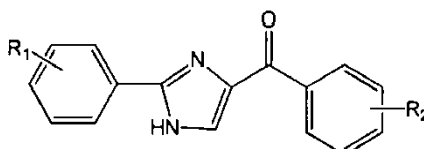
metileno, se lavó sucesivamente con H₂O, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó con MgSO₄. La filtración y la evaporación del disolvente seguido por separación por cromatografía dio el producto (d). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,52-7,35 (m, 5H), 7,28-7,43 (m, 15H), 6,85 (s, 2H), 6,41 (s, 1H), 6,08 (s, 1H). MS: 1399,8 (M-H)⁻; 402,8 (M+H)⁺.

5 (2-(Fenilamino)-1-tritil-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (e). A -78°C, se añadió *t*-BuLi en THF (1,7 M, 0,34 mL, 0,58 mmoles) a una disolución de compuesto (d) protegido por tritilo (116 mg, 0,289 mmoles) en THF. Después se añadió cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (66,5 mg, 0,289 mmoles) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se desactivó con NH₄Cl saturado, y se secó con MgSO₄. La filtración y la evaporación del disolvente seguido por cromatografía proporcionó el compuesto (e) (75 mg, 43,7%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,55-7,41 (m, 5H), 7,32 (s, 1H), 7,28-7,18 (m, 15H), 6,94 (s, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,70 (s, 3H). MS: 594,2 (M-H)⁻; 596,3 (M+H)⁺.

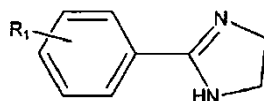
10 (2-(Fenilamino)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5e). A una disolución de compuesto (e) protegido con tritilo (50 mg, 0,084 mmoles) en etiléter se añadió HCl 2M en éter (1 mL, 1 mmol). La mezcla de reacción se agitó toda la noche y se lavó con NaHCO₃ saturado y se secó con MgSO₄. La filtración y la evaporación del disolvente seguido por cromatografía rápida para proporcionar la desprotección de compuesto 5e (18 mg, 63%). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,54 (s, br, 1H), 7,51-7,43 (m, 3H), 7,33 (d, 2H), 7,04 (s, 2H), 6,62 (br, 2H), 3,82 (s, 6H), 3,73 (s, 3H). MS: 352,1 (M-H)⁻; 354,3 (M+H)⁺.

Ejemplo de referencia 5

Síntesis de compuestos de aril-benzoil-imidazol seleccionados

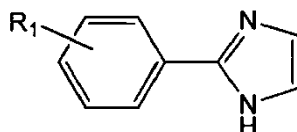


Preparación de 2-aril-4,5-dihidro-1*H*-imidazoles 14b, 14c, 14x (Figura 7).



20 A una disolución de benzaldehído 8(b, c, x) apropiado (60 mmoles) en *t*-BuOH (300 mL) se añadió etilendiamina (66 mmoles) y se agitó durante 30 min a TA. Se añadieron carbonato de potasio (75 mmoles) y yodo (180 mmoles) a la mezcla de reacción de forma secuencial seguido por la agitación a 70°C durante 3 h. Se añadió sulfito sódico (Na₂SO₃) y la mezcla se extrajo mediante cloroformo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (cloroformo:metanol 20:1) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 50-60%.

Preparación de 2-aril-1*H*-imidazoles (9a-j, p, x; Figuras 7 y 8).

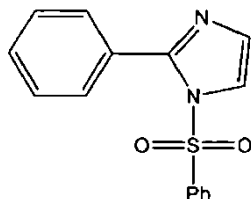


30 Método A (esencial solo para 9b, 9x Figura 7): A una disolución de 2-aril-4,5-dihidro-1*H*-imidazol 14b, x (35 mmoles) en DMSO (100 mL) se añadió carbonato de potasio (38,5 mmoles) y diacetoxiyodobenceno (38,5 mmoles). La mezcla de reacción se agitó toda la noche en la oscuridad. Se añadió agua seguido por extracción con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 3:2) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 30%-50%.

35 Método B (esencial solo para 9c; Figura 7): A una disolución de 2-aril-4,5-dihidro-1*H*-imidazol 14c (50 mmoles) en DMF (70 mL) se añadió DBU (55 mmoles) y CBrCl₃ (55 mmoles). La mezcla de reacción se agitó toda la noche y se añadió una disolución de NaHCO₃ (acuosa) saturada seguido por la extracción con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía de columna rápida (cloroformo:metanol 50:1) para proporcionar un sólido blanco. Rendimiento: 7%.

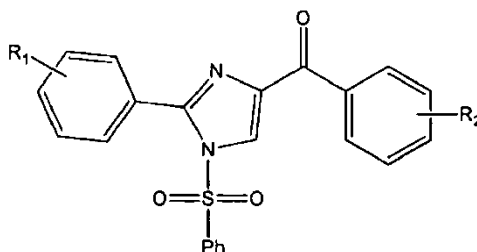
40 Método C (esencial para 9a, 9d-j, 9p; Figura 8): A una disolución de benzaldehído (8a, 8d-j, 8p) apropiada (100 mmoles) en etanol (350 mL) a 0°C se añadió una disolución de oxalaldehído al 40% en agua (12,8 mL, 110 mmoles) y una disolución de 29% de hidróxido de amonio en agua (1000 mmoles, 140 mL). Después de agitar durante 2-3 días a TA, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se sometió a cromatografía de columna rápida con diclorometano como eluyente para dar el compuesto del título como un polvo amarillo. Rendimiento: 20%-40%.

Preparación de 2-aril-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazoles (10a-j, p, x; Figuras 7 y 8).



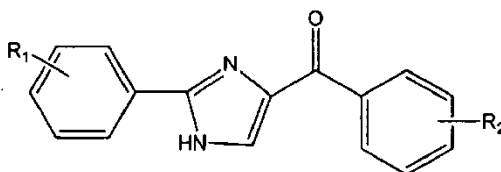
A una disolución de 2-aril-1*H*-imidazol 9a-j, p, x (20 mmoles) en THF anhidro (200 mL) a 0°C se añadió hidruro sódico (60% de dispersión en aceite mineral, 1,2 g, 30 mmoles) y se agitó durante 30 min. Se añadió cloruro de benceosulfonilo (2,82 mL, 22 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó toda la noche. Después de la dilución mediante 100 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturado, la mezcla de reacción se extrajo mediante acetato de etilo (500 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 2:1) para dar un sólido pálido. Rendimiento: 50%-70%.

Preparación de aril (2-aril-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)metanonas (11aa-ai, ba, ca, cb, da, db, ea, eb, fa, fb, ga, gb, ha, hb, ia, ib, ja, jb, pa; Figuras 7 y 8).



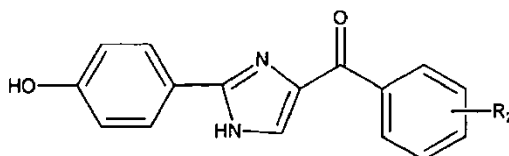
A una disolución de 2-aril-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol (6,0 mmoles) 10a-j, p, x en THF anhidro (30 mL) a -78°C se añadió *tert*-butil-litio 1,7 M en pentano (5,3 mL, 9,0 mmoles) y se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de benzoilo sustituido apropiado (7,2 mmoles) a -78°C y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con 100 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturado y se extrajo mediante acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 4:1) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 15%-40%.

Procedimiento general para la preparación de aril (2-aril-1*H*-imidazol-4-il)metanonas (12aa-ai, ba, ca, cb, da, db, ea, eb, fa, fb, ga, gb, ha, hb, ia, ib, ja, jb, pa; Figuras 7 y 8).



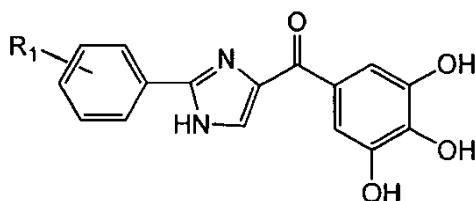
A una disolución de aril (2-aril-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)metanonas (2,0 mmoles) 11aa-ai, ba, ca, cb, da, db, ea, eb, fa, fb, ga, gb, ha, hb, ia, ib, ja, jb, pa en THF (20,0 mL) se añadió fluoruro de tetrabutilamonio 1,0 M (4,0 mmoles) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó mediante 50 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturado y se extrajo mediante acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 3:1) o se recrystalizó a partir de agua y metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 80-95%.

Preparación de (2-(4-hidroxifenil)-1*H*-imidazol-4-il)(aril)metanonas (12ka, 12kb; Figura 8).



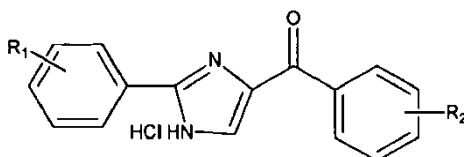
A una disolución de (2-(4-(benciloxi)fenil)-1*H*-imidazol-4-il)(aril)metanona 12ja o 12jb, (1 mmol) en AcOH (20 mL) se añadió HCl concentrado (2 mL) y se puso a refluxo toda la noche. Después de eliminar el disolvente, el residuo se recrystalizó a partir de diclorometano para dar el compuesto del título con un sólido amarillo. Rendimiento: 70-85%.

Preparación de (2-aril-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trihidroxifenil)metanonas 13ea, 13fa, 13ha (Figura 8).



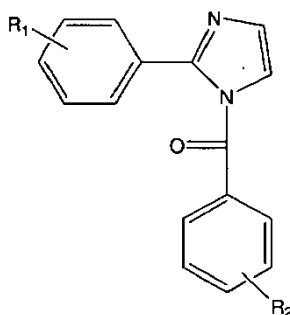
A una disolución de aril (2-aril-1*H*-imidazol-4-il)metanona 12ea, 12fa o 12ha (0,5 mmoles) en CH₂Cl₂ (6,0 mL) se añadió 1,0 M de BBr₃ (2 mmoles) en CH₂Cl₂ y se agitó durante 1 h a TA. Se añadió agua para destruir el exceso de BBr₃. El sólido precipitado se filtró y se recrystalizó a partir de MeOH para proporcionar un sólido amarillo.

Preparación de sal de HCl de aril (2-aril-1*H*-imidazol-4-il)metanona (12db-HCl).



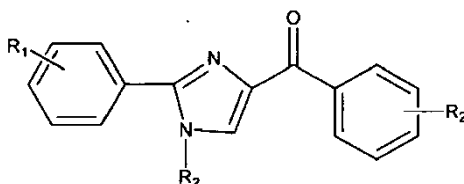
A una disolución de 12db (0,5 mmoles) en metanol (20 mL) se añadió disolución 2 M de cloruro de hidrógeno (5 mmoles) en etiléter y se agitó toda la noche a TA. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se lavó mediante CH₂Cl₂ para dar el compuesto del título. Rendimiento: 95%.

Preparación de aril (2-fenil-1*H*-imidazol-1-il)metanona (12aba, 12aaa; Figura 9).



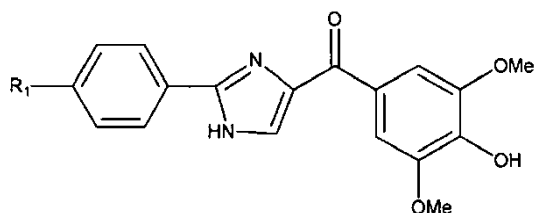
A una disolución de 2-fenil-1*H*-imidazol 9a (10 mmoles) en THF (20 mL) se añadió NaH (15 mmoles) y cloruro de benzoilo sustituido (12 mmoles) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó toda la noche y se diluyó mediante disolución de NaHCO₃ saturado seguido por extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (cloroformo) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 12-16%.

Preparación de 1-sustituido-(2-fenil-1*H*-imidazol-1-il)-aril-metanona (12dc, 12fc, 12daa, 12dab, 12cba, 11gaa, 12la; Figuras 10-11).



La síntesis de 12dc, 12fc y 12daa, 12dab y 12cba se resume en la Figura 10. Los compuestos 12da, 12cb y 12fa se sintetizaron según la síntesis descrita anteriormente y en las Figuras 7 y 8. El tratamiento de 12da y 12fa con cloruro de aluminio proporcionó los 12dc, 12fc *para*-desmetilados con el 3,5-dimetoxi estando intacto. El compuesto 12daa se preparó por bencilación de la posición N-1 de 12da. Mientras la metilación de la posición N-1 de 12da y 12cb proporcionó compuestos 12dab y 12cba, respectivamente.

Síntesis de 12dc, 12fc, 12daa, 12dab, 12cba: método D (para 12dc y 12fc) [Figura 10]:

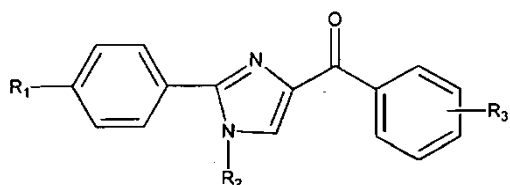


R1 = CH₃ (12dc)

R1 = Cl (12fc)

- 5 A una disolución de 12da y 12fa (200 mg) en THF (20 mL) se añadió cloruro de aluminio (10 equiv). La mezcla de reacción se agitó toda la noche. Se añadió agua seguido por extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 1:1) para dar un sólido blanco-amarillento. Rendimiento: 60%-80%.

Síntesis de 12daa, 12dab, 12cba, Método E: [Figura 10]:



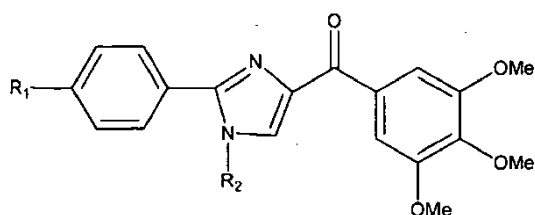
- 10 R₁=Me; R₂=Bn; R₃=3,4,5-(OMe)₃ (12daa)

R₁=Me; R₂=CH₃; R₃=3,4,5-(OMe)₃ (12dab)

R₁=OMe; R₂=CH₃; R₃=F (12cba)

- 15 A una disolución de 12da y 12cb (100 mg) en THF (10 mL) en un baño de hielo se añadió hidruro sódico (1,2 equiv.) seguido por la adición de yoduro de metilo (para 12dab, 12cba) o bromuro de bencilo (para 12daa) (2 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó durante 5 h en condiciones de reflujo. Después de la dilución mediante 50 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturado, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 2:1) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 50%-98%.

Síntesis de 11gaa y 12la (Figura 11):



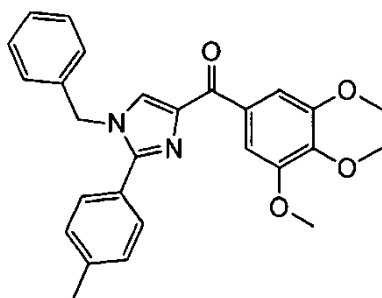
20

R₁=N(Me)₂; R₂=(4-OMe)PhSO₂ (11gaa)

R₁=Br; R₂= H (12la)

- 25 Los compuestos de benzaldehído sustituido 8(l, g) se convirtieron a compuestos 9(l, g) en presencia de hidróxido de amonio y glicoxal para construir la estructura de imidazol. Los anillos de imidazol de los compuestos 9(l, g) se protegieron mediante un grupo fenilsulfonilo apropiado seguido por acoplamiento con cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo para conseguir el compuesto 11(la, gaa). El tratamiento de 11la con fluoruro de *tert*-butilamonio para eliminar el grupo protector proporcionó 12la.

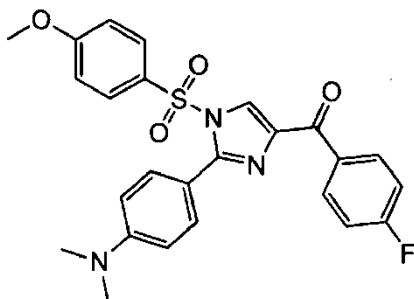
Caracterización estructural de (1-bencil-2-(*p*-tolil)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12daa) (Figura 11)



(12daa)

Rendimiento: 92,8%; pf 135-137°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7,81 (s, 1H), 7,80 (d, J = 6,5 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,41-7,45 (m, 3H), 7,31-7,33 (m, 2H), 7,20 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 5,33 (s, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,98 (s, 6H), 2,47 (s, 3H). MS (ESI) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ 442,2, encontrado 443,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HPLC1: t_R 4,28 min, pureza >99%.

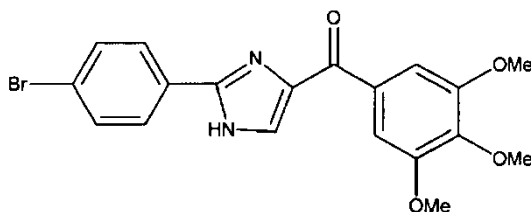
Caracterización estructural de (2-(4-(dimetilamino)fenil)-1-((4-metoxifenil)sulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12gba).



(12gba)

Rendimiento: 34,1%; pf 147-149°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8,07 (q, J = 8,5 Hz, 5,5 Hz 2H), 7,78 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,23 (t, J = 8,5 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 6,68 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,08 (s, 3H). MS (ESI) calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$ 479,1, encontrado 502,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HPLC2: t_R 18,6 min, pureza 96,9%.

Síntesis de (2-(4-bromofenil)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12la) (Figura 11)



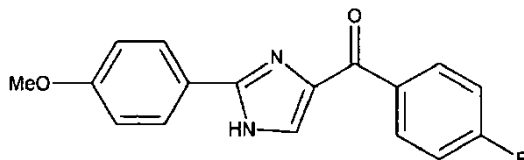
15 Síntesis de 9l, 9g: A una disolución de benzaldehído apropiado (8l y 8g, 100 mmoles) en etanol (400 mL) a 0°C se añadió una disolución de oxalaldehído (gloxal) al 40% en agua (1,1 equiv.) y una disolución de 29% de hidróxido de amonio en agua (10 equiv.). Después de agitar durante 2-3 días a TA, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se sometió a cromatografía de columna rápida con diclorometano como eluyente para proporcionar el compuesto del título como un polvo amarillo. Rendimiento: 10%-30%.

20 Síntesis de 10la, 10gb: A una disolución de imidazoles (9l, 9g) (10 mmoles) en THF anhidro (200 mL) a 0°C se añadió hidruro sódico (60% de dispersión en aceite mineral, 1,2 equiv.) y se agitó durante 20 min. Se añadió cloruro de 4-metoxibencenosulfonilo (para 10gb) o cloruro de bencenosulfonilo (para otros) (1,2 equiv) y la mezcla de reacción se agitó toda la noche. Después de dilución mediante 200 mL de disolución (acuosa) de NaHCO_3 saturada, la mezcla de reacción se extrajo mediante acetato de etilo (600 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 2:1) para dar un sólido pálido. Rendimiento: 40%-95%.

30 Síntesis de 11la, 11gaa: A una disolución de 2-aril-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol (10la, 10gb) (5,0 mmoles) en THF anhidro (30 mL) a -78°C se añadió *tert*-butil-litio 1,7 M en pentano (1,2 equiv) y se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (1,2 equiv.) a -78°C y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con 100 mL de disolución (acuosa) de NaHCO_3 saturada y se extrajo mediante acetato de etilo (300 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 3:1) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 5%-45%.

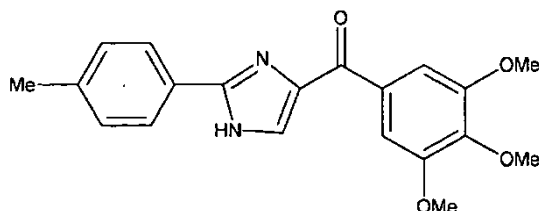
Síntesis de 12la: A una disolución de aril (2-aril-1-(fenilsulfonyl)-1H-imidazol-4-il)metanona (11la, 2,0 mmoles) en THF (25,0 mL) se añadió de fluoruro de tetrabutilamonio 1,0 M (2 equiv) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó mediante 60 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada y se extrajo por acetato de etilo (150 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 4:1) o se recrystalizó a partir de agua y metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 80-98%.

Síntesis de (4-fluorofenil)(2-(4-metoxifenil)-1H-imidazol-4-il)metanona (12cb) (Figura 7).



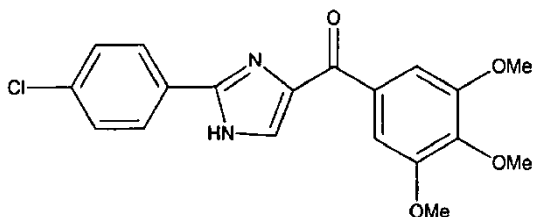
A una disolución de (4-fluorofenil)(2-(4-metoxifenil)-1-(fenilsulfonyl)-1H-imidazol-4-il)metanona (11cb, 872 mg, 2,0 mmoles) en THF (20,0 mL) se añadió fluoruro de tetrabutilamonio 1,0 M (4,0 mL, 4,0 mmoles) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó mediante 50 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada y se extrajo por acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se recrystalizó a partir de agua y metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 90%; pf 245-247°C.

Síntesis de (2-(p-tolil)-1H-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12da) (Figura 8).



A una disolución de (1-(fenilsulfonyl)-2-(p-tolil)-1H-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11da, 492 mg, 1,0 mmoles) en THF (15,0 mL) se añadió fluoruro de tetrabutilamonio 1,0 M (2,0 mL, 2,0 mmoles) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó mediante 30 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada y se extrajo por acetato de etilo (80 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se recrystalizó desde agua y metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 88,5%.

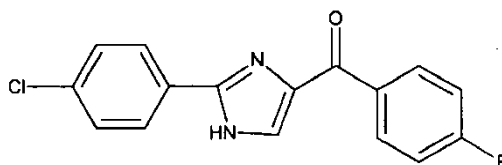
Síntesis de (2-(4-clorofenil)-1H-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12fa) (Figuras 8 y 14).



2-(4-Clorofenil)-1H-imidazol (9f): A una disolución de 4-clorobenzaldehído (8f) (100 mmoles) en etanol (350 mL) a 0°C se añadió una disolución de oxalaldehído al 40% en agua (12,8 mL, 110 mmoles) y una disolución de hidróxido de amonio al 29% en agua (1000 mmoles, 140 mL). Después de agitar durante 2-3 días a TA, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se sometió a cromatografía de columna rápida con diclorometano como eluyente para proporcionar el compuesto del título como un polvo amarillo. Rendimiento: 19,8%. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (br, 1H), 7,94 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,51(d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,27 (s, 1H), 7,03 (s, 1H). MS (ESI): calculado para C₉H₇ClN₂, 178,0, encontrado 178,9 [M+H]⁺.

2-(4-Clorofenil)-1-(fenilsulfonyl)-1H-imidazol (10f): A una disolución de 2-(4-clorofenil)-1H-imidazol (9f) (20 mmoles) en THF anhidro (200 mL) a 0°C se añadió hidruro sódico (60% de dispersión en aceite mineral, 1,2 g, 30 mmoles) y se agitó durante 30 min. Se añadió cloruro de bencenosulfonyl (2,82 mL, 22 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó toda la noche. Después de la dilución mediante 100 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada, la mezcla de reacción se extrajo mediante acetato de etilo (500 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 2:1) para dar un sólido pálido. Rendimiento. 54,9%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,65 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,58 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,38 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 7,34-7,36 (m, 4H), 7,12 (d, J = 1,5 Hz, 1H). MS (ESI): calculado para C₁₅H₁₁ClN₂O₂S, 318,0, encontrado 341,0 [M+Na]⁺.

- 5 (2-(4-Clorofenil)-1(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11fa): A una disolución de 2-(4-clorofenil)-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol (10f) (6,0 mmoles) en THF anhidro (30 mL) a -78°C se añadió *tert*-butil-litio 1,7 M en pentano (5,3 mL, 9,0 mmoles) y se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (7,2 mmoles) a -78°C y se agitó durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluye con 100 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada y se extrajo por acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 4:1) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 36,8%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,05 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,77 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,62 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,48 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 7,39 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,37 (s, 2H). MS (ESI): calculado para C₂₅H₂₁ClN₂O₆S, 512,1, encontrado 513,1 [M+H]⁺.
- 10 (2-(4-Clorofenil)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12fa): A una disolución de (2-(4-clorofenil)-1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11fa) (2,0 mmoles) en THF (20,0 mL) se añadió fluoruro de tetrabutilamonio 1,0 M (4,0 mmoles) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó mediante 50 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada y se extrajo por acetato de etilo (100 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 3:1) o se recrystalizó a partir de agua y metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 80-95%. Rendimiento: 36,9%; pf 193-195°C. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,75 (br, 1H), 7,96 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,83 (s, 1H), 7,47 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 7,23 (s, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,94 (s, 6H), 2,43 (s, 3H). MS (ESI): calculado para C₁₉H₁₇ClN₂O₄, 372,1, encontrado 395,1 [M+Na]⁺, 370,9 [M-H]⁻. Gradiente de HPLC: Disolvente A (agua) y Disolvente B (metanol): 0-15 min 40-100% de B (gradiente lineal), 15-25 min 100% de B; t_R 16,36 min, pureza >99%.
- 15
- 20 Síntesis de (2-(4-Clorofenil)-1*H*-imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12fb) (Figura 8).



- 25 A una disolución de (2-(4-clorofenil)-1(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (11fb, 440 mg, 1,0 mmoles) en THF (12,0 mL) se añadió fluoruro de tetrabutilamonio 1,0 M (2,0 mL, 2,0 mmoles) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó mediante 20 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada y se extrajo por acetato de etilo (60 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se recrystalizó desde agua y metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 83,7%.

Caracterización fisicoquímica de compuestos e intermedios de aril-benzoil-imidazol

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol (9a)	Rendimiento: 36,8 %. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12,52 (br, 1 H), 7,95 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2 H), 7,44 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,34 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1H), 7,25-7,27 m, 1 H), 7,04 - 7,07 (m, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₉ H ₈ N ₂ , 144,1, encontrado 167,1 [M + Na] ⁺ .
2-(4-fluorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9b)	Rendimiento: 56,5 %. ¹ H RMN (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12,46 (br, 1 H), 7,94-7,99 (m, 2 H), 7,24-7,30 (m, 2 H), 7,00- 7,03 (m, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₉ H ₇ FN ₂ , 162,1, encontrado 163 [M + H] ⁺ , 160,6 [M - H] ⁻ .
2-(4-metoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9c)	Rendimiento: 22,2 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,80 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 2 H), 7,15 (s, 2 H), 3,86 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O, 174,1, encontrado 175 [M + H] ⁺ , 172,8 [M - H] ⁻ .
2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol (9d)	Rendimiento: 36,1 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,64 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,16 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,12 (s, 1 H), 7,02 (s, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₁₀ H ₁₀ N ₂ , 158,1, encontrado 159,0 [M + H] ⁺ , 156,8 [M - H] ⁻ .
2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9e)	Rendimiento: 26,0%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,26 (s, 2 H), 7,08 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 2 H), 3,86 (s, 3 H), 3,82 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃ , 234,1, encontrado 234,9 [M + H] ⁺ .
2-(4-clorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9f)	Rendimiento: 19,8 %. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13,60 (br, 1 H), 7,94 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,51 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,27 (s, 1 H), 7,03 (s, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₉ H ₇ ClN ₂ , 178,0, encontrado 178,9 [M + H] ⁺ .

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
4-(1 <i>H</i> -imidazol-2-il)- <i>N,N</i> -dimetilanilina (9g)	Rendimiento: 16,5 %. ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 7,70 (dd, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2,0 Hz, 2 H), 7,10 (s, 2 H), 6,75 (dd, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2,0 Hz, 2 H), 3,02 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₁ H ₁₃ N ₃ , 187,1, encontrado 187,9 [M + H] ⁺ , 185,8 [M - H] ⁻ .
2-(3,4-dimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9h)	Rendimiento: 22,0 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,52 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,27-7,28 (m, 1 H), 7,14 (s, 2 H), 6,88 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 3,91 (s, 3 H), 3,87 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ , 204,1, encontrado 205,1 [M + H] ⁺ , 202,8 [M - H] ⁻ .
2-(2-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9i)	Rendimiento: 25,5 %. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12,31 (br, 1 H), 7,84 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,76 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,65 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,16 (br, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₀ H ₇ F ₃ N ₂ , 212,1, encontrado 212,9 [M + H] ⁺ , 210,7 [M - H] ⁻ .
2-(4-(benciloxi)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9j)	Rendimiento: 12,1 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,77 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,36-7,47 (m, 5 H), 7,10-7,18 (m, 2 H), 7,06 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 5,13 (s, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O, 250,1, encontrado 251,1 [M + H] ⁺ , 248,8 [M - H] ⁻ .
2-(4-Bromofenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9l)	Rendimiento: 19,5%. ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 12,59 (s, 1 H), 7,87 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 2 H), 7,64 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1 H), 7,27 (s, 1 H), 7,04 (s, 1 H). MS (ESI) calculado para C ₉ H ₇ BrN ₂ 222,0, encontrado 222,8 [M + H] ⁺ .
2-(4-(Trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9p)	Rendimiento: 26,2 %; ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,03 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,66 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,25 (s, 2 H). MS (ESI) calculado para C ₁₀ H ₇ F ₃ N ₂ 212,1, encontrado 213,1 [M + H] ⁺ .
2-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -imidazol (9x)	Rendimiento: 53,7 %. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12,97 (br, 1 H), 8,32 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 8,17 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,42 (s, 1 H), 7,17 (s, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₉ H ₇ N ₃ O ₂ , 189,1, encontrado 189,9 [M + H] ⁺ , 187,8 [M - H] ⁻ .
2-fenil-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol (10a)	Rendimiento: 50,3 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,64-7,67 (m, 1 H), 7,56 (t, <i>J</i> = 9,0 Hz, 1 H), 7,32-7,48 (m, 9 H), 7,12-7,16 (m, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ S, 284,1, encontrado 307,1 [M + Na] ⁺ .
2-(4-fluorofenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol (10b)	Rendimiento: 56,9 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,66 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,58 (t, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1 H), 7,36-7,42 (m, 6 H), 7,12 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,06 (t, <i>J</i> = 10,0 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₅ H ₁₁ FN ₂ O ₂ S, 302,1, encontrado 300,8 [M - H] ⁻ .
2-(4-metoxifenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol (10c)	Rendimiento: 40,9 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,62 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1 H), 7,56 (tt, <i>J</i> = 15,0 Hz, 5,0 Hz, 1 H), 7,32-7,43 (m, 6 H), 7,10 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1 H), 6,88 (dt, <i>J</i> = 16,0 Hz, 6,0 Hz, 2 H), 3,87 (s; 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₃ S, 314,1, encontrado 337,1 [M + Na] ⁺ , 312,9 [M - H] ⁻ .
1-(fenilsulfonil)-2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol (10d)	Rendimiento: 46,6%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,63 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,55 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,42 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,35 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,27-7,29 (m, 2 H), 7,16 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,10 (s, 1 H), 2,41 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S, 298,1, encontrado 321,1 [M + Na] ⁺ .
1-(fenilsulfonil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol (10e)	Rendimiento: 55,7%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,68 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,55 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1 H), 7,42 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,35 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,11 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 2 H), 6,60 (s, 1 H), 3,90 (s, 3 H), 3,79 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₅ S, 374,1, encontrado 397,1 [M + Na] ⁺ .
2-(4-clorofenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol (10f)	Rendimiento: 54,9%. ¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,65 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,58 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,43 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,38 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,34-7,36 (m, 4 H), 7,12 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂ S, 318,0, encontrado 341,0 [M + Na] ⁺ .
<i>N,N</i> -dimetil-4-(1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-2-il) anilina (10g)	Rendimiento: 48,3%. ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 7,59 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,55 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,45 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,28-7,38 (m, 4 H), 7,07 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 6,68 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 3,04 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₂ S, 327,10, encontrado 350,0 [M + Na] ⁺ , 325,9 [M - H] ⁻ .

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
4-(1-((4-Metoxifenil)sulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)- <i>N,N</i> -dimetilanilina (10gb)	Rendimiento: 61,5 %. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,58 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,36 (t, <i>J</i> = 8,43 Hz, 4 H), 7,03 – 7,09 (m, 1 H), 6,80 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 6,69 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2 H), 3,84 (s, 3 H), 3,05 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₂ S, 327,1, encontrado 358,2 [M + Na] ⁺ .
2-(3,4-dimetoxifenil)-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol (10h)	Rendimiento: 60,3%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,64 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1 H), 7,55 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,40 (dd, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1,5 Hz, 2 H), 7,35 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,09 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,02 (dd, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2,0 Hz, 1 H), 6,89 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 6,86 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 3,95 (s, 3 H), 3,81 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₄ S, 344,10, encontrado 367,0 [M + Na] ⁺ .
1-(fenilsulfonyl)-2-(2-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol (10i)	Rendimiento: 58,6%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,64-7,67 (m, 2 H), 7,61-7,63 (m, 3 H), 7,40-7,46 (m, 5 H), 7,16 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂ S, 352,10, encontrado 353,1 [M + H] ⁺ .
2-(4-(benciloxi)fenil)-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol (10j)	Rendimiento: 62,0%; pf 102 - 104°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,56 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,46 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,20-7,40 (m, 11 H), 7,03 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1H), 6,89 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 5,08 (s, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S, 390,10, encontrado 413,1 [M + Na] ⁺ . HPLC2: t _R 18,22 min, pureza 95,9%.
2-(4-Bromofenil)-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol (10la)	Rendimiento: 61,2%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,71 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,64 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1 H), 7,57 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,49 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2 H), 7,45 (t, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,34 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,18 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H). MS (ESI) calculado para C ₁₅ H ₁₁ BrN ₂ O ₂ S 362,0, encontrado 363,0 [M + H] ⁺ .
1-(Fenilsulfonyl)-2-(4-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol (10p)	Rendimiento: 36,7 %; ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,75 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,69 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,65 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,60 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,48 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,43 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,22 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H). MS (ESI) calculado para C ₁₆ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂ S 352,1, encontrada 553,1 [M + H] ⁺ .
2-(4-nitrofenil)-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol (10x)	Rendimiento: 50%; pf 145 - 147°C. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,28 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 8,03 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,78 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,64-7,68 (m, 4H), 7,60 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,30 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H). MS (ESI): calculada para C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₄ S, 329,10, encontrado 352,0 [M + Na] ⁺ , 327,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 14,87 min, pureza 98,8%.
(4-metoxifenil)(2-fenil-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (11ab)	Rendimiento: 26,3%; pf 118 - 120°C. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,37 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 8,15-8,18 (m, 2 H), 8,12 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,56-7,64 (m, 5 H), 7,46-7,50 (m, 3 H), 7,16 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 3,90 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₄ S, 418,10, encontrado 419,1 [M + H] ⁺ . HPLC2: t _R 17,72 min, pureza 95,7%.
(3-metoxifenil)(2-fenil-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (11ac)	Rendimiento: 31,2%; pf 136 - 138°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,35 (s, 1 H), 7,86 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,72 (s, 1 H), 7,60 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,51 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,35-7,42 (m, 9H), 7,14 (dd, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2,0 Hz, 1 H), 3,88 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₄ S, 418,10, encontrado 419,1 [M + H] ⁺ . HPLC2: t _R 17,72 min, pureza 95,7%.
(2-fenil-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(<i>p</i> -tolil)metanona (11ah)	Rendimiento: 28,9%; pf 108 - 110°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,00 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,98 (q, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1,5 Hz, 2 H), 7,91 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,81 (s, 1 H), 7,44-7,48 (m, 3 H), 7,35-7,40 (m, 2 H), 7,30 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,20 (s, 2 H), 2,42 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₃ S, 402,10, encontrado 403,1 [M + H] ⁺ . HPLC2: t _R 16,06 min, pureza 96,2%.
(4-fluorofenil)(2-fenil-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (11af)	Rendimiento: 25,4%; pf 114 - 116°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,10 (q, <i>J</i> = 3,5 Hz, 5,5 Hz, 2 H), 7,88 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,67 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,48 – 7,54 (m, 3 H), 7,38 – 7,41 (m, 5 H), 7,24 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H). MS (ESI): calculada para C ₂₂ H ₁₅ FN ₂ O ₃ S, 406,10, encontrado 429,1 [M + Na] ⁺ . HPLC2: t _R 15,43 min, pureza 96,1%.
(3-fluorofenil)(2-fenil-1-(fenilsulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (11ag)	Rendimiento: 18,3%; pf 102 - 104°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,14 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,76 – 7,87 (m, 3 H), 7,74 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 1 H), 7,37 – 7,57 (m, 10 H), 7,38 – 7,41 (m, 5 H), 7,24 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₂₂ H ₁₅ FN ₂ O ₃ S, 406,10, encontrado 429,1 [M + Na] ⁺ . HPLC2: t _R 15,75 min, pureza 96,5%.

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
(4-fluorofenil)(2-(4-metoxifenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (11cb)	Rendimiento: 23,5%; pf 135 - 137°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,00 (d, <i>J</i> = 5,5 Hz, 2 H), 7,74 – 7,76 (m, 2 H), 7,54-7,58 (m, 1 H), 7,40 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2 H), 7,28-7,30 (m, 3 H), 7,14 – 7,16 (m, 2 H), 6,80-6,82 (m, 2 H), 3,80 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₃ H ₁₇ FN ₂ O ₄ S, 436,10, encontrado 459,0 [M + Na] ⁺ , 434,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 16,53 min, Pureza 96,1%.
(1-(fenilsulfonil)-2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11da)	Rendimiento: 33,8%; ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,00 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,70 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,55 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,44 (s, 2 H), 7,34 (s, 2H), 7,31 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,21 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 4,00 (s, 3 H), 3,98 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₆ S, 492,14, encontrado 515,2 [M + Na] ⁺ .
(4-fluorofenil)(1-(fenilsulfonil)-2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (11db)	Rendimiento: 18,6%; pf 142 - 144°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,07 (q, <i>J</i> = 8,5 Hz, 5,5 Hz, 2 H), 7,88 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,64 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,49 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,38 (s, 1H), 7,30 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,18 – 7,24 (m, 4 H), 2,43 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₃ H ₁₇ FN ₂ O ₃ S, 420,10, encontrado 443,0 [M + Na] ⁺ , 418,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 17,28 min, pureza 97,3%.
(1-(fenilsulfonil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11ea)	Rendimiento: 21,1%; pf 135 - 137°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,91 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,65 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,51 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,44 (s, 1 H), 7,34 (s, 2 H), 6,60 (s, 2 H), 3,98 (s, 3 H), 3,96 (s, 6 H), 3,91 (s, 3 H), 3,73 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₂₈ H ₂₈ N ₂ O ₉ S, 568,2, encontrado 569,2 [M + H] ⁺ . HPLC1: t _R 17,86 min, pureza 98,9%.
(4-fluorofenil)(1-(fenilsulfonil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (11eb)	Rendimiento: 18,8%; pf 135 - 137°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,11 (q, <i>J</i> = 5,5 Hz, 3,0 Hz, 1 H), 8,00 - 8,03 (m, 1 H), 7,82 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,78 (s, 1 H), 7,64 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1 H), 7,48 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,42 (s, 1 H), 7,21 – 7,26 (m, 4 H), 6,62 (s, 1 H), 3,98 (s, 3 H), 3,96 (s, 6 H), 3,93 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₅ H ₂₁ FN ₂ O ₆ S, 496,10, encontrado 497,1 [M + H] ⁺ . HPLC2: t _R 15,26 min, pureza 98%.
(2-(4-clorofenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (11fb)	Rendimiento: 36,8%; pf 153 - 155°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,06 (q, <i>J</i> = 5,5 Hz, 3,0 Hz, 2 H), 7,89 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,68 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,52 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,34-7,38 (m, 5H), 7,23 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₂₂ H ₁₄ ClFN ₂ O ₃ S, 440,0, encontrado 463,0 [M + Na] ⁺ . HPLC2: t _R 17,72 min, pureza 97,38%.
(2-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11ga)	Rendimiento: 32,2%; pf 157 - 159°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,89 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,62 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,48 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,43 (s, 1 H), 7,32 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,30 (s, 2H), 6,62 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,97 (s, 3 H), 3,95 (s, 6 H), 3,05 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₂₇ H ₂₇ N ₃ O ₆ S, 521,2, encontrado 544,1 [M + Na] ⁺ , 519,8 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 16,00 min, pureza 97,9%.
(2-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (11gb)	Rendimiento: 38,5%; pf 125 - 127°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,04 (q, <i>J</i> = 5,5 Hz, 3,5 Hz, 2 H), 7,80 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,61 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,45 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,39 (s, 1 H), 7,35 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,21 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 6,62 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,05 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₂₄ H ₂₀ FN ₃ O ₃ S, 449,10, encontrado 472,1 [M + Na] ⁺ , 447,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 16,85 min, pureza 96,5%.
(2-(3,4-dimetoxifenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11ha)	Rendimiento: 28,6%; pf 136 - 138°C. ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 7,92 (dd, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1,5 Hz, 2 H), 7,66 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,51 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,43 (s, 1 H), 7,33 (s, 2 H), 7,02 (dd, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2,0 Hz, 1 H), 6,91 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 6,86 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 3,98 (s, 3 H), 3,96 (s, 9 H), 3,77 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₈ S, 538,10, encontrado 561,1 [M + Na] ⁺ , 536,8 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 14,67 min, pureza 98,2%.
(2-(3,4-dimetoxifenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (11hb)	Rendimiento: 31,9%; pf 144 - 145°C. ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 8,09 (q, <i>J</i> = 5,5 Hz, 3,5 Hz, 2 H), 7,81 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,62 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,48 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,40 (s, 1 H), 7,21-7,25 (m, 2 H), 7,04 (dd, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2,0 Hz, 1 H), 6,92 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 6,86 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 3,96 (s, 3 H), 3,79 (s, 6 H). MS (ESI): calculada para C ₂₄ H ₁₉ FN ₂ O ₅ S, 466,10, encontrado 489,1 [M + Na] ⁺ , 464,8 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 15,52 min, pureza 97,4%.

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
(1-(fenilsulfonil)-2-(2-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11ia)	Rendimiento: 25,0%; pf 155 - 157°C. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 7,91 (d, <i>J</i> =8,0 Hz, 1 H), 7,84 (q, <i>J</i> =7,5 Hz, 5,0 Hz, 2 H), 7,77-7,80 (m, 2 H), 7,75 (s, 2 H), 7,66 (t, <i>J</i> =8,0 Hz, 2 H), 7,56 (d, <i>J</i> =7,5 Hz, 1 H), 7,18 (s, 2 H), 3,87 (s, 6 H), 3,81 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₆ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₆ S, 546,10, encontrado 569,0 [M + Na] ⁺ . HPLC2: <i>t</i> _R 16,16 min, pureza 98,9%.
(1-(fenilsulfonil)-2-(2-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (11ib)	Rendimiento: 25,0%; pf 151 - 153°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,03 (q, <i>J</i> =5,5 Hz, 3,0 Hz, 2 H), 7,90 (d, <i>J</i> =8,0 Hz, 2 H), 7,80 (d, <i>J</i> =8,0 Hz, 1 H), 7,69 (q, <i>J</i> =7,0 Hz, 6,5 Hz, 2 H), 7,61 (t, <i>J</i> =8,0 Hz, 1 H), 7,52 (t, <i>J</i> =8,0 Hz, 2 H), 7,34 - 7,36 (m, 2 H), 7,23 (t, <i>J</i> =8,5 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₂₃ H ₁₄ F ₄ N ₂ O ₃ S, 474,10, encontrado 497,0 [M + Na] ⁺ . HPLC2: <i>t</i> _R 16,80 min, pureza 98,2%.
(2-(4-(benciloxi)fenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (11jb)	Rendimiento: 22,3,0%; pf 149 - 151°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,09 (q, <i>J</i> =5,5 Hz, 3,5 Hz, 2 H), 7,82 (d, <i>J</i> =7,5 Hz, 2 H), 7,63 (t, 7,5 Hz, 1 H), 7,36-7,50 (m, 10 H), 7,25 (t, <i>J</i> =8,5 Hz, 2 H), 6,98 (d, <i>J</i> =8,0 Hz, 2 H), 5,17 (s, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₂₉ H ₂₁ FN ₂ O ₄ S, 512,10, encontrado 535,0 [M + Na] ⁺ . HPLC2: <i>t</i> _R 18,35 min, pureza 95,1%.
(2-(4-bromofenil)-1-(fenilsulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11la)	Rendimiento: 32,6% ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,06 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,88 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 7,77 (t, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1 H), 7,54-7,63 (m, 4 H), 7,31-7,36 (m, 4 H), 4,04 (s, 3 H), 4,01 (s, 6 H). MS (ESI) calculado para C ₂₅ H ₂₁ BrN ₂ O ₆ S 556,0, encontrado 557,0 [M + H] ⁺ .
(1-(fenilsulfonil)-2-(4-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11pa)	Rendimiento: 36,7%; ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,06 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,78 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,72 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,62 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,59 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,50 (s, 1 H), 7,37 (s, 2 H), 4,04 (s, 3 H), 4,02 (s, 6 H). MS (ESI) calculado para C ₂₆ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₆ S 546,1, encontrado 547,1 [M+H] ⁺ .
(2-(4-(dimetilamino)fenil)-1-((4-metoxifenil)sulfonil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (11gaa)	Rendimiento: 34,1%; pf 147-149°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,07 (q, <i>J</i> = 8,5 Hz, 5,5 Hz, 2 H), 7,78 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,41 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,39 (s, 1 H), 7,23 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 6,91 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 6,68 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,89 (s, 3 H), 3,08 (s, 3 H). MS (ESI) calculado para C ₂₈ H ₂₉ N ₃ O ₇ S 551,2, encontrado 573,1 [M + Na] ⁺ . HPLC2: <i>t</i> _R 18,6 min, pureza 96,9%.
(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12aa)	Rendimiento: 10,1 %; pf 227-229°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,0-8,03 (m, 2 H), 7,83 (s, 1 H), 7,34-7,38 (m, 3 H), 7,21 (s, 2 H), 3,90 (s, 3 H), 3,84 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O, 338,1, encontrado 337,1 [M - H] HPLC2: <i>t</i> _R 14,19 min, pureza 96,3%.
(4-metoxifenil)(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12ab)	Rendimiento: 16,6%; pf 179 - 181°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 11,1 (br, 1 H), 8,07-8,10 (m, 2 H), 8,04 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,84 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,49-7,51 (m, 3 H), 7,07 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,95 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ , 278,10, encontrado 279,0 [M + H] ⁺ . HPLC1: <i>t</i> _R 15,14 min, pureza > 99%.
(3-metoxifenil)(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12ac)	Rendimiento: 22,5 %; pf 160 - 162°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 11,2 (br, 1 H), 8,10-8,12 (m, 2 H), 7,87 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,61 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,48 - 7,52 (m, 5 H), 7,21 (dd, <i>J</i> = 2,5 Hz, 8,5 Hz, 1 H), 3,91 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ , 278,10, encontrado 279,0 [M + H] ⁺ . HPLC2: <i>t</i> _R 15,07 min, pureza > 99%.
(3,5-dimetoxifenil)(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12ad)	Rendimiento: 26,2%; pf 168 - 170°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,04-8,06 (m, 2 H), 7,88 (s, 1 H), 7,50-7,52 (m, 3 H), 7,15 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2 H), 6,75 (t, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 3,89 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ , 308,10, encontrado 331,1 [M + Na] ⁺ , 306,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 15,59 min, pureza > 99%.
(3,4-dimetoxifenil)(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12ae)	Rendimiento: 18,6%; pf 162 - 164°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,9 (br, 1 H), 8,05 (dd, <i>J</i> = 1,5 Hz, 8,0 Hz, 2 H), 7,86 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,74 (dd, <i>J</i> = 2,0 Hz, 8,5 Hz, 1 H), 7,56 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,50-7,52 (m, 3 H), 7,04 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 4,03 (s, 3 H), 3,99 (s, 3 H). MS (ESI): calculada para C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ , 308,10, encontrado 331,1 [M + Na] ⁺ , 306,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 13,54 min, pureza > 99%.
(4-fluorofenil)(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12af)	Rendimiento: 30,2%; pf 231 - 233°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,6 (br, 1 H), 8,02-8,05 (m, 4 H), 7,81 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,51-7,54 (m, 3 H), 7,27 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₁ FN ₂ O, 266,10, encontrado 267,0 [M +H] ⁺ , 264,8 [M - H] ⁻ . HPLC1: <i>t</i> _R 15,37 min, pureza 98,9%.

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
(3-fluorofenil)(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12ag)	Rendimiento: 23,4%; pf 212 - 214°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,05 (dd, <i>J</i> = 1,5 Hz, 7,5 Hz, 2 H), 7,86 (s, 1 H), 7,84 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 1 H), 7,74 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 7,52-7,58 (m, 4 H), 7,37 (dt, <i>J</i> = 2,0 Hz, 6,0 Hz, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₁ FN ₂ O, 266,10, encontrado 267,0 [M + H] ⁺ , 264,8 [M - H] ⁻ . HPLC1: t _R 15,29 min, pureza > 99%.
(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(<i>p</i> -tolil)metanona (12ah)	Rendimiento: 15,6%; pf 225 - 227°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 11,1 (br, 1H), 8,08 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2 H), 7,93 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,84 (s, 1 H), 7,48-7,52 (m, 3 H), 7,38 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 2 H), 2,50 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O, 262,10, encontrado 263,0 [M + H] ⁺ , 260,8 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 15,86 min, pureza 98,7%.
(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(<i>m</i> -tolil)metanona (12ai)	Rendimiento: 20,5%; pf 168 - 169°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 11,0 (br, 1 H), 8,09-8,11 (m, 2 H), 7,84 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,81-7,82 (m, 2 H), 7,47-7,52 (m, 5 H), 2,50 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O, 262,10, encontrado 285,0 [M + Na] ⁺ , 260,8 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 15,89 min, pureza > 99%.
(2-(4-fluorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12ba)	Rendimiento: 12,2%. pf 176 - 178°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,72 (br, 1 H), 8,02 (q, <i>J</i> = 5,0 Hz, 2 H), 7,84 (s, 1 H), 7,19 (t, <i>J</i> = 10,0 Hz, 2 H), 4,00 (s, 6 H), 3,97 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₉ H ₁₇ FN ₂ O ₄ , 356,10, encontrado 379,1 [M + Na] ⁺ , 354,9 [M - H] ⁻ . HPLC1: t _R 17,23 min, pureza > 99%.
(2-(4-metoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12ca)	Rendimiento: 10,2%; pf 220 - 222°C. ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 10,24 (br, 1H), 7,93 (d, <i>J</i> = 14,5 Hz, 2 H), 7,81 (s, 1H), 7,24 (s, 2 H), 7,03 (d, <i>J</i> = 14,5 Hz, 2 H), 3,97 (s, 3 H), 3,95 (s, 6 H), 3,90 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₅ , 368,10, encontrado 391,0 [M + Na] ⁺ , 367,0 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 14,46 min, pureza 98,4%.
(4-fluorofenil)(2-(4-metoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12cb)	Rendimiento: 15,2%; pf 245 - 247°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,20 (br, 1 H), 7,93-7,96 (m, 2 H), 7,85 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 2 H), 7,68 (s, 1 H), 7,15-7,17 (m, 2 H), 6,95 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2 H), 3,82 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₃ FN ₂ O ₂ , 296,10, encontrado 319,1 [M + Na] ⁺ , 294,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 15,40 min, pureza 98,8%.
(2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12da)	Rendimiento: 48,5%; pf 201 - 203°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,40 (br, 1H), 7,88 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,82 (s, 1 H), 7,31 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,24 (s, 2 H), 3,96 (s, 3 H), 3,94 (s, 6 H), 2,43 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄ , 352,10, encontrado 375,2 [M + Na] ⁺ . HPLC2: t _R 15,45 min, pureza 97,4%.
(4-fluorofenil)(2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12db)	Rendimiento: 56,3%; pf 229 - 231°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,50 (br, 1 H), 7,99-8,02 (m, 2 H), 7,88 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,60 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,30 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,23 (t, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 2,43 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₃ FN ₂ O, 280,10, encontrado 281,0 [M + H] ⁺ , 278,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 16,31 min, pureza > 99%.
(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)(2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12dc)	Rendimiento: 56,8%; pf 220-222°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,02 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,91 (s, 1H), 7,39 (s, 2H), 7,28 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H), 4,00 (s, 6H), 2,44 (s, 3H). MS (ESI) calculado para C ₁₉ H ₁₈ FN ₂ O ₄ 338,1, encontrado 339,1 [M + H] ⁺ . HPLC1: t _R 3,91 min, pureza > 99%.
(3,4,5-trimetoxifenil)(2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12ea)	Rendimiento: 86,8%; pf 196 - 198°C. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13,3 (br, 0,47 H), 13,50 (br, 0,52 H), 8,19 (s, 0,49 H), 7,90 (s, 1 H), 7,83 (s, 0,5 H), 7,59 (s, 1 H), 7,40 (s, 1 H), 7,18 (s, 1 H), 3,89 (s, 6 H), 3,86 (s, 6 H), 3,77 (s, 3 H), 3,72 (s, 3 H). MS (ESI): calculada para C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₇ , 428,2, encontrado 451,1 [M + Na] ⁺ , 426,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 14,49 min, pureza > 99%.
(4-fluorofenil)(2-(3,4,5-trimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12eb)	Rendimiento: 90,2%; pf 153 - 155°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,42 (br, 1 H), 8,00 (q, <i>J</i> = 5,5 Hz, 3,0 Hz, 2 H), 7,76 (s, 1 H), 7,23 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,19 (s, 2 H), 3,94 (s, 3 H), 3,92 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₉ H ₁₇ FN ₂ O ₄ , 356,1, encontrado 379,0 [M + Na] ⁺ , 354,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 15,31 min, pureza > 99%.
(2-(4-clorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12fa)	Rendimiento: 36,9%; pf 193 - 195°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,75 (br, 1 H), 7,96 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,83 (s, 1 H), 7,47 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,23 (s, 2 H), 3,97 (s, 3 H), 3,94 (s, 6 H), 2,43 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄ , 372,1, encontrado 395,1 [M + Na] ⁺ , 370,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 16,36 min, pureza > 99%.

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
(2-(4-clorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12fb)	Rendimiento: 83,7%; pf 232 – 234°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,78 (br, 1 H), 8,00 (q, <i>J</i> = 5,5 Hz, 3,0 Hz, 2 H), 7,96 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,78 (s, 1 H), 7,47 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,24 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₀ ClFN ₂ O, 300,1, encontrado 323,0 [M + Na] ⁺ , 298,8 [M-H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 17,08 min, pureza > 99%.
(2-(4-clorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)metanona (12fc)	Rendimiento: 80,2%; pf 216-218°C. ¹ H RMN (500 MHz, CD ₃ OD) δ 8,06 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,99 (s, 1 H), 7,61 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,52 (s, 2 H), 4,01 (s, 6 H). MS (ESI) calculado para C ₁₈ H ₁₅ ClN ₂ O ₄ 358,1, encontrado 359,1 [M + H] ⁺ . HPLC2: <i>t</i> _R 4,12 min, pureza > 99%.
(2-(4-(dimetilamino)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12ga)	Rendimiento: 91,2%; pf 195 - 197°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,39 (br, 1 H), 7,87 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,80 (s, 1 H), 7,23 (s, 2 H), 6,75(d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,95 (s, 3 H), 3,94 (s, 6 H), 3,05 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₄ , 381,2, encontrado 404,2 [M + Na] ⁺ , 380,0 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 15,20 min, pureza 95,8%.
(2-(4-(dimetilamino)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12gb)	Rendimiento: 86,7%; pf 278 - 280°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,21 (br, 1 H), 7,98 (q, <i>J</i> = 5,0 Hz, 3,5 Hz, 2 H), 7,84 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,72 (s, 1 H), 7,20 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 6,76 (t, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,06 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₈ H ₁₆ FN ₃ O, 309,1, encontrado 332,1 [M + Na] ⁺ , 307,9 [M-H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 16,06 min, pureza 95,6%.
(2-(3,4-dimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12ha)	Rendimiento: 85,0%; pf 100 - 102°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,19 (br, 1 H), 7,81 (s, 1 H), 7,58 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,48 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,25 (s, 2 H), 6,97 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 4,00 (s, 3 H), 3,96 (s, 6 H), 3,95 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₆ , 398,2, encontrado 399,1 [M + H] ⁺ , 397,0 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 13,73 min, pureza > 99%.
(2-(3,4-dimetoxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12hb)	Rendimiento: 78,3%; pf 174 - 176°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,02 (t, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,75 (s, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 7,48 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 7,23 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 6,95 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H), 3,99 (s, 3 H), 3,96 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₈ H ₁₅ FN ₂ O ₃ , 326,1, encontrado 349,0 [M + Na] ⁺ 324,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 14,65 min, pureza > 99%.
(2-(2-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12ia)	Rendimiento: 83,8%; pf 75 - 77°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,37 (br, 1 H), 8,00-8,02 (m, 1 H), 7,87 (s, 1 H), 7,82-7,85 (m, 1 H), 7,69-7,74 (m, 1 H), 7,62-7,66 (m, 1 H), 7,25 (s, 2 H), 3,99 (s, 3 H), 3,98 (s, 6 H). MS (ESI): calculada para C ₂₀ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₄ , 406,1, encontrado 429,1 [M + Na] ⁺ , 405,0 [M-H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 13,98 min, pureza > 99%.
(4-fluorofenil)(2-(2-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12ib)	Rendimiento: 91,1%; pf 152 - 154°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,12-8,14 (m, 2 H), 7,97 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,82-7,85 (m, 2 H), 7,69 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1 H), 7,61 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,22 (t, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₀ F ₄ N ₂ O, 334,1, encontrado 357,1 [M + Na] ⁺ , 332,9 [M-H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 15,10 min, pureza > 99%.
(2-(4-(benciloxi)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12ja)	Rendimiento: 16,5%; pf 191 - 193°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 10,22 (br, 1 H), 7,93 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,81 (s, 1 H), 7,37-7,47 (m, 5 H), 7,24 (s, 2 H), 7,11 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 5,16 (s, 2 H), 3,97 (s, 3 H), 3,95 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₅ , 444,2, encontrado 467,1 [M + Na] ⁺ , 442,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 17,36 min, pureza 95,5%.
(2-(4-(benciloxi)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12jb)	Rendimiento: 84,7%; pf 212 - 214°C. ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 10,28 (br, 1 H), 7,99-8,04 (m, 2 H), 7,92-7,95 (m, 2 H), 7,76 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1 H), 7,38-7,48 (m, 5 H), 7,20-7,25 (m, 2 H), 7,09-7,12 (m, 2 H), 5,16 (s, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₂₃ H ₁₇ FN ₂ O ₂ , 372,1, encontrado 395,1 [M + Na] ⁺ . HPLC2: <i>t</i> _R 17,97 min, pureza 97,8%.
(2-(4-hidroxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12ka)	Rendimiento: 72,3%. pf 191-193°C. ¹ H RMN (500 MHz, CD ₃ OD) δ 8,31 (s, 1 H), 7,90 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,31 (s, 2 H), 7,05 (s, 2 H), 3,95 (s, 6 H), 3,88 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₅ , 354,1, encontrado 355,1 [M + H] ⁺ , 352,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 12,25 min, pureza 98,7%.
(2-(4-(hidroxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12kb)	Rendimiento: 89,0%; pf 276 - 278°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,31 (s, 1 H), 8,13 (q, <i>J</i> = 5,5 Hz, 3,0 Hz, 2 H), 7,93 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,38 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,07 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₁ FN ₂ O ₂ , 282,1, encontrado 283,0 [M + H] ⁺ , 280,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: <i>t</i> _R 13,46 min, pureza 97,65%.

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
(2-(4-bromofenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12la)	Rendimiento: 25,6%; pf 190-192°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,99 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,92 (s, 1 H), 7,70 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,32 (s, 2 H), 4,03 (s, 3 H), 4,00 (s, 6 H). MS (ESI) calculado para C ₁₉ H ₁₇ BrN ₂ O ₄ 416,0, encontrado 417,0 [M + H] ⁺ . HPLC2: t _R 4,24 min, pureza 98,8%.
(2-(4-(trifluorometil)fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12pa)	Rendimiento: 85,3%; pf 195 - 196°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,22 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,96 (s, 1 H), 7,83 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,34 (s, 2 H), 4,04 (s, 3 H), 4,00 (s, 6 H). MS (ESI) calculado para C ₂₀ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₄ 406,1; encontrado 407,1 [M + H] ⁺ , HPLC2: t _R 18,00 min, pureza >99%.
(2-fenil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12aaa)	Rendimiento: 39,8%; pf 113 - 115°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,53 (q, <i>J</i> = 5,0 Hz, 3,0 Hz, 2 H), 7,41 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,33-7,35 (m, 3 H), 7,23 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 7,03 (s, 2 H), 3,93 (s, 3 H), 3,85 (s, 6 H). MS (ESI): calculado para C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄ , 338,1, encontrado 339,1 [M + H] ⁺ . HPLC2: t _R 13,8 min, pureza 95,6%.
(4-metoxifenil)(2-fenil)-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metanona (12aba)	Rendimiento: 56,3%; pf 68 - 70°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,78 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,54-7,56 (m, 2 H), 7,32-7,34 (m, 4 H), 7,21 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1 H), 6,93 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 3,90 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ , 278,1, encontrado 301,0 [M + Na] ⁺ , 276,8 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 14,72 min, pureza 95,7%.
Sal de HCl de (4-fluorofenil)(2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12db-HCl)	Rendimiento: 95%; pf 115 - 117°C. ¹ H RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,20-8,23 (m, 2 H), 8,18 (s, 1 H), 8,04 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 2 H), 7,42 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,37 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2 H), 2,38 (s, 3 H). MS (ESI): calculado para C ₁₇ H ₁₄ FCIN ₂ O, 316,1, encontrado 281,0 [M - HCl + H] ⁺ . HPLC2: t _R 17,16 min, pureza >99%.
(4-fluorofenil)(2-(4-metoxifenil)-1-metil-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (12cba)	Rendimiento: 90,2%; pf 148-150°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,45 (q, <i>J</i> = 8,5 Hz, 5,5 Hz, 2 H), 7,79 (s, 1 H), 7,63 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,16 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,03 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,89 (s, 3 H), 3,82 (s, 3 H). MS (ESI) calculado para C ₁₈ H ₁₅ FN ₂ O ₂ 310,1, encontrado 311,0 [M + H] ⁺ . HPLC2: t _R 4,01 min, pureza 97,6%.
(1-bencil-2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12daa)	Rendimiento: 92,8%; pf 135-137°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,81 (s, 1 H), 7,80 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 2 H), 7,58 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2 H), 7,41-7,45 (m, 3 H), 7,31-7,33 (m, 2 H), 7,20 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2 H), 5,33 (s, 2 H), 3,99 (s, 3 H), 3,98 (s, 6 H), 2,47 (s, 3 H). MS (ESI) calculado para C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₄ 442,2, encontrado 443,1 [M + Na] ⁺ . HPLC1: t _R 4,28 min, pureza > 99%.
(1-metil-2-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (12dab)	Rendimiento: 87,4%; pf 110-112°C. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,87 (s, 2 H), 7,86 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1 H), 7,65 (d, <i>J</i> = 10 Hz, 2 H), 7,37 (d, <i>J</i> = 10 Hz, 2 H), 4,01 (s, 6 H), 4,00 (s, 3 H), 3,90 (s, 3 H). MS (ESI) calculado para C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄ 366,2, encontrado 367,2 [M + H] ⁺ . HPLC1: t _R 4,23 min, pureza > 99%.
(2-(4-(dimetilamino)fenil)-1-((4-metoxifenil)sulfonyl)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(4-fluorofenil)metanona (12gba)	Rendimiento: 34,1%; pf 147-149°C. ¹ H RMN (CDCl ₃ , 500 MHz) δ 8,07 (q, <i>J</i> = 8,5 Hz, 5,5 Hz, 2 H), 7,78 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,41 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,39 (s, 1 H), 7,23 (t, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 6,91 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 6,68 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,89 (s, 3 H), 3,08 (s, 3 H). MS (ESI) calculado para C ₂₅ H ₂₂ FN ₃ O ₄ S 479,1, encontrado 502,1 [M + Na] ⁺ . HPLC2: t _R 18,6 min, pureza 96,9%.
(3,4,5-trihidroxifenil)(2-(3,4,5-trihidroxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)metanona (13ea)	Rendimiento: 66,1%. pf 294 - 296°C. ¹ H RMN (500 MHz, CD ₃ OD) δ 8,07 (s, 1 H), 7,07 (s, 2 H), 7,02 (s, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₇ , 344,1, encontrado 345,0 [M + H] ⁺ , 342,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 3,62 min, pureza 97,9%.
(2-(4-clorofenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trihidroxifenil)metanona (13fa)	Rendimiento: 79,3%; pf > 300°C. ¹ H RMN (500 MHz, CD ₃ OD) δ 8,02 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,77 (s, 1 H), 7,54 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 7,14 (s, 2 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₁ ClN ₂ O ₄ , 330,0, encontrado 331,1 [M + Na] ⁺ , 328,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 11,9 min, pureza 95,6%.
(2-(3,4-dihidroxifenil)-1 <i>H</i> -imidazol-4-il)(3,4,5-trihidroxifenil)metanona (13ha)	Rendimiento: 62,2%; pf > 300°C. ¹ H RMN (500 MHz, CD ₃ OD) δ 8,11 (s, 1 H), 7,46 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1 H), 7,42 (dd, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2,0 Hz, 1 H), 7,10 (s, 2 H), 7,02 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 1 H). MS (ESI): calculado para C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₆ , 328,1, encontrado 329,0 [M + H] ⁺ , 326,9 [M - H] ⁻ . HPLC2: t _R 3,64 min, pureza 97,9%.
2-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol (14x)	Rendimiento: 70,3%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 8,30 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 7,98 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 3,88-3,95 (m, 4 H). MS (ESI): calculado para C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ , 191,10, encontrado 191,9 [M + H] ⁺ , 189,7 [M - H] ⁻ .

Compuesto	Caracterización fisicoquímica
2-(4-fluorofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol (14b)	Rendimiento: 60,2%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,80 (q, <i>J</i> = 7,0 Hz, 2 H), 7,11 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 2 H), 3,82 (br, 4 H). MS (ESI): calculado para C ₉ H ₉ FN ₂ , 164,10, encontrado 165 [M + H] ⁺ .
2-(4-metoxifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol (14c)	Rendimiento: 56,9%. ¹ H RMN (500 MHz, CDCl ₃) δ 7,84 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2 H), 6,94 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2 H), 3,87 (s, 3 H), 3,85 (br, 4 H). MS (ESI): calculado para C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O, 176,10, encontrado 177,0 [M + H] ⁺ .

Ejemplo de referencia 6

Síntesis de compuestos de indolil-benzoil-imidazol seleccionados

- 5 La síntesis de 15xaa se esboza en la Figura 12. Esta ruta se diseñó de forma original para la síntesis de 12xa, pero la no selectividad de la benzoilación en las posiciones indol-2 e imidazol-4 dio por resultado la formación de 15xaa, que es un análogo estrechamente relacionado pero más voluminoso de 11xaa. El indol-5-carboxaldehído 8x se protegió mediante un grupo fenilsulfonilo en el NH indol para proporcionar el intermedio 8xa. El 8xa se hizo reaccionar con glicoxal e hidróxido de amonio para generar el 2-aril-imidazol 9xa. La protección del NH de imidazol con fenilsulfonilo dio el intermedio 10xaa que se acopló con cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo para producir 16xaa. La eliminación del grupo protector de 16xaa proporcionó 15xaa.

- 15 Síntesis de 1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol-5-carbaldehído (8xa). A una disolución de indol-3-carboxaldehído (100 mmoles) en etanol (500 mL) a temperatura ambiente se añadió hidróxido de potasio (110 equiv), la mezcla se agitó hasta la solubilización total. El etanol se eliminó completamente al vacío y se añadió acetona (250 mL) seguido por cloruro de bencenosulfonilo (110 equiv). El precipitado se filtró y el filtrado se concentró y se recristalizó desde metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 32,6%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,17 (s, 1H), 8,25-8,39 (m, 2H), 7,97-8,09 (m, 3H), 7,69 (t, *J* = 7,33 Hz, 1H), 7,59 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,39-7,54 (m, 2H). MS (ESI) calculado para C₁₅H₁₁NO₃S 285,1, encontrado 286,0 [M+H]⁺.

- 20 Síntesis de (5-(4-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-indol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (15xaa): A una disolución de (1-(fenilsulfonil)-2-(1-(fenilsulfonil)-2-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-1*H*-indol-5-il)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (16xaa) (1 mmol) en etanol (20 mL) se añadió hidróxido sódico (10 equiv) y se agitó toda la noche en oscuridad. La mezcla de reacción se diluyó en 50 mL de agua y se extrajo por acetato de etilo (250 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 3:1) o recristalizó desde agua y metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 30-95%.

- 25 5-(1*H*-Imidazol-2-il)-1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol (9xa). Rendimiento: 12,0%. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,33 (d, *J* = 2,9 Hz, 2H), 8,13 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,98-8,04 (m, 1H), 7,62-7,67 (m, 1H), 7,55 (d, *J* = 7,82 Hz, 2H), 7,22-7,34 (m, 4H). MS (ESI) calculado para C₁₇H₁₃N₃O₂S 323,1, encontrado 324,0 [M+H]⁺.

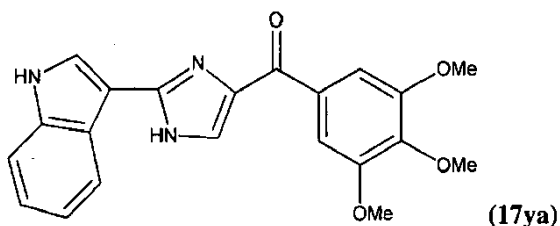
- 30 1-(Fenilsulfonil)-5-(1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-indol (10xaa). Rendimiento: 23,6%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,95 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,73 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H), 7,70 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,63-7,66 (m, 2H), 7,52-7,56 (m, 3H), 7,31-7,34 (m, 3H), 7,22 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,17 (s, 1H), 6,14 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H). MS (ESI) calculado para C₂₃H₁₇N₃O₄S₂ 463,1, encontrado 464,0 [M+H]⁺.

- 35 (1-(Fenilsulfonil)-2-(1-(fenilsulfonil)-2-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-1*H*-indol-5-il)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (16xaa). Rendimiento: 15,9%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,18-8,25 (m, 3H), 8,04 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,70-7,78 (m, 2H), 7,61-7,69 (m, 3H), 7,55 (t, *J* = 7,7 Hz, 3H), 7,50 (s, 1H), 7,38 (s, 2H), 7,34 (s, 2H), 6,94 (s, 1H), 3,99-4,06 (m, 12H), 3,94-3,99 (m, 6H). MS (ESI) calculado para C₄₃H₃₇N₃O₁₂S₂ 851,2, encontrado 852,1 [M+H]⁺.

- 40 (5-(4-(3,4,5-Trimetoxibenzoil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-indol-2-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (15xaa). Rendimiento: 45,9%; pf 239-241°C. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,45 (s, 1H), 9,44 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,04 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,61 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,29 (s, 2H), 7,26 (s, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,95-3,97 (m, 15H). MS (ESI) calculado para C₃₁H₂₉N₃O₈ 571,2, encontrado 572,2 [M+H]⁺. HPLC2: t_R 4,09 min, pureza 96,3%.

Ejemplo de referencia 7

Síntesis de (2-(1*H*-indol-3-il)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (17ya) (Figura 13)



Síntesis de 1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol-3-carboxaldehído (8ya): A una disolución de indol-3-carboxaldehído (8y) (100 mmoles) en etanol (500 mL) a TA se añadió hidróxido de potasio (1,1 equiv.). La mezcla se agitó hasta la solubilización total. El etanol se eliminó completamente al vacío y el residuo se disolvió en acetona (250 mL) seguido por adición de cloruro de bencenosulfonilo (1,1 equiv., 110 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante media hora. El precipitado se filtró y el filtrado se concentró y se recrystalizó desde metanol para dar un sólido blanco. Rendimiento: 33%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 10,17 (s, 1H), 8,25-8,39 (m, 2H), 7,97-8,09 (m, 3H), 7,69 (t, J = 7,33 Hz, 1H), 7,59 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,39-7,54 (m, 2H). MS (ESI) calculado para C₁₅H₁₁NO₃S 285,1, encontrado 286,0 [M+H]⁺.

Síntesis de 3-(1*H*-imidazol-2-il)-1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol (9ya): A una disolución de 1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol-3-carboxaldehído (8ya) (100 mmoles) en etanol (400 mL) a 0°C se añadió una disolución de oxalaldehído al 40% (gloxal) en agua (1,1 equiv., 110 mmoles) y una disolución de hidróxido de amonio al 29% en agua (10 equiv., 1000 mmoles). Después de agitar durante 2-3 días a TA, la mezcla de reacción se desactivó por agua y se extrajo por diclorometano. La fase orgánica se eliminó al vacío y el residuo se sometió a cromatografía de columna rápida con hexano/acetato de etilo (4:1-2:1) como eluyente para proporcionar el compuesto del título como un polvo amarillo. Rendimiento: 12%. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,33 (d, J = 2,9 Hz, 2H), 8,13 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,98-8,04 (m, 1H), 7,62-7,67 (m, 1H), 7,55 (d, J = 7,82 Hz, 2H), 7,22-7,34 (m, 4H). MS (ESI) calculado para C₁₇H₁₃N₃O₂S 323,1, encontrado 324,0 [M+H]⁺.

Síntesis de 1-(fenilsulfonil)-3-(1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-indol (10ya): A una disolución de 3-(1*H*-imidazol-2-il)-1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol (9ya) (20 mmoles) en THF anhidro (300 mL) a 0°C se añadió hidruro sódico (60% de dispersión en aceite mineral, 1,2 equiv., 24 mmoles) y se agitó durante 20 min. Se añadió cloruro de bencenosulfonilo (1,2 equiv., 24 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó toda la noche. Después de la dilución por 200 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada, la mezcla de reacción se extrajo por acetato de etilo (600 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 5:1) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 40%. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,02-8,08 (m, 4H), 7,72 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,35-7,60 (m, 8H), 7,23 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,10-7,16 (m, 3H). MS (ESI) calculado para C₂₃H₁₇N₃O₄S₂ 463,1, encontrado 486,0 [M+Na]⁺.

Síntesis de (1-(fenilsulfonil)-2-(1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol-3-il)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (17yaa): A una disolución de 1-(fenilsulfonil)-3-(1-(fenilsulfonil)-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-indol (10ya) (5,0 mmoles) en THF anhidro (100 mL) a -78°C se añadió *tert*-butil-litio 1,7 M en pentano (1,2 equiv., 6,0 mmoles) y se agitó durante 10 min. Una disolución de cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (1,2 equiv., 6,0 mmoles) en THF se añadió a -78°C y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se desactivó con 100 mL de disolución (acuosa) de NaHCO₃ saturada y se extrajo por acetato de etilo (300 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 3:1) para dar un sólido blanco. Rendimiento: 30%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,09 (d, J = 10 Hz, 1H), 8,04 (d, J = 10 Hz, 2H), 7,91 (s, 1H), 7,76 (d, J = 5 Hz, 2H), 7,65 (t, J = 10 Hz, 1H), 7,55-7,58 (m, 5H), 7,40 (s, 2H), 7,33-7,36 (m, 3H), 7,25 (t, J = 10 Hz, 1H), 4,05 (s, 3H), 4,03 (s, 6H). MS (ESI) calculado para C₃₃H₂₇N₃O₈ 657,0, encontrado 680,1 [M+Na]⁺.

Síntesis de (2-(1*H*-indol-3-il)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (17ya): A una disolución de (1-(fenilsulfonil)-2-(1-(fenilsulfonil)-1*H*-indol-3-il)-1*H*-imidazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (17yaa) (1 mmol) en etanol (40 mL) y agua (4 mL) se añadió hidróxido sódico (10 equiv., 10 mmoles) y se agitó toda la noche en condición de reflujo en oscuridad. La mezcla de reacción se diluyó en 50 mL de agua y se extrajo con acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columna rápida (hexano:acetato de etilo 1:1) para dar un sólido amarillo. Rendimiento: 60%. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,31 (d, J = 6,5 Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,48-7,52 (m, 3H), 7,24-7,28 (m, 2H), 4,00 (s, 6H), 3,93 (s, 3H). MS (ESI) calculado para C₂₁H₁₉N₃O₄ 377,1, encontrado 400,1 [M+Na]⁺. Pf 208-210°C.

Ejemplo 8

Síntesis de (2-(1*H*-indol-5-ilamino)tiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (compuesto 55) (Figura 15).

Una mezcla de 5-nitro-1*H*-indol (11 g, 67,9 mmoles) y Pd/C (5%, 1 g), disuelto en etanol (50 mL), se hidrogenó durante 3 h a 275,79 kPa (40 psi). La mezcla de reacción se filtró y el exceso de etanol se evaporó a presión reducida. El producto sólido se recrystalizó desde hexano para obtener el compuesto puro 5-aminoindol (55-1). Rendimiento: 92,5%. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,96 (br, 1H), 7,20 (d, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 6,67 (dd, 1H), 6,37 (s, 1H), 3,50 (s, 2H). MS (ESI) m/z 133,0 (M+H)⁺.

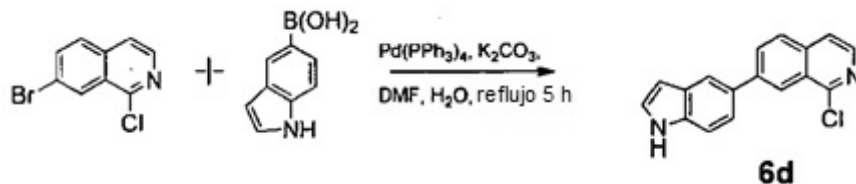
Una disolución de 5-aminoindol (8 g, 60,6 mmoles) en acetona (150 mL) se hizo reaccionar con benzoilisotiocianato (9,88 g, 60 mmoles) a TA durante aproximadamente 4 h. El sólido resultante se filtró y se trató con NaOH 2N en THF (120 mL). La mezcla se puso a reflujo durante aproximadamente 6 h y se dejó calentar a TA. El disolvente se evaporó al vacío. El residuo se diluyó con agua (20 mL) y se neutralizó a pH 7 con HCl 1N. El sólido resultante se filtró y se secó al vacío para proporcionar 5-indoliltiourea (55-2). Se disolvieron 5-indolil-tiourea (0,01 moles) y bromopiruvato de etilo (0,011 moles) en 3 mL de etanol y se dejaron a reflujo durante 2 h. La reacción se enfrió, el 2-(1*H*-indol-5-ilamino)tiazol-4-carboxilato de etilo cristalino (55-3) se recogió por filtración y se lavó con etanol. Poner a reflujo la mezcla de ésteres de etilo con la disolución de NaOH-etanol dio ácido 2-(1*H*-indol-5-ilamino)tiazol-4-carboxílico (55-4) que se usó directamente en etapas siguientes. A una mezcla del ácido en bruto (2,5 mmoles), EDCI (2,9 mmoles), HOBt (2,6 mmoles) y NMM (5,3 mmoles) en CH₂Cl₂ (30 mL) se añadió sal de HNCH₃OCH₃HCl (2,6 mmoles) y la agitación continuó a TA durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (20 mL) y se lavó secuencialmente con agua, NaHCO₃ saturado, salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener el compuesto puro 2-(1*H*-indol-5-ilamino)-*N*-metoxi-*N*-metiltiazol-4-carboxamida (55-5) (45,6% de rendimiento para un total de 5 etapas). A -78°C, a una disolución de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno (1,235 g, 5,0 mmoles) en 30 mL de THF se cargó *n*-BuLi en hexano (2,5 N, 2,4 mL, 6 mmoles) bajo protección de Ar₂ y se agitó durante 10 min se añadió amida de Weinreb (1 mmol) en 10 mL de THF a reactivo de litio y se dejó agitar a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se desactivó con NH₄Cl saturado, se extrajo con etiléter, se secó con MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía de columna para obtener compuesto 55 puro (51,7% de rendimiento). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (br, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,46 (s, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,28-7,26 (m, 1H), 7,15-7,12 (m, 1H), 6,55 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,89 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 432,1 (M+Na)⁺, 408,0 (M-H)⁻.

Ejemplo de referencia 9

Síntesis de compuestos de quinolina- e isoquinolina-arilo (Figura 16).

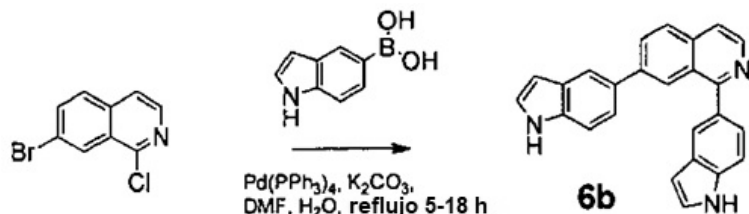
Una serie de compuestos se prepararon por acoplamiento de Suzuki de 7-bromo-1-cloroisoquinolina con varios ácidos arilborónicos.

Síntesis de 1-cloro-7-(1*H*-indol-5-il)-isoquinolina (6d) (Figura 16C):



Una mezcla de 7-bromo-1-cloroisoquinolina (0,50 g, 2,1 mmoles), ácido 5-indolborónico (0,40 g, 2,5 mmoles), tetrakis(trifenilfosfeno)paladio (0,035 g, 0,08 mmoles), carbonato de potasio (2,1 mL, 2 M, 4,1 mmoles), *N,N*-dimetilformamida (11 mL) se agitó mientras se purgaba el espacio de cabeza con argón durante 30 min. La mezcla se llevó entonces a reflujo durante 16 h antes de dejarse enfriar a TA. La mezcla se filtró a través de un lecho de gel de sílice, se diluyó con agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (50 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con NaOH (2 x 20 mL, 10% acuoso), agua (5 x 30 mL, hasta que los cambios de refracción no se vieron más en la interfase orgánica-acuosa) y cloruro de amonio (20 mL, saturado). La fase orgánica se adsorbió entonces en gel de sílice y se trató por cromatografía rápida (acetato de etilo/hexanos) para proporcionar 0,14 g (25%) de un sólido amarillo. MS (ESI): calculado para C₁₇H₁₁ClN₂, 278,1, encontrado 301,0 [M+Na]⁺. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,56-6,58 (m, 1H), 7,44 (t, *J* = 2,77 Hz, 1H), 7,57-7,59 (m, 2H), 7,93 (m, 1H), 8,04 (s, 1H), 8,13-8,20 (m, 1H), 8,27-8,31 (m, 2H), 8,43 (m, 1H), 11,25 (brs-1H).

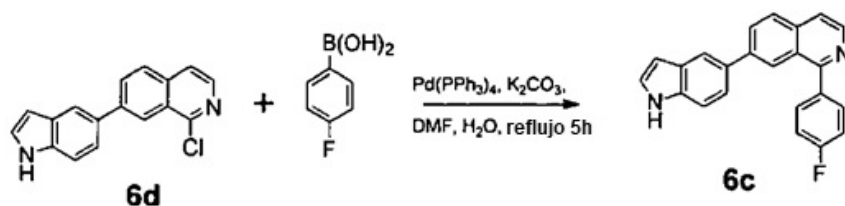
1,7-Bis-(1*H*-indol-5-il)-isoquinolina (6b) (Figura 16E):



Una mezcla de 7-bromo-1-cloroisoquinolina (0,20 g, 2,1 mmoles), ácido 5-indolborónico (0,80 g, 5,0 mmoles), tetrakis(trifenilfosfeno)paladio (0,19 g, 0,16 mmoles), carbonato de potasio (2,1 mL, 2 M, 4,1 mmoles), *N,N*-dimetilformamida (11 mL) se agitó mientras se purgaba el espacio de cabeza con argón durante 30 min. La mezcla se llevó entonces a reflujo durante 16 h antes de dejarse enfriar a TA. La mezcla se filtró a través de un lecho de gel

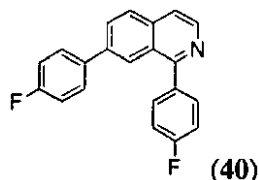
de sílice, se diluyó con agua (50 mL), y se extrajo con acetato de etilo (50 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con NaOH (2 x 20 mL, 10% acuoso), agua (5 x 30 mL, hasta que no se vieron más cambios de refracción en la interfase orgánica-acuosa) y cloruro de amonio (20 mL, saturado). La fase orgánica se adsorbió entonces en gel de sílice y se trató por cromatografía rápida (acetato de etilo/hexanos) para proporcionar 0,29 g (39%) de un sólido amarillo. MS (ESI): calculado para $C_{25}H_{17}N_3$, 359,1, encontrado 360,2 $[M+H]^+$ 382,1 $[M+Na]^+$, 358,0 $[M-H]^-$. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 6,46-6,50 (m, 1H), 6,52-6,59 (m, 1H), 7,34-7,36 (m, 1H), 7,36-7,41 (m, 2H), 7,42-7,52 (m, 3H), 7,58 (d, J = 8,30 Hz, 1H), 7,81 (dd, J = 5,49, 5,00 Hz, 2H), 7,92 (s, 1H), 8,08-8,17 (m, 2H), 8,33 (s, 1H), 8,54 (d, J = 5,61 Hz, 1H), 11,18 (br s, 1H), 11,30 (br s, 1H) ppm.

1-(4-Fluoro-fenil)-7-(1*H*-indol-5-il)-isoquinolina (6c) (Figura 16D):



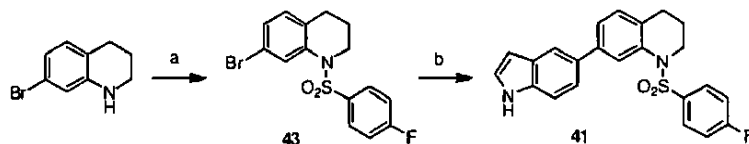
Una mezcla de 6d (0,20 g, 0,72 mmoles), ácido 4-fluorofenilborónico (0,12 g, 0,86 mmoles), tetrakis(trifenilfosfeno)paladio (0,033 g, 0,03 mmoles), carbonato de potasio (0,72 mL, 2 M, 1,4 mmoles), *N,N*-dimetilformamida (22 mL) se agitó mientras se purgaba el espacio de cabeza con argón durante 30 min. La mezcla se llevó entonces a reflujo durante 16 h antes de dejarse enfriar a TA. La mezcla se filtró a través de un lecho de gel de sílice, se diluyó con agua (50 mL), y se extrajo con acetato de etilo (50 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con NaOH (2 x 20 mL, 10% acuoso), agua (5 x 30 mL, hasta que los cambios de refracción no se vieron más en la interfase orgánica-acuosa) y cloruro de amonio (20 mL, saturado). La fase orgánica se adsorbió entonces en gel de sílice y se trató por cromatografía rápida (acetato de etilo/hexanos) para proporcionar 0,038 g (16%) de sólido amarillo. MS (ESI): calculado para $C_{23}H_{15}FN_2$, 338,12, encontrado 339,2 $[M+H]^+$ y 361,2 $[M+Na]^+$. 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6,47-6,55 (m, 1H), 6,80 (d, J = 9,16 Hz, 2H), 7,38-7,45 (m, 2H), 7,47-7,62 (m, 3H), 7,72 (d, J = 8,85 Hz, 2H), 7,79-7,96 (m, 3H), 11,18 (br s, 1H).

1,7-Bis-(4-fluoro-fenil)-isoquinolina (40) (Figura 16A)



MS (ESI): calculado para $C_{21}H_{13}F_2N$, 317,10, encontrado 318,1 $[M+H]^+$, 340,1 $[M+Na]^+$ y 315,9 $[M-H]^-$. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,31 (br s, 1H), 7,31-7,37 (m, 2H), 7,39 (br s, 1H), 7,41 (t, J = 8,54 Hz, 2H), 7,72-7,77 (m, 2H), 7,78-7,84 (m, 2H), 7,89 (br s, 1H), 7,90-7,99 (m, 1H), 8,09-8,19 (m, 3H), 8,59 (br s, 1H), 8,60-8,65 (m, 1H).

Síntesis de 7-bromo-1-(4-fluoro-bencenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (43) y 1-(4-fluoro-bencenosulfonil)-7-(1*H*-indol-5-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (41) (Figura 16B)

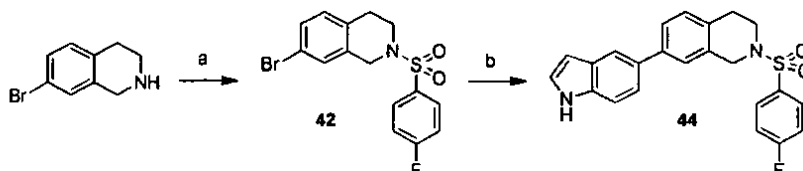


7-Bromo-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (0,60 g, 2,8 mmoles) se agitó con cloruro de 4-fluorofenilsulfonilo (1,65 g, 8,49 mmoles) en piridina (5 mL) a 80°C durante 3 h. La mezcla se enfrió, se concentró y el residuo se cromatografió (EtOAc/Hexanos en SiO_2) para dar 845 mg de un sólido marrón (81%) de compuesto 43. $C_{15}H_{13}BrFNO_2S$ 368,98, encontrado 394,0 $[M+Na]^+$ y 367,8 $[M-H]^-$. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1,58-1,67 (m, 2H), 2,41 (t, J = 6,71 Hz, 2H), 3,72-3,82 (m, 2H), 6,89 (d, J = 8,30 Hz, 1H), 7,08-7,17 (m, 2H), 7,18-7,24 (m, 1H), 7,59-7,68 (m, 2H), 7,92-8,01 (m, 1H).

43 (0,46 g, 1,3 mmoles), ácido 5-indolborónico (0,26 g, 1,6 mmoles), tetrakis(trifenilfosfeno)paladio (0,031 g, 0,03 mmoles), carbonato de potasio (1,35 mL, 2 M, 2,7 mmoles) y *N,N*-dimetilformamida (135 mL) se agitaron mientras se purgaba el espacio de cabeza con argón durante 30 min. La mezcla se llevó entonces a reflujo durante 16 h antes de dejarse enfriar a TA. La mezcla se filtró a través de un lecho de gel de sílice, se diluyó con agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (50 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con NaOH (2 x 20 mL, 10% acuoso), agua

(5 x 30 mL, hasta que no se vieron más cambios de refracción en la interfase orgánica-acuosa) y cloruro de amonio (20 mL, saturado). La fase orgánica se adsorbió entonces en gel de sílice y se trató por cromatografía rápida (acetato de etilo/hexanos) para proporcionar 0,38 g (77%) de un sólido cristalino blanco de compuesto 41. MS (ESI): calculado para $C_{23}H_{19}FN_2O_2S$, 406,12, encontrado 404,9 $[M-H]^-$ y 429,1 $[M+Na]^+$. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 1,56-1,66 (m, 2H), 2,48 (t, $J = 6,59$ Hz, 2H), 3,76-3,86 (m, 2H), 6,46-6,56 (m, 1H), 7,14 (m, $J = 7,81$ Hz, 1H), 7,33-7,37 (m, 1H), 7,38-7,45 (m, 4H), 7,49 (m, $J = 8,54$ Hz, 1H), 7,66-7,74 (m, 2H), 7,74-7,81 (m, 1H), 7,85-7,94 (m, 1H), 11,17 (br s, 1H).

7-Bromo-2-(4-fluorobenzenosulfonil)-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina (42) (Figura 16B)



Rendimiento 23%. $C_{15}H_{13}BrFNO_2S$, 369,0, encontrado 392,0 $[M+Na]^+$ y 367,7 $[M-H]^-$. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 2,75-2,82 (m, 2H), 3,32 (t, $J = 6,10$ Hz, 2H), 4,24 (s, 2H), 7,07 (d, $J = 8,30$ Hz, 1H), 7,29-7,37 (m, 1H), 7,37-7,43 (m, 1H), 7,47 (t, $J = 8,79$ Hz, 2H), 7,87-7,93 (m, 2H).

2-(4-Fluoro-benzenosulfonil)-7-(1H-indol-5-il)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (44).

Rendimiento 77%. 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 2,84-2,91 (m, 2H), 3,35 (t, $J = 5,98$ Hz, 2H), 4,30 (s, 2H), 6,44-6,48 (m, 1H), 7,17 (d, $J = 7,81$ Hz, 1H), 7,32-7,40 (m, 2H), 7,41-7,51 (m, 3H), 7,75-7,79 (m, 1H), 7,89-7,96 (m, 1H), 11,13 (br s, 1H).

Ejemplo 10

Solubilidad en agua de compuestos de aril-benzoil-imidazol (ABI) (Figura 17)

Determinación de solubilidad en agua. Para determinar la solubilidad en agua, 1 mg de cada compuesto se suspendió en 1 mL de agua y se agitó durante 48 h a temperatura ambiente (TA). La suspensión se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min y se filtró en un filtro de 0,22 μm . Las concentraciones de cada compuesto se midieron por LC-MS, consistente en un instrumento de HPLC HP S1100 (Agilent, Foster City, CA) y un detector Bruker ESQUIRE MS con un instrumento de electropulverizado/trampa de iones en modo ión positivo (Bruker, Fremont, CA). Para HPLC, se usó una columna C18 Nova-pak de fase inversa (150 mm x 3,9 mm, Waters, Milford, MA). La fase móvil estaba compuesta por 20:80 en v/v de agua/acetonitrilo. Para MASS, el pico se extrajo a 382 m/z (para compuestos de imidazol) y 399 m/z (para compuestos de tiazol) respectivamente. La concentración de cada compuesto se calculó por área de pico MS según la siguiente ecuación de calibrado: $y = 1,3295x + 114,24$ ($R^2 = 1,00$). Para hacer la curva estándar (Figura 17) a partir de la que se derivó la ecuación, se inyectaron 50, 100 μL de cada 100 $\mu g/mL$, 10 $\mu g/mL$ de compuesto ABI 12ga, y su correspondiente análogo de tiazol, además de CA-4 (véase la Figura 19 para la estructura) en acetonitrilo, en HPLC y se monitorizaron por espectroscopia de masas. La cantidad (ng) en cada inyección se representó de nuevo su área de pico de masa relativa para generar la curva estándar en la Figura 17.

Los tiempos de retención de HPLC del compuesto ABI 12ga (1,5 min) se compararon con su correspondiente análogo de tiazol (2,2 min) usando la fase móvil 80/20 de metanol/agua a un caudal de 1 mL/min y una columna de fase inversa, indicando que el derivado de imidazol era más hidrófilo que su correspondiente análogo de tiazol. Los valores logP calculados para el compuesto ABI 12ga y el correspondiente análogo de tiazol fueron aproximadamente 2,9 y 4,4, respectivamente. La solubilidad en agua del compuesto 12ga era 13 $\mu g/mL$, o aproximadamente 200 veces mayor que su equivalente de tiazol (72 ng/mL).

Ejemplo 11

Evaluación biológica de los compuestos de esta descripción

Ejemplo 11A: Inhibiciones de crecimiento celular *in vitro*

Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad de cáncer de próstata y melanoma. Todas las líneas celulares se obtuvieron de ATCC (American Type Culture Collection Manassas, VA, EE.UU.), mientras los suministros de cultivo celular se compraron de Cellgro Mediatech (Herndon, VA, EE.UU.). Se examinó la actividad antiproliferativa de nuestros compuestos de anti-tubulina en cuatro líneas celulares de cáncer de próstata humana (LNCaP, DU 145, PC-3 y PPC-1) y dos líneas celulares de melanoma humano (A375 y WM-164). La línea celular de ovario humano OVCAR-8 y su línea celular resistente que sobre-expresa P-gp (NCI/ADR-RES) se usaron como modelos MDR. Ambas líneas celulares de ovario se obtuvieron de National Cancer Institutes (NCI). Todas las líneas celulares se probaron y

autenticaron por ATCC o NCI. Todas las líneas celulares de cáncer de próstata y cáncer de ovario se cultivaron en RPMI 1640, suplementados con suero bovino fetal (FBS) al 10%.

Las células de melanoma se cultivaron en DMEM, suplementadas con FBS al 5%, mezcla de antibiótico/antimicótico al 1% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EE.UU.) e insulina bovina (5 µg/mL; Sigma-Aldrich). El potencial citotóxico de los compuestos de anti-tubulina se evaluó usando el ensayo de sulforodamina B (SRB) después de 96 h de tratamiento.

Todos los compuestos presentados se evaluaron primero para la citotoxicidad en la línea celular de melanoma de ratón B16-F1, líneas celulares de melanoma humano (A375 y WM-164) y líneas celulares de cáncer de próstata (DU145, PC-3, LNCaP, PPC-1). El compuesto 1h y ABT-751 (E7010, Abbott Laboratories/Eisai Co Ltd), que ha entrado en la fase II de estudios clínicos para el tratamiento de pacientes con diferentes cánceres, se incluyeron en los ensayos como ejemplos de agentes de unión al sitio de la colchicina. Los valores CI_{50} para la inhibición del crecimiento celular se muestran en las Tablas 1, 2 y 3. Los únicos compuestos que pertenecen a la invención son los que caen en el alcance de la fórmula (XI).

Resultados:

Tabla 1. SAR de compuestos que optimizan el anillo B

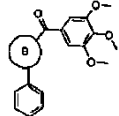
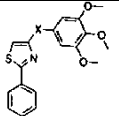
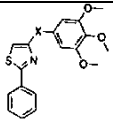
	Anillo B	$CI_{50} \pm EEM$ (nM)					
		B16-F1	A375	DU 145	PC-3	LNCaP	PPC-1
1a	1,3-fenilo	500±200	87±15	178	81	234	85
1b	4,6-pirimidina	>30000	>30000	6900	8300	7000	3700
1c	2,6-piridina	39±12	30±14	33±3	32±2	27±2	25±1
1d	2,5-furano	151±24	27±8	35	21	23	20
1e	2,5-tiazol	12500±5200	13600±3800	>10000	>10000	>10000	>10000
1f	2,4-tiofeno	72±15	15±6	26	12	17	15
1g	1,4-piperidina	>30000	>30000	>20000	>20000	>20000	>20000
1h	2,4-tiazol	55±5	28±5	71±4	21±1	28±4	43±5
1i	3,5-isoxazol	>30000	>30000	>10000	>10000	>10000	>10000
36a	2,4-oxazol	600±200	300±100	292	294	310	324
35a	2,4-oxazolina	6500±800	500±100	1200±100	1200±100	1200±100	1100±100

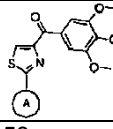
Tabla 2. SAR de compuestos que optimizan conectores carbonilo

	Conector X	$CI_{50} \pm EEM$ (nM)						
		B16-F1	A375	WM-164	DU 145	PC-3	LNCaP	PPC-1
1h	C=O	55±5	28±5	64±4	71±4	21±1	28±4	43±5
2a	C=CMe ₂	3800±1300	1900±800	3700±1200	2650	2470	1390	2040
2b	CHOH	>30000	>30000	ND	>10000	>10000	>10000	>10000
2 c-trans	<i>sin</i> -C=C-CN	5400±2100	4600±1500	4900±1300	2280	890	580	900
2c-cis	<i>anti</i> -C=C-CN	1200±300	1200±400	1000±200	~10000	~10000	1990	~10000
2d-cis	<i>sin</i> -C=N-NH ₂	2000±800	900±300	ND	1210	1120	1800	872
2d-trans	<i>Anti</i> -C=N-NH ₂	1800±700	600±200	ND	1210	1040	1300	966
2e-cis	<i>sin</i> -C=N-OH	300±100	200±100	ND*	102	120	189	160
2e-trans	<i>anti</i> -C=N-OH	11400±2100	7800±1200	ND	>10000	>10000	>10000	>10000
2f-cis	<i>sin</i> -C=N-OMe	3800±1600	2900±1200	3400±1800	>10000	>10000	>10000	>10000
2f-trans	<i>Anti</i> -C=N-OMe	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
2g	CONH	>30000	>30000	ND	>10000	>10000	>10000	>10000

	Conector X	CI ₅₀ ± EEM (nM)						
		B16-F1	A375	WM-164	DU 145	PC-3	LNCaP	PPC-1
2h	NHCO	>30000	>30000	ND	>10000	>10000	>10000	>10000
2i	Enlace (ninguno)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
2j	C=N-CN	60±21	28±12	27±13	42±2	27±1	23±2	20±1
3a	cis-C=C	11000±2800	46500±23300	10600±5800	>10000	>10000	>10000	>10000
3b	trans-C=C	32800±13000	>10000	30800±12000	>10000	>10000	>10000	>10000
4a	S	2400±900	1600±400	2000±1200	>10000	>10000	2300±200	2300±100
4b	SO ₂	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
4c	SO	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
4d	SO ₂ NH ₂	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

*ND = no determinado

Tabla 3. Actividad antiproliferativa de compuestos modificados con solubilidad acuosa mejorada

	Parte A	CI ₅₀ ± EEM (nM)					
		B16-F1	A375	DU 145	PC-3	LNCaP	PPC-1
58a	4-OTBDMSPh	500±200	700±300	434±30	183±24	549	246±8
2l	4-OHPh	110	100	116	87	103	76
62a	2-indolilo	43±21	19±9	32	24	28	28
66a	5-indolilo	25±13	8±1	13	7	10	8
68a	4-BocNHCH ₂ Ph	2900±400	7900±500	4400	3100	2600	2700
2r	4-NH ₂ CH ₂ Ph	38±11	41±13	25	80	13	34
2s	4-NHMeCH ₂ Ph	>10000	>10000	~10000	>10000	114±80	-1000
2u	4-NMe ₂ CH ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	1025±200	>10000
5a	PhNH	65±12	45±8	70±4	57±3	51±1	54±1
5Hb	4-CH ₃ PhNH	ND*	ND	35±1	38±2	35±1	36±1
5c	4-FPhNH	ND	ND	63±1	43±1	41±1	37±1
1h	Ph	55±5	28±5	71±4	21±1	28±4	43±5
ABT-751		2127±351	1111±108	839±719	786±89	658±117	701±307

*ND = no determinado

SAR de moléculas de anillo "B" alternativo. La primera serie se dirigió a alternativas al anillo "B" de tiazol. Por consiguiente, se examinó una serie de anillos "B" heterocíclicos. Como se muestra en la Tabla 1, las sustituciones con éxito del tiazol fueron piridina 1c, furano 1d y tiofeno 1f. Las CI₅₀ (12 nM ~ 35 nM frente a células de cáncer de próstata) son cercanas al compuesto 1h de tiazol. Introducir fenilo (1a), oxazolina (35a) y oxazol (36a) mantuvo la actividad en las centenas de rango nanomolar. Pero la introducción de pirimidina (1b, CI₅₀: 3,7~8,3 µM), un 2,5-tiazol invertido y 3,5-isoxazol (1e y 1i, CI₅₀: >10 µM) provocó pérdidas obvias de potencia. La modificación del anillo "B" al anillo saturado de piperidina (1g) además abolió totalmente la actividad (CI₅₀ >20 µM).

SAR de conectores alternativos. Los estudios de estabilidad metabólica hepática *in vitro* revelaron que el conector carbonilo entre los anillos "B" y "C" en compuestos SMART provocó cortas semividas (5-17 min) principalmente debido a la reducción de carbonilo. Para bloquear esta reducción de cetona al compuesto 2b conector de hidroxilo inactivo, se modificó el conector carbonilo en la segunda serie de compuestos (Tabla 2). El conector carbonilo se sustituyó con dobles enlaces (2a, 3a, y 3b), amidas (2g, 2h), oximas (2e-cis,trans y 2f-cis,trans), hidrazida (2d-cis, 2d-trans), acrilonitrilos (2c-trans, 2c-cis), cianoimina (2j), sulfonilamida (4d), éter de azufre (4a), compuestos de sulfonilo y sulfenilo (4b, 4c). un compuesto de unión directa 2i sin ningún conector entre los anillos "B" y "C" se preparó también. Entre estas modificaciones de conector, solo la unión cianoimina (2j) mostró un potencial prometedor (20 ~ 60 nM) en comparación con el compuesto carbonilo 1h, aunque un estudio de metabolismo *in vitro* mostró que la semivida de 2j en el microsoma hepático humano fue menor de 5 min. Esto sugirió que aunque se bloqueó la reducción de cetona, podía introducir una nueva carga metabólica en el compuesto 2j. Los pares isoméricos de compuestos que contienen dobles enlaces, oximas e hidrazidas se separaron. El compuesto 3a se diseñó para simular la estructura de CA-4, (Figura 19) que contiene un cis-C=C entre dos anillos arilo, desafortunadamente 3a y otros pares isoméricos perdieron actividad después de sustituir el conector C=O. Un fenómeno interesante es que el *sin*-isómero de 2e-cis (0,1 ~ 0,3 µM) mostró 10 veces más actividad que su *anti*-isómero 2e-trans (>10 µM). La semivida de 2e-cis en el microsoma hepático humano se extiende a 35 min, mientras

que las semividas de compuestos 2d pueden prolongarse a 55 min. Pero la actividad reducida (~1 μ M) de 2d también redujo su potencia.

Ejemplo 11B: Solubilidad acuosa de los compuestos de la descripción

La solubilidad de fármacos se determinó por Placa de filtro de solubilidad Multiscreen (Millipore Corporate, Billerica, MA) acoplado con LC-MS/MS. Brevemente, 198 μ L de tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4) se cargó en una placa de 96 pocillos, y 2 μ L de compuestos de prueba 10 mM (en DMSO) se dispensaron y mezclaron con agitación suave (200-300 rpm) durante 1,5 h a TA (N = 3). La placa se centrifugó a 800g durante 5 min, y el filtrado se usó para determinar su concentración y solubilidad de compuesto de ensayo por LC-MS/MS como se describe a continuación.

Introducción de grupos polares e ionizables en los agentes anti-tubulina. Una limitación principal de los agentes SMART es la baja solubilidad acuosa. Se usaron tensioactivos tales como Tween 80, para estudiar *in vivo* el comportamiento SMART, por consiguiente se obtuvieron resultados favorables. Pero estos tensioactivos son biológicamente activos y son responsables de muchos efectos secundarios. Además, se pensó que la baja solubilidad acuosa de 1h dio por resultado la baja biodisponibilidad oral (3,3%, Tabla 4). En la tercera serie de compuestos, la solubilidad acuosa se aumentó con éxito sin impactar en la potencia introduciendo grupos polares como hidroxilo e indolilos. Además, los grupos ionizables como grupos amino y alquilamino se introdujeron también en la posición *para* del anillo "A". Como se muestra en la Figura 5 y Tabla 3, la introducción de grupos indolilo al anillo "A" especialmente 5-indolilo (66a, 7 ~ 25 nM) aumentó la potencia en comparación con el compuesto 4-OH 2l (76-116 nM). El aminometilo -CH₂NH₂ en la posición *para* del anillo "A" también mantuvo la potencia (2r, 13-80 nM), pero *p*-NHMe (2s) o *p*-NMe₂ (2u) abolieron la actividad. Como se muestra en la Figura 18, la medida analítica para estimar la solubilidad acuosa mostró que el compuesto indolilo 66a aumentó la solubilidad en PBS de 1,1 μ g/mL (compuesto 1h) a 3,8 μ g/mL. El compuesto de aminometilo 2r se convirtió a la sal de HCl, que aumentó la solubilidad en más de 35 veces (>35 μ g/mL). Aunque el compuesto 2r mostró una satisfactoria solubilidad acuosa, los estudios farmacocinéticos mostraron que este compuesto aún tenía una biodisponibilidad muy pobre (% de F = 0,2%). Se creyó que el compuesto 2r se ionizaba en el estómago, y por lo tanto no se absorbía en el sistema circulatorio.

Ejemplo 11C: Estudios farmacocinéticos

Estudio farmacocinético. Se compraron ratas de Sprague-Dawley hembras (n = 3 o 4; 254 \pm 4 g) de Harlan Inc. (Indianápolis, IN). Los catéteres de vena yugular torácica de rata se compraron de Braintree Scientific Inc. (Braintree, MA). A la llegada a las instalaciones de los animales, los animales se aclimataron durante 3 días en una habitación controlada por temperatura (20-22°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h antes de cualquier tratamiento. El compuesto 1h se administró de forma intravenosa (i.v.) en los catéteres de la vena yugular a una dosis de 2,5 mg/kg (en DMSO/PEG300, 2/8), mientras que 5Ha y 5Hc se dosificaron a 5 mg/kg (en DMSO/PEG300, 1/9). Un volumen igual de solución salina heparinizada se inyectó para reemplazar la sangre quitada, y las muestras de sangre (250 μ L) se recogieron por medio de los catéteres de la vena yugular a 10, 20, 30 min, y 1, 2, 4, 8, 12, 24 h. Los compuestos 1h, 5Ha y 5Hc se dieron (p.o.) por alimentación forzada oral a 10 mg/kg (en Tween80/DMSO/H₂O, 2/1/7). Todas las muestras de sangre (250 μ L) después de la administración oral se recogieron por medio de los catéteres de la vena yugular a 30, 60, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min, y 8, 12, 24 h. Se prepararon jeringas y viales heparinizados antes de la recogida de sangre. Las muestras de plasma se prepararon centrifugando las muestras de sangre a 8.000g durante 5 min. Todas las muestras de plasma completo se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta analizarse.

Los analitos se extrajeron de 100 μ L de plasma con 200 μ L de acetonitrilo que contenían 200 nM del patrón interno ((3,5-dimetoxifenil)(2-fenil-1*H*-imidazol-4-il)metanona). Las muestras se mezclaron cuidadosamente, se centrifugaron y el extracto orgánico se barrrió al automuestreador para el análisis LC-MS/MS. El modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), barrido m/z 356 \rightarrow 188 (compuesto 1h), m/z 371 \rightarrow 203 (compuesto 5Ha), m/z 389 \rightarrow 221 (compuesto 5Hc) y m/z 309 \rightarrow 171 (el patrón interno), se usó para obtener las señales más sensibles. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron usando análisis no compartimental (WinNonlin, Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

Resultados:

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos para compuestos probados *in vivo*.

	1h		2r		5Ha		5Hc	
Ruta	IV	PO	IV	PO	IV	PO	IV	PO
N ^a	4	3	3	3	3	3	3	3
Dosis (mg/kg)	2,5	10	2,5	4	5	10	5	10
CL ^b (mL/min/kg)	7,7 \pm 1,0	-	22 \pm 13	-	17 \pm 3	-	13 \pm 2	-
Vss ^c (L/kg)	4,9 \pm 1,9	-	0,33 \pm 0,25	-	1,4 \pm 0,2	-	1,4 \pm 0,2	-
AUC ^d (min*mg/mL)	279 \pm 53	37 \pm 20	139 \pm 77	0,4	296 \pm 46	65 \pm 20	381 \pm 65	160 \pm 13

	1h		2r		5Ha		5Hc	
Ruta	IV	PO	IV	PO	IV	PO	IV	PO
C _{max} ^c (ng/mL)	3816±509	212	3,2 ± 1,6	3794±1580	4198±438	814±255	3349±686	1262 ± 362
F ⁱ (%)	3,3		0,2		11		21	

^a Números de ratas. ^b Aclaramiento sistémico. ^c Volumen de distribución después de la dosificación intravenosa. ^d Área bajo la curva después de la dosificación intravenosa, concentración de fármaco integrado con respecto al tiempo y concentración de fármaco integrado con respecto al tiempo después de la dosificación oral. ^e Concentración máxima en plasma después de la dosificación intravenosa. ^f Porcentaje de biodisponibilidad oral.

Modificación de moléculas de metoxibenzoil-aril-tiazol sustituido (SMART) para mejorar la biodisponibilidad oral. Muchos fármacos anticancerígenos que tienen como objetivo la tubulina establecidos como taxanos y vinblastina necesitan la administración intravenosa por la baja biodisponibilidad oral. La biodisponibilidad oral es un parámetro complejo que implica muchos procesos químicos y fisiológicos, tales como solubilidad, permeabilidad y estabilidad metabólica. La solubilidad de estos inhibidores de tubulina se mejoró insertando un conector amino entre los anillos "A" y "B" como en 5a-d (Figura 6), la Tabla 3 demuestra que los compuestos con puente de NH (5a-c) tenían potencia similar (35 ~ 65 nM) a 1h con solubilidad aumentada (15 y 19 µg/mL para 5a y 5c, respectivamente (Figura 18), pero son más de 20 veces más activo que ABT-751 (Tabla 3 y Figura 19 para la estructura de ABT-751).

- 5 Los estudios farmacocinéticos de rata se realizaron para estudiar si estos nuevos compuestos mostraban biodisponibilidad mejorada en comparación con el compuesto 1h (Tabla 4). Los datos mostraron claramente que 5Hc (sal de HCl de 5c) mostró más de 4,3 veces de exposición aumentada (AUC) por la ruta oral en comparación con 1h, sugiriendo que la solubilidad acuosa mejorada por el conector amino mejoró con éxito la biodisponibilidad oral. Además, la concentración máxima (C_{max}) de 5Ha y 5Hc por administración oral fue 814 y 1262 ng/mL, respectivamente. Mientras la C_{max} de 1h era solo 212 ng/mL. En general, la biodisponibilidad de 5Ha y 5Hc se aumentó de 3,3% de 1h a 11% y 21%, respectivamente (Tabla 4). El compuesto 5Hc mostró aclaramiento moderado, volumen de distribución moderado y biodisponibilidad oral aceptable. Estos datos sugirieron que estos nuevos compuestos unidos con amino sintetizados tienen la potencia y el perfil PK para desarrollarse como una nueva clase de agentes antitubulina biodisponibles oralmente.

- 20 Ejemplo 11D: Inhibición de la polimerización de tubulina *in vitro* por compuestos de la descripción

Ensayo de polimerización de tubulina *in vitro*. La tubulina de cerebro bovino (0,4 mg, >97% puro) (Cytoskeleton, Denver, CO) se mezcló con 10 µM de los compuestos de prueba y se incubó en 100 µl de tampón de tubulina general (PIPES 80 mM, MgCl₂ 2,0 mM, EGTA 0,5 mM y GTP 1 mM) a pH 6,9. La absorbancia de longitud de onda a 340 nm se monitorizó cada 1 min durante 20 min mediante al Lector de microplaca SYNERGY 4 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). El espectrofotómetro se ajustó a 37°C para la polimerización de tubulina.

Resultados:

- 30 La inhibición de polimerización de tubulina mediante compuestos potentes seleccionados 1c, 2j, 66a y 5a se investigó mediante las tres estrategias de diseño (anillos B alternativos, conectores nuevos y restos de solubilización) y se comparó con 1h. La tubulina de cerebro bovino (>97% puro) se incubó con los compuestos individuales (10 µM) para probar su efecto en la polimerización de tubulina (Figura 20a). Después de 20 min de incubación, la polimerización de tubulina se inhibió el 47% por 1h, en comparación con el vehículo. Tanto 1c como 2j inhibieron el 64% de la polimerización a 20 min con diferentes patrones de inhibición. Los compuestos 5a y 66a proporcionaron mayores inhibiciones como 78% y 81%, respectivamente. Estos datos sugieren que estos compuestos muestran fuerte actividad de polimerización antitubulina que corresponde bien con su citotoxicidad.

- 35 La inhibición de la polimerización de tubulina mediante el compuesto 5c por unión con el sitio de unión de colchicinas y en comparación con el compuesto 1h se demuestra en las Figuras 20b y 20c.

Ejemplo 11E: Los nuevos compuestos anti-tubulina superan la resistencia multifármaco mediada por P-glucoproteína.

- 40 El sistema P-glucoproteína (P-gp) parece ser un mecanismo fisiológico primario de resistencia multifármaco (MDR) que actúa como una bomba de eflujo de fármaco dependiente de ATP, que elimina de forma activa una variedad de compuestos citotóxicos estructuralmente diversos. El eflujo mejorado de estos compuestos reduce su acumulación intracelular y así reduce su citotoxicidad. Por lo tanto, los nuevos compuestos que no son susceptibles a la resistencia de fármacos podrían ser de alto valor terapéutico y económico. Además de P-gp, los agentes antitubulina usados clínicamente tienen otros mecanismos de resistencia tal como cambios en dinámicas de microtúbulo y mutaciones en β-tubulina que se conocen por limitar la sensibilidad a los taxanos. Los compuestos anti-tubulina de la invención se probaron frente a una línea celular de cáncer de ovario OVCAR-8 (padre) y la línea celular NCI/ADR-RSE que sobre-expresa P-gp (Tablas 5A, 5B).

Resultados:

Tabla 5A. Actividad anti-proliferativa de compuestos seleccionados frente a líneas celulares MDR sobre-expresadas en P-gp.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)		Factor de resistencia
	OVCAR-8	NCI/ADR-RES	
1c	33±3	13±0,8	0,4
2j	34±2	14±1	0,4
66a	10±3	4±2	0,4
2r	26±2	11±2	0,4
5a	46 ±6	27	0,6
5b	28	21	0,8
5c	44±3	25±6	0,6
1h	35±2	13±1	0,4
paclitaxel*	4,7±0,1	6263±634	1333
vinblastina	3,9±0,1	582±57	149
colchicina	17±1	1113±79	65

- 5 De forma notable, los compuestos de anti-tubulina de la invención demostraron efectos antiproliferativos equipotentes frente a OVCAR-8 y líneas celulares NCI/ADR-RES, sugiriendo que no son sustratos de P-gp y que funcionan de una forma independiente de P-gp. Esta característica es distinta de la de paclitaxel, vinblastina y colchicina en células NCI/ADR-RES.

Tabla 5B. Actividad antiproliferativa de compuestos de fenil-aminotiazol seleccionados

	R	CI ₅₀ ± EEM (nM)					
		B16-F1	A375	DU 145	PC-3	LNCaP	PPC-1
5a	H	65±12	45±8	70±4	57±3	51±1	54±1
5Hb	4-CH ₃	ND*	ND	35±1	38±2	35±1	36±1
5c	4-F	ND	ND	63±1	43±1	41±1	37±1
5d	4-Cl	ND	25 ± 7	73±1	33±1	45±1	36±1
1h	-	55 ± 5	28 ± 5	71 ± 4	21 ± 1	28 ± 4	43 ± 5
ABT-751	-	2127±351	1111±108	839±719	786±89	658±117	701±307

- 10 Los compuestos de fenilaminotiazol 5a, 5Hb, 5c y 5d demostraron una potente actividad en un número de líneas celulares de cáncer de próstata. Inesperadamente, el compuesto fenilaminoimidazol 5e no demostró actividad (CI₅₀ > 1000 nM en LNCaP, PC-3, DU-145 y PPC-1) en estas líneas celulares de cáncer de próstata. Los controles positivos para este experimento fueron 55 y 17ya que demostraron valores CI₅₀ entre 7,5 nM y 24,1 nM en las mismas líneas celulares (Tabla 5C).

- 15 Tabla 5C

Tabla 5C.	CI ₅₀ ± EEM (nM)					
	B16-F1	A375	DU 145	PC-3	LNCaP	PPC-1
5a	65±12	45±8	70±4	57±3	51±1	54±1
5Hb	ND	ND	35±1	38±2	35±1	36±1
5c	ND	ND	63±1	43±1	41±1	37±1
5d	ND	25±7	73±1	33±1	45±1	36±1
1h	55±5	28±5	71±4	21±1	28±4	43±5
ABT-751	2127±351	1111±108	839±719	786±89	658±117	701±307
d	ND	ND	>1000	>1000	>1000	>1000
e	ND	ND	>1000	>1000	>1000	>1000
5e	ND	ND	>1000	>1000	>1000	>1000
55	ND	ND	24±6	12±1	13±1	15±1
17ya	ND	ND	11±1	5±2	8±2	8±1

Una nueva serie de inhibidores de polimerización de tubulina con biodisponibilidad oral aceptable y actividad equipotente en líneas celulares de tumor resistente multifármaco se ha descubierto. Esfuerzos de la química medicinal que parten de la optimización del compuesto de referencia SMART 1h.

- 20 Las modificaciones químicas de diferentes arilos sustituidos en el anillo "B" y las uniones entre anillos "B" y "C" se investigaron en base a la evaluación biológica frente a células cancerígenas *in vitro*. Los estudios SAR revelaron que los anillos "B" óptimos incluyen piridina (1c), tiofeno (1f) y furano (1d) que mantienen una excelente potencia *in vitro*. La sustitución del conector carbonilo con cianoimina (2j) entre el anillo "B" y "C" aumentará la actividad. Se realizaron modificaciones de estructura para aumentar la solubilidad acuosa y la biodisponibilidad. La introducción de un amino
- 25 entre los anillos "A" y "B" dio los compuestos de la invención 5a-c, que mostraron potencia antiproliferativa *in vitro*

frente a células cancerígenas probadas además de líneas celulares MDR(+) y MDR(-), además, la solubilidad y la biodisponibilidad *in vivo* se mejoraron en gran medida sobre las de 1h. Por lo tanto, estos nuevos compuestos anti-tubulina representan una nueva familia de compuestos que pueden ser muy útiles en el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 12

Actividad antiproliferativa

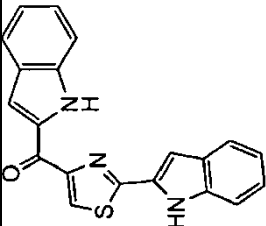
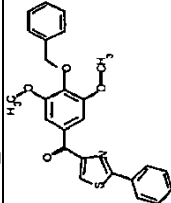
La actividad antiproliferativa de análogos preparados por los métodos de la invención se muestran en las Tablas 6 y 6A.

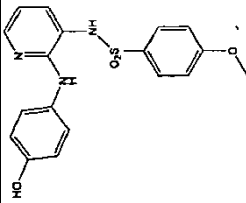
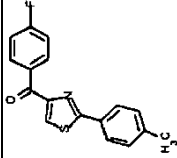
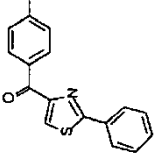
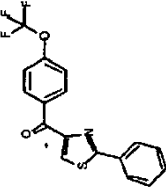
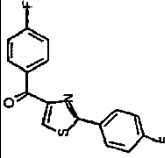
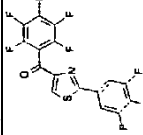
Tabla 6

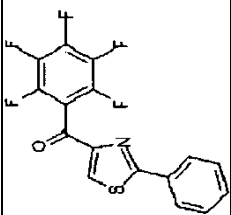
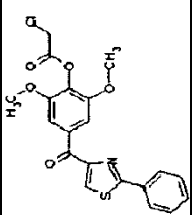
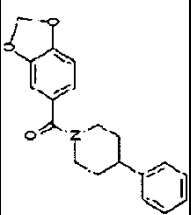
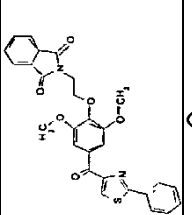
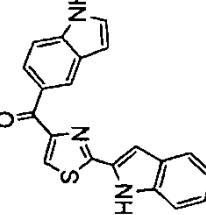
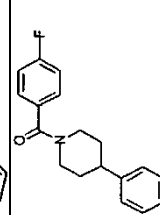
ID	LNCaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/Dx5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES
Paclitaxel	1,7	4,8	5,1	2,3	12	17		2,7	6,6	4,7	6263
Vinblastina	1,1	2,1	1,8	1,1	1	4,7		1,4	16	3,9	582
Colchicina	16	11	10	20	20	29		8,4	22	17	1113
1k	101	101	140	84	100	245	220				
2k	6	13	12	8	33	43		11	19	34	12
2m	19	8,7	6,9	6,2	11	21					
2n	101	131	143	99	210	290					
2o	65	73	121	73	38	42					
2p	>10000	2385	1899	1079	2200	16560					
2q	>10000	>10000	>10000	>10000	>20000	>20000					
5c-HCl	53	53	70	43							
6d	703	908	1637	929							

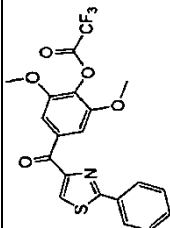
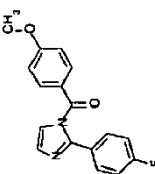
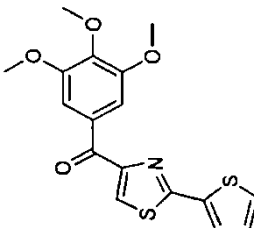
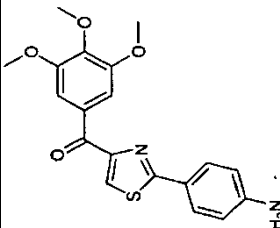
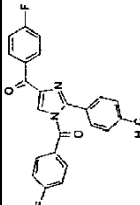
*ND: no determinado

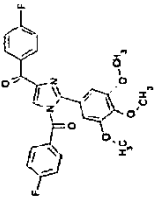
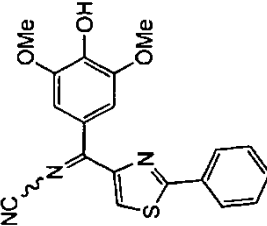
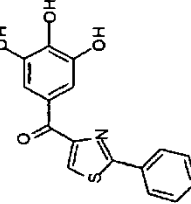
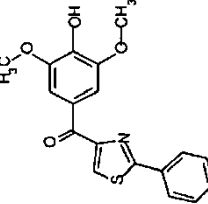
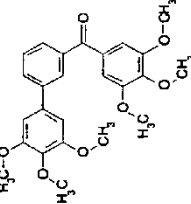
Tabla 6A

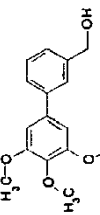
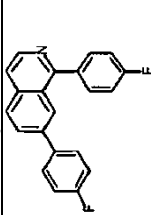
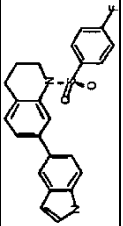
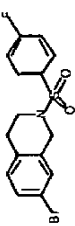
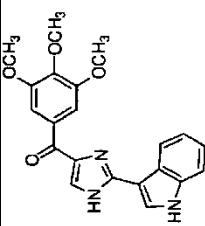
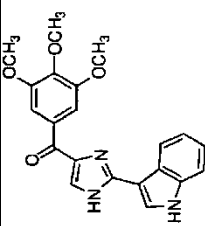
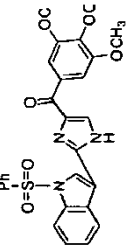
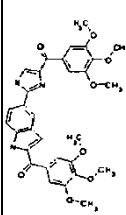
Estructura	ID	LNCaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/Dx5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES
	8	346	704	580	230	318	570	404				
	9	-10000	-10000	-10000	-10000							

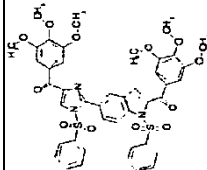
Estructura	ID	Cl ₅₀ (nM)										
		LNCaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/Dx5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES
	10	658	786	839	701	1111	2127	661				
	11	>10000	>10000	-10000	-10000	3470	4900		4700			
	12	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000					
	13	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000				
	14	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000					
	16	>10000	>10000	>10000	>10000	15200	6900					

Estructura	ID	Cl ₅₀ (nM)										
		LNcaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/Dx5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES
	17	2100	1900	2600	1300	4300	9800					
	18	~10000	~10000	~10000	~10000							
	19	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000					
	20	1452	>10000	642	633	2300	3100	1300				
	21	314	403	435	216	383	924	408				
	22	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000					

Estructura	ID	Cl ₅₀ (nM)										
		LNCaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/Dx5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES
	23	~10000	~10000	~10000	~10000							
	24	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000				
	25	48	44	24	13	20	38					
	26	23	16	16	15	11	14					
	29	1788	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000					

Estructura	ID	Cl ₅₀ (nM)										
		LNCaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/DX5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES
	30	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000					
	32	1664	2291	4601	1170	2700	>10000	2600				
	33	>2000	>2000	>2000	>2000	9800	>20000					
	34	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000				
	35	1500	40100	21900	15000							

Cl ₅₀ (nM)													
Estructura	ID	LNCaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/Dx5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES	
	39	4300	32500	16800	21400								
	40	13400	19600	18400	6200								
	41	15750	18170	17040	>20000								
	42	43590	23790	24880	>20000								
	43	12690	14720	17210	>20000								
	17ya	12	10	17	21	17,35	32,94	12,08					
	17yaa	233,7	148,3	592,1	208,9	481,2	538,7	467,6					
	15xaa	1068	2628	5917	4575	1800	1390	1700					

Cl ₅₀ (nM)												
Estructura	ID	LNCaP	PC-3	DU 145	PPC-1	A375	B16-F1	WM164	MES-SA	MES-SA/Dx5	OVCAR-8	NCI/ADR-RES
	16xaa	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000				

Ejemplo 13

Evaluación biológica de derivados de isoquinilina

Cultivo celular

- 5 LNCaP, PC-3, DU-145, PPC-1, MES-SA y MES-SA/DX5 se obtuvieron originalmente de ATCC (Rockville, MD). Todas las células obtenidas de ATCC se expandieron inmediatamente y se congelaron de manera que todas las líneas celulares pudieran recomenzarse cada 2-3 meses a partir de un vial congelado de la misma carga de células. Para los estudios de xenoinjerto *in vivo*, PC-3 se autenticó en el Laboratorio Diagnóstico del Animal de investigación (Columbia, MO) dentro de los cuatro meses antes de los estudios. La contaminación entre especies se probó por PCR y la identidad de las líneas celulares se verificó generando un perfil genético. MES-SA y MES-SA/DX5 se mantuvieron en Medio 5A de McCoy que contenía L-glutamina 2 mM suplementada con suero bovino fetal (FBS) al 10%. Todas las demás células se mantuvieron en medio RPMI-1640 con L-glutamina 2 mM y FBS al 10%.

Ensayo de inhibición de crecimiento

- 15 La actividad citotóxica o antiproliferativa de compuestos de ensayo se investigó en varias líneas celulares usando el ensayo de sulforodamina B (SRB). Las células cultivadas se pusieron en placas de 96 pocillos y se incubaron con medio que contenía diferentes concentraciones de los compuestos de prueba durante 96 h. Las células se tiñeron con disolución SRB. La densidad óptica se determinó a 540 nm en un lector de microplaca (Dynex Technologies, Chantilly, VA). Se construyeron representaciones de porcentaje de inhibición del crecimiento celular frente a concentración de fármaco, y la concentración que inhibió el crecimiento celular al 50% respecto al control no tratado (CI_{50}) se determinó por regresión de mínimos cuadrados no lineal usando el programa WinNonlin (Pharsight Corporation, Cary, NC).

Análisis del ciclo celular

- 25 La distribución del ciclo celular se determinó por tinción de yoduro de propidio (PI). Las células tratadas se lavaron con PBS y se fijaron con etanol enfriado con hielo al 70% toda la noche. Las células fijadas se tiñeron entonces con 20 μ g/mL de PI en presencia de RNasa A (300 μ g/mL) a 37°C durante 30 min. La distribución del ciclo celular se analizó por los servicios básicos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Tennessee, TN.

Estudios del metabolismo *in vitro*

- 30 Para ambas fases I, la mezcla de incubación, en tampón de fosfato de potasio 65 mM (pH 7,4), consistió en 1 mg/mL de proteínas microsomales hepáticas, NADPH 3 mM, y compuesto de prueba 0,5 μ M. La concentración de metanol (usado para disolver el sustrato) fue 1% (v/v). El volumen total de la incubación fue 200 μ L y las mezclas de reacción se incubaron a 37°C. Para generar las curvas de estabilidad para compuestos de prueba las diferentes incubaciones se pararon a 10, 20, 30, 60 y 90 minutos para el análisis de los compuestos que quedan. Todas las reacciones se pararon mediante la adición de 200 μ L de acetonitrilo enfriado con hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron después a 3000g durante 5 min y el sobrenadante se analizó por LC-MS/MS.

Estudios farmacocinéticos en ratones

- 40 Se usaron ratones ICR macho (5-6 semanas, 20-25 g). Para 6a, 6b y 6c se administró una dosis de 5 mg/kg por medio de la ruta i.v., i.p. y p.o. Las dosis i.v. se administraron por medio de la vena de la cola. Las dosis orales se administraron por alimentación forzada. En cada punto temporal, tres o cuatro ratones se eutanizaron por isoflurano (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) y muestras de sangre (hasta 600 μ L cada una) se tomaron de la vena cava posterior. Las muestras de plasma se almacenaron a -20°C antes del análisis. Las proteínas en plasma se precipitaron por la adición de acetonitrilo (150 μ L, que contenía el patrón interno) a 100 μ L de plasma de ratón. Las muestras se agitaron haciendo vórtice y después se centrifugaron a 8000g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un vial limpio para la inyección en el espectrómetro de masas para el análisis.

45 Estudio de eficacia antitumoral *in vivo*

- 50 Las células PC-3 ($2,5 \times 10^6$ células/sitio) más Matrigel (BD biosciences, San José, CA) se inyectaron de forma subcutánea en los flancos de ratones nu/nu macho. El tamaño tumoral se midió usando calibradores cada 2-4 días y se calculó como $V = \pi/6 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100~150 mm³, se inició el tratamiento con fármaco. El grupo de control se trató con vehículo (Captex200 al 20% en Tween80). Durante el tratamiento, el tamaño del tumor y los pesos corporales se midieron cada 2-4 días.

Cuento de glóbulos blancos

Se obtuvo sangre completa de ratones desnudos al final del estudio de eficacia. Para contar los glóbulos blancos (WBC) usando un hemacitómetro, 10 μ L de muestra de sangre completa se diluyeron con los 190 μ L de ácido

acético al 2%. Con el ajuste de luz apropiado, los leucocitos aparecieron como puntos oscuros en el hemacitómetro. El WBC en cada muestra se contó dos veces en una hora después de la dilución y se calculó el promedio.

Resultados

5 Tabla 7. Eficacia anti-cancerígena de compuestos de isoquinolina en diferentes líneas celulares cancerígenas y líneas celulares MDR mediadas por P-glicoproteína

	CI ₅₀ (nM)				
	6a	6b	6c	Vinblastina	Docetaxel
LNCaP	80,6 ± 17,1	98,1 ± 17,9	38,3 ± 9,7	3,4 ± 0,9	4,7 ± 1,3
PC-3	64,4 ± 12,2	71,8 ± 9,1	25,6 ± 8,3	1,4 ± 0,3	6,3 ± 0,4
DU-145	91,7 ± 10,2	113,4 ± 21,4	46,6 ± 13,8	2,6 ± 1,0	5,2 ± 1,0
PPC-1	60,6 ± 3,4	47,9 ± 10,0	27,7 ± 4,5	1,1 ± 0,4	2,7 ± 1,0
P-gp					
MES-SA	78,2 ± 1,8	129,8 ± 38,0	35,6 ± 2,8	2,3 ± 0,8	5,9 ± 1,1
MES-SA/DX5	119,4 ± 0,4	177,8 ± 32,8	59,2 ± 0,1	45,7 ± 5,3	76,4 ± 8,7
Factor de resistencia	1,5	1,4	1,7	20	13

NOTA: P-gp se sobre-expresa en MES-SA/DX5. El factor de resistencia (RF) se calculó como la relación de valores CI₅₀ para la sublínea celular resistente a la de la línea celular parental. Todos los experimentos se realizaron al menos en tres réplicas.

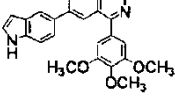
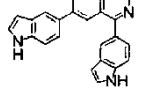
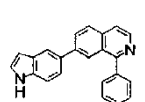
Tabla 8. Compuesto 6a, 6b y 6c detuvieron a las células PC-3 en la fase G₂M.

	CE ₅₀ de detención en fase G ₂ M (nM)
6a	53,4
6b	91,9
6c	23,3

10 Tabla 9. Resumen de semividas (ruta de fase I) de 6a, 6b y 6c en microsomas hepáticos de ratón, rata, hámster, conejo, cobaya, perro, mono y humano.

	T ½ (min)		
	6a	6b	6c
Ratón	3,4	10	13
Rata	12	9	14
Hámster	6	11	20
Conejo	17	16	16
Cobaya	15	15	8
Perro	13	30	29
Mono	16	13	9
Humano	32	40	47

Tabla 10. Resumen de propiedades farmacocinéticas de compuesto 6a, 6b y 6c en ratones.

		6a	6b	6c
				
PM		410,5	359,4	338,4
CL IV (mL*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	5 mg/kg	51	14	30
V _d IV (L*kg ⁻¹)	5 mg/kg	2,3	1,1	1,8
C _{max} IP (ng/mL)	5 mg/kg	678,4	1500	1100
AUC IP (min*µg/mL)	5 mg/kg	59	218	55
Biodisponibilidad IP	% de F _{ip}	60	60	33
C _{max} PO (ng/mL)	5 mg/kg	6,7	50	50
AUC (min*µg/mL)	5 mg/kg	5	7	4
Biodisponibilidad PO	% de F _{po}	5	2,1	2,7

15 La eficacia y tolerabilidad de 6b y 6c se midió en modelos de xenoinjerto después de inyección i.p. (Figura 34). Los xenoinjertos de PC-3 se trataron con vehículo (qd), 6b (40 mg/kg, qd) o 6c (40 mg/kg, qd) durante 3 semanas. Los vehículos de dosificación estaban compuestos de Captex200 al 20% en Tween80. Los volúmenes tumorales (mm³)

se representaron frente al tiempo y son las medias \pm DE de ocho animales. Los volúmenes tumorales y las tasas de supervivencia o pesos corporales se muestran en la Figura 34A. El tamaño del hígado (g) de cada ratón desnudo se midió después de 3 semanas de tratamiento y se mostró en la Figura 34B. El número de glóbulos blancos se contó en sangre completa recogida del animal después de 3 semanas de tratamiento y se muestra en la Figura 34C.

5 Ejemplo 14

Actividad antiproliferativa de compuestos ABI seleccionados

Ensayo de citotoxicidad de cultivo celular

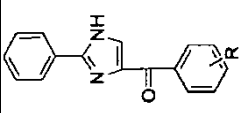
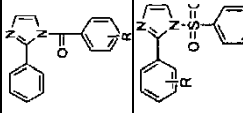
Materiales y métodos

La actividad antiproliferativa de los compuestos ABI en tres líneas celulares de melanoma (A375 y WM-164, línea celular de melanoma humano; B16-F1, línea celular de melanoma de ratón) y cuatro líneas celulares de cáncer de próstata humano (LNCaP, DU 145, PC-3 y PPC-1) se estudiaron. Todas estas líneas celulares se compraron de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) excepto la línea celular PPC-1. Las células MDA-MB-435 y MDA-MB-435/LCCMDR1 se proporcionaron amablemente por el Dr. Robert Clarke de la Escuela Universitaria de Medicina de Georgetown, Washington, DC. Las células de melanoma se cultivaron en DMEM (Cellgro Mediatech, Inc., Herndon, VA) y las células de cáncer de próstata se cultivaron en RPMI 1640 (Cellgro Mediatech, Inc., Herndon, VA) suplementado con FBS al 10% (Cellgro Mediatech). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. Se pusieron en placas 1000 a 5000 células en cada pocillo de placas de 96 pocillos dependiendo de la tasa de crecimiento y se expusieron a diferentes concentraciones de un compuesto de prueba durante 48 h (células de melanoma de crecimiento rápido) o 96 h (células de cáncer de próstata de crecimiento lento) en tres a cinco réplicas. Los números de células al final del tratamiento con fármaco se midieron por el ensayo de sulforodamina B (SRB). Brevemente, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 10% y se tiñeron con SRB al 0,4%, y las absorbancias a 540 nm se midieron usando un lector de placas (DYNEX Technologies, Chantilly, VA). Los porcentajes de supervivencia celular frente a concentraciones de fármaco se representaron, y los valores de CI₅₀ (concentración que inhibió el crecimiento celular al 50% de control no tratado) se obtuvieron por análisis de regresión no lineal usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados

Los resultados de las actividades antiproliferativas *in vitro* de los compuestos usando tres líneas celulares de melanoma (una línea celular de melanoma murina, B16-F1, y dos líneas celulares de melanoma metastático humanas, A375 y WM-164) y cuatro líneas celulares de cáncer de próstata humanas (LNCaP, PC-3, Du 145 y PPC-1) se resumen en las Tablas 11-13.

Tabla 11. Efectos inhibidores del crecimiento *in vitro* de compuestos sin sustituciones del anillo A

Estructura	ID	R	Cl ₅₀ (nM)						
			A375	B16-F1	WM164	LNCaP	PC-3	Du 145	PPC-1
	12aa	3,4,5-(OMe) ₃	160	120	10	152	288	196	133
	12ab	4-OMe	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12ac	3-OMe	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12ad	3,5-(OMe) ₂	2800	5400	2100	3611	3274	2590	2129
	12ae	3,4-(OMe) ₂	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12af	4-F	580	930	630	613	2197	846	575
	12ag	3-F	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12ah	4-Me	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12ai	3-Me	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12aba	4-OMe	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12aaa	3,4,5-(OMe) ₃	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	10a	H	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	10x	4-NO ₂	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	10j	4-OBn	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

ES 2 718 637 T3

5 A partir de la Tabla 11, los compuestos 12aa-12ai mostraron actividad moderada con valores de Cl_{50} en el intervalo μM (promedio de las siete líneas celulares). El compuesto más potente de esta serie fue 12aa con un valor de Cl_{50} promedio de 160 nM. La eliminación de uno de los grupos metoxi del 3,4,5-trimetoxi en el anillo C (12ad, 12ae) llevó a una pérdida significativa de actividad ($Cl_{50} > 10 \mu M$ para 12ae y una Cl_{50} promedio de 3,1 μM para 12ad). El compuesto con 4-fluoro en el anillo C (12af) también mostró actividad relativamente buena ($Cl_{50} = 0,91 \mu M$), un descubrimiento que tiene una importante implicación, porque reemplazar el resto trimetoxi con un grupo 4-fluoro puede proporcionar buena actividad y estabilidad metabólica mejorada. La posición del flúor en el anillo C fue crítica para la actividad porque un desplazamiento de 4-fluoro a 3-fluoro dio por resultado la pérdida total de actividad ($Cl_{50} > 10 \mu M$ para 12ag comparado con 0,91 μM para 12af). Este resultado sugirió que un dador de enlace de hidrógeno potencial está presente cerca de la posición 4 de este anillo.

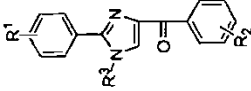
10 Como se indica claramente en la Tabla 11, las posiciones de los anillos A y C fueron críticas. Un desplazamiento sencillo del resto de anillo C de la posición 4 a la posición 1 en el anillo imidazol (anillo B) dio por resultado la pérdida total de la actividad ($Cl_{50} > 10 \mu M$ para 12aba, 12aaa, 10a, 10x, 10j).

ND- no determinado

			ID	R ¹	R ²	C ₁₅₀ ± EEM (nM)									
						A375	B16-F1	WM164	LNcAP	PC-3	Du 145	PPC-1	OVCAR-8	NCI/ADR-RES	
	12ba	4-F	3,4,5-(OMe) ₃	205±19	320±41	73±8	98±2	169±12	132±24	81±1					
	12ca	4-OMe	3,4,5-(OMe) ₃	30±5	108±12	31±4	31±1	45±1	48±0,5	34±0,3					
	12cb	4-OMe	4-F	31±5	63±7	28±3	28±2	31±2	41±38	29±1					
	12da	4-Me	3,4,5-(OMe) ₃	9±2	46±5	8±2	12±1	9±0,4	15±0,5	11±0,1					
	12db	4-Me	4-F	143±13	222±10	156±19	45±2	56±3	78±5	54±1					
	12db-HCl			108±11	297±23	112±9	ND	ND	ND						
	12dc	4-Me	3,5-(OMe) ₂ -4-OH	105	387	123	134	127	174	110					
	12ea	3,4,5-(OMe) ₃		4800	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000					
	12eb	3,4,5-(OMe) ₃	4-F	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000					
	12fa	4-Cl	3,4,5-(OMe) ₃	43±5	168±14	26±3	24±1	35±1	36±0,4	26±0,2	47	19			
	12fb	4-Cl	4-F	52±4	73±6	74±9	49±2	81±2	65±1	52±1					
	13fa	4-Cl	3,4,5-(OH) ₃	3900	1810	2100	10000	10000	10000	>10000					
	12ga	4-N(Me) ₂	3,4,5-(OMe) ₃	82±9	361±29	80±11	58±2	92±4	95±1	67±0,7					
12gb	4-N(Me) ₂	4-F	56±7	129±11	62±8	57±6	81±3	72±0,4	45±0,3						
12ha	3,4-(OMe) ₂	3,4,5-(OMe) ₃	113±14	1400±200	191±18	121±10	203±7	168±15	117±1						
12hb	3,4-(OMe) ₂	4-F	10000	4210	1400	2533	10000	10000	2172±48						
12ia	2-CF ₃	3,4,5-(OMe) ₃	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000						
12ib	2-CF ₃	4-F	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000						
13ea	3,4,5-(OH) ₃	3,4,5-(OH) ₃	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000						
12ia	4-OBn	3,4,5-(OMe) ₃	5200	10000	5500	2786	10000	10000	2844						
12jb	4-OBn	4-F	93±8	117±16	90±12	44±7	79±0,4	60±3	43±0,2						
12ka	4-OH	3,4,5-(OMe) ₃	1600	2400	1800	ND	ND	ND	ND						
12kb	4-OH	4-F	10000	>10000	>10000	10000	>10000	>10000	>10000						
12kc	4-OH	3-OH, 4,5-(OMe) ₂	10000	5600	6400										
	12la	4-Br	3,4,5-(OMe) ₃	32	74	36	34	36	49	33					
	12pa	4-CF3	3,4,5-(OMe) ₃	163,1	468,7	175	134	127	174	110					
	13ha	3,4-(OH) ₂	3,4,5-(OH) ₃	>10000	>10000	>10000	ND	ND	ND	ND					

A partir de la Tabla 12 los compuestos con sustituciones 3,4,5-trimetoxi y 4-fluoro en el anillo C mostraron buena actividad con diferentes sustituciones en el anillo A. Estos compuestos demostraron excelente actividad antiproliferativa con valores CI_{50} tan bajos como 8,0 nM en la línea celular WM164 (12da). En general, los compuestos que incorporan un único sustituyente en la posición *para* del anillo A fueron más potentes como puede verse a partir de las actividades 12ca, 12cb, 12da, 12db, 12fa, 12fb, 12ga y 12gb (CI_{50} = 7,9-110 nM). La sal de 12db-HCl (CI_{50} = 172 nM) mostró actividad ligeramente disminuida en comparación con la correspondiente base libre 12db (CI_{50} = 109 nM). El compuesto 12fb (CI_{50} = 63,7 nM), con un único sustituyente halógeno en la posición *para* de los anillos A y C, demostró potencia y estaba desprovisto de un resto metoxi. Los compuestos con sustituyentes 3,4,5-trimetoxi en el anillo A perdieron la actividad completamente (CI_{50} >10 μ M para 12ea, 12eb), sugiriendo ambientes de unión muy diferentes cerca del anillo A y el anillo C. La eliminación del sustituyente 5-metoxi del anillo A mejoró la actividad significativamente (CI_{50} = 330 nM y >10 μ M para 12ha, 12ea respectivamente). La desmetilación del 3,4,5-trimetoxi disminuyó la actividad bruscamente de 43 nM (12fa) a 3,89 μ M (13fa). Se observaron resultados similares para 13ea, 12ka, 12kb y 13ha debido a la desmetilación de sustituyentes o bien en el anillo A o en el C. Los grupos dadores de electrones (4-metoxi, 4-dimetilamino, 4-metilo) y grupos aceptores de electrones (4-cloro, 2-trifluorometilo) en el anillo A no mostraron diferencias sustanciales en la actividad. La introducción de un grupo trifluorometilo en la posición *orto* del anillo A provocó la pérdida completa de actividad (CI_{50} >10 μ M para 12ia, 12ib). La presencia de un grupo benciloxi en la posición *para* del anillo A (CI_{50} = 75 nM para 12jb) dio por resultado un aumento de 440 veces en la actividad cuando se compara con el compuesto *para*-hidroxi 12kb (CI_{50} = 33 μ M). Merece la pena anotar que el compuesto 12jb, con el 4-fluoro en el anillo C, tiene mejor actividad que la de su equivalente 12ja, que tiene un grupo 3,4,5-trimetoxi en el anillo C (CI_{50} es 75 nM para 12jb y 7,3 μ M para 12ja).

Tabla 13. Efectos inhibidores del crecimiento *in vitro* de compuestos con protección en el anillo B.

Estructura	ID	R ¹	R ²	R ³	Cl ₅₀ ± EEM (nM)						PPC-1
					A375	B16-F1	WM164	LNCaP	PC-3	Du 145	
	11ab	H	4-OMe	SO ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11ac	H	3-OMe	SO ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11ah	H	4-Me	SO ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11af	H	4-F	SO ₂ Ph	630±72	946±86	596±61	573	2233	846	575
	11ag	H	3-F	SO ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11cb	4-OMe	4-F	SO ₂ Ph	36±5	71±8	43±6	31±2	33±2	52±3	32±0,7
	11db	4-Me	4-F	SO ₂ Ph	113±14	287±31	107±14	55±3	80±1	80±1	57±1
	11ea	3,4,5-(OMe) ₃	3,4,5-(OMe) ₃	SO ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11eb	3,4,5-(OMe) ₃	4-F	SO ₂ Ph	3840	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11fb	4-Cl	4-F	SO ₂ Ph	88±9	107±12	70±6	48±1	76±2	64±1	54±1
	11ga	4-N(Me) ₂	3,4,5-(OMe) ₃	SO ₂ Ph	162±13	1200±90	308±32	62±2	93±6	99±2	72±0,4
	11gb	4-N(Me) ₂	4-F	SO ₂ Ph	55±7	242±26	56±4	56±6	83±3	74±0,5	48±0,3
	11ha	3,4-(OMe) ₂	3,4,5-(OMe) ₃	SO ₂ Ph	192±15	970±68	139±15	114±6	197±9	144±29	117±2
	11hb	3,4-(OMe) ₂	4-F	SO ₂ Ph	960±59	2000±400	1400±30	1915±77	10000	3312	1441±49
	11ia	2-CF ₃	3,4,5-(OMe) ₃	SO ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11ib	2-CF ₃	4-F	SO ₂ Ph	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	11jb	4-OBn	4-F	SO ₂ Ph	64±7	110±15	48±5	35±1	75±0,5	58±1	38±0,2
	12dab	4-Me	3,4,5-(OMe) ₃	Me	32	134	40	32	46	36	28
	12cba	4-OMe	4-F	Me	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
	12daa	4-Me	3,4,5-(OMe) ₃	CH ₂ Ph				683,2	465,8	1501	777,9
	12gba	4-N(Me) ₂	4-F	SO ₂ PhOMe	~100	~100	~100	73,2	44,14	129,4	63,4

De la Tabla 13, los compuestos con un grupo de protección de fenilsulfonilo unido al nitrógeno del anillo imidazol (11cb, 11db, 11fb, 11ga, 11gb, 11ha, 11jb) también eran muy activos con Cl_{50} en el intervalo nM (Tabla 13). Generalmente las actividades de estos compuestos son comparables a sus equivalentes no protegidos correspondientes como se ejemplifica comparando las actividades de 11cb (43 nM), 11db (111 nM), 11fb (72 nM), 11ga (285 nM), 11gb (87 nM), 11ha (268 nM) y 11jb (61 nM) con sus equivalentes no protegidos correspondientes 12cb (36 nM), 12db (109 nM), 12fb (64 nM), 12ga (131 nM), 12gb (72 nM), 12ha (330 nM) y 12jb (75 nM). Otros compuestos (11ab-11ag, 11ea, 11eb, 11hb, 11ia y 11ib, 1-50 μ M) eran generalmente mucho menos activos, también en línea con sus equivalentes (12ab-12ag, 12ea, 12eb, 12hb, 12ia y 12ib, 1-50 μ M).

Ejemplo 15

Actividad de los compuestos aril-benzoil-imidazol (ABI) en células de melanoma resistentes a fármacos

El flujo de fármaco mediado por P-glucoproteína (Pgp) representa un mecanismo principal para que las células cancerígenas eviten el aumento de concentraciones de fármaco intracelular anticancerígeno efectivo. La actividad de los compuestos ABI se comparó frente a las células de melanoma resistente a multifármaco (MDR) (MDA-MB-435/LCCMDR1) y sus células cancerígenas no resistentes parentales (MDA-MB-435). Aunque MDA-MB-435 se designó originalmente como una línea celular de cáncer de mama, se ha mostrado definitivamente que se origina a partir de la línea celular de melanoma M14. Los compuestos 12da, 12fb, 12cb, 11cb y 11fb junto con otros agentes dirigidos a la tubulina que incluyen colchicina, paclitaxel y vinblastina se probaron tanto en la línea celular de melanoma MDR como en su línea celular de melanoma parental (Tabla 14A). Paclitaxel y vinblastina son fármacos anticancerígenos usados clínicamente conocidos por tener como objetivo la tubulina celular. Aunque la colchicina no es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer, su profármaco, ZD6126, está en ensayo clínico para tumores sólidos. Bortezomib es el primer inhibidor de proteasoma terapéutico y se aprobó en 2003 por la FDA para el uso en múltiples mielomas. ABT-751 se conoce por tener como objetivo el sitio de unión de la colchicina de tubulina. Es un candidato a fármaco prometedor en el ensayo clínico para niños con recaída de neuroblastoma o neuroblastoma refractario. Los compuestos 12da, 12fb, 12cb, 11cb, 11fb tenían índices de resistencia mucho mejores (3,0 para 12da, 0,9 para 12fb, 1,3 para 12cb, 0,8 para 11cb, 0,7 para 11fb) que la colchicina (65,8), paclitaxel (69,3) y vinblastina (27,5). Aunque la colchicina, paclitaxel y vinblastina mostraron excelente actividad en las líneas celulares de melanoma no resistente (0,5-10 nM), estos compuestos fueron significativamente menos potentes en la línea celular de melanoma MDR (277-658 nM). En contraste, 12cb, 11cb, 11fb tuvieron esencialmente una potencia equivalente tanto en líneas celulares de melanoma MDR (15 nM, 38 nM, 30 nM, 30 nM, 35 nM para 12da, 12fb, 12cb, 11cb y 11fb respectivamente) como no resistentes (5 nM, 41 nM, 24 nM, 38 nM, 50 nM para 12da, 12fb, 12cb, 11cb y 11fb respectivamente). El compuesto 12da era más activo que el paclitaxel y la colchicina en células A375 y WM-164.

Tabla 14A. Efectos inhibidores del crecimiento *in vitro* de los compuestos ABI en comparación con otros fármacos anticancerígenos en la línea celular de melanoma resistente a multifármaco (célula MDR) y la línea celular parental sensible correspondiente (célula de melanoma normal).

ID del compuesto	$Cl_{50} \pm$ EEM (nM) (n=3)						
	A375	B16-F1	WM-164	Unión a tubulina (μ M)	MDA-MB-435	MDA-MB-435/LCC6MDR1	Índice de resistencia*
12da	9 \pm 2	46 \pm 5	8 \pm 2	0,2 \pm 0,1	5 \pm 1	15 \pm 2	3,0
12fb	52 \pm 4	73 \pm 6	74 \pm 9	3,9 \pm 2,1	41 \pm 2	38 \pm 2	0,9
12cb	31 \pm 5	63 \pm 7	28 \pm 3	3,4 \pm 1,5	24 \pm 2	30 \pm 4	1,3
11cb	36 \pm 5	71 \pm 8	43 \pm 6	ND	38 \pm 3	30 \pm 2	0,8
11fb	88 \pm 9	107 \pm 12	74 \pm 8	ND	50 \pm 6	35 \pm 3	0,7
Paclitaxel	12 \pm 3	17 \pm 2	18 \pm 3	N/A	4 \pm 1	277 \pm 41	69,3
Vinblastina	1,1 \pm 0,2	4,7 \pm 0,7	0,6 \pm 0,1	ND	0,4 \pm 0,1	11 \pm 1	27,5
Colchicina	20 \pm 3	29 \pm 5	10 \pm 2	1,8 \pm 0,5	10 \pm 1	658 \pm 50	65,8
Bortezomib	8 \pm 1	24 \pm 2	8 \pm 1	ND	ND	ND	ND
ABT-751	1111 \pm 108	2127 \pm 351	661 \pm 56	ND	ND	ND	ND

*Los índices de resistencia se calcularon dividiendo los valores Cl_{50} en la línea celular resistente a multifármaco MDA-MB-435/LCC6MDR1 por los valores Cl_{50} en la línea celular parental sensible correspondiente MDA-MB-435. Abreviaturas: N/A, valor no disponible; ND, no determinado.

Tabla 14B. Eficacia anti-cancerígena y afinidad de unión al sitio de la colchicina de ABI en diferentes líneas celulares cancerígenas y MDR con diferentes mecanismos de resistencia. Los ABI mostraron excelente potencia frente a todas las líneas celulares de melanoma probadas incluyendo líneas celulares altamente metastáticas y resistentes a multifármaco. La alta afinidad de unión de ABIs al sitio de unión de la colchicina en la tubulina confirmó su objetivo dentro de las células.

	CI ₅₀ ± EEM (nmol/L) (n=3)							
	12cb	12da	12fb	Paclitaxel	Vinblastina	Colchicina	ABT-751	SN-38
A375	31±5	9±2	52±4	12±3	1±0,1	20±3	685±108	ND
A375MA2	44±5	8±1	55±4	8±1	1±0,2	18±2	265±36	ND
B16-F1	63±7	46±5	73±6	17±2	5±1	29±5	2127±351	ND
WM-164	28±3	8±2	74±9	18±3	0,6±0,1	10±2	661±56	ND
MDR1								
MDA-MB-435*	24±2	5±1	41±2	4±1	0,4±0,1	10±1	417±23	ND
MDA-MB-435/LCC6MDR1	30±4 (1)	11±2 (2)	38±2 (1)	277±4 (69)	11±1 (28)	658±50 (66)	577±31 (1)	ND
OVCAR-8*	25±2	11±1	45±2	10±0,2	2±0,1	12±1	785±17	2±0,2
NCI/ADR-RES	13±1 (0,5)	5±0,1 (0,5)	20±6 (0,4)	5109±170 (511)	570±84 (285)	737±51 (61)	864±42 (1)	10±1 (5)
MRP								
HEK293 - pcDNA3.1 *	12±2	9±1	54±0,3	9±0,3	5±0,1	3±0,4	645±153	3±0,4
HEK293-MRP1	16±2 (1)	8±1 (0,9)	33±7 (0,6)	30±3 (3)	24±1 (5)	5±0,1 (2)	717±28 (1)	9±0,04 (3)
HEK293-MRP2	14±4 (1)	8±0,3 (0,9)	39±12 (0,7)	37±2 (4)	28±2 (6)	3±0,3 (1)	747±7 (1)	7±0,1 (2)
BCRP								
HEK293-482R2	17±1 (1)	8±1 (0,9)	23±3 (0,4)	50±1 (6)	25±1 (5)	5±0,1 (2)	653±72 (1)	123±28 (41)
Unión a la tubulina (μM)*	3±1	0,2±0,1	4±1	N/A	ND	2±1	3,1 ⁺⁺	ND

Notas: *: línea celular parental a sublínea celular resistente al fármaco; MDR1 se sobre-expresó en MDA-MB-435/LCC6MDR1 y NCI/ADR-RES; MRP1, MRP2 y BCRP se sobre-expresaron en HEK293-MRP1, HEK293-MRP2 y HEK293-482R2. Los índices de resistencia (números en el paréntesis) se calcularon dividiendo los valores CI₅₀ en la sublínea celular resistente por los de la línea celular parental correspondiente. *: CI₅₀ para la unión a la tubulina se calculó a partir del ensayo de centelleo por proximidad de unión por competición de [³H]colchicina. **: afinidad de unión presentada en la bibliografía para ABT-751. Abreviaturas: N/A, no aplicable ya que se unen a la tubulina en diferentes sitios.

Los resultados de la Tabla 14A mostraron que la línea celular MDA-MB-435/LCCMDR1 era muy resistente a la colchicina, paclitaxel y vinblastina. Pero los ABI de esta invención mostraron igual potencia a la línea celular resistente al fármaco y la línea celular parental sensible. Este resultado sugiere fuertemente que los ABI no son sustratos para P-gp. Por consiguiente, superan la resistencia a multifármacos encontrada en células MDA-MB-435/LCCMDR1. Las curvas de respuesta a la dosis se muestran en la Figura 21 para 12fb, 12da y 12cb. La Tabla 14B explora más los mecanismos de resistencia para paclitaxel, SN-38, vinblastina y colchicina en comparación a los ABI 12cb, 12da y 12fb. MRP y BCRP dieron resistencia moderada al paclitaxel (índices de resistencia de 4 y 6, respectivamente), vinblastina (índices de resistencia de 6 y 5, respectivamente), y BCRP dieron significativa resistencia a SN-38 (índice de resistencia de 41). Sin embargo, ninguno de los ABI fue susceptible a la resistencia mediada por MRP o BCRP (los índices de resistencia oscilaron de 0,4 a 1,0). ABT-751, como los ABI, no fue susceptible a MDR1, MRP o BCRP.

Ejemplo 16

Ensayo de polimerización de microtúbulo *in vitro*

15 Materiales y métodos

Se mezcló tubulina de cerebro bovino (0,4 mg) (Cytoskeleton, Denver, CO) con 10 μM del compuesto de prueba y se incluyó en 110 μl de tampón de tubulina general (PIPES 80 mM, MgCl₂ 2,0 mM, EGTA 0,5 mM y GTP 1 mM) a pH 6,9. La absorbancia a 340 nm se monitorizó cada 1 min durante 15 min mediante el Lector de Microplacas SYNERGY 4 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). El espectrofotómetro se ajustó a 37°C para la polimerización de tubulina.

Resultados

Se examinó la inhibición de polimerización de tubulina mediante compuestos de aril-benzoil-imidazol (ABI). Se incubó tubulina de cerebro bovino (>97% pura) con tres potentes compuestos ABI, 12cb, 12da y 12db a una concentración de 10 μM, para determinar el efecto de estos compuestos ABI en la polimerización de tubulina (Figura 22). La polimerización de tubulina se inhibió completamente mediante el compuesto 12da, mientras que se observó ~80% de inhibición durante la incubación con compuestos 12cb y 12db.

Este efecto de desestabilización de microtúbulo fue similar al de la colchicina y vinblastina pero fue contrario al del paclitaxel. Los resultados no solo confirmaron que los ABI pueden interactuar directamente con la tubulina sino que también sugirieron que pueden compartir el mismo sitio de unión con la colchicina (o vinblastina).

Ejemplo 17

5 Inhibición de melanoma *in vitro*

Materiales y métodos

Las células de melanoma B16-F1 se pusieron en placas a una densidad de formación de colonias (2000 células por pocillo en placas de seis pocillos) encima de base de agar al 0,8%. Las células se cultivaron en agar al 0,4% junto con medio DMEM suplementado con suero bovino fetal y una disolución antibiótica-antimicótica a 37°C en una atmósfera de aire al 95% y CO₂ al 5%. Las células se trataron con los compuestos 12da, 12cb y 12fb a diferentes concentraciones (20, 100 y 500 nM). Los compuestos se añadieron a los medios a partir de disoluciones madre de DMSO 1 mM, y se usó una dilución correspondiente de DMSO como control. Las células se cultivaron durante 14 días. Las placas se fotografiaron, y el número de colonias se midió mediante el Contador de Colonias Automatizado Artek 880 (Artek Systems Corporation, Farmingdale, NY).

15 Resultados

Se muestran cuatro fotos representativas en la Figura 23. Después de 14 días de incubación, aproximadamente 130 colonias detectables (diámetro mayor de 100 µm) se formaron en los controles (sin tratamiento).

Los compuestos 12cb y 12da inhibieron de forma efectiva la formación de colonias de melanoma B16-F1 incluso a la menor concentración probada, 20 nM ($p < 0,05$ en comparación con el control). 12fb mostró inhibición efectiva a 100 nM. Los tres compuestos probados mostraron inhibición completa de la formación de colonias a 0,5 µM, probando más la eficacia antimelanoma de los ABI.

Ejemplo 18

Actividad anti-tumoral *in vivo*

Materiales y métodos

25 Animales: ratones C57/BL hembra, edad de 4-6 semanas, se compraron de Harlan Laboratories (Harlan Laboratories Inc., Indianápolis, IN). El alojamiento animal cumplía las especificaciones de la Asociación para la Evaluación y Acreditación y Cuidado del Animal de Laboratorio. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices de nuestro Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional.

30 Evaluación *in vivo* de la eficacia. Se prepararon células B16-F1 de melanoma de ratón en medio DMEM libre de FBS (Cellgro Mediatech) a una concentración de 5×10^6 células viables/mL. La suspensión celular (100 µL) se inyectó de forma subcutánea en el flanco dorsal derecho de cada ratón. Cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 100-150 mm³, aproximadamente 7 días después de la inoculación celular, todos los ratones que portaban tumores se dividieron en grupos de control y tratamiento en base al tamaño del tumor ($n = 5$ por grupo). Cada grupo tenía tamaño de tumor promedio similar. Los ratones en los grupos de control (control negativo) se inyectaron de forma intraperitoneal con 50 µL de disolución vehículo solo o DTIC a 60 mg/kg (control positivo) una vez al día. El volumen del tumor se midió cada 2 días con un calibrador digital electrónico trazable (Fisher Scientific, Inc., Pittsburgh, PA) y se calculó usando la fórmula $a \times b^2 \times 0,5$, donde a y b representan los diámetros mayor y menor, respectivamente. El volumen del tumor se expresó en milímetros cúbicos. Los datos se expresaron como media \pm DE para cada grupo y se representaron como una función del tiempo. El porcentaje de reducción de tumor a la conclusión del experimento (14 días después de comenzar el tratamiento) se calculó con la fórmula $100 - 100 \times [(T - T_0)/(C - C_0)]$, donde T representa el volumen de tumor medio de un grupo tratado en un día específico, T_0 representa el volumen de tumor medio del mismo grupo en el primer día de tratamiento, C representa el volumen de tumor medio de un control en un día específico y C_0 representa el volumen de tumor medio del mismo grupo en el primer día de tratamiento. La actividad animal y el peso corporal promedio de cada grupo se monitorizó durante el periodo de experimento entero para evaluar la toxicidad del compuesto. al final del tratamiento, a todos los ratones se les hizo la eutanasia por CO₂ seguido por dislocación cervical, y los tumores se cosecharon para más estudios.

Resultados

50 Para evaluar la eficacia de análogos de ABI *in vivo*, se probó la actividad antitumoral del compuesto 12cb en xenoinjerto B16-F1 de melanoma de ratón frente a DTIC, el patrón de oro en el tratamiento de melanoma maligno, se usó como un control positivo (Figura 24A). Veinte ratones C57/BL hembra se dividieron en cuatro grupos: un grupo de control con vehículo, un grupo de tratamiento DTIC (60 mg/kg), un grupo de tratamiento de 12cb (10 mg/kg), y un grupo de tratamiento de 12cb (30 mg/kg). Cada ratón se inyectó con 0,5 millones de células de melanoma B16-F1 de forma subcutánea. Siete días después de la inoculación tumoral, el tratamiento comenzó con cada compuesto inyectado de forma intraperitoneal diaria (Figura 24). El volumen del tumor se redujo de forma

significativa ($p < 0,05$) a 47%, 51% y 73% para 12cb (10 mg/kg), DTIC (60 mg/kg) y 12cb (30 mg/kg), respectivamente, después de 14 días de tratamiento. No se observó pérdida de peso significativa en cualquiera de los grupos de tratamiento durante el experimento.

Dos niveles de dosis de 12fb, 15 y 45 mg/kg, se eligieron. DTIC a 60 mg/kg se usó como un control positivo. El modelo de aloinjerto de melanoma B16-F1 en ratones C57BL/6 se eligió primero para el estudio. Después de 13 días de tratamiento (Figura 24B), el compuesto 12fb inhibió el crecimiento del tumor de melanoma (valor TGI) por 32% a 15 mg/kg y 82% a 45 mg/kg. El valor p de la prueba t de Student de 12fb a 45 mg/kg comparado con el control fue menor que 0,001, que indican una diferencia significativa. El valor p de la prueba t de 12fb a 15 mg/kg comparado con el control fue 0,08, sugiriendo que esta dosis no fue efectiva. En comparación 12fb a 45 mg/kg con DTIC a 60 mg/kg, que tenía un TGI de 51%, el valor p de prueba t fue aproximadamente 0,001, sugiriendo que 12fb tenía actividad sustancialmente mejor que la de DTIC. Para los grupos de control y de tratamiento de 15 mg/kg de 12fb, el peso corporal promedio aumentó ligeramente a lo largo del periodo de experimento.

Para confirmar más la actividad *in vivo* de ABI, se usó el modelo de xenoinjerto de melanoma humano A375 en ratones SHO, y 12fb a 25 mg/kg se probó. Se usó DTIC a 60 mg/kg como un control positivo de nuevo. Después de 31 días de tratamiento (Figura 24C), 12fb inhibió el crecimiento del tumor de melanoma (valor TGI) por 69%, mientras que DTIC inhibió el crecimiento en 52%. El valor p de la prueba t del tratamiento de 12fb frente al control fue menor que 0,001, sugiriendo que 12fb inhibió significativamente el crecimiento del tumor de melanoma a 25 mg/kg. El valor p de la prueba t del tratamiento 12fb frente a DTIC fue menor que 0,05, sugiriendo de nuevo que 12fb tenía mejor actividad que la de DTIC. El peso corporal promedio de todos los grupos aumentaron ligeramente a lo largo del periodo del experimento. Las actividades físicas para los ratones también parecieron normales, sugiriendo que 25 mg/kg era una dosis bien tolerada por los ratones SHO.

Ejemplo 19

Unión a colchicina

Materiales y métodos

Cada compuesto de prueba se preparó a 20 x concentración en tampón G-PEM (Cytoskeleton Inc., Denver, CO) seguido de pipeteo de 10 μ L de compuesto de prueba en las placas de 96 pocillos. Diez microlitros de colchicina marcada tritiada (Perkin-Elmer, Waltham, MA) se añadió a cada pocillo de prueba. Posteriormente, 180 μ L de suspensión de gota/tubulina (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) se añadió en cada pocillo. La placa se incubó durante 45 min a 37°C antes de que se leyera mediante a un lector de placas NXT Topcount (Perkin-Elmer, Waltham, MA). La colchicina "fría" no radiomarcada se incluyó como un control positivo y paclitaxel como un control negativo porque el paclitaxel enlaza a un sitio diferente en la tubulina y no compite por la unión al sitio de la colchicina. Los datos se procesaron usando un programa GraphPad Prism.

Análisis del ciclo celular

El análisis por citometría de flujo se realizó para estudiar la distribución de la fase del ciclo celular. Las células A375 se cultivaron en platos de cultivo de tejido de 10 cm hasta que la confluencia fue aproximadamente 80%, y después las células se trataron con 0, 10, 50, 200 y 1000 nM de colchicina, 12da, 12fb y 12cb, durante 24 h en el medio de crecimiento. El ADN celular se tiñó con PBS que contenía 50 μ g/mL de yoduro de propidio y 100 μ g/mL de RNasa A. El ciclo celular se determinó usando un citómetro BD LSR-II (BD Biosciences, San José, CA) con 10.000 células marcadas. Los datos se analizaron y los gráficos se prepararon usando el programa Modfit 2.0 (Verity Software House, Topsham, ME).

Resultados

Tres sitios de unión al ligando en α/β -heterodímero de tubulina se han presentado: sitio de unión de paclitaxel, sitio de unión de vinblastina y sitio de unión de colchicina. La afinidad de unión del compuesto 12cb usando colchicina unida en 3 H y un ensayo de centelleo por proximidad de unión competitiva (SPA) se midió. Los resultados confirmaron la fuerte unión de 12cb con una afinidad de unión de $3,4 \pm 1,5 \mu$ M (Figura 25A). La tubulina unida a colchicina con un valor de CI_{50} de $1,8 \pm 0,5 \mu$ M bajo estas condiciones. Estos resultados indicaron claramente que los compuestos ABI inhiben de forma efectiva la polimerización de tubulina.

El gráfico de unión (Figura 25A) muestra claramente que los ABI pueden unirse de forma competitiva al sitio de unión de la colchicina a la tubulina. Como la concentración de los tres compuestos probados aumentó de 0,03 μ M a 100 μ M, la colchicina tritiada aumentada se eliminó de forma competitiva desde la tubulina y se emitieron conteos SPA menores. El control negativo, paclitaxel, dio solo una línea plana, porque teóricamente no se uniría al sitio de unión de la colchicina en tubulina. Segundo, los ABI tienen una afinidad de unión relativamente alta al sitio de unión de colchicina a tubulina. Los valores CI_{50} calculados por GraphPad Prism mostraron que 12da tiene la mayor afinidad de unión. La afinidad de unión se correlacionó de forma positiva a la actividad antimelanoma *in vitro*; cuanto mayor es la afinidad de unión, mayor es la actividad antimelanoma.

Los ABI demostraron que detienen las células mediante el análisis del ciclo celular en la fase G2/M como indicación de que tienen como objetivo la tubulina. Los compuestos 12da, 12fb y 12cb se probaron junto con la colchicina como un control positivo en las células A375 (Figura 25B). Cuatro diferentes concentraciones – 10, 50, 200 y 1000 nM – de cada compuesto se eligieron para mostrar el efecto de la dosis (Figura 25C y 25D). Para controles (no tratamiento) sin interferencia, aproximadamente 16% de células A375 se distribuyeron en la fase G2/M. Para el grupo de tratamiento con colchicina, como la concentración aumentó de 10 nM a 50 nM, el porcentaje de células distribuidas en la fase G2/M aumentó de 14% a 85%. Los ABI tenían resultados similares para células A375, deteniéndolas en la fase G2/M de una forma dependiente de la dosis. La potencia de las diferentes concentraciones en la detención de células en la fase G2/M correlacionada de forma positiva con una actividad *in vitro*.

10 Ejemplo 20

Farmacología *in vitro* e *in vivo* de compuestos 17ya, 12fa y 55

Materiales y métodos

15 Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad de cáncer de próstata. Todas las líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP, PC-3 y DU145, PPC-1) se obtuvieron de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.). PC-3_TxR humano, era resistente al paclitaxel y se usó un modelo MDR comparado con PC-3. Los suministros del cultivo celular se compraron de Cellgro Mediatech (Herndon, VA, EE.UU.). Todas las líneas celulares se usaron para probar la actividad antiproliferativa de los compuestos 17ya, 12fa y 55 por ensayo de sulforodamina B (SRB). Todas las líneas celulares de cáncer se mantuvieron en medio RPMI 1640 con glutamina 2 mM y suero bovino fetal (FBS) al 10%.

20 Ensayo de polimerización de microtúbulo *in vitro*. Se mezcló tubulina de cerebro porcino (0,4 mg) (Cytoskeleton, Denver, CO) con 1 y 5 μ M del compuesto de la prueba o vehículo (DMSO) y se incubó en 100 μ L de tampón (PIPES 80 mM, $MgCl_2$ 2,0 mM, EGTA 0,5 mM, pH 6,9 y GTP 1 mM). La absorbancia a 340 nm de longitud de onda se monitorizó cada min durante 15 min (Lector de microplaca SYNERGY 4, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). El espectrofotómetro se mantuvo a 37°C para la polimerización de tubulina.

25 Incubaciones metabólicas. Los estudios de estabilidad metabólica se realizaron incubando 0,5 μ M de compuestos de prueba en un volumen de reacción total de 1 mL que contenía 1 mg/mL de proteína microsomal en tampón de reacción [0,2 M de disolución de tampón fosfato (pH 7,4), $NADP^+$ 1,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM y 0,4 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa] a 37°C en un baño de agua en agitación. El sistema de regeneración de NADPH (disolución A y B) se obtuvo de BD Biosciences (Bedford, MA). Para los estudios de glucuronidación, el cofactor de ácido glucurónico-UDP 2 mM (Sigma, St. Louis, MO) en agua desionizada se incubó con $MgCl_2$ 8 mM, 25 μ g de alameticina (Sigma, St. Louis, MO) en agua desionizada, y disoluciones de regeneración de NADPH (BD Biosciences, Bedford, MA) como se describe anteriormente. La concentración de DMSO total en la disolución de reacción fue aproximadamente 0,5% (v/v). Las alícuotas (100 μ L) de las mezclas de reacción usadas para determinar la estabilidad metabólica se muestrearon a 5, 10, 20, 30, 60 y 90 min. El acetonitrilo (150 μ L) que contenía 200 nM del patrón estándar se añadió para desactivar la reacción y precipitar las proteínas. Las muestras se centrifugaron entonces a 4.000g durante 30 min a TA, y el sobrenadante se analizó directamente por LC-MS/MS.

40 Método analítico. Se inyectó disolución de muestra (10 μ L) en un sistema HPLC de la serie Agilent (Agilent 1100 Series Agilent 1100 Chemstation, Agilent Technology Co., Ltd). Todos los analitos se separaron en una columna C18 de diámetro estrecho (Alltech Alltima HP, 2,1x100 mm, 3 μ m, Fisher, Fair Lawn, NJ). Se usaron dos modos de gradiente. Para los estudios de estabilidad metabólica, se usó el modo de gradiente para alcanzar la separación de los analitos usando mezclas de fase móvil A [ACN/ H_2O (5%/95%, v/v) que contenía 0,1% de ácido fórmico] y fase móvil B [ACN/ H_2O (95%/5%, v/v) que contenía 0,1% de ácido fórmico] a un caudal de 300 μ L/min. La fase móvil A se usó al 10% de 0 a 1 min seguido por un gradiente programado de forma lineal a 100% de fase móvil B en 4 min, el 100% de fase móvil B se mantuvo durante 0,5 min antes de una caída rápida a 10% de fase móvil A. Se continuó con fase móvil A durante otros 10 min hasta el final del análisis.

50 Se usó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, API Qtrap 4000™ (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canadá), que operaba con una fuente TurbolonSpray. El voltaje de la aguja de pulverización se ajustó a 5 kV para el modo positivo. La cortina de gas se ajustó a 10; el gas 1 y el gas 2 se ajustaron a 50. El gas de disociación asistida por colisión (CAD) en el medio y la temperatura de la sonda calentadora de la fuente a 500°C. El modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), barriendo a m/z 378 \rightarrow 210 (17ya), m/z 373 \rightarrow 205 (12fa), m/z 410 \rightarrow 242 (55) y m/z 309 \rightarrow 171 (patrón interno), se usó para obtener las señales más sensibles. La adquisición de datos y el procesamiento cuantitativo se consiguieron usando el programa Analyst™, Ver. 1.4.1 (Applied Biosystems).

55 Solubilidad acuosa. La solubilidad de los fármacos se determinó por Placa de filtro de solubilidad Multiscreen (Millipore Corporate, Billerica, MA) acoplado con LC-MS/MS. Brevemente, se cargaron 198 μ L de tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4) en una placa de 96 pocillos, y se dispensaron 2 μ L de compuestos de prueba 10 mM (en DMSO) y se mezclaron con agitación suave (200-300 rpm) durante 1,5 horas a TA (N = 3). La placa se centrifugó a 800g durante 10 min, y el filtrado se usó para determinar su concentración y la solubilidad del compuesto de prueba por LC-MS/MS como se describe anteriormente.

Estudio farmacocinético. Se compraron ratones ICR macho ($n = 3$ por grupo) de 6 a 8 semanas de edad de Harlan Inc., y se usaron para examinar las farmacocinéticas (PK) de 17ya, 12fa y 55. Todos los compuestos (10 mg/kg) se disolvieron en DMSO/PEG300 (1/9) y se administraron mediante una única inyección intravenosa (i.v.) (50 μ L) en la vena de la cola. Las muestras de sangre se recogieron a 5, 15 y 30 min, 1, 1,5, 2, 3, 4, 8, 12 y 24 h después de la administración i.v. A los ratones se les alimentó (p.o.) de forma forzada oral a 20 mg/kg (en Tween80/DMSO/H₂O, 2/2/6) de cada compuesto de prueba para evaluar su biodisponibilidad oral. Las muestras de sangre se recogieron a 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 8, 12 y 24 h después de la administración p.o.

Se compraron ratas Sprague-Dawley hembra ($n = 3$; 254 ± 4 g) de Harlan Inc. (Indianápolis, IN). Se compraron catéteres de la vena yugular torácica de rata de Braintree Scientific Inc. (Braintree, MA). A la llegada a las instalaciones de los animales, los animales se aclimataron durante 3 días en una habitación controlada por temperatura (20-22°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h antes de cualquier tratamiento. Los compuestos 17ya, 12fa y 55 se administraron i.v. en la vena yugular torácica a una dosis de 5 mg/kg (en DMSO/PEG300, 1/9). Un volumen igual de solución salina heparinizada se inyectó para sustituir la sangre quitada, y las muestras de sangre (250 μ L) se recogieron por medio del catéter de la vena yugular a 10, 20, 30 min y 1, 2, 4, 8, 12, 24 h. A las ratas se les alimentó (p.o.) de forma forzada oral a 10 mg/kg (en Tween80/DMSO/H₂O, 2/2/6) de cada compuesto de prueba para evaluar su biodisponibilidad oral. Todas las muestras de sangre (250 μ L) después de la administración oral se recogieron por medio del catéter de la vena yugular a 30, 60, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min y 8, 12, 24 h. Se prepararon jeringas y viales heparinizados antes de la recogida de sangre. Las muestras de plasma se prepararon centrifugando las muestras de sangre a 8.000g durante 5 min. Todas las muestras de plasma se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta que se analizaron.

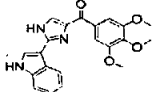
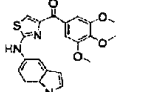
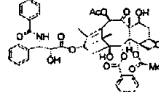
Los analitos se extrajeron de 100 μ L de plasma con 200 μ L de acetonitrilo que contenían 200 nM del patrón interno. Las muestras se mezclaron cuidadosamente, se centrifugaron y el extracto orgánico se transfirió al automuestreador para el análisis de LC-MS/MS.

Estudios de xenoinjerto de PC-3_TxR. Se prepararon células PC-3_TxR (10×10^7 por mL) en medio de crecimiento RPMI1640 que contenía FBS al 10%, y se mezcló con Matrigel (BD Biosciencias, San José, CA) a relación 1:1. Se establecieron tumores inyectando 100 μ L de la mezcla (5×10^6 células por animal) de forma subcutánea (s.c.) en el flanco de ratones desnudos atímicos macho de 6-8 semanas de edad. La longitud y anchura de los tumores se midió y el volumen tumoral (mm^3) se calculó por la fórmula, $\pi/6 \times L \times W^2$, donde la longitud (L) y la anchura (W) se determinaron en mm. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 300 mm^3 , los animales que portaban tumores PC-3_TxR se trataron con vehículo [Tween80/DMSO/H₂O (2/2/6)], o 17ya (10 mg/kg) oralmente. El calendario de dosificación fue 3 veces a la semana durante cuatro semanas.

Resultados

17a y 55 muestran amplia citotoxicidad en las células, incluyendo células resistentes a multifármaco. La capacidad de 17ya y 55 para inhibir el crecimiento de las líneas celulares cancerígenas se evaluó usando el ensayo SRB (Tabla 15). Ambos compuestos inhibieron el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer humano, incluyendo cinco líneas celulares de cáncer de próstata y una de glioma, con valores CI_{50} en el intervalo nanomolar bajo. 17ya exhibió una potencia 1,7-4,3 veces mayor que 55 en estas líneas celulares. La línea celular PC-3 resistente a paclitaxel (PC-3/TxR) que sobre-expresa P-glucoproteína (p-gp), se usó para estudiar el efecto de la resistencia al fármaco en 17ya y 55 y para comparar frente a su línea celular PC-3 parental. Los valores CI_{50} de docetaxel eran $1,2 \pm 0,1$ nM y $17,7 \pm 0,7$ nM en células PC-3 y PC-3/TxR, respectivamente. 17ya y 55 eran ambas equipotentes frente a PC-3 parental y PC-3/TxR, mientras que paclitaxel y docetaxel mostraron resistencia relativa de 85 y 15 veces, respectivamente. Estos datos indican que tanto 17ya como 55 sortearon la resistencia al fármaco mediada por P-gp.

Tabla 15. Datos de citotoxicidad de 17ya y 55.

Línea celular	Tipo	Citotoxicidad [Valores de CI_{50} , media \pm DE nM]		
		17ya	55	Paclitaxel
				
PC-3	Próstata	$5,2 \pm 0,2$	$16 \pm 1,5$	$0,6 \pm 0,05$
PC-3/TxR	Próstata	$2,1 \pm 0,1$ (0,4)	$6,7 \pm 0,5$ (0,4)	$51 \pm 2,3$ (85)
LNCaP	Próstata	$12 \pm 0,1$	$27 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,2$
Du-145	Próstata	$17 \pm 0,2$	$38 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,1$
PPC-1	Próstata	$21 \pm 0,1$	$36 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,8$
U87MG	Glioma	$10 \pm 1,6$	$22 \pm 3,0$	NR

Los valores CI_{50} (media \pm DE) se determinaron después de tratamiento de 96 h ($N = 3$). El paclitaxel se usó como un control positivo. Los datos en paréntesis indicaron factor de resistencia cuando se compara con los valores CI_{50} en PC-3 y PC-3/TxR. NR, No presentado.

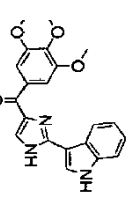
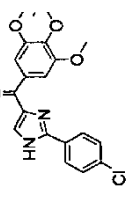
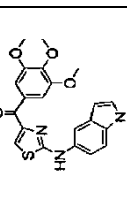
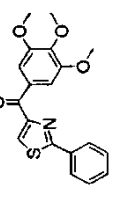
17ya y 55 se unen al sitio de unión a colchicina en tubulina, inhiben la polimerización de la tubulina, e inducen la apoptosis celular (Figura 26). Un ensayo de unión de masa competitivo se desarrolló para estudiar la interacción de

- inhibidores de molécula pequeña con tubulina. En este estudio, las concentraciones variables de 17ya o 55 se usaron para competir con la unión de colchicina-tubulina. Ambos compuestos compitieron de forma efectiva con la colchicina para la unión a la tubulina (Figura 26A); sin embargo, sus curvas de unión competitiva se desviaron sustancialmente de cero a mayores concentraciones cuando se compara con la podofiltoxina, un ligando de unión al sitio de colchicina potente conocido. Esto sugiere que tanto 17ya como 55 mostraron menos afinidad que la podofiltoxina o que se unen parcialmente al sitio de unión a la colchicina. La vinblastina, el control negativo, no inhibió la unión colchicina-tubulina, demostrando con éxito la especificidad de este ensayo de unión de masa competitiva.
- Se incubó tubulina de cerebro porcino (>97% pura) con 17ya o 55 (5 μ M) para probar su efecto en la polimerización de tubulina (Figura 26B). 17ya y 55 inhibieron la polimerización de tubulina en 47% y 40% a los 15 min, respectivamente. La colchicina a 5 μ M se usó como un control positivo e inhibió la polimerización de tubulina en 32%. Estos datos sugieren que tanto 17ya como 55 tienen una inhibición ligeramente mayor de la polimerización de tubulina que la colchicina. Por lo tanto, el mecanismo molecular de estos compuestos es unirse al sitio de unión a la colchicina, inhibiendo la polimerización de la tubulina e induciendo la citotoxicidad.
- Las células PC-3 y PC-3/TxR se expusieron a 0,8 a 600 nmol/L de 17ya, 55, o docetaxel durante 24 h. Los niveles de complejos ADN-histona se usaron para representar la apoptosis celular. Tanto 17ya como 55 fueron igualmente potentes para inducir la apoptosis celular en PC-3 (Figura 26C) y PC-3/TxR (Figura 26D) en 24 h. Aunque docetaxel era altamente potente para inducir la apoptosis de las células PC-3, era más débil en las células PC-3/TxR debido a la sobre-expresión de P-gp.
- 17ya y 55 mostraron propiedades tipo fármaco favorables. Las propiedades tipo fármaco, tal como estabilidad metabólica, permeabilidad, solubilidad acuosa e interacciones fármaco-fármaco, se examinaron para 17ya y 55 (Tabla 16A). 17ya mostró mayor estabilidad metabólica y solubilidad acuosa que 55. Ambos compuestos químicos mostraron valores de permeabilidad más que adecuados, sugiriendo su potencial para usarse oralmente. Además, tanto 17ya como 55 mostraron altos valores de Cl_{50} en el intervalo micromolar en los ensayos de inhibición de enzima CYP, indicando que ambos compuestos pueden evitar las interacciones fármaco-fármaco a través de las principales enzimas hepáticas CYP. Sobre todo, ambos compuestos mostraron propiedades tipo fármaco favorables.

Tabla 16A. Propiedades tipo fármaco del compuesto 17a y 55. Se evaluaron la estabilidad metabólica, permeabilidad, solubilidad e interacciones fármaco-fármaco potenciales. Cada valor representa la media de estudios duplicados.

Medida	Unidades	17ya	55	Controles positivos (media)
Estabilidad metabólica				
Semivida en microsomas hepáticos humanos	min	> 60	28	Verapamil (12)
Permeabilidad				
$P_{app(A \rightarrow B)}$ en el ensayo CaCO-2	10^{-6} cm/s	36	99	Propranolol (19)
Solubilidad acuosa	μ g/mL	> 75	19	1h (1,1)
Interacciones fármaco-fármaco				
Valor Cl_{50} en Cyp3A4 (sustrato: testosterona)	μ M	20	5,5	cetoconazol (0,02)
Valor Cl_{50} en Cyp2D6 (sustrato: dextrometorfano)	μ M	> 50	34	Quinindina (0,1)
Valor Cl_{50} en Cyp2C19 (sustrato: (S)-mefenitoina)	μ M	6,6	5,3	Ticlopidina (0,37)
Valor Cl_{50} en Cyp2C9 (sustrato: Diclofenac)	μ M	17	4,9	Sulfafenazol (0,5)
Valor Cl_{50} en Cyp1A2 (sustrato: fenacetina)	μ M	9,2	8,1	Furafilina (2,2)

Tabla 16B. Resumen de propiedades tipo fármaco y farmacocinéticas de 17ya, 12fa, 55 y 1h.

	17ya	12fa	55	1h
				
Peso molecular	377	372	409	355
Cl ₅₀ en PC3 (nM)	10	35	28	21
Semivida en HLM (Fase I)	-80	44	30	17
Semivida en HLM (Fase I+II)	-90	NA	43	17
Solubilidad	>75	12	19	1
PK_IV5mgk_CI de rata	mL/min/kg	16		7,7 (2,5mpk)
PK_IV5mgk_V de rata	L/kg	1,9		4,9 (2,5mpk)
PK_PO10mgk_Cmax de rata	ng/mL	1109		212
PK_PO10mgk_AUC de rata	min*µg/mL	218		37
PK_Biodisponibilidad de rata	% de F	35		3,3
PK_IV10mgk_CI de ratón	mL/min/kg	61		130
PK_IV10mgk_V de ratón	L/kg	4		4,9
PK_PO20mgk_Cmax de ratón	ng/mL	2592		NA
PK_PO20mgk_AUC de ratón	min*µg /mL	201		NA
PK_Biodisponibilidad de ratón	% de F	62		NA

Como se muestra en la Tabla 16B, 17ya tenía una semivida de 80 min mediante la reacción en fase I, sugiriendo que 17ya era estable en los procesos metabólicos de fase I. La semivida (90 min) en presencia de ácido UDP-glucurónico era similar a la observada en su ausencia. Estos datos sugirieron que 17ya es estable en microsomas hepáticos humanos, y se esperaba que se obtendría bajo aclaramiento y larga semivida en humanos. Por otro lado, 55 mostró 30 y 43 min como semividas cuando estaba en presencia y ausencia de ácido UDP-glucurónico, respectivamente. El compuesto 12fa muestra la semivida con 44 en la fase I. Estos datos sugirieron que los tres compuestos mostraban estabilidad aceptable en los microsomas hepáticos humanos, y 17ya es más estable que 12fa y 55. Cuando se investigaba su metabolismo, se encontró que 12fa y 55 mostraban mayores niveles de reducción de cetona (no se muestran datos), sugiriendo que 12fa y 55 son más lábiles que 17ya.

El compuesto 17ya mostró gran solubilidad acuosa, 12fa y 55 mostraron solubilidad aceptable.

El compuesto 17ya contenía un anillo de imidazol y este anillo mejoró la solubilidad acuosa, dando por resultado >75 µg/mL de solubilidad acuosa (Tabla 16A). Los compuestos 12fa y 55 mostraron menos solubilidad acuosa, y exhibieron 12 y 19 µg/mL, respectivamente. Sobre todo, 17ya demostró una gran solubilidad acuosa, y 12fa y 55 mostraron una solubilidad acuosa aceptable, y mucho mejor que 1h. La mayor solubilidad de 12fa se tradujo en biodisponibilidad oral muy mejorada en comparación a 1h (35% frente a 3,3% en ratas). De forma similar para 17ya y 55, la solubilidad acuosa correlacionó con la biodisponibilidad oral muy mejorada como se trata debajo (Tabla 17).

Estudios farmacocinéticos de 17ya y 55 en ratones, ratas y perros. Los parámetros farmacocinéticos de 17ya y 55 dados en una única dosis (i.v. o p.o.) en ratones ICR, ratas Sprague-Dawley, perros beagle se resumen en la Tabla 17. 17ya mostró bajo aclaramiento en ratones y ratas, sugiriendo que 17ya mostró estabilidad metabólica, y mínimo metabolismo de primer paso en estas especies. Además, 17ya había moderado el volumen de distribución en ratones y ratas, indicando que puede distribuirse apropiadamente en los tejidos, incluyendo tumores. A diferencia de en ratones y ratas, sorprendentemente, el aclaramiento total de 17ya en perros fue alto. Dos metabolitos abundantes en el plasma de perro, un metabolito hidroxilado y un metabolito desconocido con +34 m/z del parental (datos no mostrados), fueron consecuentes con los encontrados en los microsomas hepáticos de perro. En resumen, se obtuvo mayor aclaramiento y menor exposición oral para 17ya en comparación con 55 en perros, pero no en ratones y ratas. Además, 17ya mostró abundantes metabolitos solo en los microsomas hepáticos de perro, pero no en microsomas de ratón, rata o humano (datos no mostrados). 17ya mostró 21%, 36% y 50% de biodisponibilidad oral aceptable en ratas, ratones y perros, respectivamente. Mientras, 55 tenía bajo aclaramiento en ratas y moderado aclaramiento en ratones y perros. Similar a 17ya, 55 mostró un moderado volumen de distribución en estas especies. 55 tenía tasas de biodisponibilidad oral constantes entre las tres especies (24%-36%). Estas propiedades indican que tanto 17ya como 55 son potenciales inhibidores de tubulina oralmente disponibles.

Tabla 17. Estudios farmacocinéticos de compuestos 17ya y 55 en ratones, ratas y perros.

	17ya		55	
	IV	PO	IV	PO
PK de ratón (N=3)				
Dosis, mg/kg	10	20	10	20
Aclaramiento, mL/min/kg	19	NR	40	NR
Vss, L/kg	2,9	NR	1,3	NR
t _{1/2} , min	101	339	46	126
AUC, min*µg/mL	540	384	249	171
C _{max} , ng/mL	4800	1560	7739	1253
F, %		36%		34%
PK de rata (N=3)				
Dosis, mg/kg	5	10	5	10
Aclaramiento, mL/min/kg	9,5 ± 2,3	NR	10 ± 1,4	NR
Vss, L/kg	1,8 ± 0,2	NR	1,0 ± 0,1	NR
t _{1/2} , min	139 ± 24	206 ± 12	73 ± 5,0	350 ± 214
AUC, min*µg/mL	553 ± 143	233 ± 134	509 ± 73	246 ± 163
C _{max} , ng/mL	3672 ± 519	999 ± 445	4609 ± 55	757 ± 520
F, %		21%		24%
PK de perro (N=4)				
Dosis, mg/kg	2	5	2	5
Aclaramiento, mL/min/kg	109 ± 29	NR	15 ± 3,2	NR
Vss, L/kg	94 ± 95	NR	0,9 ± 0,2	NR
t _{1/2} , min	2757 ± 1573	1695 ± 439	82 ± 15	191 ± 9,0
AUC, min*µg/mL	18,5 ± 4,7	23,1 ± 11,3	141 ± 30	128 ± 154
C _{max} , ng/mL	400 ± 118	210 ± 133	2552 ± 576	862 ± 1010
F, %		50%		36%

17ya y 55 inhiben el crecimiento de los xenoinjertos de próstata resistentes a paclitaxel (PC-3/TxR). Se inocularon células de cáncer de próstata resistentes a PC-3 (Figura 27A) y paclitaxel (PC-3/TxR) (Figura 27B) en ratones desnudos y se dejó que los volúmenes tumorales alcanzaran aproximadamente 150-300 mm³. Se usó docetaxel (10 o 20 mg/kg), que es un compuesto clínico para el cáncer de próstata, para evaluar su efectividad en modelos de resistencia al fármaco mediada por P-gp *in vivo*. Se encontró que el tumor PC-3/TxR era de crecimiento rápido y el volumen alcanzó 1500-2500 mm³ a la terminación del estudio. Aunque 10 y 20 mg/kg de docetaxel administrado de forma intravenosa mostró una respuesta a la dosis en ambos modelos (Figuras 27A y 27B), el efecto de la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) disminuyó de 84% de TGI en tumores PC-3 a 14% de TGI en tumores PC-3/TxR cuando se dosificaron de forma intravenosa a 10 mg/kg (Tabla 18). Además, a la mayor dosis (20 mg/kg), docetaxel provocó una regresión parcial (>100% de TGI) de tumores de PC-3, aunque apenas 56% de TGI en tumores de PC-3/TxR. La efectividad del docetaxel en tumores de PC-3/TxR se disminuyó dramáticamente cuando se compara a la de tumores PC-3, sugiriendo que la eficacia se alteró por la resistencia al fármaco mediado por P-gp, y estos resultados están en muy buen acuerdo con nuestros datos de citotoxicidad o apoptosis *in vitro*. En contraste con la falta de eficacia del docetaxel en los tumores de PC-3/TxR, el 17ya administrado de forma oral (6,7 mg/kg) demostró más del 100% de TGI sin un efecto en sus pesos corporales (Figura 27B y Tabla 18). Además, 2 de 4 ratones desnudos que portaban tumores PC-3/TxR estaban libres de tumores el día 19 (datos no mostrados).

El modelo de xenoinjerto PC-3/TxR se utilizó adicionalmente para evaluar las eficacias de 17ya (en otros horarios de dosificación) y 55. La dosis tolerada máxima (pérdida de peso corporal > 20%) de 17ya se encontró que era 10 mg/kg, cuando se dosificó oralmente una vez al día durante cuatro días; o a 3,3 mg/kg dos veces al día (b.i.d.) durante cinco días (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 27C, se dosificaron 3,3 mg/kg de 17ya b.i.d. para los primeros cuatro días consecutivos en la primera semana, y el horario se cambió después a una vez al día entre las semanas 2 y 4. El resultado muestra que se obtuvo una regresión parcial durante el día 4-19, y el TGI fue 97%; y uno de los siete ratones estaba libre de tumor el día 26. Mayor dosis (10 mg/kg) con menor frecuencia de dosificación (q2d) de 17ya (Figura 27D) provocó la regresión parcial durante los días 13 a 29. Estos datos sugieren que los regímenes con dosis optimizadas y horarios de dosificación facilitarán que 17ya inhiban con éxito los tumores PC-3/TxR. 55, se administró de forma oral a ratones desnudos con 10 o 30 mg/kg b.i.d., y cinco veces a la semana entre las semanas 1 y 4. Como se muestra en la Fig 27C, los perfiles de inhibición muestran una respuesta a la dosis en el tumor PC-3/TxR. El valor de TGI fue 59% para el grupo de tratamiento con una menor dosis (10 mg/kg). Además, la mayor dosis (30 mg/kg) comenzó a mostrar regresión parcial (>100% de TGI) desde el día 19 hasta la terminación del estudio (día 26). Algunos ratones en el grupo de vehículo perdieron peso corporal en el punto final, en parte, debido a la cachexia del cáncer. Por el contrario, los ratones tratados con 17ya (3,3 mg/kg) o 55 (30 mg/kg) estuvieron ganando peso (Tabla 18), sugiriendo que estas dosis optimizadas de 17ya o 55 pueden tolerarse bien y fueron preventivas de la cachexia del cáncer.

Tabla 18. Actividad antitumoral de los compuestos 17ya y 55 frente al docetaxel evaluado simultáneamente *in vivo*.

	Horario de dosificación	Punto final	Número de final/comienzo	Peso corporal (g)		Tamaño tumoral (mm ³)		TGI (%)
				Comienzo	Final	Comienzo	Final	
Xenoinjerto PC-3								
Vehículo_IV	Día 1 y 9	Día 19	6/6	30 ± 2	32 ± 4	271 ± 83	875 ± 292	-
Docetaxel_IV_10mpk	Día 1 y 9	Día 19	5/5	29 ± 2	24 ± 2	247 ± 49	341 ± 101	84
Docetaxel_IV_20mpk	Día 1 y 9	Día 19	5/5	28 ± 3	24 ± 3	243 ± 68	172 ± 62	> 100
Xenoinjerto PC-3/TxR								
Vehículo_IV	Día 1 y 9	Día 19	5/5	33 ± 1	26 ± 5	171 ± 57	2061 ± 858	-
Docetaxel_IV_10mpk	Día 1 y 9	Día 19	4/4	31 ± 2	25 ± 2	143 ± 20	1774 ± 183	14
Docetaxel_IV_20mpk	Día 1 y 9	Día 19	4/4	30 ± 1	25 ± 4	170 ± 86	999 ± 905	56
17ya_PO_6,7mpk	qd × 5/w	Día 19	4/4	33 ± 3	34 ± 3	172 ± 69	126 ± 100	> 100
Vehículo_PO	b.i.d × 5/w	Día 26	6/7	30 ± 2	25 ± 2	156 ± 30	2591 ± 1423	-
55_PO_10mpk	b.i.d × 5/w	día 26	7/7	29 ± 2	26 ± 3	143 ± 44	1152 ± 433	59
55_PO_30mpk	b.i.d × 5/w	día 26	7/7	29 ± 3	30 ± 2	134 ± 34	101 ± 19	> 100
17ya_PO_3,3mpk ^e	qd × 5/w	día 26	7/7	29 ± 2	30 ± 2	139 ± 44	214 ± 97	97

	Horario de dosificación	Punto final	Número de final/comienzo	Peso corporal (g)		Tamaño tumoral (mm ³)		TGI (%)
				Comienzo	Final	Comienzo	Final	
					2		172	
Vehículo_PO	q2d × 3/w	Día 29	5/5	24 ± 2	21 ± 1	299 ± 40	1521 ± 580	-
17ya_PO_10mpk	q2d × 3/w	día 29	5/5	24 ± 2	28 ± 2	294 ± 156	237 ± 103	> 100

Horario de dosificación: qd × 5/w = una administración dada en cinco días consecutivos por semana; b.i.d. × 5/w = dos administraciones dadas en cinco días consecutivos por semana; o q2d × 3/w = cualquier otro día de administración o tres veces a la semana.

- 5 ^a El horario de dosis fue dos administraciones dadas en cuatro días consecutivos de la primera semana, y el horario de dosis se cambió (por la toxicidad) a una administración dada en cinco días consecutivos por semana para la segunda a la cuarta semana.

- 10 Penetración al cerebro de 17ya y 55 en ratones desnudos. Se determinaron las concentraciones del cerebro completo en ratones desnudos a 1 h y 4 h después de la administración oral de 20 mg/kg de 17ya o 55 (Tabla 19). Las relaciones de concentraciones en el cerebro al plasma se determinaron y se compararon con docetaxel en los ratones desnudos. 55 mostró mayor penetración al cerebro que 17ya y docetaxel. 17ya solo mostró relaciones de concentración cerebro/plasma ligeramente mayores que el docetaxel tanto a 1 como a 4 h. Las concentraciones en el cerebro de 55 alcanzaron 14 a 19% de concentraciones en plasma a 1 h y 4 h, respectivamente, mostrando una relación cerebro/plasma 3,2 veces mayor tanto a 1 h como a 4 h en comparación con el docetaxel. Estos datos sugieren que 55 mostró propiedades potencialmente favorables para tratar el glioma, ya que tiene mayor penetración al cerebro y mayor potencia (22 nM, Tabla 15) en células de glioma.

Tabla 19. Estudios de la barrera hematoencefálica (BHE) de compuestos 17ya y 55. Las concentraciones en cerebro y plasma se determinaron en ratones desnudos a 1 y 4 h después de la administración de docetaxel (IP, 10 mpk), 17ya (PO, 20 mpk) y 55 (PO, 20 mpk). Cada valor representa la media ± DE de 3 ratones desnudos.

Medida	Docetaxel		17ya		55	
	1h	4h	1h	4h	1h	4h
Cerebro (ng/mL)	33 ± 14	20 ± 9	124 ± 108	49 ± 32	180 ± 44	73 ± 18
Plasma (ng/mL)	768 ± 92	345 ± 94	2058 ± 1252	570 ± 438	1669 ± 867	380 ± 32
Cerebro/plasma (%)	4,4 ± 2,0	6,0 ± 2,9	5,4 ± 1,9	8,9 ± 1,7	14 ± 7,9	19 ± 3,1

- 20 Ejemplo 21. Farmacocinéticas de los compuestos

Tabla 20.

ID del compuesto	Semivida en microsoma hepático humano (min)	Semivida en microsoma hepático de ratón (min)	Semivida en microsoma hepático de rata (min)	Semivida en microsoma hepático de perro (min)	Semivida en microsoma hepático de mono (min)
1h	17	<5	31	19	<5
2e-cis	35				
2i	32				
2k	10	9	32	16	<5
2l	20	11	49	30	8
6a	32	3,43	12	13	16
6b	40	10	9	30	13
6c	47	13	14	29	9
7d	24	37	42	29	15
12da	23	8	28	17	
12fa	56	23	46	26	
12fb	37				
12dab	21	<5	12	46	

Ejemplo 22

- 25 Actividad biológica de compuestos de metoxibenzoil-aril-tiazol sustituidos en 4 (SMART) 1h, 2k y 2l: inhibidores de microtúbulo activo

Materiales y métodos

Ensayo de polimerización de microtúbulo *in vitro*. Se mezcló tubulina de cerebro bovino (0,4 mg) (Cytoskeleton, Denver, CO) con 10 μ M del compuesto de prueba o vehículo (DMSO) y se incubó en 100 μ l de tampón (PIPES 80 mM, $MgCl_2$ 2,0 mM, EGTA 0,5 mM, pH 6,9 y GTP 1 mM). La absorbancia a 340 nm de longitud de onda se monitorizó cada min durante 15 min (Lector de microplaca SYNERGY 4, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). El espectrofotómetro se mantuvo a 37°C para la polimerización de la tubulina.

Ensayo de unión por competición MS. Se incubaron colchicina, vinblastina y paclitaxel (1,2 μ M para cada uno) con tubulina (1,2 mg/mL) en el tampón de incubación (PIPES 80 mM, $MgCl_2$ 2,0 mM, EGTA 0,5 mM, pH 6,9) a 37°C durante 1 h. Se examinó 1h (0,5-125 μ M) para competir individualmente con la unión a tubulina de colchicina, vinblastina y paclitaxel. Los ligandos en forma libre se separaron de la tubulina o microtúbulo usando un método de ultrafiltración (microconcentrador) (Microcon, Bedford, MA) con un tamaño de corte molecular de 30k Da. La colchicina, vinblastina y paclitaxel se determinaron por el método LCMS/MS. La capacidad de 1h para inhibir la unión de ligandos se expresó como un porcentaje de unión de control en ausencia de cualquier competidor. Cada reacción se realizó por triplicado.

Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad del cáncer de próstata y melanoma. Todas las líneas celulares de próstata y melanoma se obtuvieron de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.), mientras los suministros de cultivo celular se compraron de Cellgro Mediatech (Herndon, VA, EE.UU.). La actividad antiproliferativa de los compuestos se examinó en cuatro líneas celulares de cáncer de próstata humano (LNCaP, DU 145, PC-3 y PPC-1) y dos líneas celulares de melanoma humano (A375 y WM-164). La línea celular de ovario humano OVCAR-8 y su línea celular resistente que sobre-expresa P-gp, NCI/ADR-RES, se usaron como modelos MDR. Ambas líneas celulares de ovario se obtuvieron de National Cancer Institutes (NCI). Todas las líneas celulares de cáncer de próstata se cultivaron con suero bovino fetal (FBS) al 10%.

Análisis del ciclo celular. La citometría de flujo se realizó para estudiar los efectos de los compuestos en la distribución del ciclo celular. Las células PC-3 y A375 se trataron en medio de crecimiento con las concentraciones indicadas de compuestos 1h, 2k, 2l durante 24 h. El ADN celular se tiñó con 100 μ g/mL de yoduro de propidio y 100 μ g/mL de RNasa A en PBS y la citometría de flujo se realizó para determinar la distribución del ciclo celular de las células.

Detección de apoptosis por ELISA. La cuantificación del enriquecimiento de mono- y oligonucleosomas en el citoplasma se usó para determinar la capacidad de los compuestos para inducir la apoptosis (detección de muerte celular ELISA PLUS, Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estudio farmacocinético. Se compraron ratones ICR macho (n = 3 o 4 por grupo) de 6 a 8 semanas de edad de Harlan Inc., y se usaron para examinar las farmacocinéticas (PK) de los compuestos. 1h, 2k, 2l (15 mg/kg) se disolvieron en PEG300/DMSO (1/4) y se administraron mediante una única inyección i.v. en la vena de la cola. Las muestras de sangre se recogieron a 2, 5, 15 y 30 min, 1, 2, 4, 8, 16 y 24 h después de la administración. Se compraron ratas Sprague-Dawley macho (n = 4; 254 \pm 4 g) de Harlan Inc. (Indianápolis, IN). 1h, 2k, se administraron de forma intravenosa en los catéteres de la vena yugular a 2,5 mg/kg (en DMSO/PEG300, 1/4). Las muestras de sangre (250 μ L) se recogieron a 10, 20, 30 min 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h. Un método de precipitación de proteína se usó para la preparación de la muestra. Se añadió una alícuota (200 μ L) de acetonitrilo (ACN) a 100 μ L de plasma y después se agitó formando un vórtice cuidadosamente durante 15 s. Después de la centrifugación, el sobrenadante se analizó por cromatografía líquida junto con espectrometría de masas (LC-MS/MS). Los parámetros de PK se determinaron usando análisis no compartimental (WinNonlin, Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

Estudios de xenoinjerto de tumor PC-3 y A375. Se prepararon células PC-3 y A375 (5×10^7 por mL) en medio de crecimiento libre de rojo de fenol que contenía FBS al 10%, y se mezcló con Matrigel (BD Biosciences, San José, CA) en relación 1:1. Los tumores se establecieron inyectando 100 μ L de la mezcla ($2,5 \times 10^6$ células por animal) de forma subcutánea (s.c.) en el flanco de ratones desnudos atímicos macho de 6-8 semanas de edad. La longitud y anchura de tumores se midió y el volumen tumoral (mm^3) se calculó por la fórmula $\pi/6 \times L \times W^2$, donde la longitud (L) y la anchura (W) se determinaron en mm. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 150 mm^3 , los animales que portaban tumores PC-3 se trataron con vehículo [Captex200/Tween80 (1/4)], 1h (5 y 15 mg/kg), 2k (5 y 15 mg/kg) y 2l (50 mg/kg) de forma intraperitoneal durante 21 días. Se usó vinblastina (0,5 mg/kg) como el control positivo y se dosificó q2d con vehículo [DMSO/PEG300 (1/9)]. Por otro lado, los ratones que portaban tumor A375 se trataron durante 34 días con vehículo [Captex200/Tween80 (1/4)], 1h (20 mg/kg) o 2k (15 mg/kg). Las dosis se seleccionaron en base a estudios de toxicidad aguda de 1h y 2k en ratones ICR (n = 2/grupo) mostrando que las dosis hasta 30 mg/kg y 15 mg/kg, respectivamente, no provocaron más del 10% de pérdida de peso corporal después de 4 días consecutivos de dosificación intraperitoneal.

Actividad antitumoral *in vivo* [inhibición del crecimiento tumoral (% de T/C), retraso del crecimiento tumoral (valor T-C) y muerte de la célula tumoral (log de muerte celular total)]. Se describe la evidencia del efecto del fármaco por los siguientes parámetros: % de T/C = $[\Delta \text{ de volumen tumoral del grupo tratado}] / [\Delta \text{ volumen tumoral del grupo de control}] \times 100\%$. Los valores T-C (retraso del crecimiento tumoral) se basaron en el tiempo medio (en días), necesario para que los tumores de tratamiento (T) y el grupo de control (C), alcanzaran un tamaño predeterminado (600 mm^3 en este estudio). Estos valores se usaron entonces para la cuantificación de la muerte celular tumoral

siguiendo la ecuación: $\log \text{ de muerte celular} = (T - C) / (3,32 \times T_d)$. T_d es el tiempo de doblado de volumen tumoral en días. En este estudio, se define el tiempo doblado necesario para que el tumor aumente de 300 a 600 mm³.

Prueba rotarod. Los ratones ICR recibieron entrenamiento tres veces al día durante dos días para permitirlos estar en la barra rotatoria durante >120 segundos a 12 rpm. Los ratones de aleatorizaron después por la longitud de tiempo que podrían estar en la barra rotatoria y se dividieron en 7-8 ratones por grupo. 1h a una dosis de 5 o 15 mg/kg en Captex200/Tween80 (1/4) se administró por inyección intraperitoneal. Se usó vinblastina a una dosis de 0,5 mg/kg/día como un control positivo bajo las mismas condiciones. La prueba de rotarod se realizó dos veces a la semana. El tratamiento se paró el día 31, y la observación posterior se examinó en las semanas 1, 2 y 4 después de la terminación del tratamiento. La velocidad de la barra se aumentaba de 59 rpm a 40 rpm durante un periodo de 5 min. El rendimiento se midió como la longitud de tiempo que un ratón podría estar en la barra rotatoria.

Estudios de resistencia al fármaco *in vivo*. Al final de los estudios de xenoinjerto de PC-3, se quitaron los tumores sólidos de los grupos de control y tratados con 1h (15 mg/kg) y se digirieron con colagenasa al 0,1% (Tipo I) y 50 mg/mL de DNAsa (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ). Las células dispersas se pusieron en una placa en medio RPMI + FBS al 10% y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 24 h para permitir la unión. Los efectos antiproliferativos de 1h se compararon para determinar si las células tumorales que permanecen en los xenoinjertos de PC-3 retuvieron la sensibilidad al fármaco. Las células PC-3 obtenidas de ATCC se usaron como control *in vitro*. Los análisis estadísticos se realizaron usando la prueba t sencilla.

Resultados

En base a los estudios de relación estructura-actividad, se seleccionaron tres compuestos (Figura 28A) para la caracterización biológica. Mientras 1h y 2k son moléculas altamente potentes con propiedades citotóxicas nanomolares bajas, 2l que estaba diseñado racionalmente como un metabolito potencial con solubilidad mejorada, tenía los efectos antiproliferativos menos potentes (Tabla 21).

Tabla 21. Eficacia *in vitro* de compuestos en líneas celulares de próstata, melanoma y resistentes al fármaco (n = 3, media ± EE). Paclitaxel, vinblastina y colchicina se usaron como controles positivos como se presenta previamente.

Línea celular	Tipo de célula	CI ₅₀ ± EEM (nM)					
		SMART-H	SMART-F	SMART-OH	Paclitaxel	Vinblastina	Colchicina
LNCaP	Próstata	28±4 ^a	6±1 ^a	103±9	1,7±0,2	1,1±0,1	16±4
PC-3	Próstata	21±1 ^a	13±1 ^a	87±5	4,8±0,3	2,1±0,2	11±1
Du-145	Próstata	71±4 ^a	12±1 ^a	116±14	5,1±0,1	1,8±1,1	10±2
PPC-1	Próstata	43±5 ^a	8±1 ^a	76±2	2,3±0,8	1,1±0,4	20±1
B16-F1	Melanoma	55±5 ^a	43±21 ^a	113±6	17±2	4,7±0,7	29±5
A375	Melanoma	28±5 ^a	33±14 ^a	93±11	12±3	1,1±0,2	20±3
OVCAR-8	Ovario	35±2	34±3	110±8	4,7±0,1	3,9±0,1	17±1
NCI/ADR-RES	Ovario	13 ± 1	12±1	45±5	6263±634	582±57	1113±79
Factor de resistencia		0,4	0,4	0,4	1333	149	65

SMART-H en la Tabla 21 es 1h; SMART-F en la Tabla 21 es 2k; y SMART-OH en la Tabla 21 es 2l.

SMART inhiben la polimerización de microtúbulos por unión al sitio de unión de la colchicina en tubulina.

Se incubó tubulina de cerebro bovino (>97% pura) con los compuestos individuales (10 µM) para probar su efecto en la polimerización de tubulina (Figura 28B). Mientras 1h y 2k inhibieron la polimerización de tubulina en 90%, 2l inhibió la polimerización solo al 55%. Estudios previos demostraron una inhibición dependiente de la concentración de la polimerización de tubulina por 1h. Además, bajo las mismas condiciones experimentales, la CI₅₀ para 1h (4,23 µM) es similar a la de la colchicina (4,91 µM). Estos datos sugieren que los compuestos muestran fuerte actividad de polimerización antitubulina que corresponde bien con su citotoxicidad (Tabla 21). La capacidad de los compuestos para competir por sitios de unión conocidos en la tubulina se determinó usando un nuevo ensayo de unión competitivo MS, que se desarrolló en nuestro laboratorio. Tres ligando de tubulina, que corresponden a los tres sitios de unión en tubulina, colchicina, vinblastina y paclitaxel se usaron para estos estudios de unión competitivos. Se encontró que, sobre un intervalo de concentración de 0,1-125 µM, 1h compitió específicamente con la unión de colchicina a tubulina, pero no compitió con la unión a tubulina de vinblastina o paclitaxel (Figura 28C).

Los compuestos SMART inhiben el crecimiento de líneas celulares cancerígenas resistentes a multifármaco.

La capacidad de los compuestos para inhibir el crecimiento de las líneas celulares cancerígenas se evaluó usando el ensayo SRB. Como se muestra en la Tabla 21, los compuestos inhibieron el crecimiento de varias líneas celulares cancerígenas humanas, que incluyen cuatro líneas celulares de cáncer de próstata, y dos líneas celulares de melanoma, con valores CI₅₀ en el intervalo nanomolar bajo. De los tres compuestos, 2l fue el menos potente (CI₅₀ 76-116 nM). 2k mostró el mejor efecto antiproliferativo con valores de CI₅₀ entre 6 y 43 nM en las líneas celulares de cáncer de próstata y melanoma. Además, el efecto de los compuestos en las líneas celulares OVCAR-8 y NCI/ADR-RES se evaluó también (Tabla 21). Los compuestos fueron igualmente potentes frente a la célula MDR (NCI-ADR-

RES) y la línea celular parental (OVCAR-8). Paclitaxel, vinblastina y colchicina mostraron valores de resistencia relativa de 1333, 149 y 65 veces, respectivamente (Tabla 21). Estos datos indican que los compuestos sortean la resistencia al fármaco mediada por P-gp.

- 5 Los compuestos SMART detienen las células PC-3 (próstata) y A375 (melanoma) en la fase G2/M del ciclo celular e inducen la apoptosis celular. Las células PC-3 y A375 se expusieron a 10, 50, 200 y 1000 nM de los compuestos durante 24 h. El tratamiento con los compuestos SMART dio por resultado la acumulación dependiente de la concentración de las células tanto PC-3 como A375 en la fase G2/M con disminuciones simultáneas en el porcentaje de células en la fase G0/G1 (Figuras 29A y 29B). La proporción de células en fase G2/M aumentó significativamente cuando se trató con 50 a 200 nM de 1h, 2k, 2l. La apoptosis se examinó entonces midiendo el nivel de complejos
- 10 ADN-histona citoplasmático en células PC-3 y A375 después de 24 h de tratamiento. Aumentar la concentración de los compuestos SMART aumentó el nivel de complejos de ADN-histona citoplasmáticos en células PC-3 y A375 (Figura 29C). El efecto fue más pronunciado en las células A375 que en las células PC-3, pero la apoptosis fue evidente en ambos tipos de células. 1h y 2k indujeron apoptosis moderada a una concentración de 50 nM, mientras que 2l indujo apoptosis solo a concentraciones mayores que o iguales a 200 mM.
- 15 Perfil PK *in vivo* de compuestos SMART. Un bolo de dosis única de cada compuesto (15 mg/kg) se administró por inyección en la vena de la cola a ratones ICR para caracterizar sus farmacocinéticas (Figura 30A). 1h y 2k mostraron propiedades PK similares, pero 2l mostró AUC ligeramente mayor que 1h y 2k indicativo de un menor aclaramiento para 2l (Tabla 22). 2l tenía también V_{ss} 2-3 veces mayor que la de 1h y 2k. Los valores de aclaramiento para los tres compuestos fueron iguales a o mayores que 90 mL/min/kg, el caudal de sangre hepática en ratones, sugiriendo que
- 20 además de la eliminación hepática, pueden estar implicadas otras rutas de degradación en la eliminación de los compuestos. Las farmacocinéticas de 1h y 2k (2,5 mg/kg) se examinaron también en ratas (Figura 30B). De forma interesante, los bajos valores de aclaramiento y velocidades de extracción hepática se obtuvieron mediante ambos compuestos, sugiriendo que estos compuestos muestran diferencias de especie en el aclaramiento. En ratas, 1h mostró propiedades farmacocinéticas favorables, que son bajo aclaramiento (6 mL/min/kg), volumen moderado de distribución (7,6 L/kg), larga semivida (24 h) y alta exposición (AUC, 5,8 h*µg/mL) (Tabla 22) cuando se administró
- 25 iv.

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de compuestos SMART. Se administraron 15 mg/kg y 2,5 mg/kg i.v. de SMART en ratones y ratas, respectivamente.

<i>In vivo</i> , parámetros farmacocinéticos de compuestos SMART					
Especie	Parámetro	Unidad	SMART-H	SMART-F	SMART-OH
Ratones	AUC	lu· * µg/mL	1,9	2,2	2,6
	$t_{1/2}$	min	140	141	740
	V_{ss}	L/kg	4,9	6,6	16,5
	CL	mL/min/kg	130	112	90
Ratas	AUC	lu· * (µg/mL	5,8	1,6	NA
	$t_{1/2}$	min	1431	2410	NA
	V_{ss}	L/kg	7,6	34	NA
	CL	mL/min/kg	6	11	NA

NA, no disponible

SMART-H en la Tabla 22 es 1h; SMART-F en la Tabla 22 es 2k; y SMART-OH en la Tabla 22 es 2l.

- 30 Los compuestos SMART inhiben el crecimiento de xenoinjertos de próstata y melanoma sin neurotoxicidad. Se dejó alcanzar a los tumores PC-3 de cáncer de próstata y A375 de melanoma en ratones un volumen de 150 mm³ y después los ratones que portaban tumores se trataron con los compuestos SMART. Como se muestra en la Figura 31A, los volúmenes tumorales en el grupo de control aumentaron a 680 mm³ durante los 21 días de duración del estudio. Los volúmenes tumorales en el grupo tratado con 1h aumentaron a 370 mm³ (tratamiento de 5 mg/kg) y 176
- 35 mm³ (tratamiento de 15 mg/kg) para el día 21, indicando una fuerte actividad antitumoral para este compuesto. Los tumores en los animales tratados con 2k aumentaron a 269 mm³ (tratamiento de 5 mg/kg) y 292 mm³ (tratamiento de 15 mg/kg), mientras que los animales en el grupo tratado con 2l (50 mg/kg) tuvieron tumores de 331 mm³ el día 21. Esta reducción en el volumen tumoral se invirtió tras la retirada de los compuestos SMART (datos no mostrados). La Tabla 23 resumió la eficacia *in vivo* (% de T/C, valores T-C y log de muerte celular) de los compuestos SMART.
- 40 Tabla 23. Eficacia *in vivo* de los compuestos SMART (administrados i.p.) en próstata (PC-3), melanoma (A375). Se resumen el % de T/C, valor de T-C y log de muerte celular. El tiempo de doblado del xenoinjerto de melanoma fue 4,6 d. La vinblastina se usó como el control positivo. Se considera que el % de T/C ≤42% es moderadamente activo por el criterio del Instituto Nacional del Cáncer. NA, no disponible.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Modelo de xenoinjerto	% T/C	Tiempo medio para alcanzar 600 mm ³ .	T-C (días)	Log de muerte celular total
Vehículo	NA	Próstata	100	19 días	NA	NA
Vinblastina	0,5	Próstata	29	NA	NA	NA
SMART-H	5	Próstata	29	NA	NA	NA
SMART-H	15	Próstata	4	NA	NA	NA

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Modelo de xenoinjerto	% T/C	Tiempo medio para alcanzar 600 mm ³ .	T-C (días)	Log de muerte celular total
SMART-F	5	Próstata	21	NA	NA	NA
SMART-F	15	Próstata	24	NA	NA	NA
SMART-OH	50	Próstata	34	NA	NA	NA
Vehículo	NA	Melanoma	100	18 días	NA	NA
SMART-H	20	Melanoma	30	28 días	10	0,7
SMART-F	15	Melanoma	28	29 días	11	0,7

SMART-H en la Tabla 23 es 1h; SMART-F en la Tabla 23 es 2k; y SMART-OH en la Tabla 23 es 2l.

- El tumor 1h obtuvo un % de T/C = 29% y 4% con tratamiento de 5 y 15 mg/kg (todas las dosis fueron intraperitoneales (i.p.)), respectivamente, mientras, 2k obtuvo un % de T/C de 21% y 24% con tratamiento de 5 y 15 mg/kg, respectivamente. La alta dosis de 2l (50 mg/kg) mostró el % de T/C de 34%. La vinblastina, el control positivo, mostró un % de T/C de 29% en el día 22 en xenoinjertos de PC-3 (Figura 31B). Las medidas de peso corporal, para monitorizar la toxicidad, indicaron que solo 1 de 8 ratones tratados con 1h (15 mg/kg), y 2 de 7 ratones tratados con 2k (15 mg/kg) perdieron más del 15% de peso corporal. Además de los efectos antitumorales de los compuestos en los tumores de próstata PC-3, 1h (20 mg/kg) y 2k (15 mg/kg) demostraron una significativa reducción de tumores A375. Como se muestra en la Figura 31C, los volúmenes tumorales del grupo de control aumentaron a 2183 mm³, mientras que los 14 volúmenes en los grupos de tratamiento 1h y 2k aumentaron a 775 mm³ y 722 mm³, respectivamente. El tratamiento de 1h y 2k representó el % de T/C de 28% y 29%, respectivamente. Las pruebas rotarod se realizaron para examinar los efectos neurotóxicos *in vivo* de 1h. En base al resultado de los experimentos de eficacia *in vivo*, 5 o 15 mg/kg [administración i.p., Captex200/Tween80 (1/4)] de 1h se eligió para estudiar el efecto en la coordinación motora. Un tratamiento de 0,5 mg/kg con vinblastina se usó como el control positivo bajo las mismas condiciones. Como se muestra en la Figura 31D, la vinblastina redujo gradualmente el tiempo (en segundos) que los ratones podrían estar en la barra rotatoria, y alcanzó importancia para los días 27 y 31 ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de vehículo. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en los grupos de tratamiento 1h, sugiriendo que 1h no provocó neurotoxicidad en los ratones ICR a dosis que están asociadas con efectos antitumorales.
- 1h no desarrolló resistencia al fármaco en ratones que portaban tumor PC-3. Se escindieron los tumores PC-3 de los ratones desnudos después de 21 días de tratamiento con vehículo ($n = 3$) o 15 mg/kg de 1h ($n = 3$). Los tumores sólidos se digirieron y dispersaron en células como se describe en la sección de métodos. La línea celular PC-3 de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) se usó como un control. Los valores CI_{50} fueron $29,1 \pm 1,1$, $29,1 \pm 0,8$ y $30,4 \pm 0,5$ nM en células PC-3 de ATCC, y células disociadas de tumores tratados con vehículo y 1h, respectivamente. Estos datos demuestran que 1h no indujo resistencia al fármaco en tumores PC-3 después de 21 días de tratamiento de 1h continuo.

Ejemplo 23

Modelado molecular

Métodos

- Todos los estudios de modelado molecular se realizaron con el paquete de modelado molecular de Schrödinger 2008 (Schrödinger LLC, Nueva York, NY), realizándose en un puesto de trabajo Dell Linux. Debido a que el tamaño de los compuestos ABI son mucho más cercanos a los de ABT-751, más que DAMA-colchicina, se seleccionó el complejo de tubulina con ABT-751 (código PDB: 3KHC) como sistema de modelado. Los ABI se construyeron y se prepararon usando el módulo Ligprep, y se acoplaron al sitio ABT-751 usando el módulo de deslizamiento en el paquete de Schrödinger. Los mejores complejos de acoplamiento se sometieron a dinámicas moleculares restringidas para liberar cualquier tensión usando el módulo MacroModel con campo de fuerza OPLS-2005. El ligando y sus residuos circundantes en 15 Å se dejaron mover libremente, mientras que los residuos fuera del radio de 15 Å se mantuvieron rígidos.

Resultados

- El modelado molecular para los compuestos ABI de unión en tubulina se estudió. Varias estructuras cristalinas del complejo ligando-tubulina están disponibles en el banco de datos PDB, con la más reciente de Dorleans *et al.* En general, el bolsillo de unión de colchicina tolera una variedad de estructuras moleculares, que pueden indicar sustanciales cambios de conformación en la unión del ligando. De hecho, Dorleans *et al.* resolvió la estructuras cristalinas tanto del dímero de tubulina vacío como el complejo de ligando-tubulina. Encontraron que, sin la presencia de ligando, el giro 7 (T7, residuos 244-251, Figura 32) en el monómero beta se dobla para ocupar el bolsillo de unión, mientras que se voltea hacia afuera tras la unión del ligando. La hélice 7 asociada (H7, residuos 224-243) y la hélice 8 (H8, residuos 252-260) se desplazaron tras la unión del ligando. Es concebible que el grado que T7 se desplaza depende del tamaño del ligando individual. Esta flexibilidad presenta un desafío significativo para entender los modos de unión precisos para los ligandos individuales sin resolver las estructuras cristalinas reales. Sin embargo, el análisis cuidadoso de los posibles modos de unión podría proporcionar algunos conocimientos en la unión de diferentes ligandos.

Los modos de unión de 12cb y 11cb (modelo de rama) se muestran en la Figura 32A y 32B. Por comparación, se representan los complejos de estructura cristalina de ABT-751 y DAMA-colchicina (modelos de cable) junto con el complejo ABI-12cb/tubulina en la Figura 32A. Por claridad, solo las estructuras secundarias relacionadas que forman el bolsillo de unión en la β -tubulina se muestran en la Figura 32A. Las estructuras totales de 12cb, ABT-751 y DAM-colchicina solapan muy bien en el bolsillo de unión. Varias interacciones de enlace de hidrógeno potenciales entre el compuesto 12cb y la tubulina se identificaron. El grupo carbonilo en 12cb estaba a la suficiente proximidad para formar dos interacciones de enlace de hidrógeno con la estructura de NH de Leu-252 y H8 y la cadena lateral de Asp-251 en T7 del β -monómero de tubulina. El sustituyente *para*-flúor en el anillo C estaba cerca de la cadena lateral de Cys241 en T7 y Tyr202 en S6, formando posiblemente uno o dos enlaces de hidrógeno. El protón del imidazol está muy cerca y probablemente forme un enlace de hidrógeno con Thr179 en el giro T5 (residuos 173-182) del α -monómero de tubulina (Figura 32A). Junto con las interacciones hidrófobas proporcionadas por los anillos aromáticos, la probable formación de estos enlaces de hidrógeno contribuirían a la alta afinidad de unión al dímero de tubulina, dando por resultado alta potencia antiproliferativa.

El modo de unión de 11cb estará concebiblemente menos definido ya que dos de los tres anillos aromáticos puede ocupar el bolsillo de unión en el β -monómero mientras que el tercer anillo puede extenderse hacia la interfase de los monómeros α/β , similar a como se une la cadena lateral de DAMA-colchicina. El modelado indica que el grupo protector probablemente se extiende a la interfase del dímero de tubulina, mientras que los anillos A, C de 11cb ocupan un bolsillo de unión y orientación similares a 12cb (Figura 32B). Esto puede explicar la actividad similar entre los dos compuestos, incluso aunque 11cb tenga un sistema anular extra. Desde los estudios de modelado molecular presentados en las Figuras 32A y 32B, el dador del enlace de hidrógeno es probable que sea el grupo tiol en Cys-241 en el giro 7 de la subunidad β en el dímero α/β -tubulina.

El modo de unión de ABI 12fb se modeló (no se muestra) y se comparó con DAMA-colchicina (véase la Figura 19 para la estructura de la colchicina) en el heterodímero α/β -tubulina. La estructura total de 12fb y DAMA-colchicina solaparon muy bien. El resto *p*-fluorofenilo solapa con el resto trimetoxifenilo que está interactuando con el giro T7 en la subunidad β . De forma similar, el resto *p*-clorofenilo ocupa el otro lado del bolsillo donde el anillo de siete miembros de la DAMA-colchicina está, con el átomo de cloro ocupando el bolsillo donde interactúa el resto metoxi.

Ejemplo 24

Formación de imágenes del microtúbulo

Materiales y métodos

El kit de reorganización del citoesqueleto Celómico (Thermo Scientific, Rockford, IL) se usó para obtener una prueba visualmente apreciable de los ABI interactuando con la tubulina dentro de las células. Las células de melanoma WM-164 se trataron con cada compuesto durante 18 h por duplicado usando una placa de 96 pocillos recubierta con colágeno (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Después las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (Thermo Scientific, Rockfor, IL) y se permeabilizaron usando suministro de tampón de permeabilización del kit. El anticuerpo primario para la tubulina y el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia se añadieron posteriormente a las células. Los núcleos celulares se tiñeron por DAPI. También se aplicó a todas las células el colorante verde para la célula completa. Todas las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia invertida Olympus IX71 (Olympus Corp., Tokio, Japón) con capas de imágenes separadas de tubulina (rojo), núcleos (azul) y células completas (verde). Para la comparación, se incluyen paclitaxel, colchicina y ABT-751, junto con los ABI.

Resultados

La prueba visual de los ABI interactuando con la tubulina dentro de las células se examinó. La organización del microtúbulo en las células WM-164 de melanoma humano tras el tratamiento con diferentes compuestos se presenta en la Figura 33. Las imágenes de microtúbulos mostraron claramente que los cinco compuestos probados dieron por resultado la reorganización del citoesqueleto. Hubo una diferencia significativa entre paclitaxel y los otros cuatro compuestos (colchicina, ABT-751, 12cb y 12da). El tratamiento con paclitaxel dio por resultado una condensación de microtúbulos que se extendían ordenadamente alrededor de los núcleos en comparación con los controles, coherente con sus mecanismos de acción para estabilizar los microtúbulos. Por el contrario, el tratamiento con colchicina, ABT-751, 12cb y 12da tuvo efectos similares en los microtúbulos y dio por resultado algún grado de fragmentación de microtúbulos, coherente con su mecanismo común de acción para desestabilizar los microtúbulos. Estos resultados también confirmaron que los ABI compartían el mismo objetivo celular con la colchicina e inducían el mismo efecto celular.

Ejemplo 25

Actividad disruptora vascular de los compuestos 17ya y 55

Método

Células. Se cultivaron HUVEC (Células endoteliales de la vena umbilical humana) y se expandieron en EGM-2 BulletKit (Lonza, núm. de cat. CC-3162), que contiene suplementos de crecimiento que incluyen hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos humano básico con heparina (hFGF-B), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento tipo R3-insulina 1 (IGF-1), ácido ascórbico, heparina, suero bovino fetal, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y GA-1000 (gentamicina y anfotericina B) en el medio basal de célula endotelial 2. Las células entre el tercer y quinto paso se usaron para los experimentos. Las células de cáncer de próstata humano PC-3 y las células de cáncer de mama humano T47D se cultivaron en medio RPMI-1640 con suero bovino fetal al 5%.

Estudios de inhibición del crecimiento celular. La actividad citotóxica o antiproliferativa de los compuestos de prueba se investigó en varias líneas celulares usando el ensayo de sulforodamina B (SRB). Las células cultivadas se pusieron en placas de 96 pocillos y se incubaron en medio que contenía diferentes concentraciones de los compuestos de prueba durante 24 h o 48 h. Las células se tiñeron con disolución de sulforodamina B (SRB). La densidad óptica se determinó a 540 nm en un lector de microplaca (Dyner Technologies, Chantilly, VA). Se construyeron representaciones de porcentaje de inhibición del crecimiento celular frente a concentración de fármaco, y la concentración que inhibió el crecimiento celular en 50% respecto al control de vehículo (CI_{50}) se determinó por regresión de mínimos cuadrados no lineal usando el programa WinNonlin (Pharsight Corporation, Cary, NC).

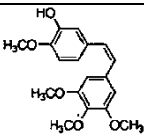
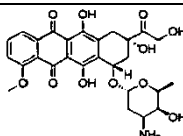
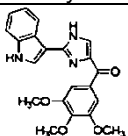
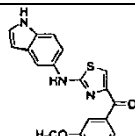
Ensayos de formación capilar y disrupción. Los ensayos de formación capilar se realizaron en placas de 96 pocillos poniendo en placas 12.000 células/pocillo de HUVEC en una capa de Matrigel (BD Biosciences). Para evaluar la acción anti-capilar, los capilares se dejaron formar durante un periodo de 16 h antes de la adición de compuesto de prueba o control con vehículo. Además, el efecto inhibidor de la formación capilar del compuesto de prueba se investigó tratando células HUVEC con compuestos de prueba antes de la formación capilar. Se adquirieron las imágenes inmediatamente después de la adición de compuesto, 5, 10, 15 y 25 h después de la exposición al compuesto de prueba. La formación capilar se cuantificó contando el número de tubos y nodos que tenían al menos tres bordes.

Ensayo de permeabilidad monocapa endotelial. La permeabilidad de una monocapa celular endotelial se evaluó en el sistema transwell. Las HUVEC se pusieron en placas a 2×10^6 células por inserción de placa de 24 pocillos en medio EGM-2 y se incubaron durante 72 h para alcanzar el 100% de confluencia. Los compuestos de prueba se diluyeron en medio EGM-2 y se añadieron a la cámara superior del aparato. Después de 1, 2 y 4 h de incubación, los compuestos se quitaron y se añadieron 75 μ g/mL de dextrano conjugado con FITC (PM 40.000) durante 5 minutos. Las medidas de fluorescencia de la cámara inferior se tomaron después de la excitación a 485 nm y la emisión se midió a 520 nm usando el Lector de microplacas Synergy 4 de BioTek.

Resultado

17ya y 55 mostraron alta actividad antiproliferativa frente a las células endoteliales. 17ya y 55 se evaluaron por la actividad citotóxica frente a las células endoteliales suplementadas con factor de crecimiento y cultivos de células endoteliales privadas de factor de crecimiento. Se usaron combretastatina A-4 (CA4) y doxorubicina como control positivo y negativo, respectivamente. El compuesto 17ya mostró mayor potencia que el compuesto 55 frente a células endoteliales que proliferan activamente (Tabla 24 y Figura 35). Tanto 17ya como 55 mostraron selectividad por las células endoteliales mostrando menores valores de CI_{50} en comparación con una de las células de cáncer de próstata. CA4, 17ya y 55 fueron 8, 5 y 3 veces más activas frente a las células endoteliales que frente a las células cancerígenas, respectivamente, mientras que la doxorubicina no era específica a las células endoteliales (Tabla 24 y Figura 35). Sin embargo, no se observó selectividad entre las células endoteliales quiescentes y activas con estos compuestos (datos no mostrados).

Tabla 24. Inhibición del crecimiento de células endoteliales de 17ya y 55. N=3

	CA4	Doxorubicina	17ya	55
				
PC3	3,2	397,0	7,8	23,3
T47D	6,0	352,8	18,0	37,4
HUVEC	1,2	273,6	2,8	9,7
Relación de selectividad*, células cancerígenas/HUVEC	7,6	1,4	4,6	3,1

* Para obtener la relación de selectividad entre las células cancerígenas y las células HUVEC, se usaron los valores medios de CI_{50} (nM) de los compuestos de prueba en células PC3 y T47D.

17ya altera la formación de capilares endoteliales pero no altera los capilares preformados. La actividad de 17ya se investigó en las células endoteliales implicadas en la formación del tubo capilar *in vitro*. Las células endoteliales se pusieron en una matriz de Matrigel y se observó la formación y construcción de tubos capilares en presencia o ausencia de compuestos (CA4, doxorubicina y 17ya).

Para evitar la confusión entre la etapa temprana de formación del tubo y la disrupción de la construcción del tubo, las células HUVEC en la matriz en presencia de tratamiento de fármaco se incubaron durante 15 h. Después se determinó la disrupción del capilar contando el número de tubos y nodos en cada grupo de tratamiento. Por otro lado, para evaluar el efecto del compuesto de prueba en los capilares preformados, se dejó que las células HUVEC en la matriz formaran tubo capilar durante 16 h y los capilares se trataron con los compuestos de prueba.

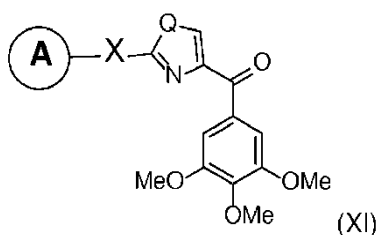
Como resultado, el número de tubos y nodos se disminuyó gradualmente en el tiempo debido a la deficiencia o consumo de nutriente por las células HUVEC (Figura 36). Esta tendencia se observó en cada grupo de tratamiento con fármaco (Figura 36). Para examinar la diferencia entre los capilares no tratados y pretratados se compararon los grupos de incubación a las 15 h (Figura 36).

17ya y 55 aumentaron la permeabilidad de las monocapas de células endoteliales. Los agentes antitubulina podrían modificar la integridad de las capas de células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos teniendo como objetivo el citoesqueleto de las células endoteliales. Por consiguiente, se sabe que el efecto de disrupción vascular del agente antitubulina aumenta la permeabilidad del vaso sanguíneo y por consiguiente podría llevar a la fuga de proteína y alta viscosidad de la sangre. Esto podría dar por resultado la reducción del flujo sanguíneo, provocando la posterior muerte tumoral por hipoxia y privación de nutrientes.

El efecto de 17ya y 55 se evaluó en la permeabilidad vascular usando el estudio *in vitro* que usa el sistema transwell con monocapas HUVEC confluyentes. El cambio en la permeabilidad por el compuesto de prueba se midió por la fuga de dextrano (PM 40.000) después de 1, 2 y 4 h del tratamiento con fármaco. Se usó CA4 como un control positivo. CA4, 17ya y 55 dieron por resultado la permeabilidad aumentada y el efecto fue más pronunciado a 1 h de la incubación (no se mostraron datos). 17ya mostró una potencia similar a CA4 (Figura 38). La doxorubicina no indujo ningún cambio en la permeabilidad de la monocapa de células endoteliales (Figura 38).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la estructura de fórmula XI:



En el que

5 X es NH;

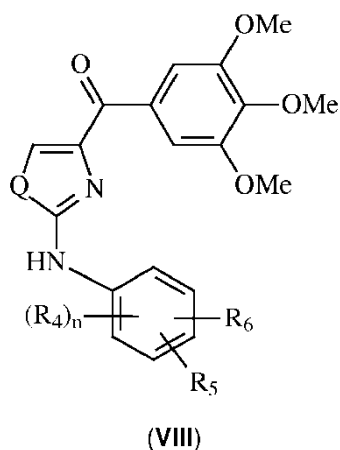
Q es S; y

A es un anillo fenilo o indolilo sustituido o no sustituido;

10 En el que dicho anillo A está opcionalmente sustituido por 1-5 sustituyentes que son independientemente O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF₃, CN, -CH₂CN, NH₂, hidroxilo, -(CH₂)_iNHCH₃, (CH₂)_iNH₂, -(CH₂)_iN(CH₃)₂, -OC(O)CF₃, alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, -OCH₂Ph, -NHCO-alquilo, COOH, -C(O)Ph, C(O)O-alquilo, C(O)H, -C(O)NH₂ o NO₂; e

i es un número entero entre 0-5.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se representa por la estructura de fórmula VIII:



15 En el que

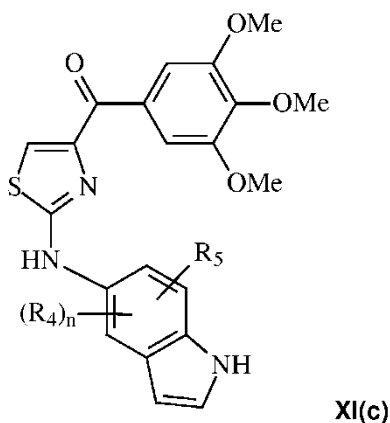
R₄, R₅ y R₆ son independientemente hidrógeno, O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF₃, CN, -CH₂CN, NH₂, hidroxilo, -(CH₂)_iNHCH₃, -(CH₂)_iNH₂, -(CH₂)_iN(CH₃)₂, -OC(O)CF₃, alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, -OCH₂Ph, -NHCO-alquilo, COOH, -C(O)Ph, C(O)O-alquilo, C(O)H, -C(O)NH₂ o NO₂;

Q es S;

20 i es un número entero entre 0-5; y

n es un número entero entre 1-3.

3. El compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se representa por la estructura de fórmula XI(c):



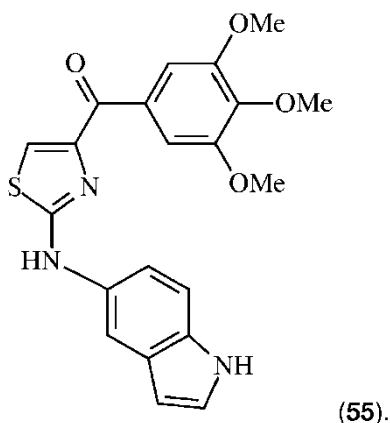
En el que

R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno, O-alquilo, O-haloalquilo, F, Cl, Br, I, haloalquilo, CF₃, CN, -CH₂CN, NH₂, hidroxilo, -(CH₂)_iNHCH₃, -(CH₂)_iNH₂, -(CH₂)_iN(CH₃)₂, -OC(O)CF₃, alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado, haloalquilo, alquilamino, aminoalquilo, -OCH₂Ph, -NHCO-alquilo, COOH, -C(O)Ph, C(O)O-alquilo, C(O)H, -C(O)NH₂ o NO₂;

i es un número entero entre 0-5; y

n es un número entero entre 1-4.

4. El compuesto según la reivindicación 3 en el que dicho compuesto es el compuesto 55, representado por la estructura:



5. El compuesto según la reivindicación 2, en el que dicho compuesto es (2-(fenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5a), (2-(p-tolilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5b), (2-(p-fluorofenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5c), o (2-(4-clorofenilamino)thiazol-4-il)(3,4,5-trimetoxifenil)metanona (5d).

6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o su sal, producto farmacéutico, tautómero, hidrato, N-óxido, farmacéuticamente aceptable, o combinaciones de los mismos.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en el tratamiento, supresión, reducción de la gravedad, reducción del riesgo o inhibición del cáncer en un sujeto, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de melanoma, cáncer de melanoma metastático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, leucemia, cáncer renal, cáncer del SNC y combinaciones de los mismos.

9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en el tratamiento de un tumor o tumores resistentes al fármaco en un sujeto, en el que dicho tumor se selecciona del grupo que consiste en tumor cancerígeno de melanoma, tumor cancerígeno de melanoma metastático, tumor de cáncer de próstata y tumor de cáncer de ovario, y combinaciones de los mismos.

ES 2 718 637 T3

10. El compuesto para usar según la reivindicación 8 o la reivindicación 9 en el que dicho compuesto se administra en combinación con otra terapia para el cáncer.

11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en la destrucción de una célula cancerígena *in vivo*.

- 5 12. Un método *ex vivo* de destrucción de una célula cancerígena que comprende proporcionar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y poner en contacto la célula cancerígena con el compuesto en condiciones efectivas para matar la célula cancerígena.

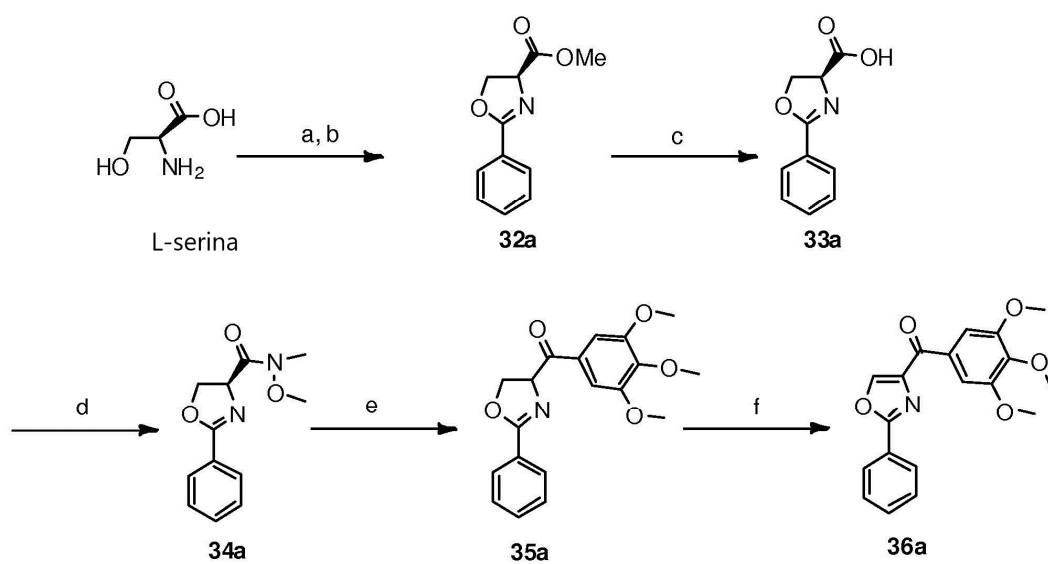


Figura 1

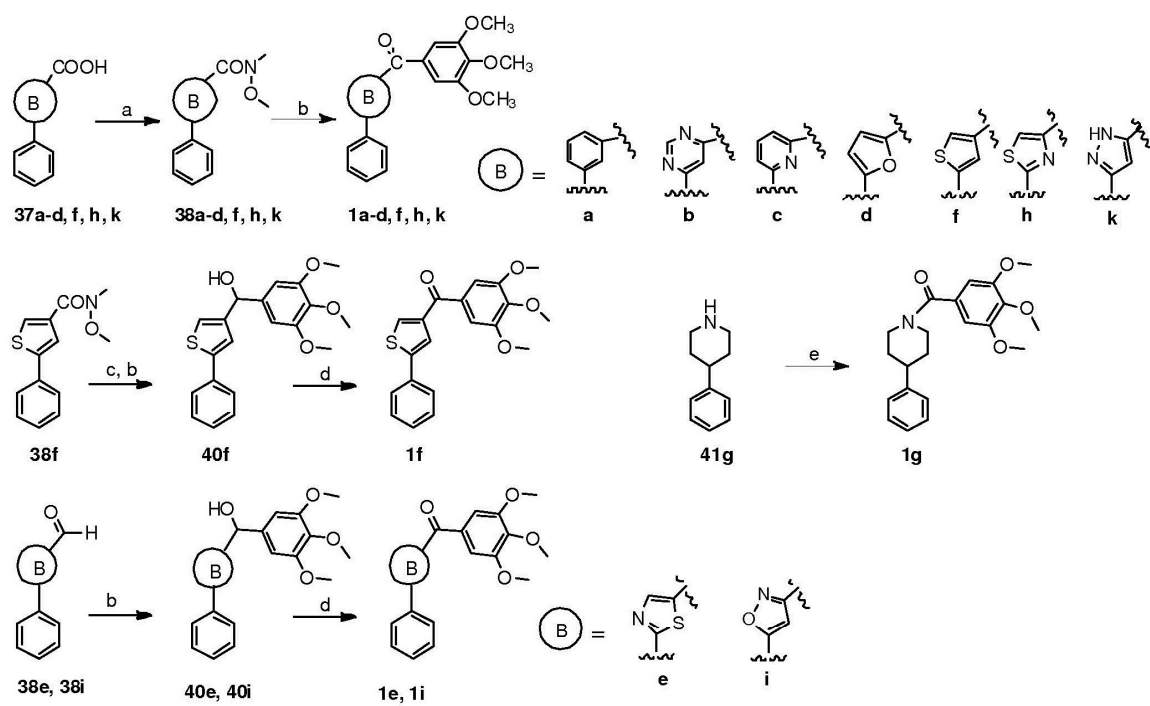


Figura 2

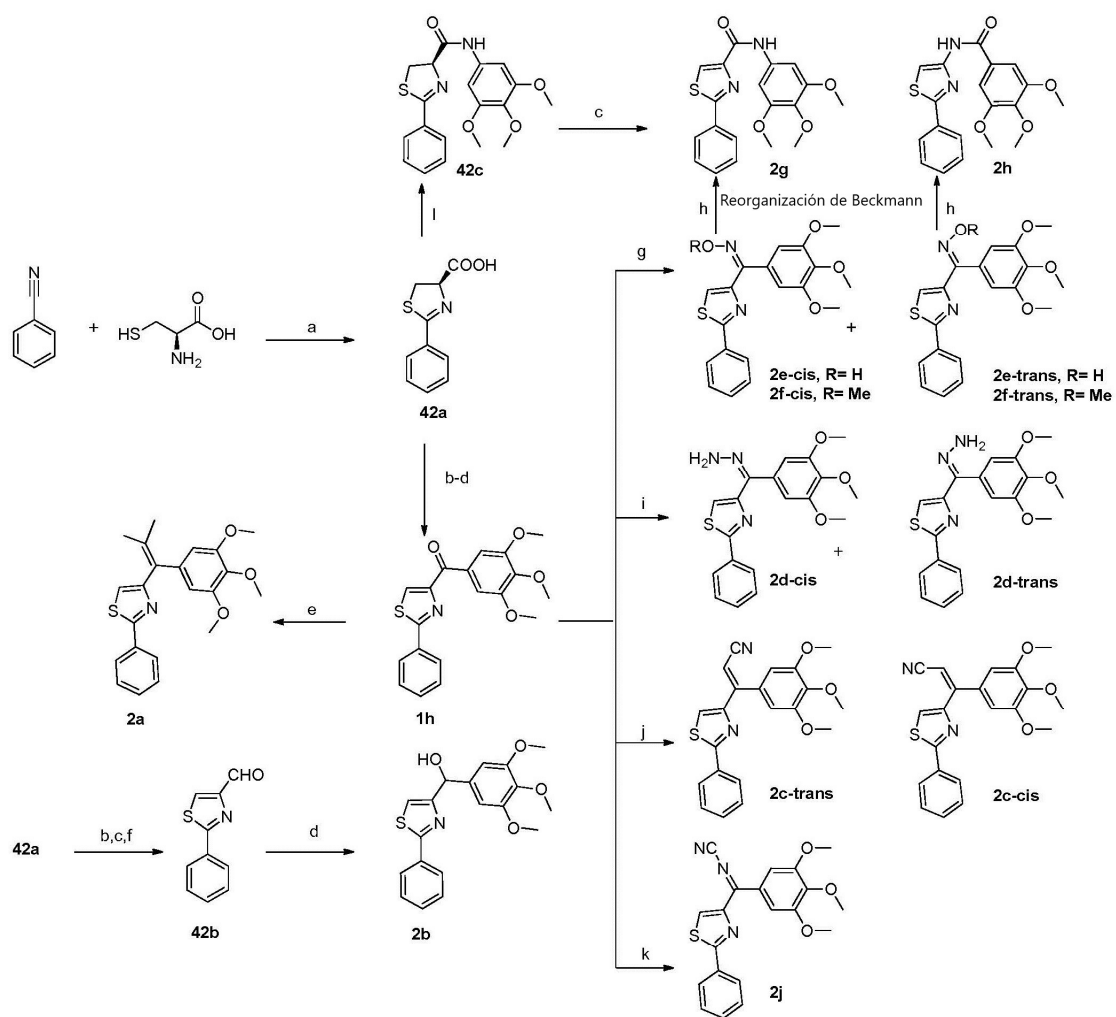


Figura 3

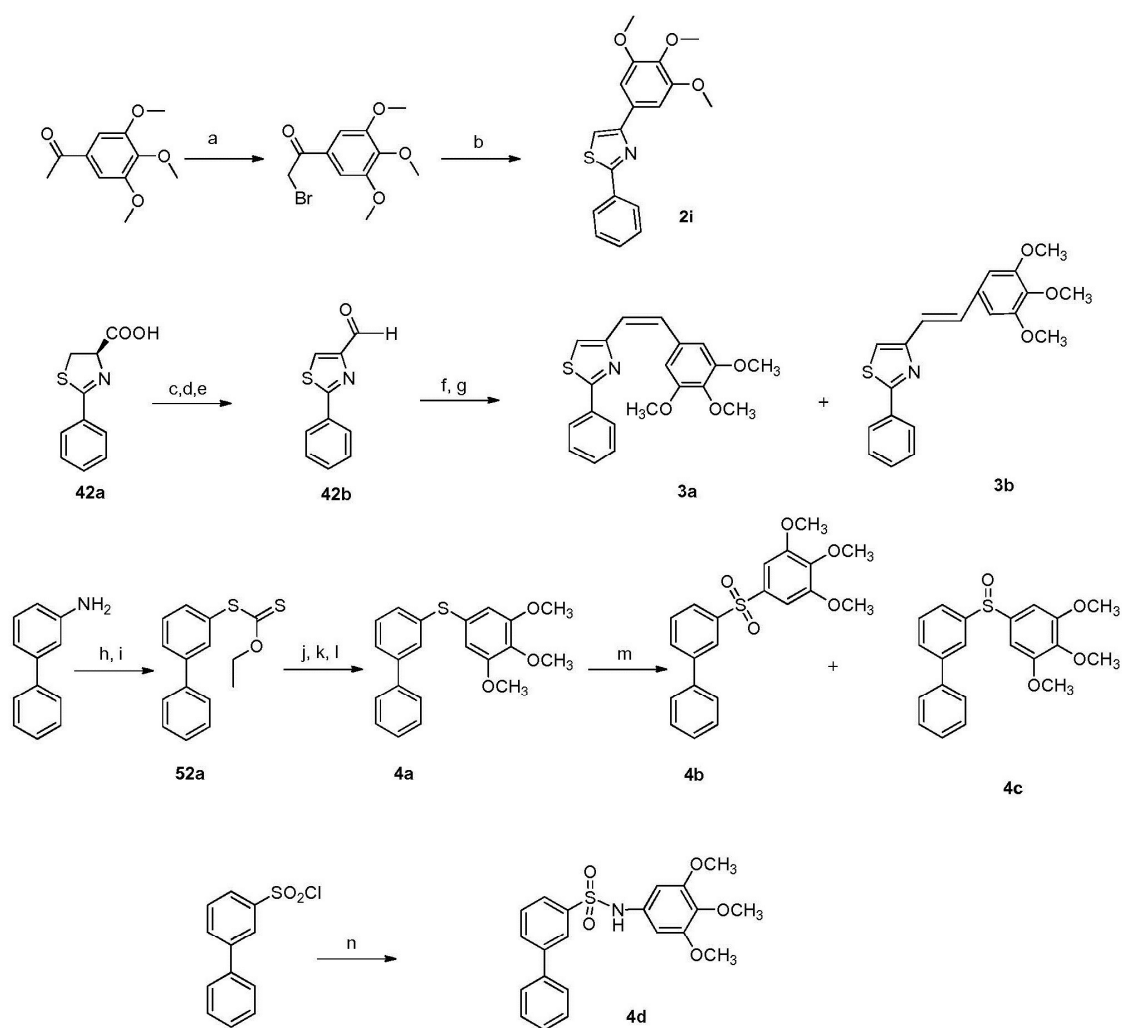


Figura 4

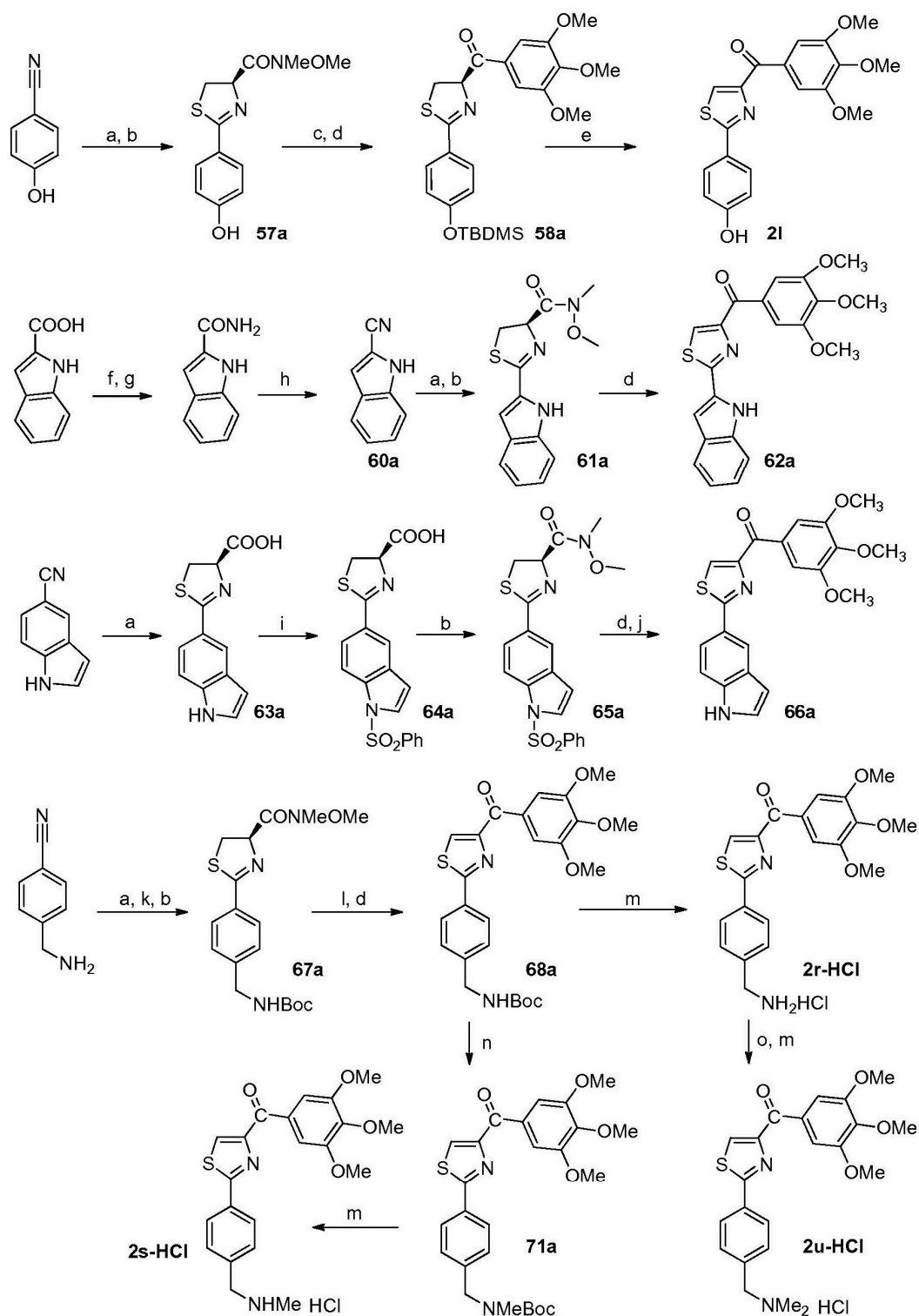


Figura 5

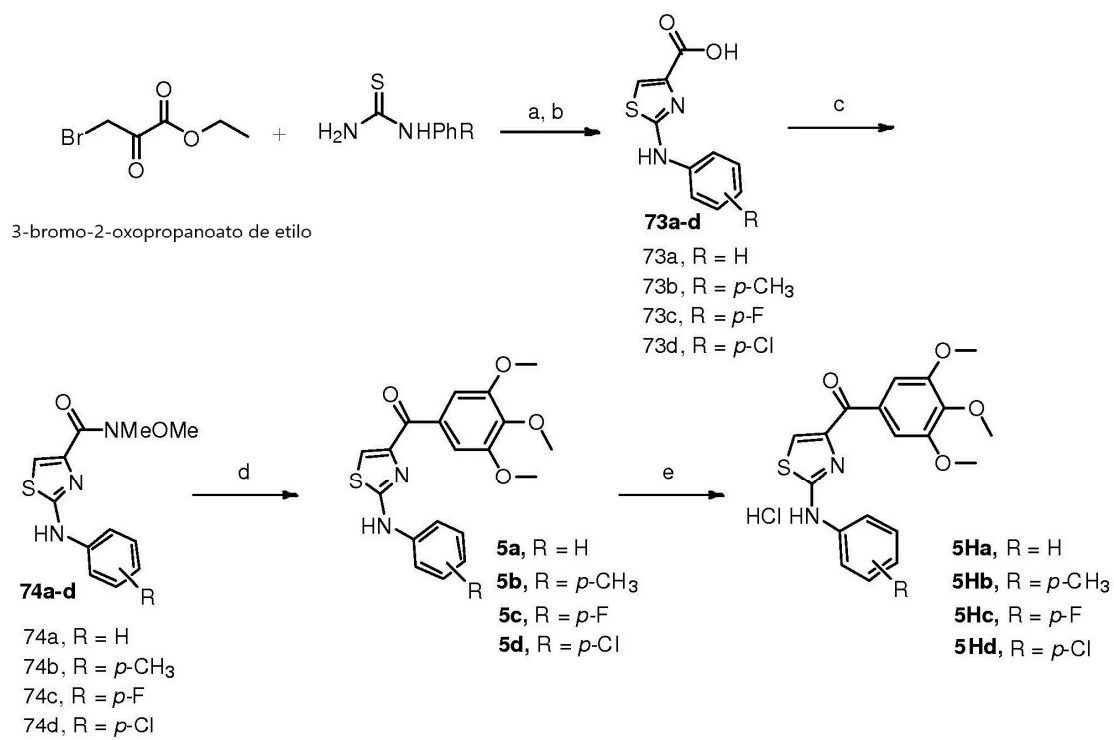
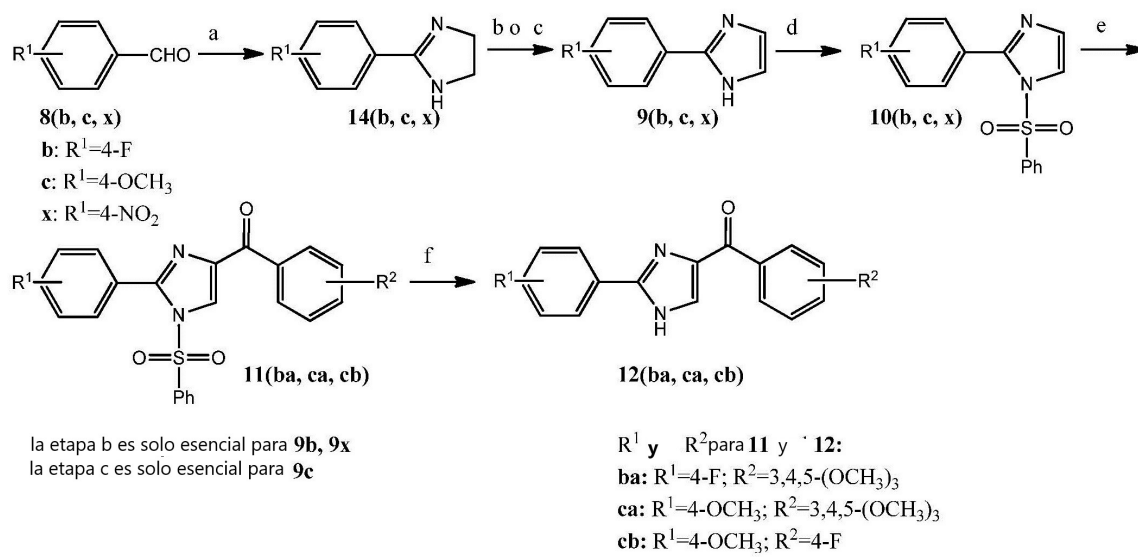


Figura 6

**Figura 7**

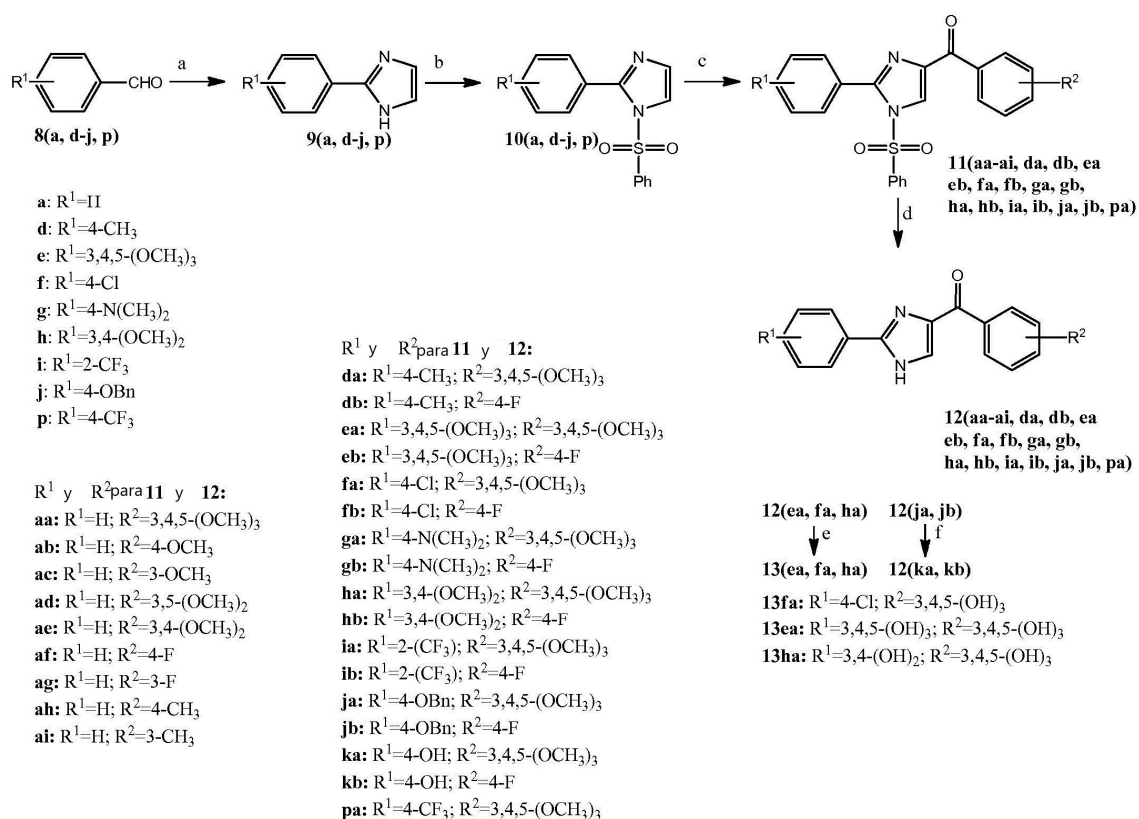


Figura 8

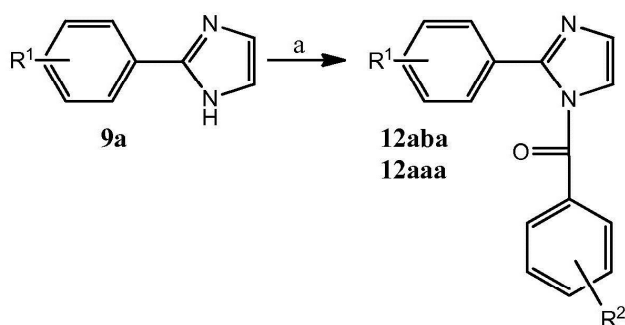


Figura 9

R¹ y R² para
12aba: $R^1=H$; $R^2=4-OCH_3$
12aaa: $R^1=H$; $R^2=3,4,5-(OCH_3)_3$

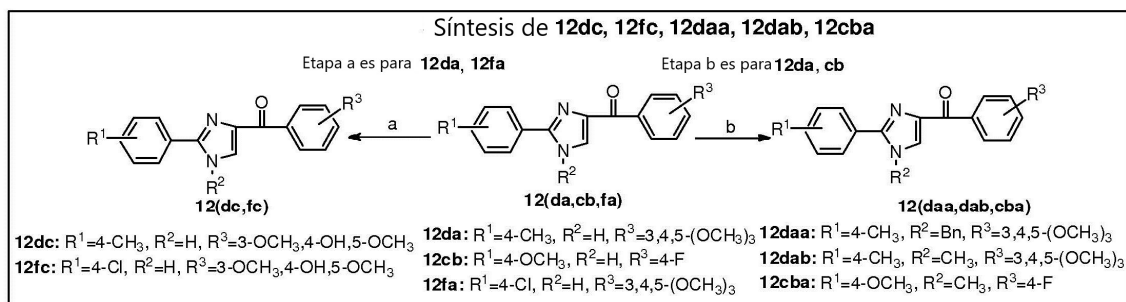


Figura 10

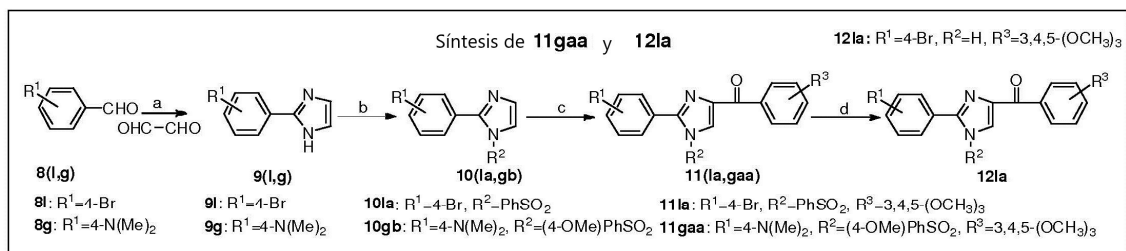


Figura 11

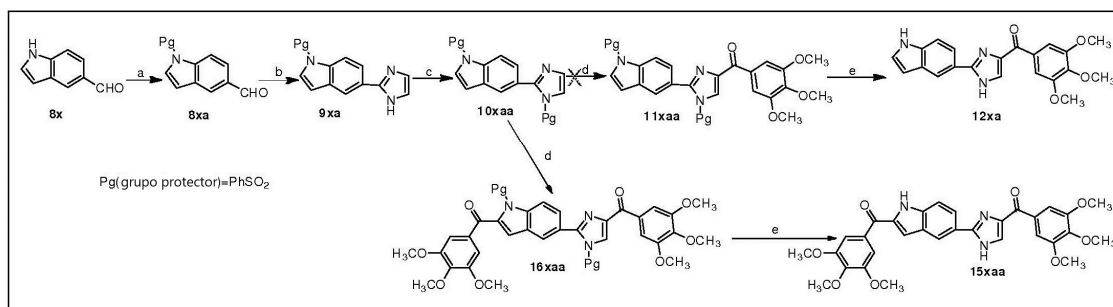


Figura 12

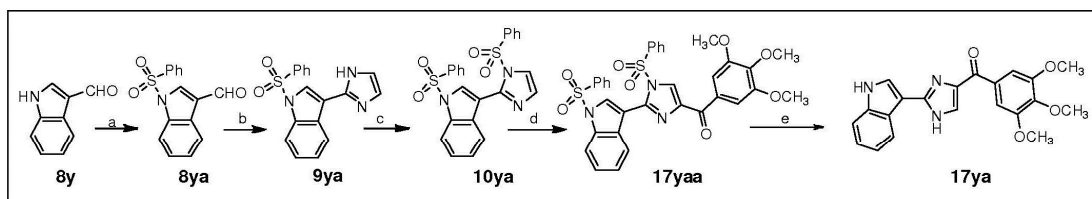


Figura 13

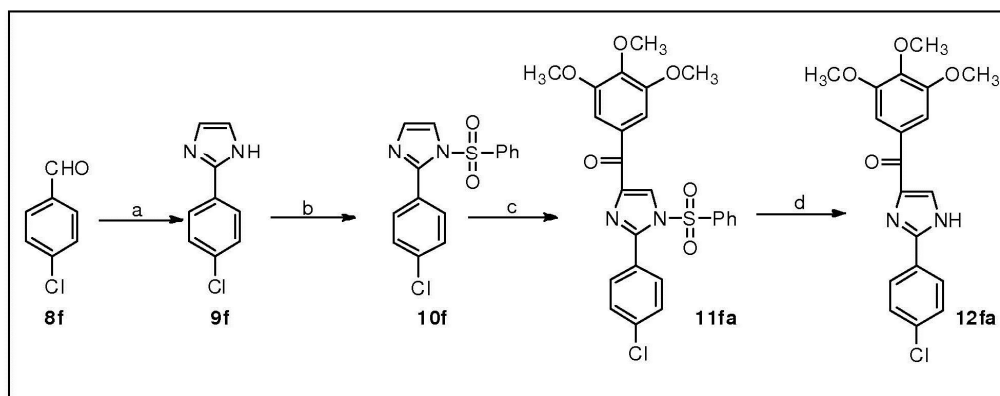


Figura 14

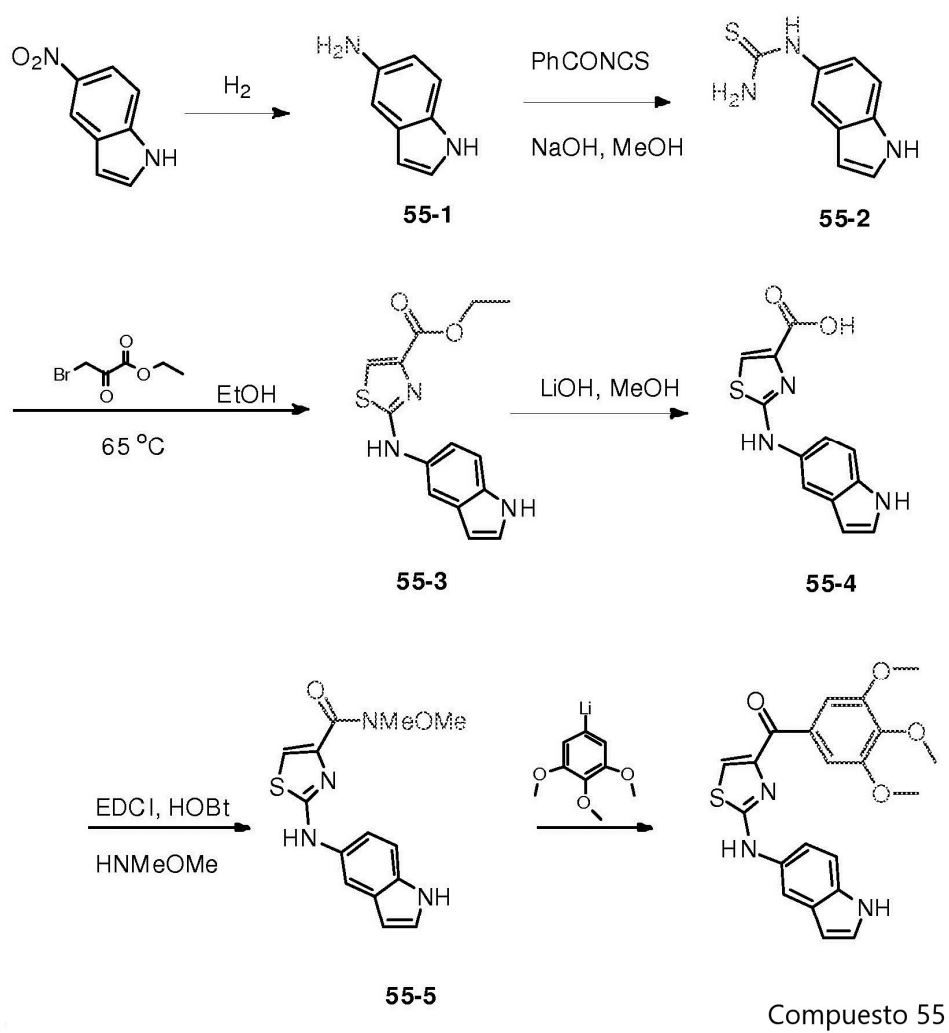


Figura 15

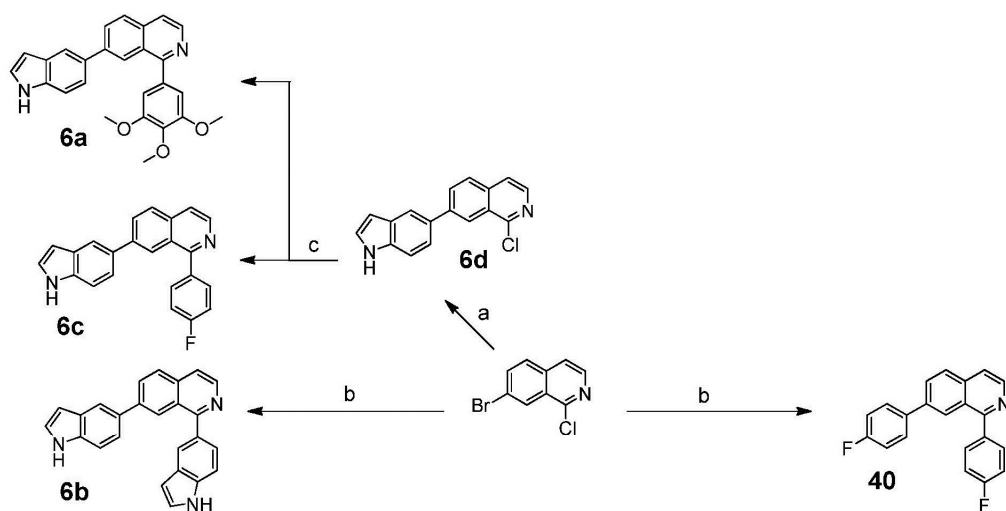


Figura 16A

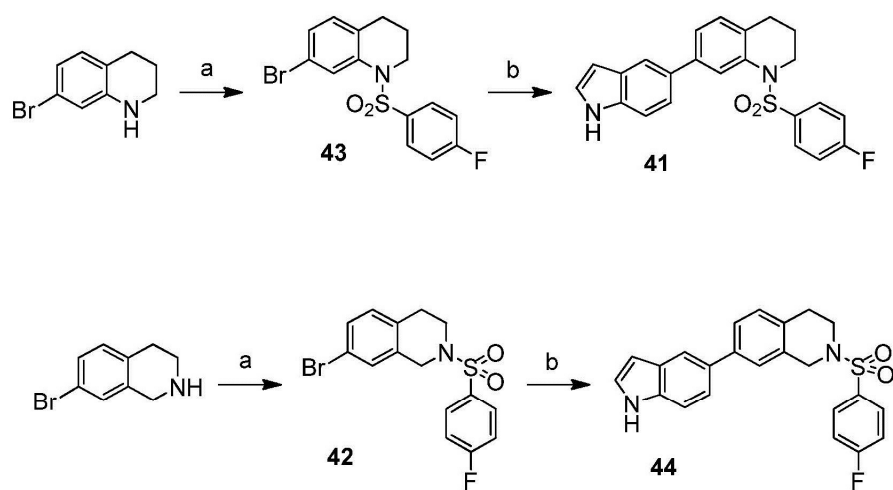


Figura 16B

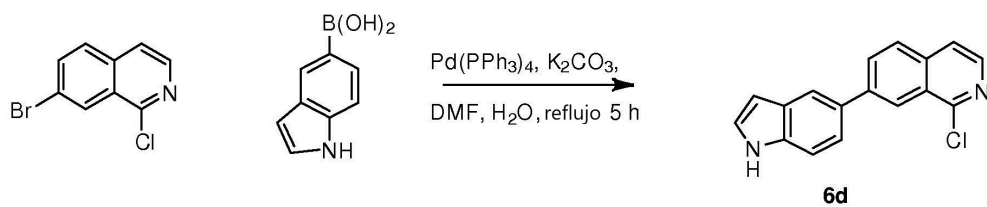


Figura 16C

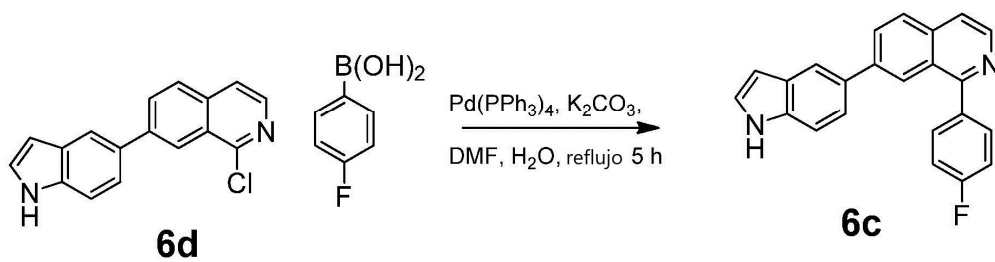


Figura 16D

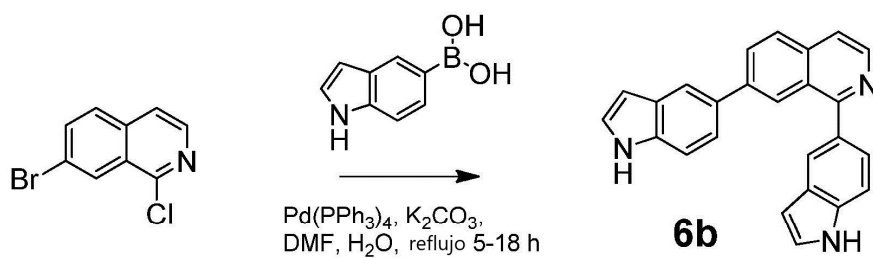


Figura 16E

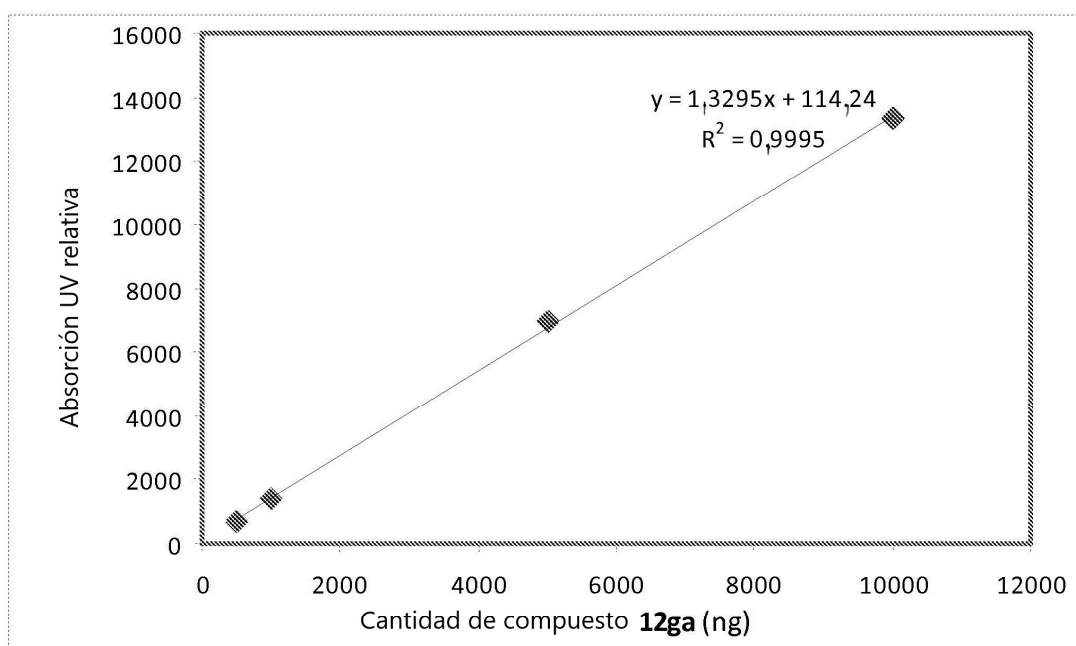


Figura 17

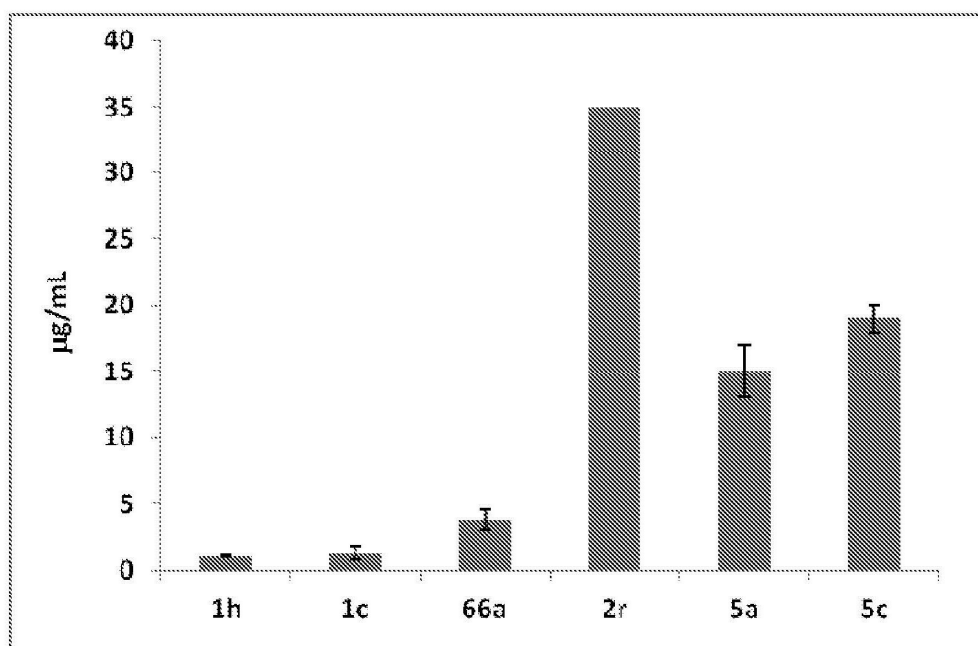


Figura 18

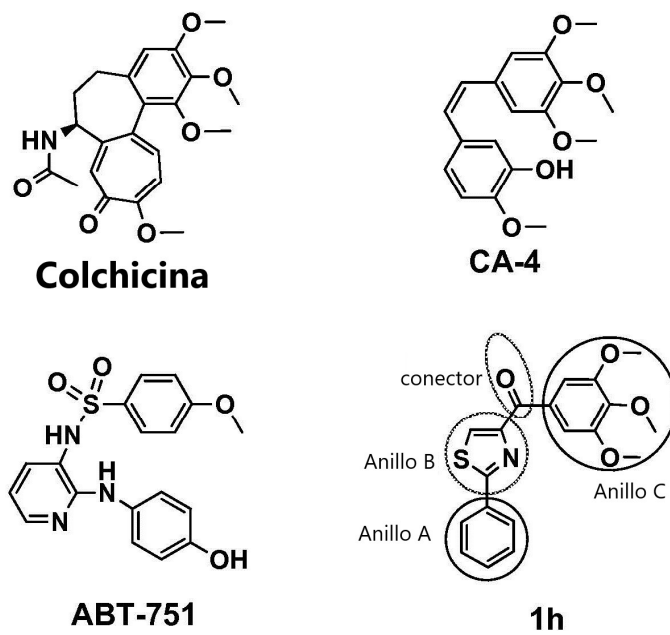


Figura 19

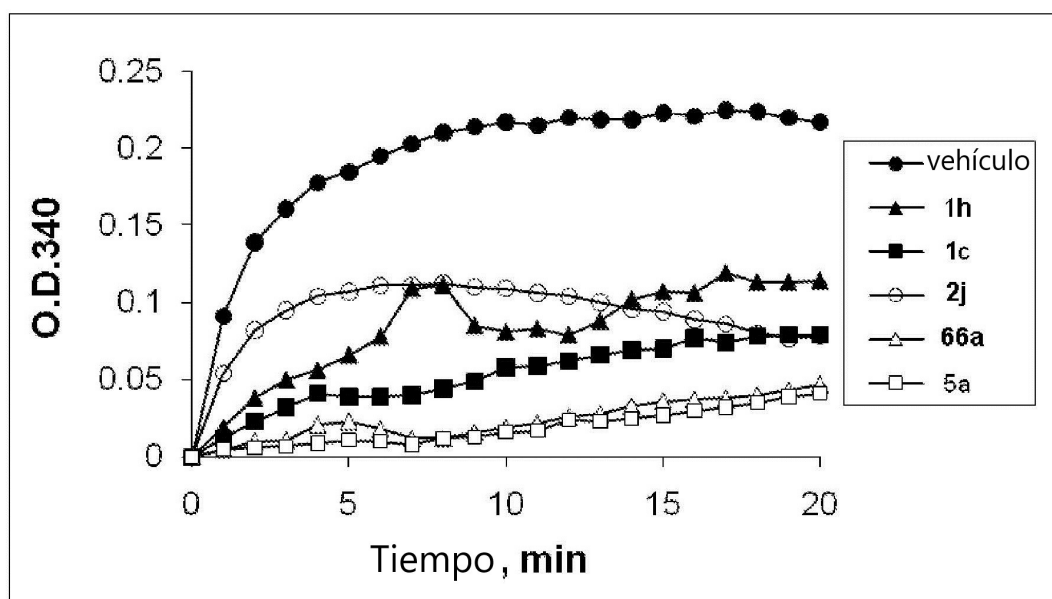


Figura 20a

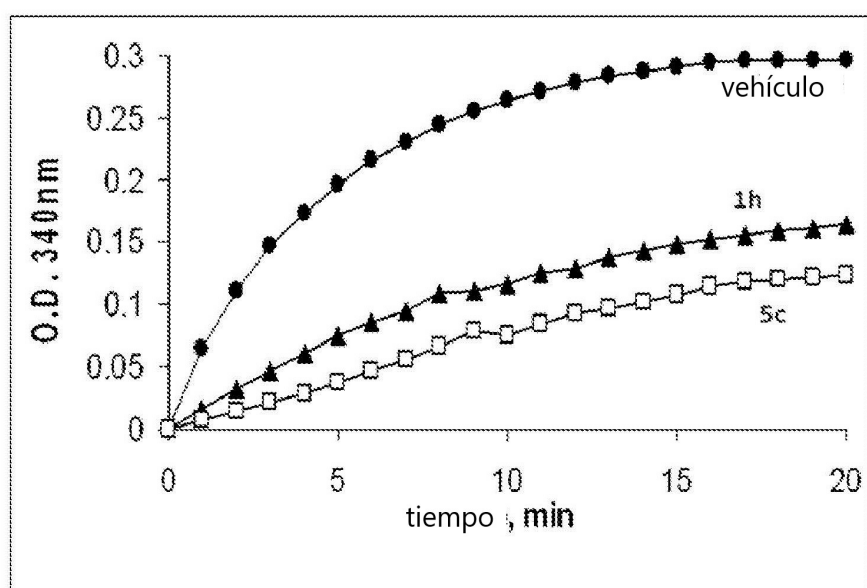
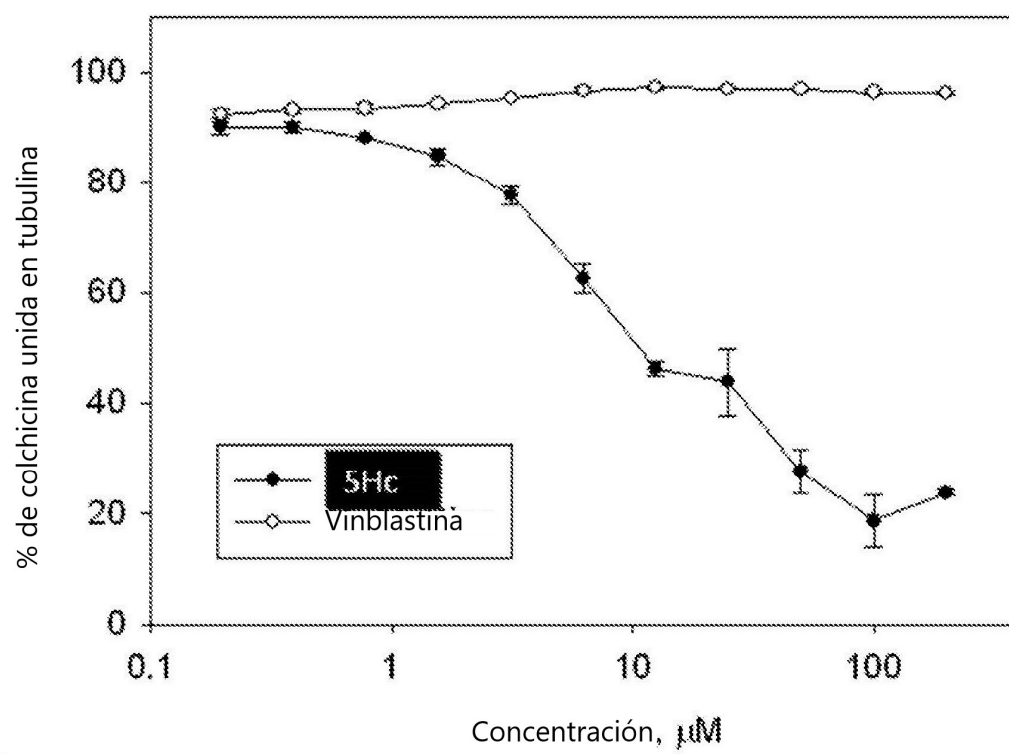


Figura 20b

**Figura 20C**

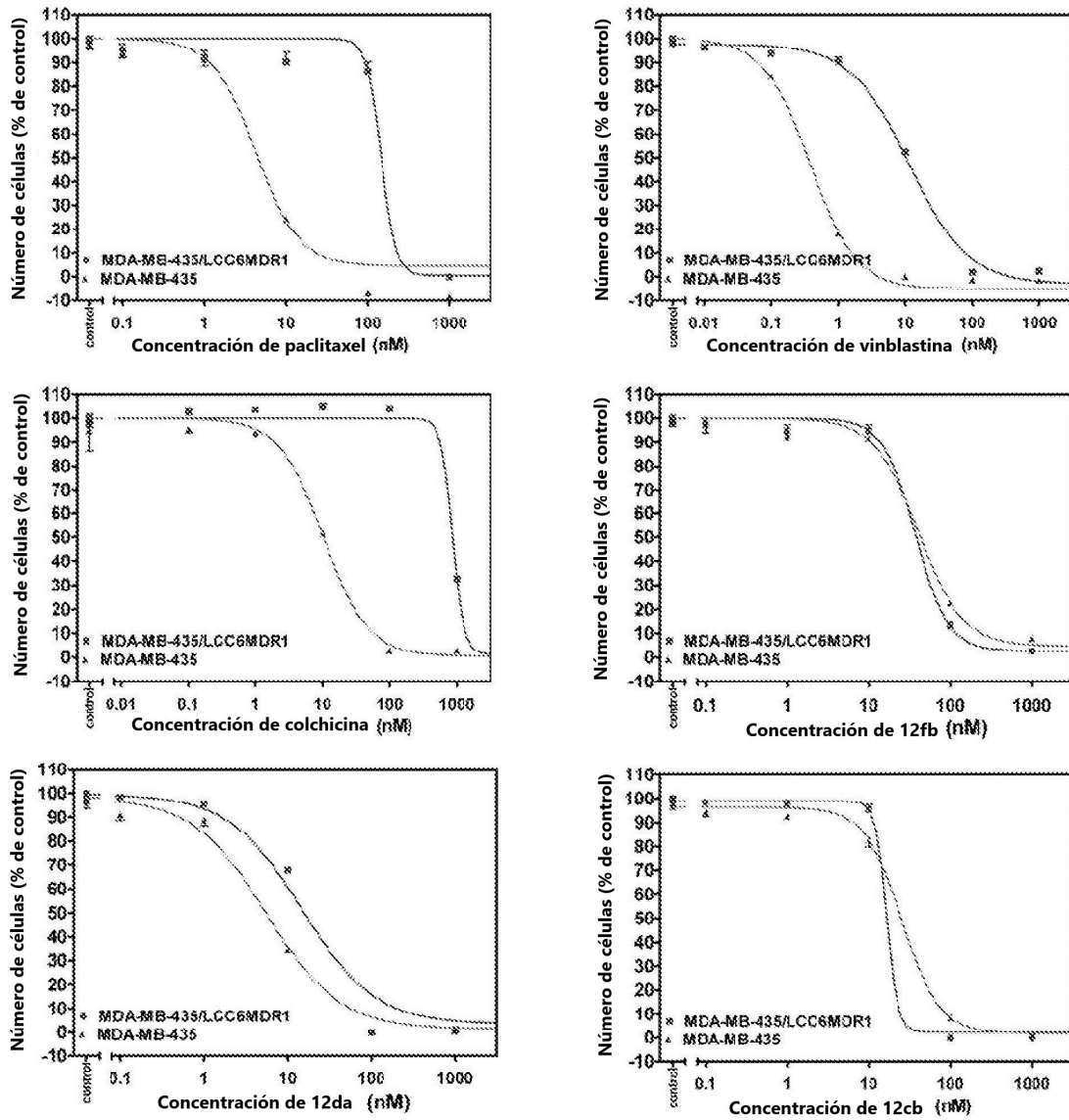


Figura 21

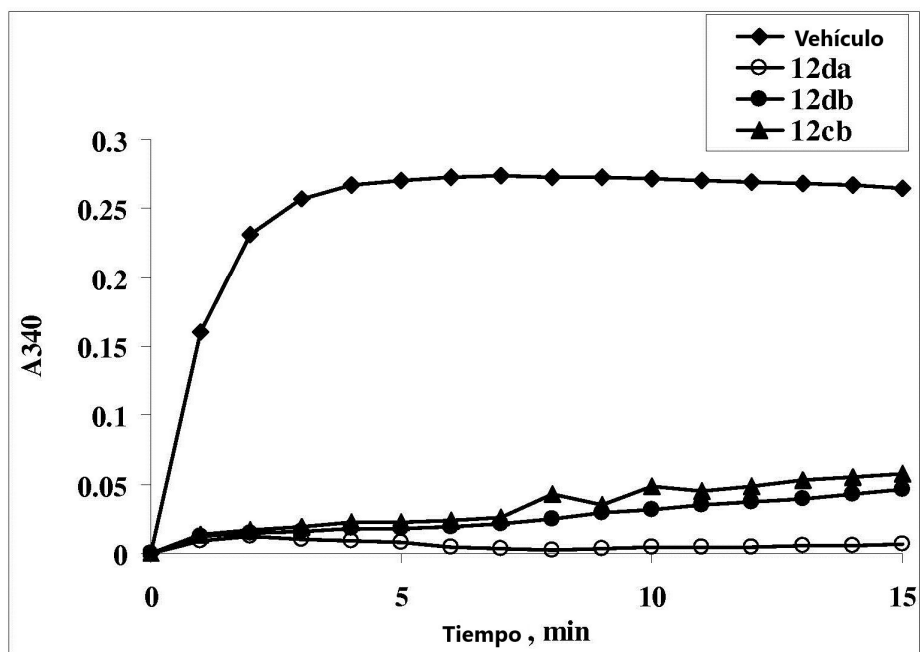


Figura 22

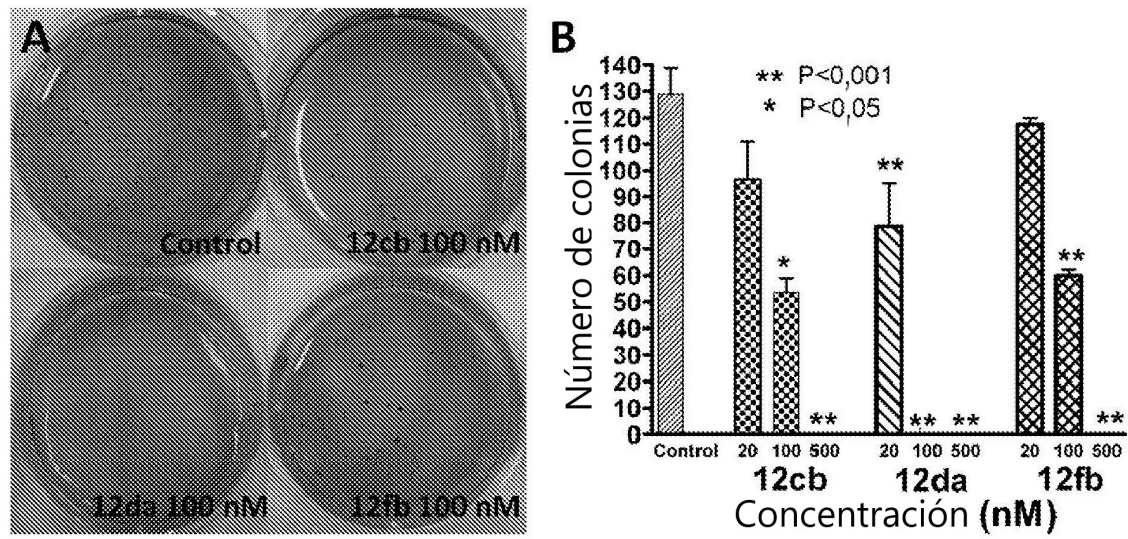
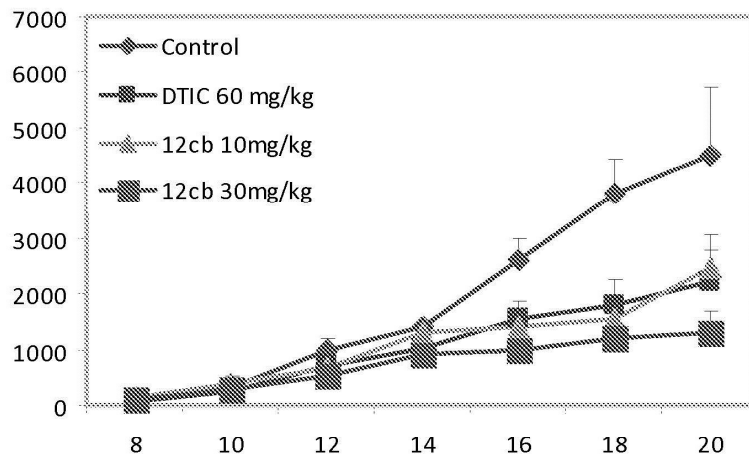


Figura 23



B

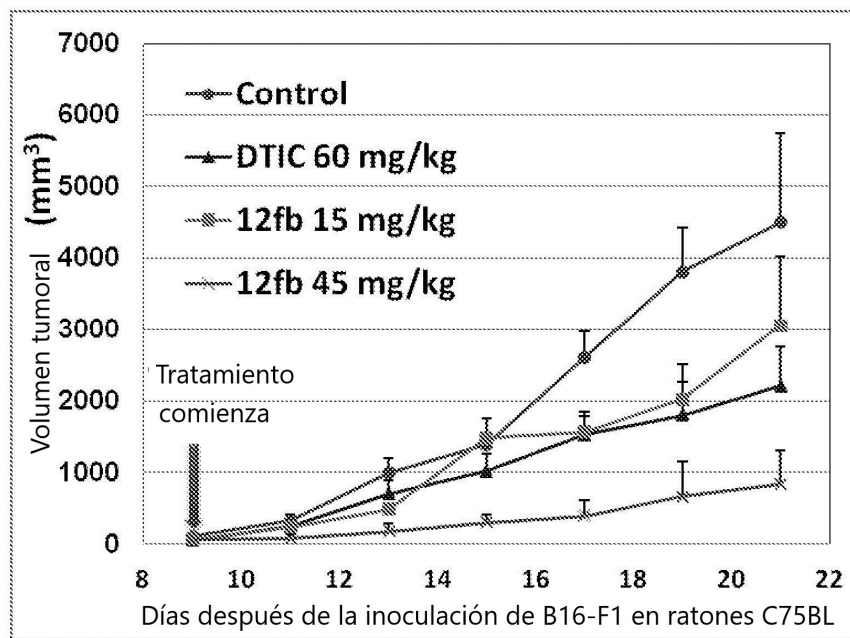
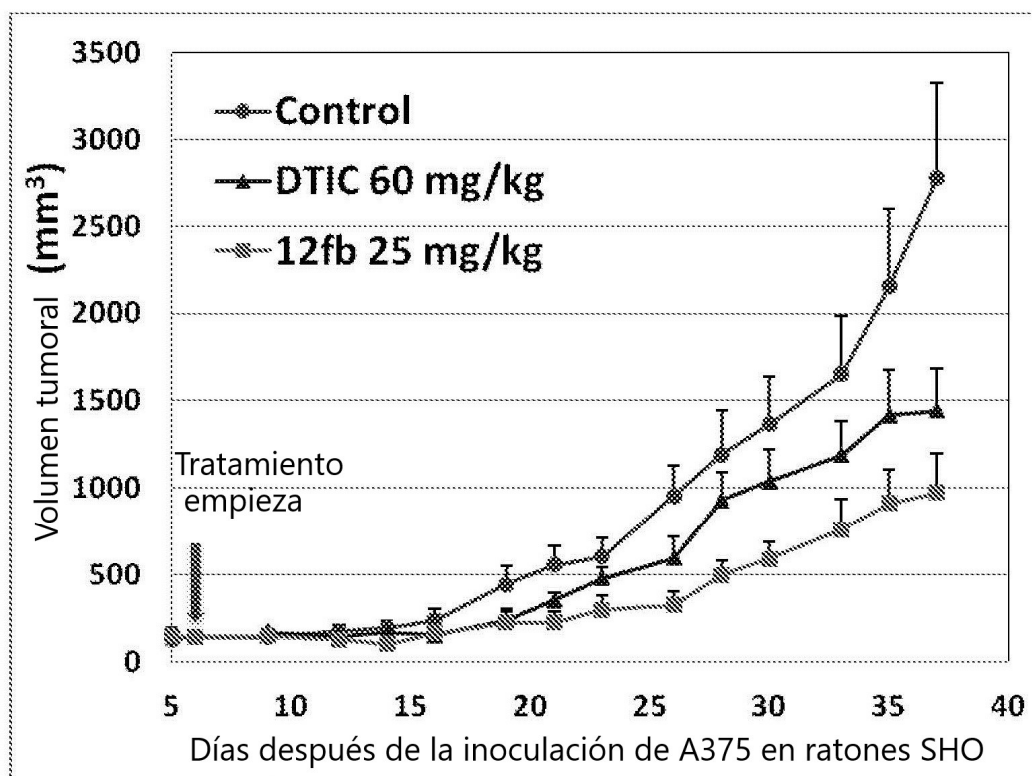


Figura 24

C

**Figura 24 continuación**

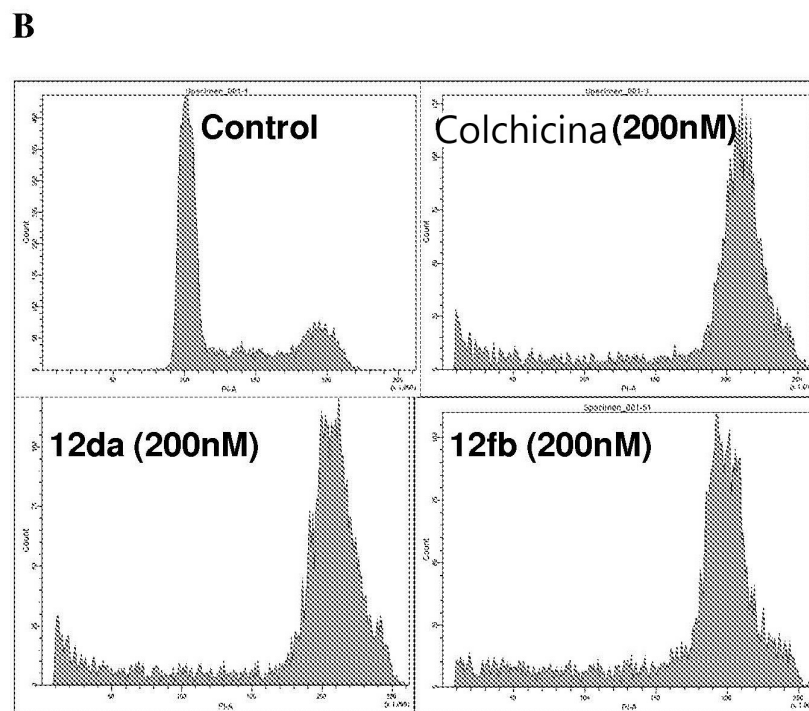
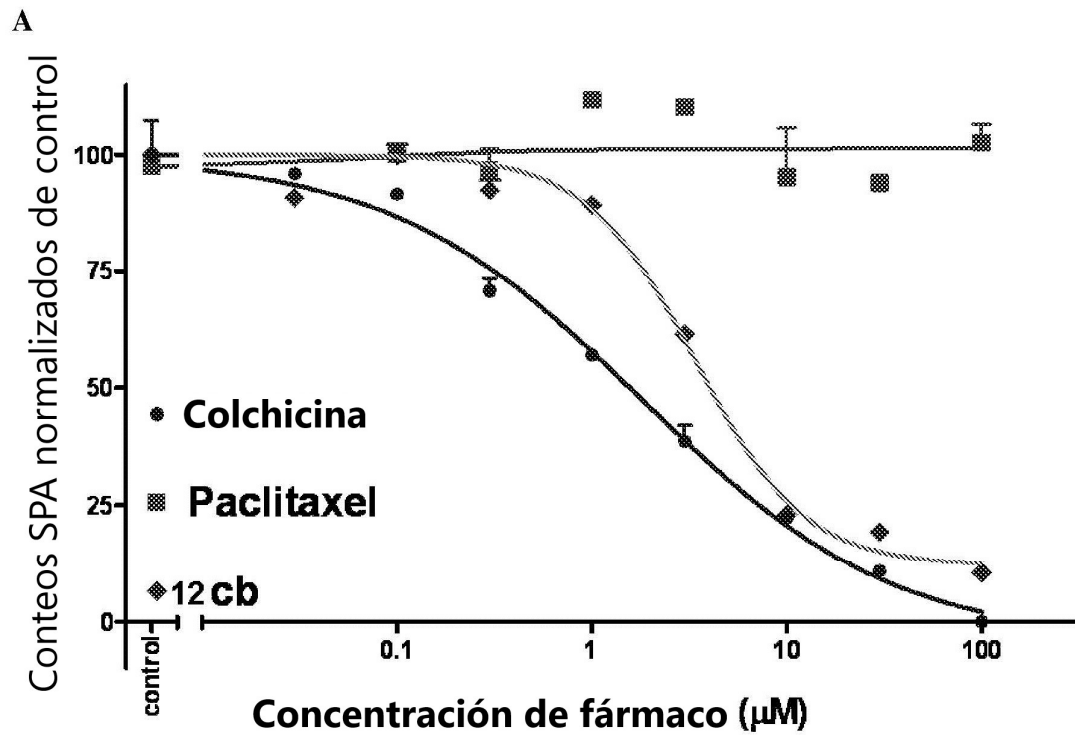


Figura 25

C

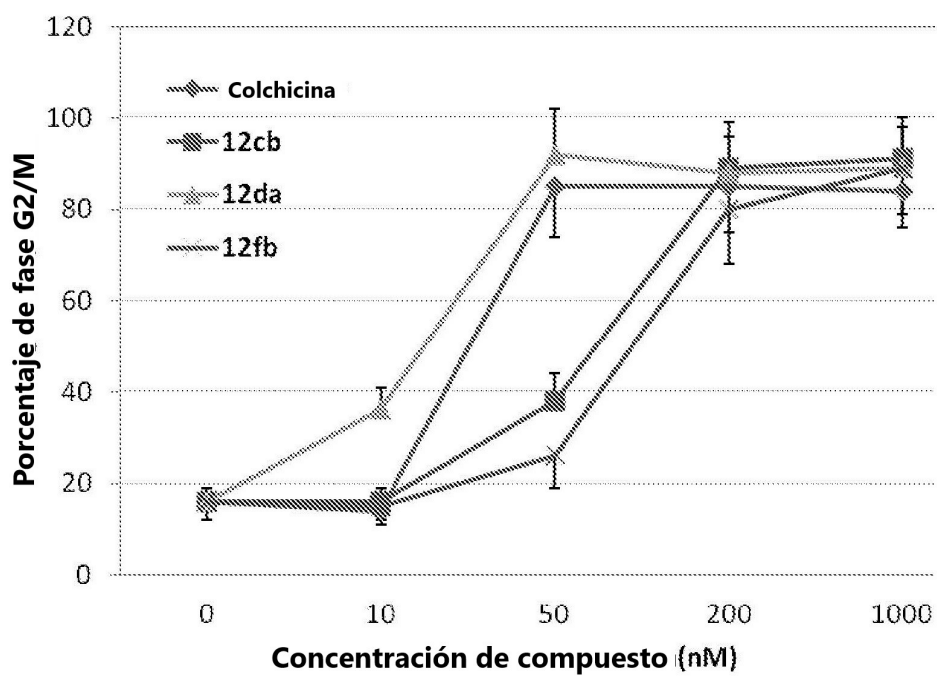
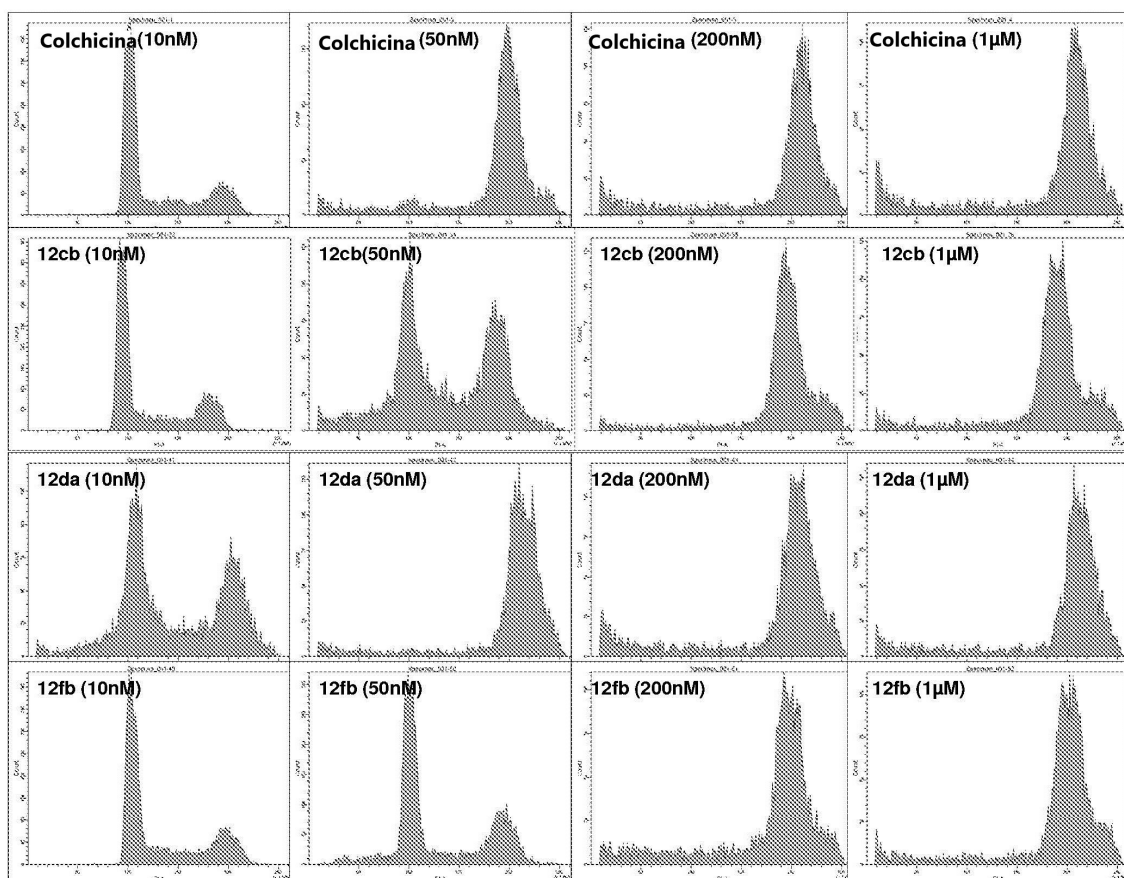
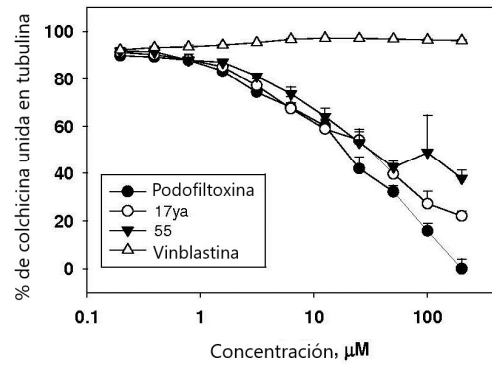


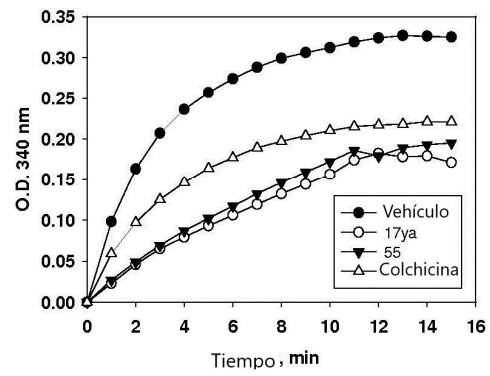
Figura 25 continuación

D**Figura 25 continuación**

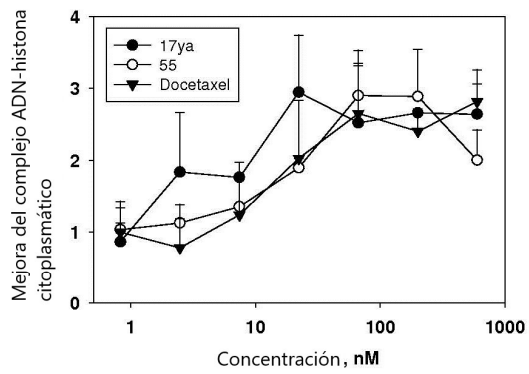
A



B



C



D

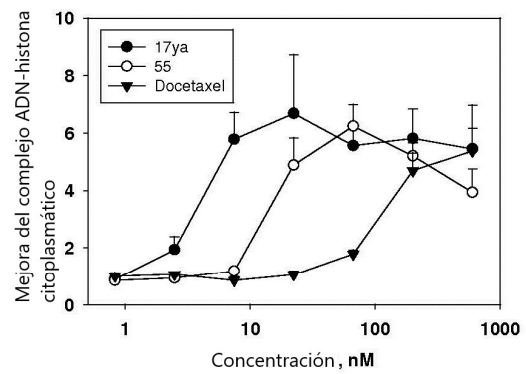
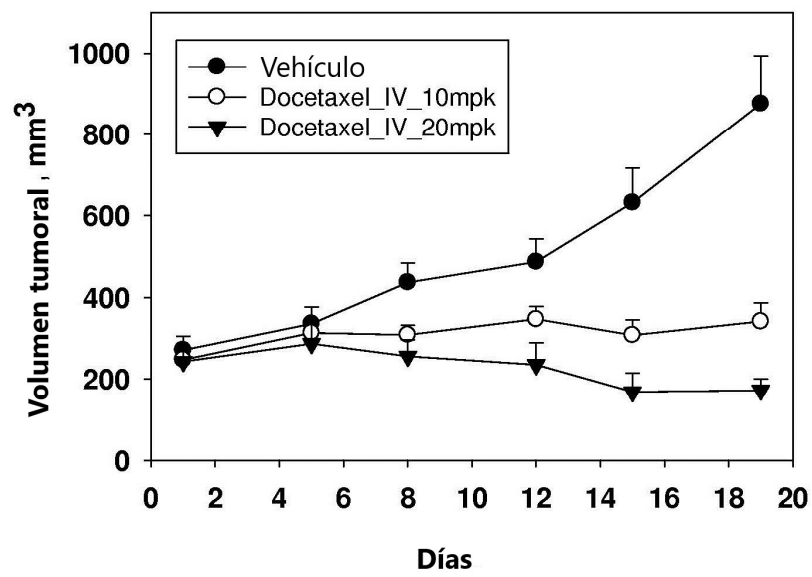


Figura 26

A



B

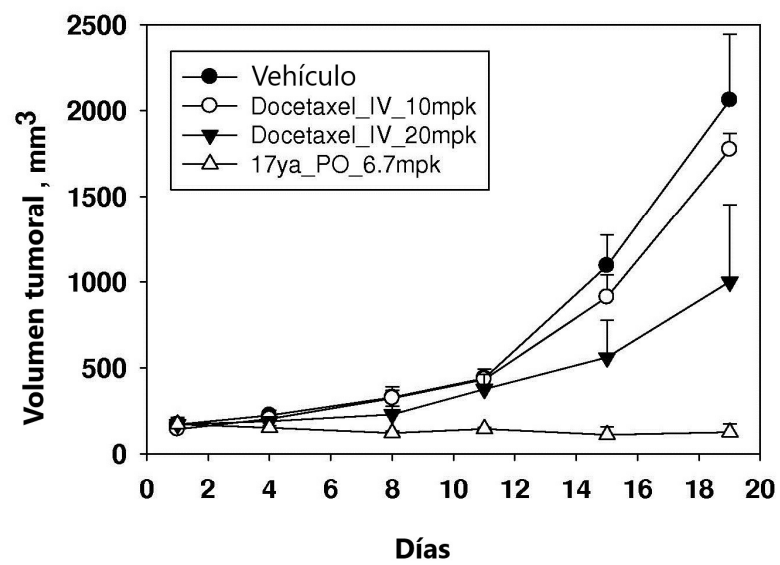
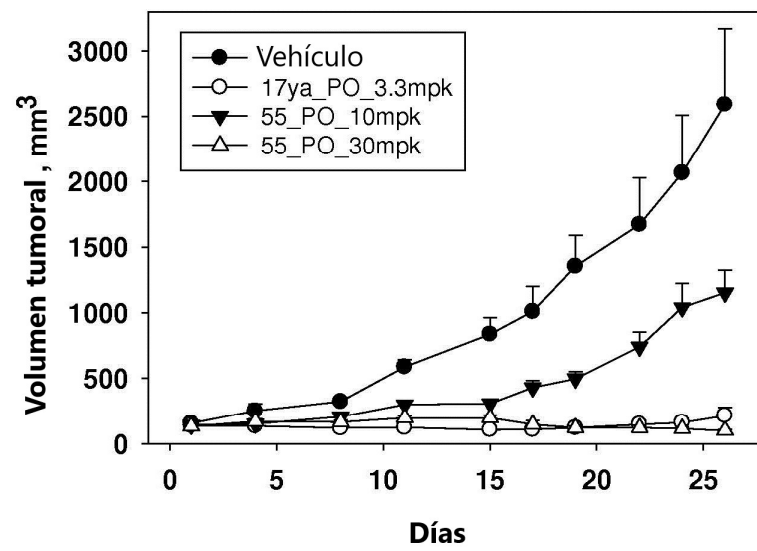


Figura 27

C



D

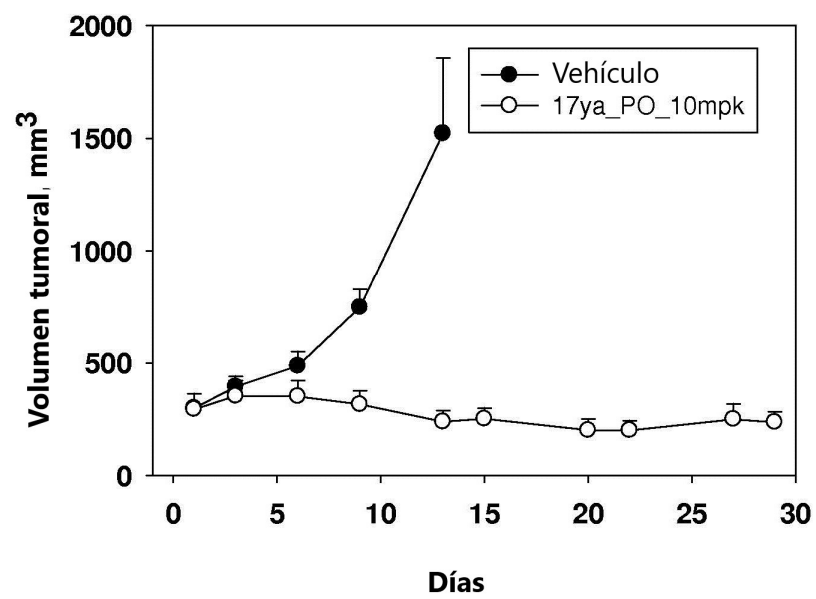
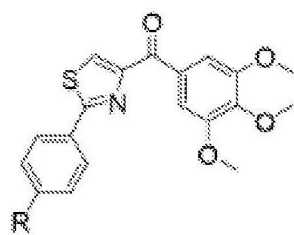


Figura 27 continuación

A



R = -H, 1h

R = -F, 2k

R = -OH, 2l

B

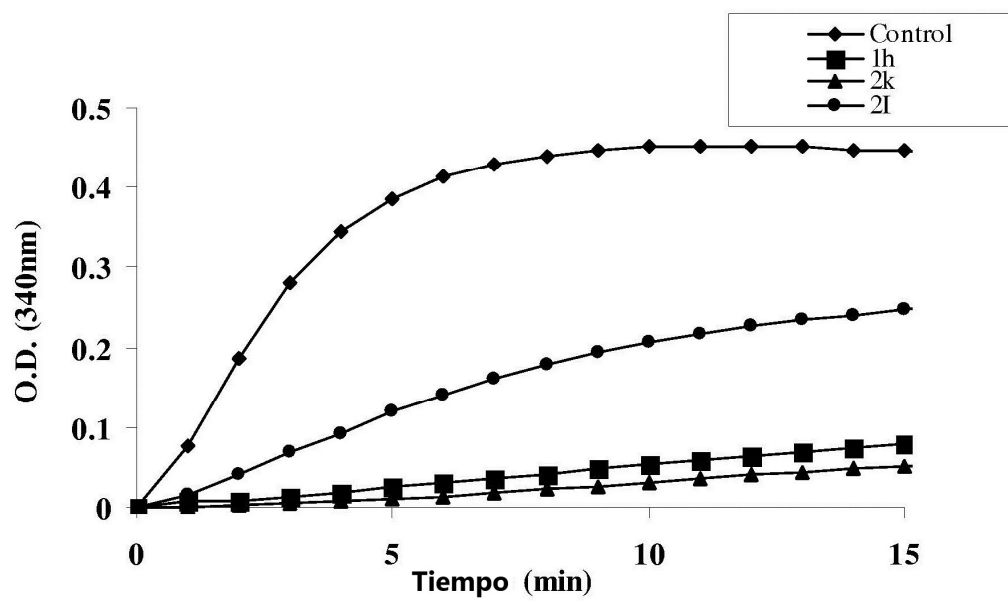


Figura 28

C

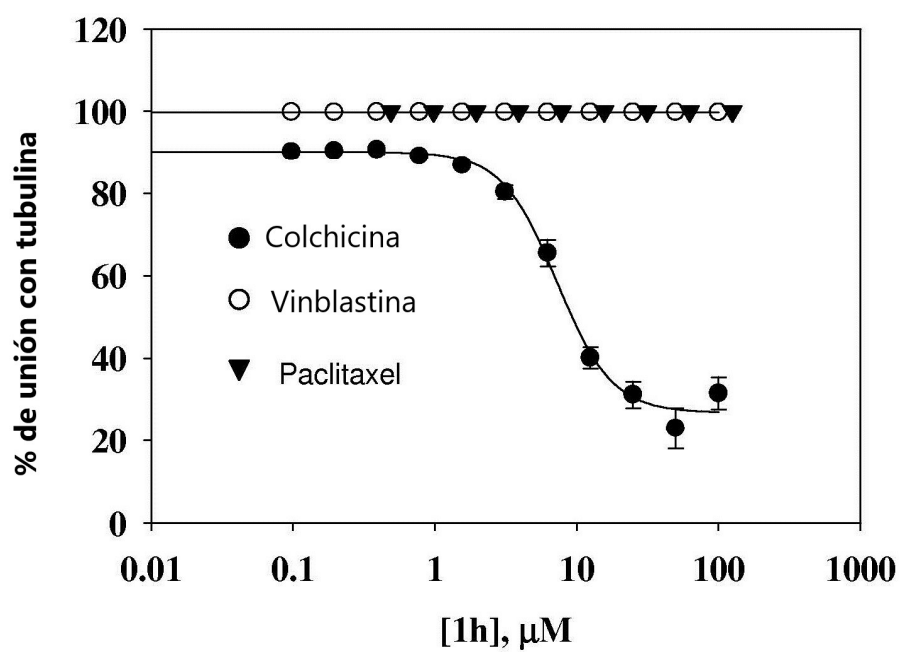
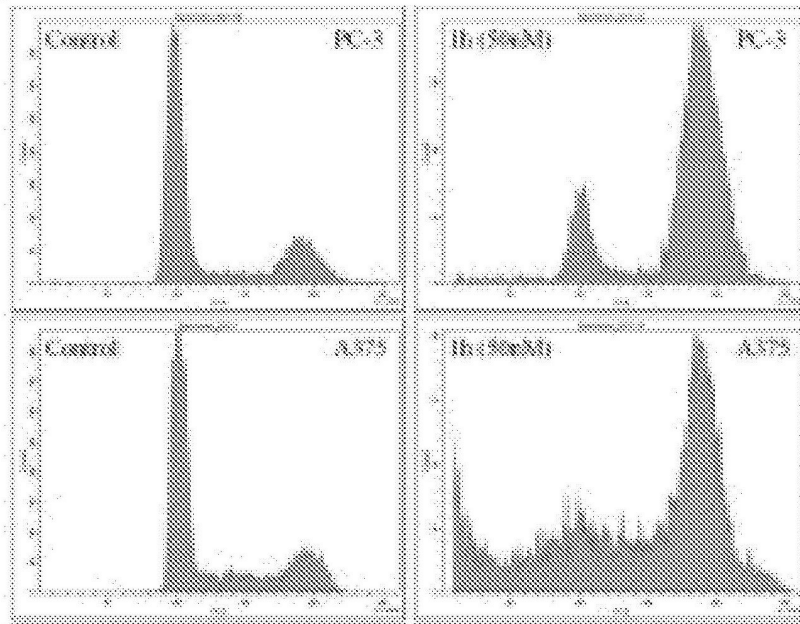


Figura 28 continuación

A



B

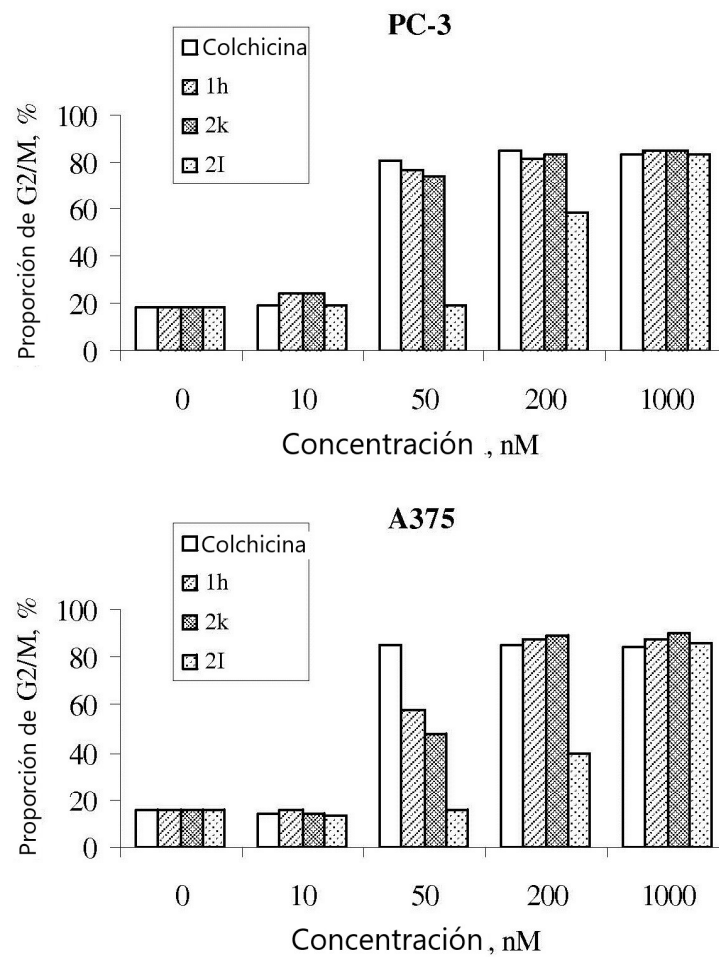


Figura 29

C

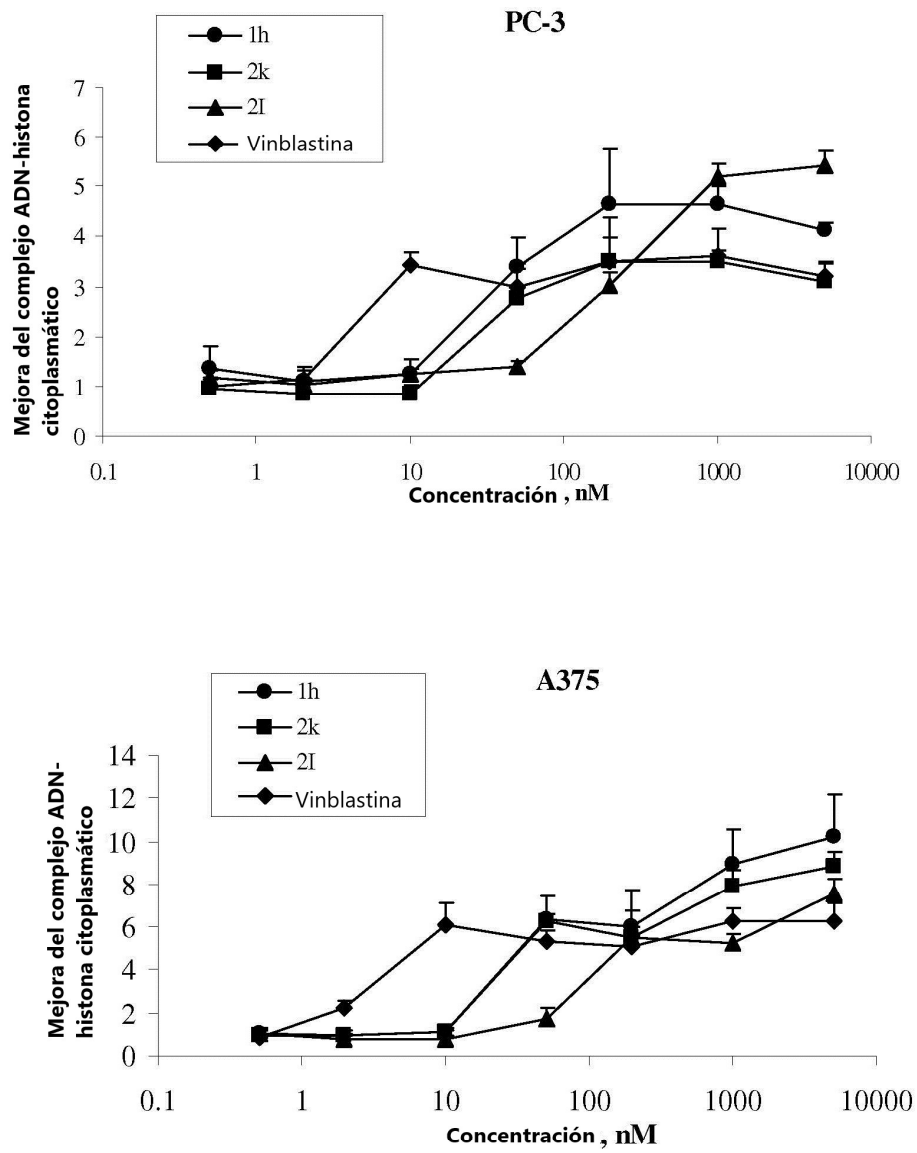
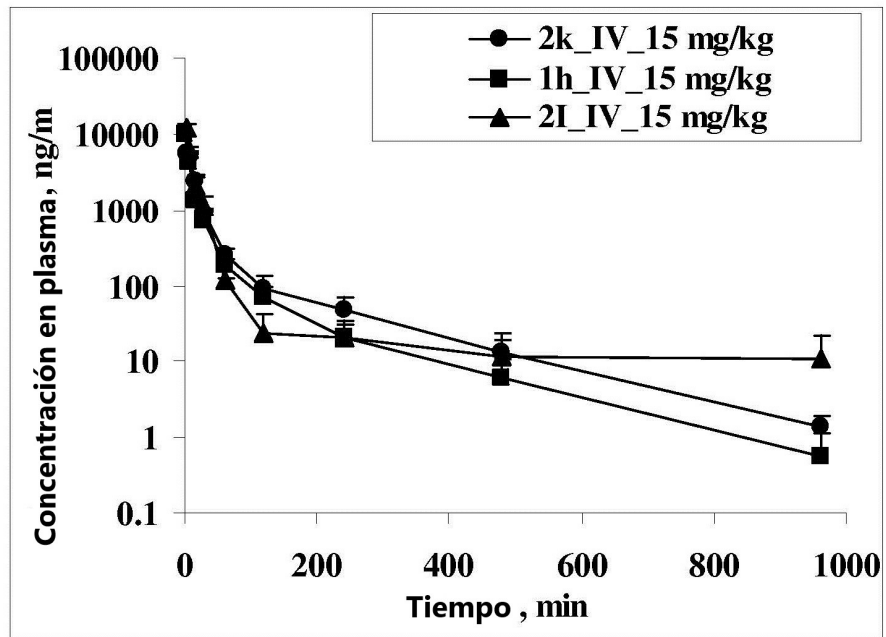


Figura 29 continuación

A



B

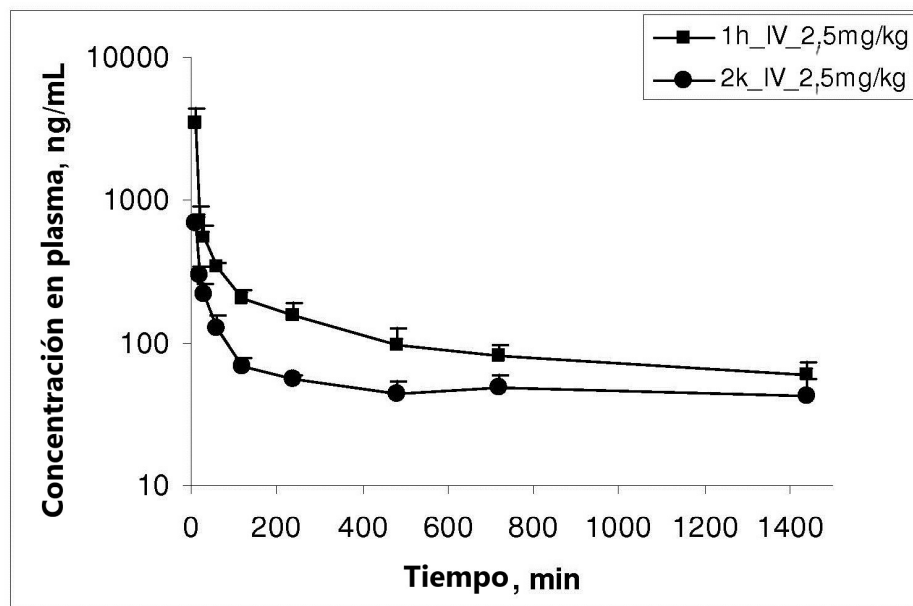
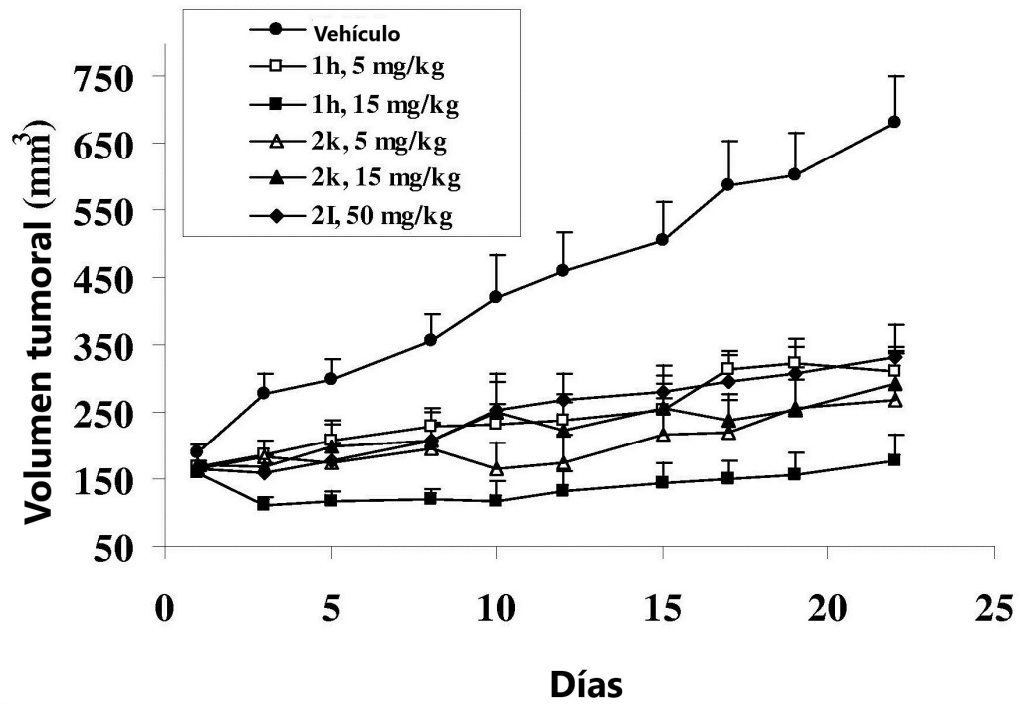


Figura 30

A



B

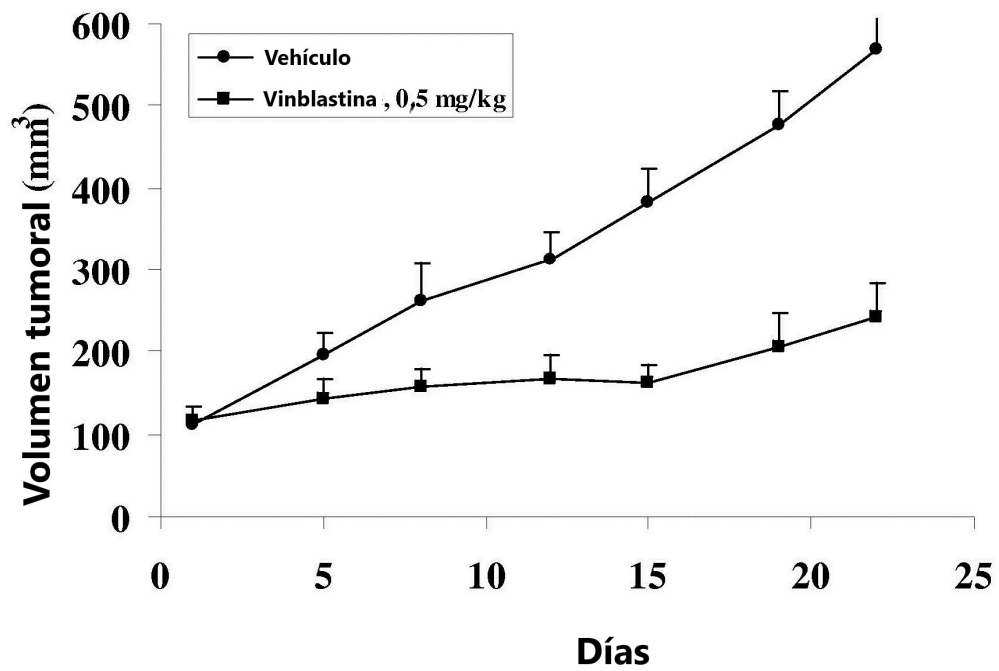
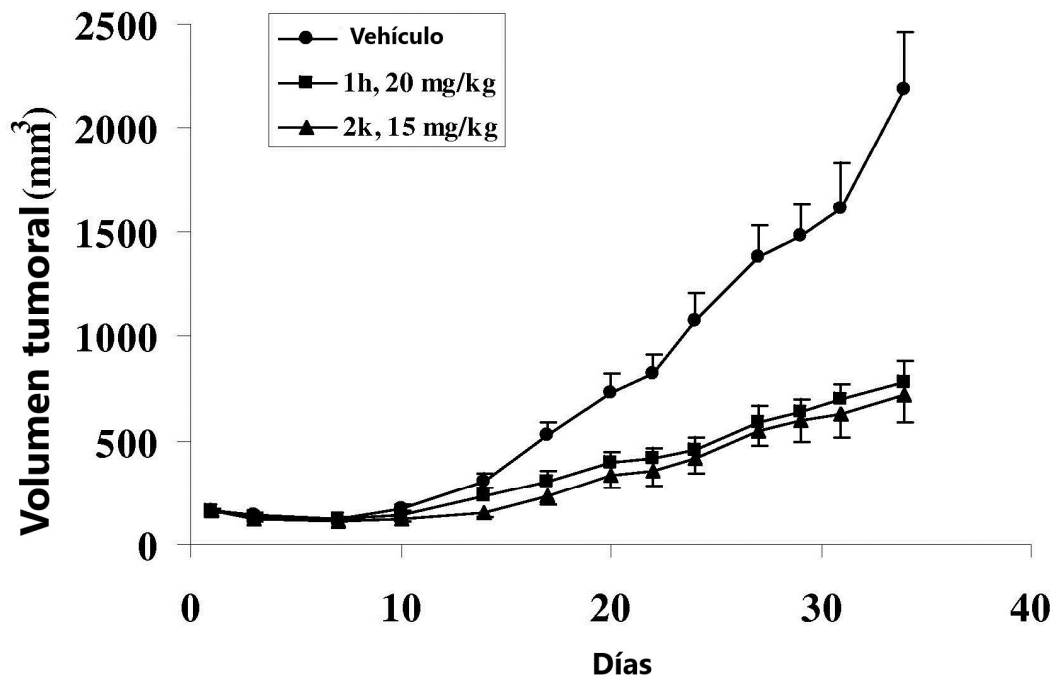


Figura 31

C



D

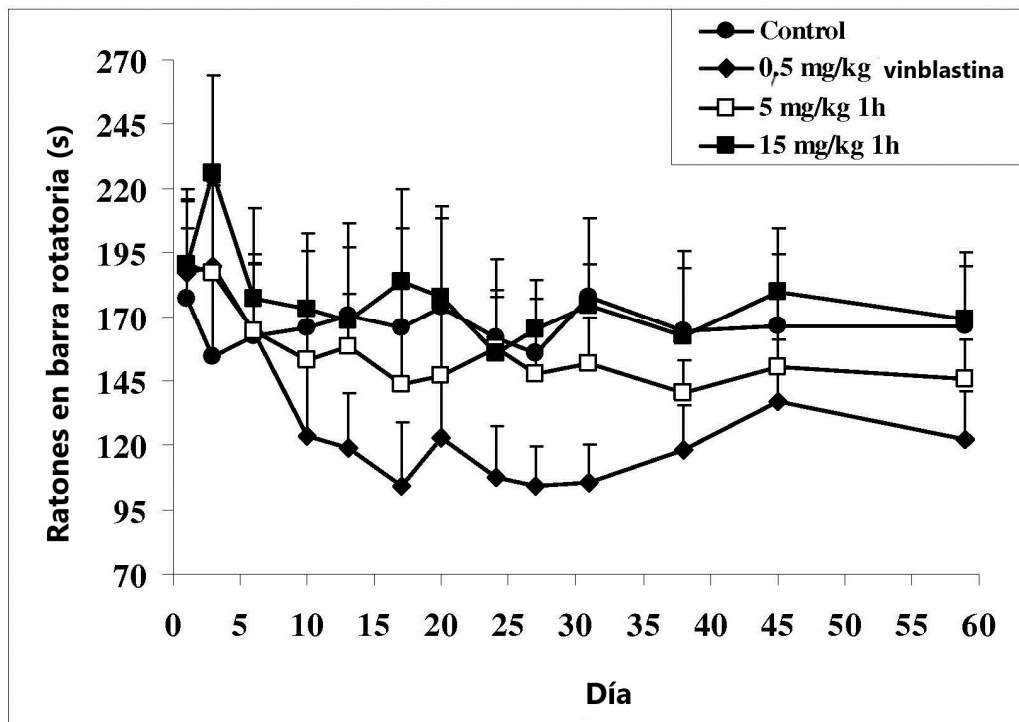


Figura 31 continuación

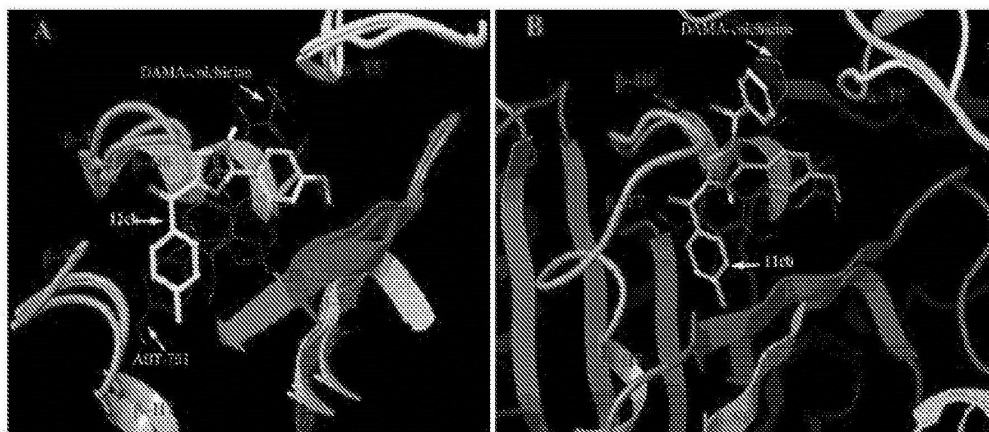


Figura 32

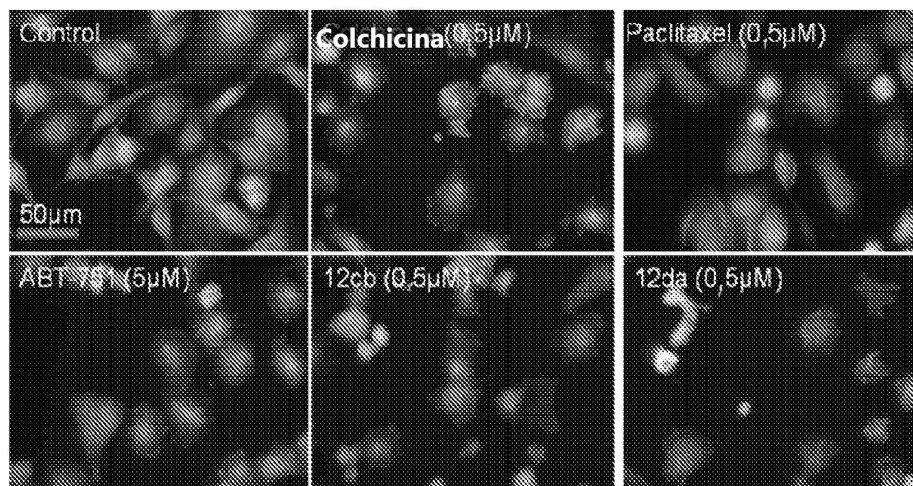


Figura 33

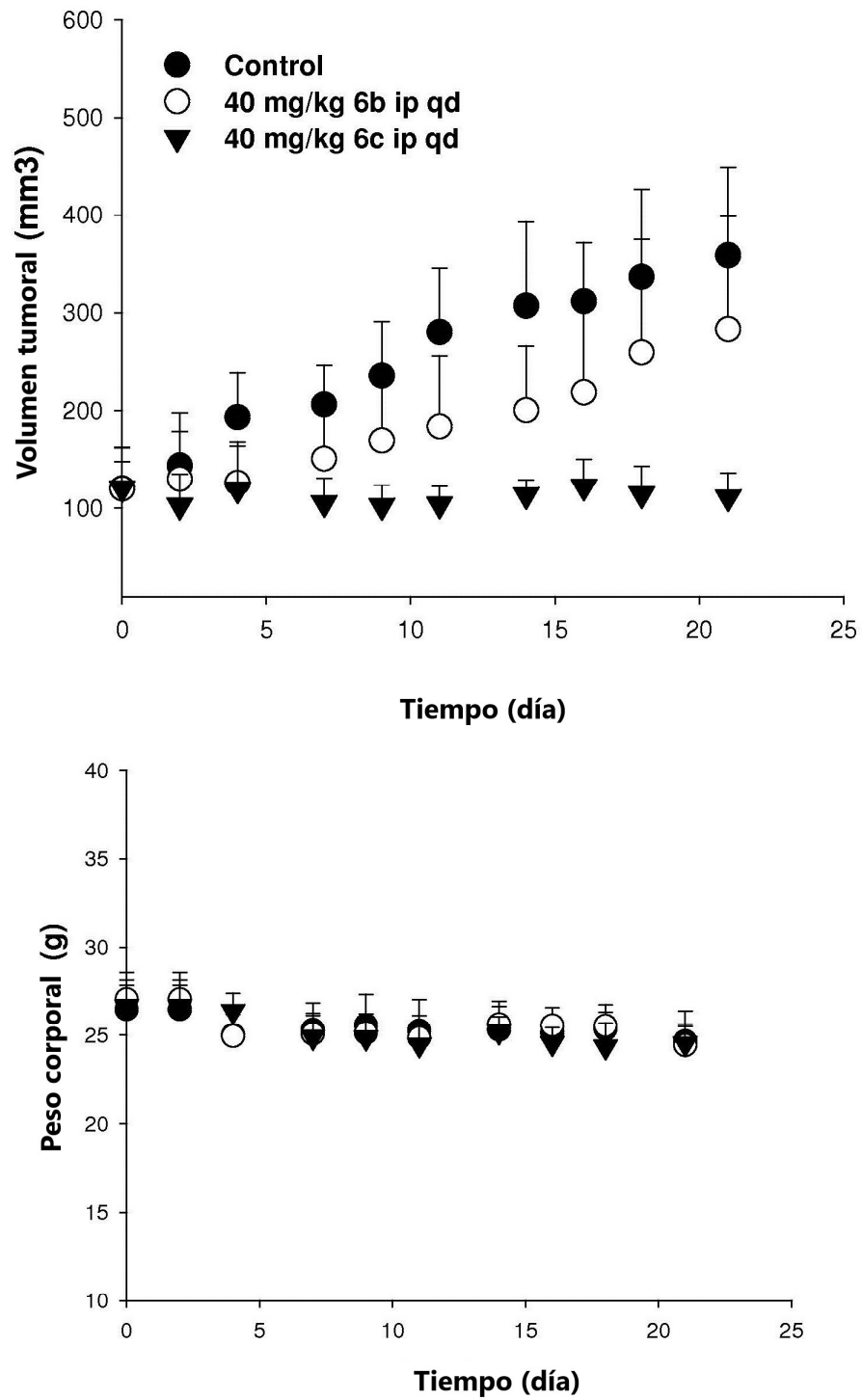


Figura 34A

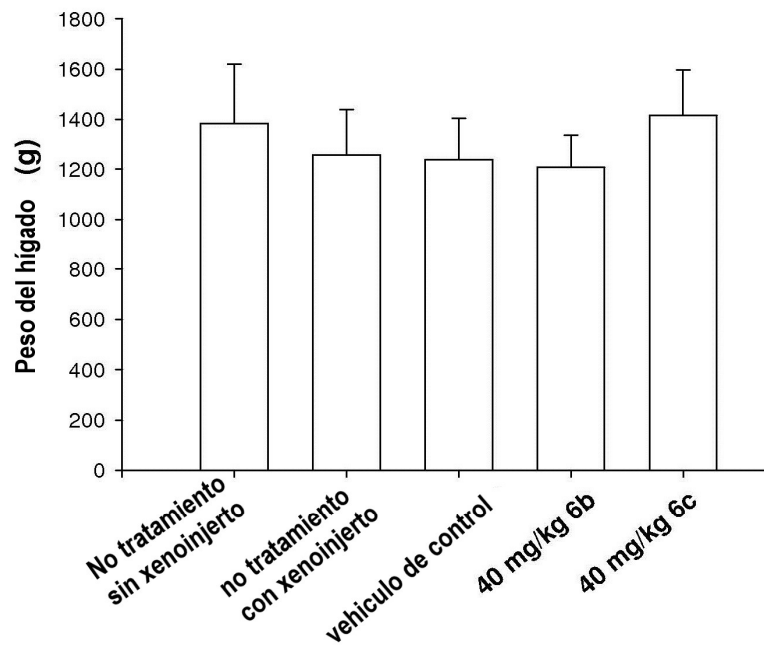


Figura 34B

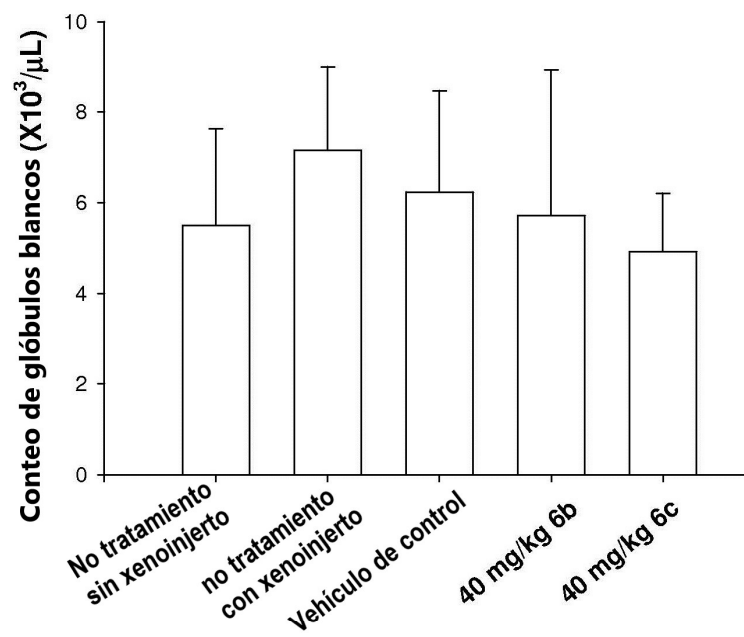
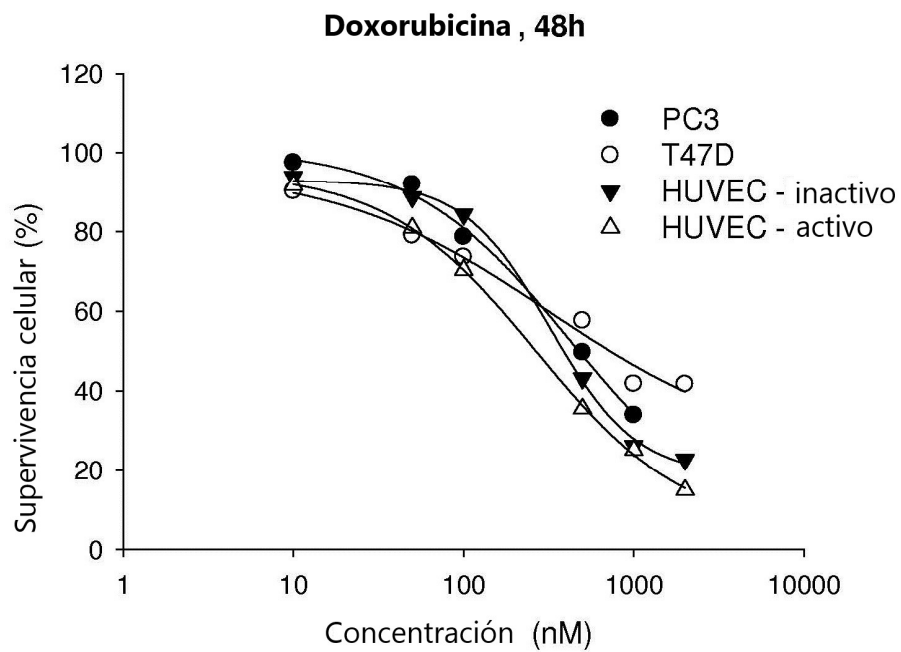


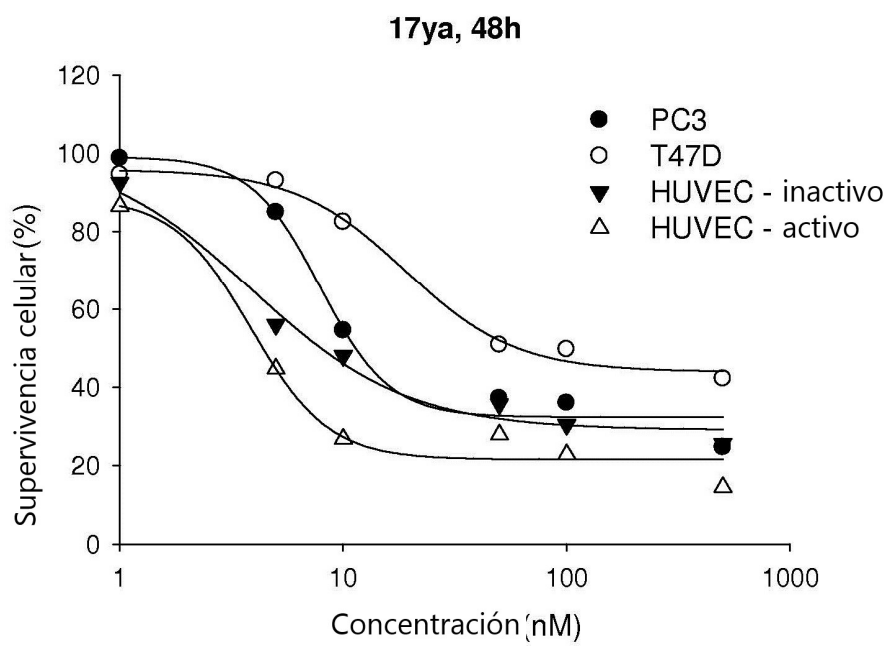
Figura 34C

Figura 34

A



B

**Figura 35**

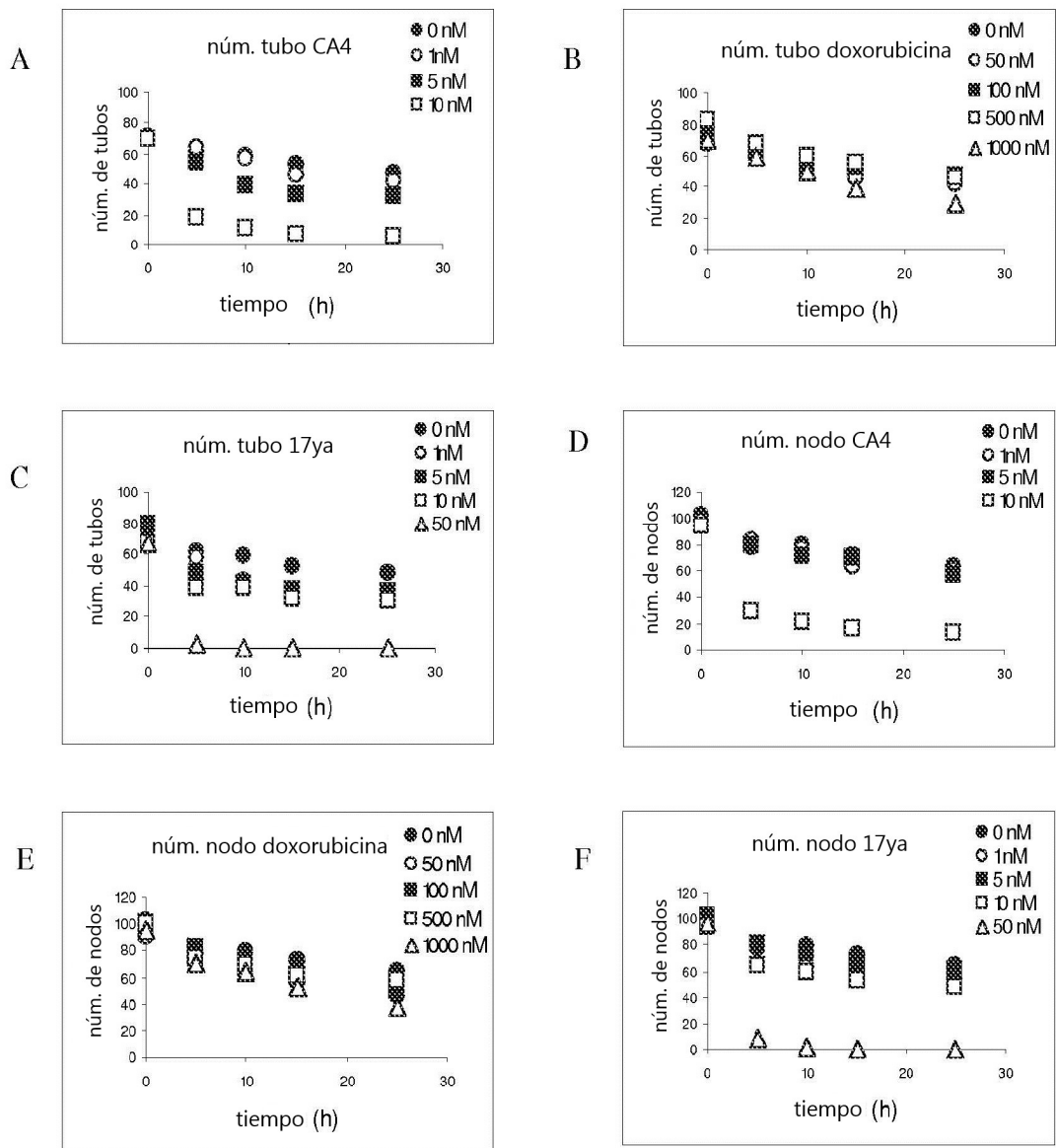


Figura 36

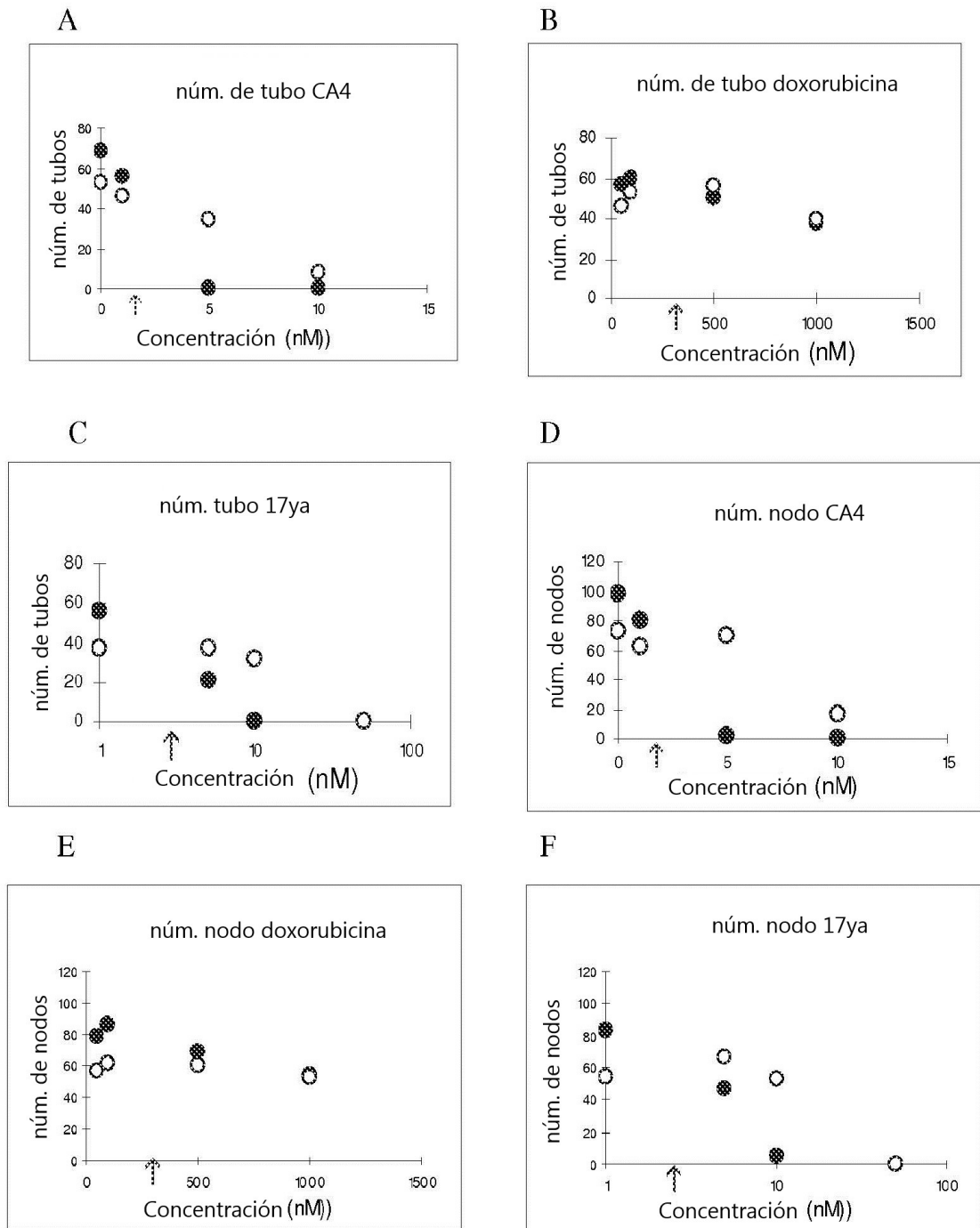
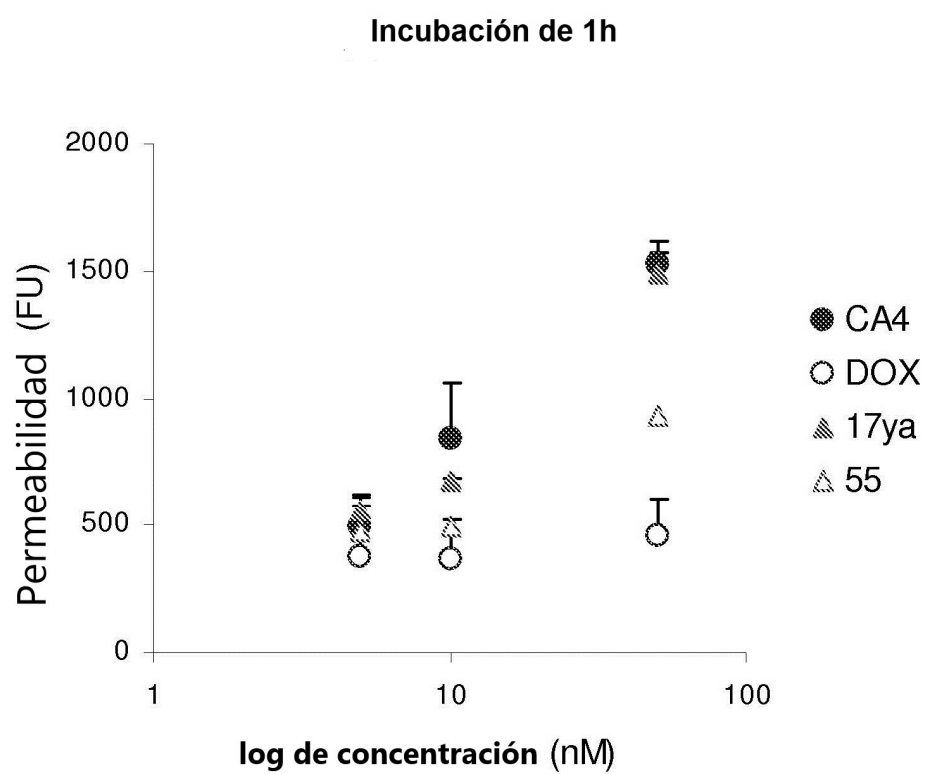


Figura 37

**Figura 38**