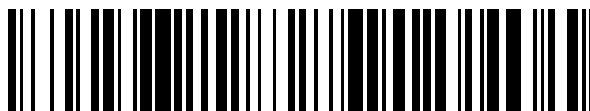


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 101**

51 Int. Cl.:

**C07D 311/76** (2006.01)

**A61K 31/366** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2015 PCT/EP2015/056791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15144911**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2015 E 15712178 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3122735**

54 Título: **3-Fenil-7-hidroxi-isocumarinas como inhibidores del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)**

30 Prioridad:

**28.03.2014 GB 201405644**

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

**16.12.2019**

73 Titular/es:

**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION SCHOLARS, AND THE OTHER MEMBERS OF BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY & UNDIV. TRINITY OF QUEE (100.0%)  
Trinity College Dublín, College Green  
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

**DONNELLY, SEAMAS;  
LLOYD, DAVID;  
O'REILLY, CIARAN y  
FAYNE, DARREN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 735 101 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

3-Fenil-7-hidroxi-isocumarinas como inhibidores del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al desarrollo de inhibidores del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y la utilidad de dichos inhibidores en el tratamiento del cáncer.

### Antecedentes de la invención

10 La citoquina huérfana, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), es un medidor proinflamatorio pleiotrópico, liberado por numerosos tipos de células, incluyendo células endoteliales, eosinófilos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos. MIF ejerce numerosos efectos biológicos y juega un papel clave en los procesos inflamatorios y autoinmunitarios mediante la inducción de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, ciclooxigenasa y la liberación de óxido nítrico por macrófagos. Además, MIF está implicado en la regulación por defecto de la proteína oncogénica p53 y puede contrarrestar la producción de glucocorticoides. En consecuencia, MIF se ha implicado en la patogénesis de numerosas patologías inflamatorias incluyendo septicemia, aterosclerosis, lupus, artritis reumatoide, asma, glomerulonefritis y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Su papel en la biología del cáncer se ha resaltado recientemente. De forma poco usual para una citoquina, MIF contiene un sitio enzimático bien definido, que actúa como una ceto-enol tautomerasa. Se cree que este sitio de la tautomerasa tiene un papel en los numerosos efectos biológicos presentados por MIF.

20 MIF existe como un trímero simétrico que consiste en 3 subunidades repetitivas de 12,5 KDa y 114 restos, cada una con una homología  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ . De forma inusual, además de su papel como citoquina, MIF muestra también dos actividades catalíticas distintas: una ceto-enol tautomerasa y una oxidorreductasa mediada por tiol. El trímero MIF consiste en tres sitios activos de ceto-enol tautomerasa hidrófobos que se dividen cada uno en dos subunidades. El resto de prolina del extremo N de cada subunidad se encuentra dentro del sitio activo y muestra un bajo  $pK_a$  de aproximadamente 5,6-6. El carácter nucleofílico de este resto le permite catalizar la isomerización de numerosos sustratos incluyendo 4-hidroxi fenil piruvato (HPP), ácido fenil pirúvico y D-Dopacromo.

25 MIF se expresa en exceso en numerosos cánceres incluyendo el cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de células escamosas de cuello de útero, cáncer de páncreas, glioblastomas, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y melanoma maligno, cáncer gástrico, glioma, cáncer nasofaríngeo.

30 Como actor clave en varios tipos de cánceres, de forma evidente, el desarrollo de novedosos inhibidores de MIF, que podrían servir potencialmente como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de las patologías anteriormente mencionadas es muy deseable.

En el documento WO2012142498, Gaweco describe compuestos de quinolinona que demuestran la actividad inhibidora de MIF.

35 De forma similar, en el documento US2007270395, Jagadish describe compuestos de quinolinona y compuestos de quinolina que demuestran la actividad inhibidora de MIF. Se dice que dichos compuestos tienen utilidad en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino.

40 Rose et al. (J. Chem. Soc. 1965, 6100) describen la síntesis de 3-hidroxiisocumarinas sustituidas mediante la condensación de ácido y anhídrido homoftálico. Se evaluó la actividad estrogénica de 7-hidroxi-3-p-hidroxifenilisocumarina y 7-hidroxil-3(2,4-dihidroxifenil)-isocumarina, se descubrió que ambos compuestos eran inactivos.

De Angelis et al. (Bio-org. Med. Chem, 2005, 13, 6539) describen la síntesis de compuestos de isocumarina y la evaluación de dichos compuestos en ensayos de unión a estrógeno. Se identificaron algunos ligandos del receptor de estrógenos beta selectivos.

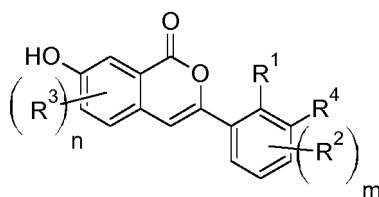
45 Cho et al. (Bio-org. Med. Chem. 1998, 6, 2449) describen la síntesis de derivados de 3-arilisoquinolina y la evaluación de la citotoxicidad de dichos derivados contra las células tumorales de melanoma humano.

### Sumario de la invención

50 En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos que se definen en las reivindicaciones. En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que se definen en las reivindicaciones. En un aspecto más adicional, la presente invención proporciona compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer, como se define en las reivindicaciones.

### Descripción

Se divulga en el presente documento un compuesto que tiene la fórmula



en la que n es 0 a 3; m es 0 a 3;

R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático;

en el que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> pueden estar independientemente no sustituidos o sustituidos con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático; en la que, independientemente, cualquiera de R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> puede estar no sustituido, o sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>;

en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; en la que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> no son simultáneamente hidrógeno;

y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

R<sup>1</sup> puede ser un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; que puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>4</sup> es hidrógeno.

R<sup>4</sup> puede ser un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; que puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>1</sup> es hidrógeno.

R<sup>1</sup> puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; en la que alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>4</sup> es hidrógeno.

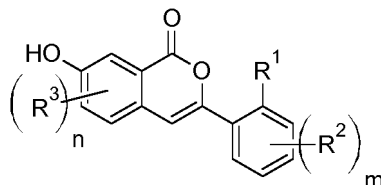
R<sup>4</sup> puede ser alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; en la que alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un

- 5 sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>1</sup> es hidrógeno.
- 10 R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> pueden ser independientemente alquilo C<sub>1-12</sub>; en la que alquilo C<sub>1-12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.
- 15 R<sup>1</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo.
- R<sup>1</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo y R<sup>4</sup> es hidrógeno.
- R<sup>4</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo.
- 20 R<sup>4</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo y R<sup>1</sup> es hidrógeno.
- R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> se pueden seleccionar independientemente entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo.
- R<sup>3</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo.
- 25 R<sup>3</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo; R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-12</sub>; en la que alquilo C<sub>1-12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>4</sup> es hidrógeno.
- 30
- 35 R<sup>3</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo; R<sup>4</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un alquilo C<sub>1-12</sub>; en la que alquilo C<sub>1-12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>1</sup> es hidrógeno.
- 40
- 45 R<sup>3</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo; y R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> se pueden seleccionar independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-12</sub>; en la que alquilo C<sub>1-12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.
- 50
- R<sup>3</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo; R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo; y R<sup>4</sup> es hidrógeno.
- 55 R<sup>3</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo; R<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo; y R<sup>1</sup> es

hidrógeno.

R<sup>3</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en hidrógeno o hidroxilo; R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo.

- 5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos que tienen la fórmula:



en la que n es 0 a 3; m es 0 a 3;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático;

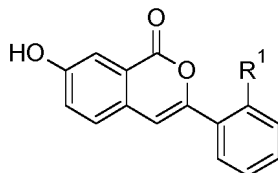
- 10 en el que R<sup>1</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

- 15 R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

- 20 R<sup>3</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático; en la que, independientemente, cualquiera de R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> puede estar no sustituido, o sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

La presente divulgación proporciona un compuesto que tiene la fórmula:

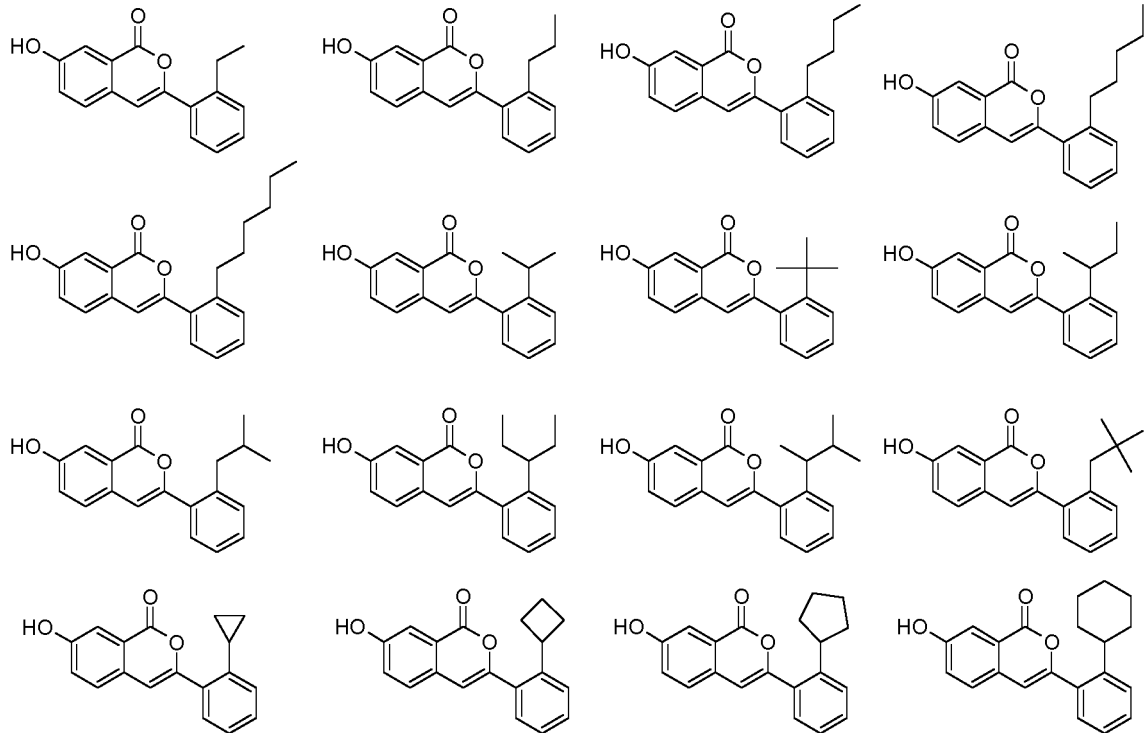


- 35 en la que, R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-12</sub>; en la que alquilo C<sub>1-12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

- 45 R<sup>1</sup> puede ser alquilo C<sub>1-12</sub>; que puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un flúor, cloro, bromo, yodo

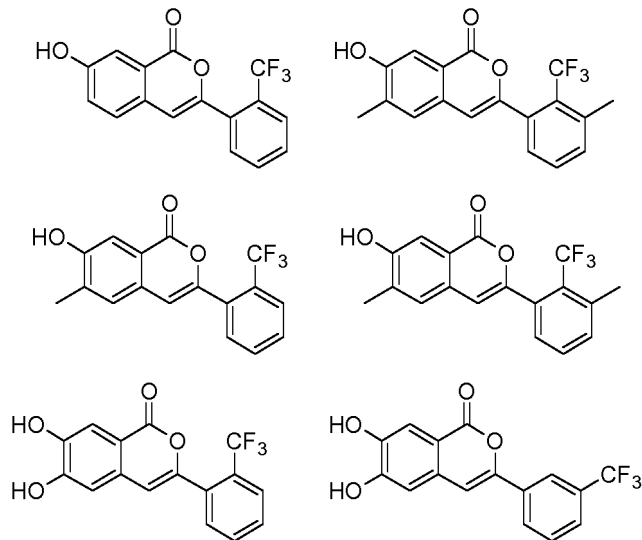
De forma adecuada, R<sup>1</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, -CFH<sub>2</sub>, -CF<sub>2</sub>H, -CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>.

De forma adecuada, los compuestos divulgados en el presente documento se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en:



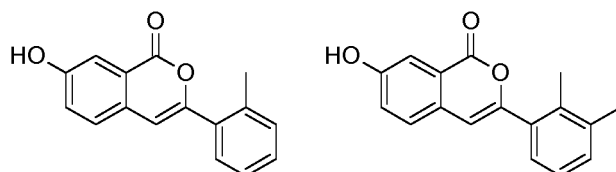
5 y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

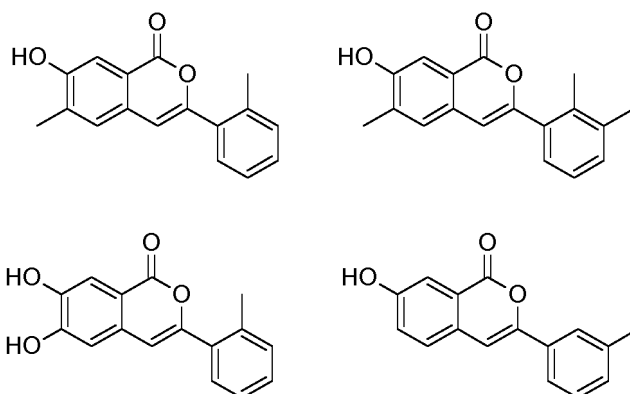
De forma adecuada, el compuesto se puede seleccionar entre el grupo que consiste en:



10 y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

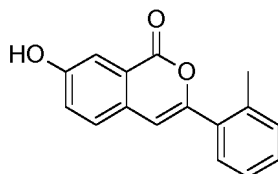
Como alternativa, el compuesto se puede seleccionar entre el grupo que consiste en:





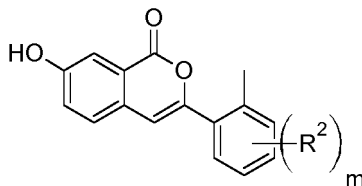
y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

En una realización preferida el compuesto de la invención tiene la fórmula:



5 y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona compuestos que tienen la fórmula



en la que m es 0 a 3;

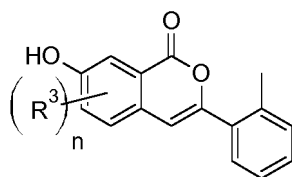
10 cualquier R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; en el que R<sup>2</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en el que cualquier R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

o una sal farmacéuticamente aceptable o un hidrato del mismo.

20 R<sup>2</sup> puede seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en un halógeno, un grupo amino, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>2</sup> puede estar no sustituido o sustituido con un halógeno, por ejemplo flúor.

25 Por ejemplo, R<sup>2</sup> puede ser un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en flúor, cloro, bromo y yodo. R<sup>2</sup> puede ser un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en flúor, cloro, bromo y yodo. Por ejemplo R<sub>2</sub> puede ser un grupo CF<sub>3</sub>, un grupo CH<sub>2</sub>F, un grupo CHF<sub>2</sub> o un grupo CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>. R<sup>2</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, isopropilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. R<sup>2</sup> puede ser un grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido con un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en flúor, cloro, bromo y yodo. R<sup>2</sup> puede ser un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo propiloxi, un grupo butiloxi, un grupo pentiloxi o un grupo hexiloxi.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene la fórmula



n es 0 a 3;

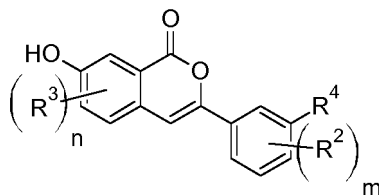
en la que cualquier  $R^3$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de  $C_1-C_{12}$ ;

- 5 en el que cualquiera de cualquiera de  $R^3$  puede estar no sustituido, o sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo  $C_1-C_6$ , un alcoxi  $C_1-C_6$ , un éter  $C_1-C_6$ , un tioéter  $C_1-C_6$ , un éster  $C_1-C_6$ , una cetona  $C_1-C_6$ , una cetimina  $C_1-C_6$ , una sulfona  $C_1-C_6$ , un sulfóxido  $C_1-C_6$ , una amida  $C_1-C_6$  primaria, una amida  $C_1-C_6$  secundaria, un haloalquilo  $C_1-C_6$ , un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso,  $-C(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ ,  $-OC(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ ,  $-OC(O)NR'R'$ ,  $-N(R')C(O)NR'R'$ ,  $-N(R')C(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ , oxo, cicloalquilo  $C_3-C_6$ , heterociclilo  $C_3-C_6$ , heteroarilo  $C_2-C_5$  y arilo  $C_6-C_{10}$ ; en la que  $R'$  se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo  $C_1-C_6$ ;
- 10 y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

- 15 Cualquiera de  $R^3$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino y alquilo  $C_1-C_6$ ; y  $R^3$  puede estar no sustituido o sustituido con un halógeno, por ejemplo flúor.

$R^3$  puede ser un hidroxilo,  $R^1$  es alquilo  $C_1-C_{12}$  y  $R^4$  es hidrógeno.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos que tienen la fórmula



- 20 en la que n es 0 a 3; m es 0 a 3;

$R^2$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de  $C_1-C_{12}$ ,  $C_3-C_{10}$  cicloalifático, heterociclo  $C_2-C_{10}$  alifático,  $C_6-C_{20}$  aromático y  $C_2-C_{20}$  heteroaromático, alcoxi  $C_1-C_{12}$ ;

- 25  $R^3$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de  $C_1-C_{12}$ ,  $C_3-C_{10}$  cicloalifático, heterociclo  $C_2-C_{10}$  alifático,  $C_6-C_{20}$  aromático y  $C_2-C_{20}$  heteroaromático; en la que, independientemente, cualquiera de  $R^2$  o  $R^3$  puede estar no sustituido, o sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo  $C_1-C_6$ , un alcoxi  $C_1-C_6$ , un éter  $C_1-C_6$ , un tioéter  $C_1-C_6$ , un éster  $C_1-C_6$ , una cetona  $C_1-C_6$ , una cetimina  $C_1-C_6$ , una sulfona  $C_1-C_6$ , un sulfóxido  $C_1-C_6$ , una amida  $C_1-C_6$  primaria, una amida  $C_1-C_6$  secundaria, un haloalquilo  $C_1-C_6$ , un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso,  $-C(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ ,  $-OC(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ ,  $-OC(O)NR'R'$ ,  $-N(R')C(O)NR'R'$ ,  $-N(R')C(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ , oxo, cicloalquilo  $C_3-C_6$ , heterociclilo  $C_3-C_6$ , heteroarilo  $C_2-C_5$  y arilo  $C_6-C_{10}$ ; en la que  $R'$  se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo  $C_1-C_6$ ;
- 30

- 35  $R^4$  se selecciona entre el grupo que consiste en un alifático de  $C_1-C_{12}$ ,  $C_3-C_{10}$  cicloalifático, heterociclo  $C_2-C_{10}$  alifático,  $C_6-C_{20}$  aromático y  $C_2-C_{20}$  heteroaromático; en el que  $R^4$  puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo  $C_1-C_6$ , un alcoxi  $C_1-C_6$ , un éter  $C_1-C_6$ , un tioéter  $C_1-C_6$ , un éster  $C_1-C_6$ , una cetona  $C_1-C_6$ , una cetimina  $C_1-C_6$ , una sulfona  $C_1-C_6$ , un sulfóxido  $C_1-C_6$ , una amida  $C_1-C_6$  primaria, una amida  $C_1-C_6$  secundaria, un haloalquilo  $C_1-C_6$ , un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso,  $-C(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ ,  $-OC(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ ,  $-OC(O)NR'R'$ ,  $-N(R')C(O)NR'R'$ ,  $-N(R')C(O)O$ -alquilo  $C_1-C_6$ , oxo, cicloalquilo  $C_3-C_6$ , heterociclilo  $C_3-C_6$ , heteroarilo  $C_2-C_5$  y arilo  $C_6-C_{10}$ ; en la que cada  $R'$  se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo  $C_1-C_6$ ;
- 40

- 45 y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de las mismas.

$R^3$  puede ser hidroxilo.

$R^3$  puede ser un hidroxilo,  $R^4$  puede ser alquilo  $C_1-C_{12}$  y  $R^1$  puede ser hidrógeno.



R<sup>3</sup> puede ser un hidroxilo en la posición 6 del anillo de isocumarina.

n puede ser 0, 1, 2 o 3.

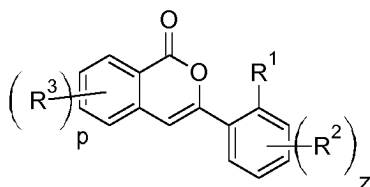
n puede ser 0. n puede ser 1 o 2 o 3.

m puede ser 0, 1, 2 o 3.

5 m puede ser 0. m puede ser 1 o 2 o 3.

n y m pueden ser 0.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene la fórmula



en la que p es 0 a 4; z es 0 a 4;

10 R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático;

15 en el que R<sup>1</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

20 R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

25 R<sup>3</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático; en el que independientemente, cualquiera de R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

35 para su uso en el tratamiento de cáncer.

p puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. z puede ser 0, 1, 2, 3 o 4.

p puede ser 0. p puede ser 1, 2, 3 o 4.

40 p puede ser 0 y R<sup>1</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-12</sub>; en la que alquilo C<sub>1-12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en el que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

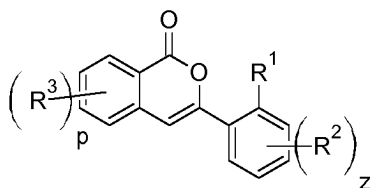
45 p puede ser 0 y R<sup>1</sup> se puede seleccionar entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo.

p puede ser 0 y R<sup>1</sup> puede ser metilo.

MIF se expresa en exceso en numerosos cánceres incluyendo el cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de células escamosas de cuello de útero, cáncer de páncreas, glioblastomas, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y melanoma maligno, cáncer gástrico, glioma, cáncer nasofaríngeo.

5 De forma adecuada, los compuestos de la invención pueden utilizarse en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste: cáncer broncopulmonar, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de células escamosas de cuello de útero, cáncer de páncreas, glioblastomas, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y melanoma maligno, cáncer gástrico, glioma, cáncer nasofaríngeo.

10 En un aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos que tienen la fórmula:



en la que p es 0 a 4; z es 0 a 4;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático;

15 en el que R<sup>1</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en el que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

20 R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

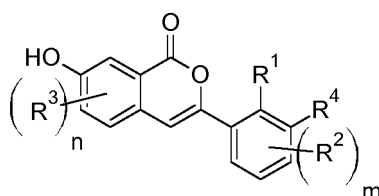
25 R<sup>3</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático; en el que independientemente, cualquiera de R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en el que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

30 en el que p es 0, R<sup>1</sup> no es hidrógeno;

35 para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en: cáncer broncopulmonar, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de células escamosas de cuello de útero, cáncer de páncreas, glioblastomas, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y melanoma maligno, cáncer gástrico, glioma, cáncer nasofaríngeo.

De forma adecuada, los compuestos de la invención se utilizan en el tratamiento del cáncer de pulmón.

45 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



en la que n es 0 a 3; m es 0 a 3;

R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático;

5 en el que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> pueden estar independientemente no sustituidos o sustituidos con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

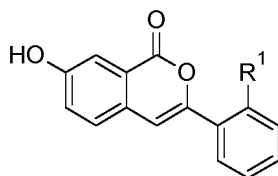
15 R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

20 R<sup>3</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalifático, heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alifático, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aromático y C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> heteroaromático; en la que, independientemente, cualquiera de R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> puede estar no sustituido, o sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

25 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> no son simultáneamente hidrógeno;

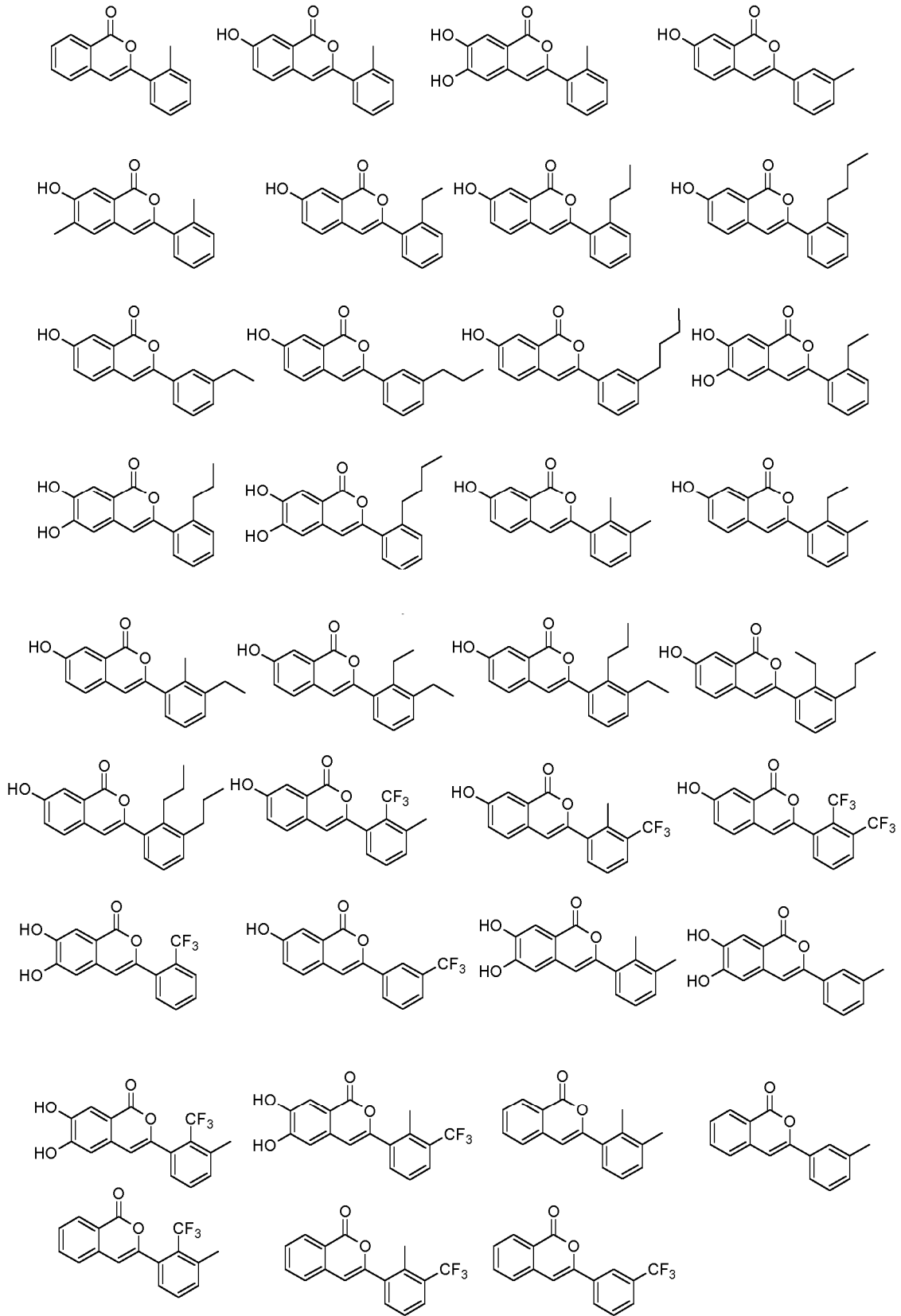
y las sales farmacéuticamente aceptables e hidratos de los mismos; para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón.

30 De forma adecuada, la presente invención proporciona compuestos que tienen la fórmula:



35 en la que, R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-<sub>12</sub>; en la que alquilo C<sub>1</sub>-<sub>12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón.

40 En otro aspecto más adicional, la presente divulgación proporciona compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en:



para su uso en el tratamiento de cáncer.

- 5 El cáncer se puede seleccionar entre el grupo que consiste en: cáncer broncopulmonar, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de células escamosas de cuello de útero, cáncer de páncreas, glioblastomas, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer

colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y melanoma maligno, cáncer gástrico, glioma, cáncer nasofaríngeo.

De forma adecuada, el compuesto de la invención se usa en el tratamiento del cáncer de pulmón.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con un elevada expresión y/o actividad de MIF, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación.

### **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** muestra la inhibición de la actividad enzimática de la tautomerasa de MIF con 25 inhibidores potenciales de MIF y un inhibidor de MIF conocido, iso-1. Se calculó la inhibición como la reducción de la tasa de cambio de la reacción de la tautomerasa con la adición del inhibidor promediada durante cinco minutos.

La **Figura 2** muestra que la inhibición de LPS indujo la producción de TNF- $\alpha$  con 25 inhibidores potenciales de MIF y un inhibidor de MIF conocido, iso-1. (A) Células RAW macrófagas se sembraron en placas a  $1 \times 10^5$  por pocillo y se pretrataron con los inhibidores a  $100 \mu\text{M}$  durante 30 minutos antes de la estimulación con  $100 \text{ ng/ml}$  de LPS. Tras 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron para determinar los niveles de TNF- $\alpha$  usando un kit ELISA de TNF- $\alpha$ . (B) Las células Raw se pretrataron con  $50 \mu\text{M}$  de cada inhibidor 30 minutos antes de la estimulación con LPS y los sobrenadantes se evaluaron tras 16 horas para el nivel de TNF- $\alpha$ . (C) Las células RAW se pretrataron con  $10 \mu\text{M}$  de inhibidores de la tautomerasa 30 minutos antes de la estimulación con LPS. Los datos se presentan como media y SEM (n=6).

La **Figura 3** muestra la inhibición de la actividad enzimática de la tautomerasa de MIF de 5 compuestos seleccionados a partir de los 25 inhibidores potenciales de MIF seleccionados. La inhibición observada con  $100 \text{ ng/ml}$  de MIF con su sustrato L-dopacromo incubado con cada uno de los inhibidores a  $100 \mu\text{M}$  se midió con un espectrofotómetro durante 20 minutos.

La **Figura 4** muestra la inhibición de MIF inducida por PGE-2. Las células RAW macrófagas se sembraron en placas a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  por pocillo y se pretrataron con ISO-1 y TI 19, y a continuación se trataron con  $100 \text{ ng/ml}$  de LPS durante la noche a  $37^\circ\text{C}$  en una estufa incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5%. Las células RAW se trataron con  $100 \mu\text{M}$  de inhibidores como se ha indicado. Los sobrenadantes se evaluaron usando el kit ELISA PGE-2. ( $p < 0,05$ ,  $p > 0,01$ , Los datos se presentan como media y SEM (n=6)).

La **Figura 5** muestra que la inhibición de la actividad enzimática de MIF reduce la proliferación celular.  $100 \text{ ng/ml}$  de rMIF promueve significativamente la proliferación de LLC en comparación con las células LLC sin tratar. La proliferación se inhibe significativamente en presencia de  $100 \mu\text{M}$  de TI 19, pero menos que en presencia de ISO-1. (\*\* $p < 0,001$ , Los datos se presentan como media + SEM, n=6)

La **Figura 6** muestra que el volumen tumoral de células de Lewis pulmonares es significativamente menor en ratones MIF-KO y MIF-P1G en comparación con los silvestres. Se inyectaron células de Lewis de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 WT, ratones P1G y MIF KO. Las mediciones de calibre se tomaron dos veces semanalmente y el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) se calculó como  $0,5 \times L \times W^2$  (n=4).

La **Figura 7** muestra la apariencia gruesa de tumores subcutáneos en el día 24 del modelo. La Figura 7A muestra un tumor en un ratón no tratado, La Figura 7b es un control y muestra un tumor en el que el ratón se trató con DMSO al 5% y la Figura 7C muestra un tumor en el que el ratón se trató con TI 19.

La **Figura 8** muestra que la inhibición de la actividad de la tautomerasa de MIF atenúa el crecimiento tumoral. Se inyectaron células de Lewis de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6. Se inyectaron los animales por vía intraperitoneal 30 min antes de la inoculación del tumor y dos veces a la semana posteriormente, con  $35 \text{ mg/kg}$  de TI (inhibidor de la tautomerasa solubilizado en DMSO) o como se ha indicado. Se tomaron mediciones con el calibre dos veces a la semana y se calculó el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) como  $0,5 \times L \times W^2$ . (\*\* $p < 0,01$ , n=4).

La **Figura 9** muestra que la inhibición de la actividad de la tautomerasa de MIF atenúa el crecimiento tumoral. Se inyectaron células de Lewis de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6. Una vez que el tumor ha llegado a ser palpable en el flanco del ratón (7-8 días después de la inoculación), se inyectaron los animales por vía intraperitoneal y dos veces a la semana posteriormente, con  $35 \text{ mg/kg}$  de TI (inhibidor de la tautomerasa solubilizado en DMSO) o como se ha indicado. Se tomaron mediciones con el calibre dos veces a la semana y se calculó el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) como  $0,5 \times L \times W^2$ . (\*\* $p < 0,01$ , n=4).

La **Figura 10** muestra el efecto inhibitor de los análogos de TI 19 sobre la actividad enzimática de la tautomerasa de MIF. Se calculó la inhibición como la reducción de la tasa de cambio de la reacción de la tautomerasa con la adición del inhibidor promediada durante cinco minutos.

La **Figura 11** muestra que el efecto inhibitor de los análogos de TI 19 sobre LPS indujo la producción de TNF- $\alpha$ . (A) Células RAW macrófagas se sembraron en placas a  $1 \times 10^5$  por pocillo y se pretrataron con los inhibidores a  $100 \mu\text{M}$  durante 30 minutos antes de la estimulación con  $100 \text{ ng/ml}$  de LPS. Tras 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron para los niveles de TNF- $\alpha$  usando un kit ELISA de TNF- $\alpha$ .

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento que determinados compuestos divulgados en el presente documento tienen la capacidad de modular la actividad de MIF.

Antes de la descripción adicional, se recopilan aquí determinados términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Estas definiciones deben leerse a la luz del resto de la divulgación y entenderse por una persona experta en la materia. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia.

La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de lo siguiente: disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, con la condición de que sean compatibles con la administración farmacéutica. El uso de transportadores y excipientes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido por los expertos en la materia. Además, las composiciones pueden comprender además otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas suplementarias, adicionales, o potenciadas.

La expresión "composición farmacéutica" como se usa en el presente documento se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto como se divulga en el presente documento formulado junto con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos contemplados en el presente documento pueden administrarse a un mamífero, tal como un ser humano, pero pueden también administrarse a otros mamíferos tales como un animal, por ejemplo, animales domésticos, animales de granja y animales de laboratorio, en necesidad de tratamiento veterinario. El mamífero tratado en los métodos contemplados en el presente documento es, de forma adecuada un mamífero con cáncer.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto en cuestión que estimulará la respuesta biológica o médica deseada en un tejido, sistema o animal (por ejemplo, mamífero o ser humano). Los compuestos contemplados en el presente documento se administran al "sujeto", "individuo" o "paciente", (que puede ser un mamífero como se ha descrito anteriormente), en cantidades terapéuticamente eficaces para tratar una enfermedad o trastorno. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto es la cantidad requerida para conseguir un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado.

La expresión "sal o sales farmacéuticamente aceptables" como se usa en esta memoria descriptiva se refiere a las sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en los compuestos utilizados en las composiciones. Los compuestos básicos que se contemplan en el presente documento son capaces de formar una plétora de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos básicos son aquellas que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, incluyendo, aunque no de forma limitativa, cualquiera de los siguientes: cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, fosfato, fosfato de ácido, malato, oxalato, nicotinato, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, sacarato, formiato, benzoato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, glutamato, y pamoato (es decir, sales de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)).

Los compuestos ácidos contemplados en el presente documento son capaces de formar una plétora de sales farmacéuticamente aceptables con diversas sustancias básicas. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos y, particularmente, sales de calcio, magnesio, sodio, litio, cinc, potasio y hierro. Los compuestos que comprenden un resto básico o ácido pueden formar también sales farmacéuticamente aceptables con aminoácidos. Los compuestos de la divulgación pueden contener grupos ácidos y básicos; por ejemplo, un grupo amino y un grupo de ácido carboxílico. En ese caso, el compuesto puede existir como una sal de adición de ácido, un ion híbrido, o una sal básica.

El término "estereoisómeros", cuando se usa en el presente documento, consiste en todos los enantiómeros o diastereómeros. Estos compuestos pueden designarse por los símbolos "(+)", "(-)", "R" o "S", dependiendo de la configuración de los sustituyentes alrededor del átomo de carbono estereogénico en cuestión. La persona normalmente experta en la materia reconocerá que una estructura puede denotar implícitamente un centro quiral.

Los compuestos divulgados en el presente documento pueden existir en formas solvatadas así como en formas no solvatadas, por ejemplo, como hidratos o con otros disolventes farmacéuticamente aceptables tales como etanol, y similares. Los compuestos divulgados en el presente documento abarcan las formas solvatadas y no solvatadas. El compuesto de la invención puede ser amorfo. El compuesto de la invención puede existir como un único polimorfo o como una mezcla de polimorfos. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención está en forma cristalina.

La divulgación abarca también los compuestos marcados isotópicamente de la divulgación, en el que dichos compuestos marcados isotópicamente son idénticos a los compuestos de la invención excepto que uno o más átomo están sustituidos por una variante isotópica. Los isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$  y  $^{36}\text{Cl}$ , respectivamente. Por ejemplo, un compuesto de la divulgación puede tener uno o más átomos de hidrógeno sustituidos con deuterio.

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que se transforman *in vivo*

para dar como resultado un compuesto divulgado o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto. El profármaco puede transformarse *in vivo* mediante varios mecanismos, por ejemplo, mediante la acción de las enzimas esterasa, amidasa o fosfatasa, o mediante metabolismo oxidativo y o reductivo. Dicha transformación que libera el fármaco a partir del profármaco podría producirse en diversas localizaciones, por ejemplo, en la luz intestinal o tras el tránsito del intestino, sangre o hígado. La transformación puede ser también, o de forma alternativa mediante, una hidrólisis química o un ataque enzimático. Los profármacos son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, si un compuesto de la divulgación o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto contiene un grupo de ácido carboxílico, un profármaco puede comprender un éster formado por la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo ácido con un grupo tal como alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alcanoiloximetilo (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), 1-(alcanoiloxi)etilo que tiene de 4 a 9 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcanoiloxi)-etilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono, alcoxicarboniloximetilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, 1-(alcoxicarboniloxi) etilo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcoxicarboniloxi)etilo que tiene de 5 a 8 átomos de carbono, N-(alcoxicarbonil)aminometilo que tiene de 3 a 9 átomos de carbono, 1-(N-(alcoxicarbonil)amino)etilo que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, 3-ftalidilo, 4-crotonolactonilo, gamma-butirolacton-4-ilo, di- N,N-alquilamino (C<sub>1-2</sub>)alquilo (C<sub>2-3</sub>) (tal como β-dimetilaminoetilo), carbamoil-alquilo (C<sub>1-2</sub>), N,N-dialquilcarbamoilo (C<sub>1-2</sub>)-alquilo (C<sub>1-2</sub>)y piperidino-, pirrolidino- o morfolinoalquilo (C<sub>2-3</sub>).

De forma similar, si un compuesto divulgado en el presente documento contiene un grupo funcional alcohol, un profármaco puede formarse mediante la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo alcohol con un grupo tal como alcanoiloximetilo (C<sub>1-6</sub>), 1-(alcanoiloxi)(C<sub>1-6</sub>)etilo, 1-metil-1-(alcanoiloxi) (C<sub>1-6</sub>)etilo, alcoxi (C<sub>1-6</sub>)carboniloximetilo, N-alcoxi (C<sub>1-6</sub>)carbonilaminometilo, succinoilo, alcanóilo (C<sub>1-6</sub>), α-aminoalcanóilo (C<sub>1-4</sub>), arilalcoilo y α-aminoalcoilo, o α-aminoacil-α-aminoacilo, donde cada grupo α-aminoacilo se selecciona independientemente entre los L-aminoácidos que se producen naturalmente, -P(O)(OH)<sub>2</sub>, -P(O)(O alquilo(C<sub>1-6</sub>))<sub>2</sub> o glicosilo (el radical resultante procedente de la eliminación de un grupo hidroxilo de la forma hemiacetal de un carbohidrato).

Si un compuesto divulgado en el presente documento incorpora un grupo funcional amina, se puede formar un profármaco, por ejemplo, mediante la creación de una amida o un carbamato, un derivado de N-aciloxialquilo, un derivado de (oxodioxolenil)metilo, una base de N-Mannich, imina o enamina.

## **INHIBIDORES DE MIF**

### **Estudios de acoplamiento**

Para identificar inhibidores potenciales de MIF, se llevó a cabo un cribado informático de una biblioteca virtual de compuestos, en el que los compuestos se acoplaron al sitio activo de la tautomerasa de MIF.

La estructura cristalina de MIF cristalizado simultáneamente con el sustrato p-hidroxifenilpiruvato (HPP) se descargó del Banco de datos de proteínas (PDB código 1CA7). La proteína se preparó usando el protocolo automático de preparación de proteínas con el programa informático Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group).

Debido a su velocidad y precisión, se seleccionó el programa de acoplamiento Fast Rigid Exhaustive Docking (FRED) para llevar a cabo una campaña de cribado virtual. FRED (OpenEye Scientific Software) es un programa de acoplamiento de proteína-ligando, que tiene una biblioteca/base de datos de multiconfórmers y un archivo receptor como moléculas de entrada y salidas de la base de datos de entrada con más probabilidad de unirse al receptor.

Chemgauss es una función de puntuación desarrollada por OpenEye, que utiliza funciones gaussianas para describir la fórmula y la química de las moléculas. La estrategia de acoplamiento FRED es puntuar exhaustivamente todas las posibles posiciones de cada ligando en el sitio activo. La búsqueda exhaustiva se basa en rotaciones y traslaciones rígidas de cada confórmer. Esta novedosa estrategia evita completamente los problemas de muestreo asociados con los métodos estocásticos usados por muchos otros programas de acoplamiento.

A fin de validar el modelo de los inventores, se evaluó la capacidad de FRED para reproducir la conformación bioactiva de numerosos ligandos. 50, 100 y 500 confórmers del ligando HPP así como el inhibidor ISO-1 de MIF prototípico se generaron usando OMEGA (OpenEye) y se acoplaron en el sitio MIF activo. Una evaluación de las diversas funciones de puntuación proporcionadas por FRED mostró que la función de puntuación Chemgauss3 fue de forma consistente la más precisa y clasificó la conformación bioactiva fuera del conjunto de datos de conformación clasificados. Por lo tanto, Chemgauss3 se convirtió en la función de puntuación preferida a lo largo del resto de la campaña de cribado virtual.

A continuación se llevó a cabo una validación adicional del modelo usando un pajar virtual seguido por el análisis de una curva característica de funcionamiento del receptor (curva ROC). Un conjunto de datos consistente es 40 inhibidores de MIF activos conocidos descargados de BindingDB ([www.BindingBD.org](http://www.BindingBD.org)) se combinaron con un conjunto que contenía 960 'presuntos' compuestos inactivos obtenidos de la base de datos Maybridge hit finder. Se generaron 50, 100 y 500 confórmers de este conjunto de datos utilizando OMEGA para observar si el número de confórmers tenía un efecto sobre la tasa de enriquecimiento.

A continuación se acopló el pajar virtual utilizando la función de puntuación Chemgauss3 de FRED. A continuación

se generaron las curvas características de funcionamiento del receptor (ROC) para establecer la capacidad del modelo de distinguir entre los compuestos activos y los compuestos inactivos o señuelos. En este caso, la ABC (el área bajo la curva) era de 0,87 (el valor máximo es de 1,0, por tanto 0,87 se considera una curva ROC muy buena sugiriendo que el modelo tiene una precisión capaz de distinguir entre compuestos activos e inactivos) para el conjunto de datos de 50 confórmeros (no se observaron diferencias en este número para los 100 y 500 confórmeros).

Se descargó un conjunto de datos de un proveedor consistente de aproximadamente 205000 moléculas de www.SPECS.net. El conjunto se limpió y preparó utilizando el protocolo de preparar ligandos en Pipeline Pilot. El conjunto de datos se racionalizó adicionalmente mediante un protocolo de filtración, que filtró los compuestos por sus propiedades 'físicoquímicas análogas a un inhibidor de MIF conocido'. A continuación se generaron 50 confórmeros de este conjunto de datos usando OMEGA y se acoplaron en el sitio activo de MIF con FRED. A continuación se agruparon los resultados en 25 agrupaciones, A continuación se inspeccionaron los compuestos manualmente y se seleccionó un subconjunto para el ensayo. Se seleccionaron 25 potenciales inhibidores de MIF para la evaluación biológica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo celular**

#### **RAW 264.7**

Se obtuvo la línea de células RAW 264.7 obtenida a partir de la ECACC, número de catálogo 85062803. Se mantuvieron las células RAW en medio DMEM (Gibco- n.º de cat. 41965-039) suplementado con FCS al 10 % (Gibco- n.º de cat. 10270-106), 100 U/ml de penicilina y estreptomina (Gibco- n.º de cat. 15070-063) y 2 mM de L-Glutamina (Gibco - n.º de cat. 25030-081). Se mantuvieron las células en una atmósfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. Las células se pasaron cada 2-3 días cuando alcanzaron una confluencia del 80-90 %. Se retiraron las células de la parte inferior de los matraces utilizando raspadores celulares y se centrifugaron durante 5 minutos a temperatura ambiente a 400 g en una centrifuga de sobremesa. Se descartó el medio y las células se volvieron a suspender en medio DMEM reciente.

#### **Carcinoma de Lewis de pulmón (LLC1)**

Se obtuvo la línea de células LLC1 del Prof. Tariq Sethi (Kings College London). LLC1 son una línea de células Lewis de carcinoma de pulmón que expresa la luciferasa de Gaussia transformada de manera estable. Se mantuvieron las células LLC1 en DMEM suplementado con FCS al 10 %, 2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina/estreptomina. Se subcultivaron las células retirando el medio y añadiendo 5 ml de Tripsina-EDTA al 0,05 % (Gibco- n.º de cat. 25200-056) durante 1 minuto a 37 °C. Se neutralizó la tripsina añadiendo medio. Se recogieron las células y se centrifugaron durante 5 minutos en una centrifuga de sobremesa y se volvieron a suspender en medio nuevo. Se pasaron las células cada 2-3 días.

#### **Condiciones celulares**

Todas las células se mantuvieron en un entorno estéril a 37 °C en una atmósfera humidificada y con una concentración de CO<sub>2</sub> (5 %). Se subcultivaron todas las células cuando alcanzaron un 80-90 % de confluencia.

#### **Generación de MIF recombinante**

Se purificó MIF recombinante humano según Bernhagen et al. (Biochemistry, 1994. 33(47): pág. 14144-55). En resumen, células BL21 de *E. coli* que expresaban la construcción pET11b-MIF se hicieron crecer con una absorbancia a 600 nm (DO) de 0,6-0,08. Isopropil 1-tio-P-D-galactopiranosido (IPTG) (Sigma - n.º de cat. 16758) se añadió a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión del gen de MIF y se incubó durante 3 horas más. A continuación se recogieron las bacterias mediante centrifugación y después se congelaron los aglomerados celulares. La purificación de la proteína posteriormente se subcontrató a Scottish Biomedical, donde los aglomerados bacterianos se descongelaron y se volvieron a suspender en 3 ml de solución salina tamponada con Tris. A continuación se lisaron las bacterias añadiendo un número equivalente de perlas de vidrio y sometiendo a una vortización fuerte durante 10 minutos. Se retiraron las perlas de vidrio mediante centrifugación a 1000 g durante 10 minutos y se centrifugó el extracto bacteriano a 1000 g durante 30 minutos más. A continuación, el sobrenadante se esterilizó por filtración con un filtro de membrana de 45 ppm y a continuación con un filtro de membrana de 22 ppm y pasaron por una columna de cromatografía de intercambio aniónico MONO Q. MIF se eluyó usando solución salina tamponada con Tris en las primeras fracciones de flujo pistón y se combinó y se colocó en hielo. Estas fracciones combinadas se aplicaron a continuación a una columna de fase inversa C8-SepPak. El material no unido se eluyó lavando con agua y acetonitrilo/agua al 20 %. A continuación se eluyó MIF usando 6 volúmenes de columna de acetonitrilo/agua al 60 %. A continuación esta muestra se renaturalizó disolviendo MIF a una concentración de 200-400pg/ml en tampón fosfato de sodio 20 mM que contenía urea 8 M y DTT 5 mM y se dializó frente a un tampón de fosfato de sodio 20 mM.

#### **Regulación MIF de TNF- $\alpha$**



Se sembraron en placas las células RAW 264.7 macrófagas a  $1 \times 10^5$ /ml en 450  $\mu$ l de medio en una placa de 48 pocillos. 16 horas después, las células se trataron con ISO-1 o inhibidores de la tautomerasa a una concentración final de 10, 50 o 100  $\mu$ M durante 30 minutos antes de la estimulación con 100 ng/ml de LPS. Se recogieron los sobrenadantes tras 20 horas para la determinación de los niveles de TNF- $\alpha$ . Se determinaron los niveles de TNF- $\alpha$  usando un ELISA específico de TNF- $\alpha$  (n.º de CAT DY410 R&D Syst).

#### ELISA de TNF- $\alpha$

Se revistieron placas de 96 pocillos con 50  $\mu$ l de anticuerpo de captura (0,8  $\mu$ g/ml) en PBS y se precintaron y se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación se lavaron las placas tres veces en PBS Tween al 0,05 % y se secaron las placas. Se bloquearon las placas añadiendo 150  $\mu$ l de BSA al 1 % en PBS (Gibco - n.º de cat. 14190-094) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron las placas de nuevo como se ha descrito anteriormente. 50  $\mu$ l de muestra o patrón se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación se lavaron las placas de nuevo como se ha descrito. Se añadieron 50  $\mu$ l de anticuerpo de detección (200ng/ml) en BSA al 1 % en PBS a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas de nuevo como se ha descrito. Se añadieron 50  $\mu$ l de concentración de trabajo de Estreptavidina - HRP a cada pocillo y se cubrieron las placas y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. 50  $\mu$ l de solución sustrato (un comprimido de OPD y un comprimido de tampón/peróxido de hidrógeno urea se disolvieron en 20 ml de agua para dar como resultado una solución tamponada lista para el uso, Sigma - n.º de cat. 9187-50) se añadió a cada pocillo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. 25  $\mu$ l de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se añadieron a cada pocillo para detener la reacción. A continuación se midió la densidad óptica de cada pocillo con un espectrofotómetro a 450 nm.

#### ELISA DE PEG-2

Las células Raw macrófagas de murino se sembraron en placas a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  y se pretrataron con 100  $\mu$ M de cada uno de los inhibidores a una concentración de 100, 50 o 10  $\mu$ M durante 30 minutos a 37 °C en una estufa incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células Raw macrófagas se trataron a continuación con 100 ng/ml de LPS y se recogieron los sobrenadantes tras 16 horas a 37 °C en una estufa incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % y se analizaron para la producción de PGE-2. Se midieron los niveles de PGE-2 mediante ELISA. (n.º de CAT KGE004 R&D Syst).

#### Ensayos de proliferación de LLC-GLuc con rMIF

Se sembraron en placas células LLC-Gluc en una placa de 6 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/ml en DMEM suplementado con P/S, FCS al 10 % y L-Glu. Tras la adherencia durante la noche, se añadieron 100 ng/ml de MIF junto con los inhibidores o DMSO a un total de 1 ml de medio exento de suero. Se recogieron las células después de 48 horas mediante tripsinización y se contaron en un hemocitómetro.

#### Modelo de LLC1 subcutáneo

Se recogieron los cultivos en fase log de células LLC-1 mediante tripsinización y se lavaron tres veces con solución salina tamponada estéril (PBS) y se volvieron a suspender a una densidad celular de  $5 \times 10^5$ /ml en PBS. Los animales se afeitaron con una afeitadora eléctrica 24 horas antes de la inyección subcutánea. Se inyectaron  $5 \times 10^5$  células Lewis de pulmón en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas. Los animales se controlaron durante la duración del experimento y se registraron las mediciones del tumor dos veces a la semana con calibres digitales. Se calculó el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) como  $0,5 \times L \times W^2$ , donde la longitud es representativa del diámetro más grande del tumor y la anchura representa el diámetro más pequeño del tumor. Se sacrificaron los animales cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 15 mm o si los tumores se ulceraron. A continuación se extrajeron los tumores junto con los pulmones, el bazo y el hígado.

Se inyectaron células de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 WT, ratones C57BL/6 MIF KO o ratones C57BL/6 P1G. Se tomaron mediciones con el calibre dos veces a la semana y se calculó el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) como  $0,5 \times L \times W^2$ .

#### Tratamiento con el inhibidor de la tautomerasa *In vivo*

30 minutos antes de la inoculación de LLC-1, se administraron los inhibidores (TI 19/ ISO-1) a una concentración de 35 mg/kg en un volumen de 100  $\mu$ l de DMSO al 5 % en PBS estéril. Se proporcionaron inyecciones a los grupos de control de vehículo DMSO al 5 % en PBS estéril o PBS estéril solo. Los animales se trataron dos veces a la semana durante cuatro semanas.

### ENSAYOS BIOLÓGICOS

#### Ensayos para la evaluación de inhibidores de molécula pequeña de MIF

##### Ensayo de inhibición de la tautomerasa

MIF ha mostrado poseer una actividad enzimática única, cataliza la conversión de L-dopacromo en su derivado de

indol, ácido dihidroxiindol carboxílico. La capacidad de los compuestos candidatos para inhibir la actividad tautomerasa de MIF se cuantificó utilizando ácido hidroxifenil pirúvico (HPP) como sustrato.

5 Se preparó el metil éster de L-dopacromo a 2,4 mM mediante la oxidación del éster metílico de L-3,4-dihidroxifenilalanina con peryodato de sodio. La solución se mezcló bien y se puso a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de ponerse sobre hielo en la oscuridad. Se añadieron 100 ng de rMIF a cada uno de los inhibidores de la tautomerasa o ISO-1 a varias concentraciones (1, 50 y 100  $\mu$ M) con sustrato. Se midió la disminución en la absorbancia con un espectrofotómetro a 475 nm cada 10 segundos durante 10 minutos.

10 Se midió la velocidad de reacción de rMIF y el sustrato solo con el tiempo a 475 nm. Esta se comparó con la velocidad de esta reacción con la adición de 100  $\mu$ M de cada uno de los inhibidores. Se calculó la inhibición como porcentaje en la reducción de la tasa de cambio con la adición del inhibidor promediado durante cinco minutos.

Cada uno de los 25 inhibidores de la tautomerasa potenciales se analizaron en este ensayo de la tautomerasa. Esto permitió a los inventores determinar lo eficaz que era cada uno de los inhibidores para reducir específicamente la actividad enzimática de MIF. La **Figura 1** muestra cada uno de los compuestos en este ensayo de la tautomerasa.

15 De los compuestos ensayados TI 1, 2, 4, 7, 8, 11, 14, 19, 20, 21 y 23 redujeron la actividad de la tautomerasa en aproximadamente un 70 %. Como se puede observar en la **Figura 1**, 18 inhibidores potenciales de MIF del panel fueron más eficaces que el inhibidor de la tautomerasa ISO-1 comercialmente disponible. Se observó que TI 19, uno de los compuestos más pequeños del panel, tenía una de las mejores reducciones de la actividad enzimática de MIF, con una reducción del 74 % en el cambio de color observado.

20 La **Figura 3** muestra la inhibición de la actividad enzimática de la tautomerasa de MIF para 5 compuestos ilustrativos. TI 19 demostró el mayor porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de MIF.

#### Efecto de los compuestos sobre la producción de TNF- $\alpha$

25 Se pensaba originalmente que el factor inhibidor de la migración de macrófagos dirigía la migración de los macrófagos, dándole por tanto su nombre; sin embargo, se ha descubierto frecuentemente que los macrófagos son una de las principales fuentes de MIF liberado tras el choque tóxico. Se ha notificado que MIF es un importante regulador de las respuestas a las bacterias Gram-negativas *in-vitro* e *in vivo*.

30 Además, se sabe que monocitos/macrófagos y linfocitos T activados que tienen un papel clave en la respuesta inflamatoria en la patogénesis de varias patologías incluyendo enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias secretan MIF. Además, la producción de mediadores proinflamatorios tales como el factor- $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleuquina (IL)-  $1\beta$ , IL-6 e IL-8, cada una las cuales actúa en la inducción de la respuesta proinflamatoria, ha demostrado estimularse mediante MIF.

Los macrófagos son una fuente esencial de MIF. RAW 264.7 es una línea de células macrófaga de monocitos leucémicos. La proteína MIF preformada, así como el ARNm de MIF, se encuentran en células RAW 264.7 no estimuladas. MIF se secreta tras la estimulación de estas células con concentraciones muy bajas de LPS.

35 El inhibidor de MIF ISO-1 tiene la capacidad de reducir los niveles en circulación de TNF- $\alpha$  en un modelo inducido por LPS de septicemia de murino. El papel de MIF en esta respuesta celular puede aprovecharse para cribar inhibidores de la actividad enzimática de MIF. Usando la línea de células RAW 264.7, ISO-1 ha mostrado inhibir la producción de TNF- $\alpha$  inducida por la adición de LPS.

40 Inicialmente, el panel de 25 novedosos inhibidores potenciales de la tautomerasa se cribó en un sistema *in-vitro*. Para hacer esto, los inventores aprovecharon el hecho de que MIF era necesario para una producción óptima de TNF- $\alpha$  inducida por LPS. Los inventores razonaron por tanto que sus potenciales TI deberían poder inhibir TNF- $\alpha$  inducida por LPS en células RAW macrófagas de murino. Las células RAW macrófagas de murino se sembraron en placas a 37 °C en una estufa incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. 16 horas después, las células se pretrataron con cada uno de los inhibidores a una concentración de 100, 50 o 10  $\mu$ M durante 30 minutos, a continuación se añadieron 100 ng/ml de LPS a las células y se recogieron los sobrenadantes tras 16 horas y se analizaron para la producción de TNF- $\alpha$  mediante ELISA.

45 Como se puede observar en la **Figura 2A**, 21 de los 25 inhibidores del panel pudieron reducir la producción de TNF- $\alpha$ . A 100  $\mu$ M, 18 de estos inhibidores fueron más eficaces que el inhibidor de la tautomerasa de MIF comercialmente disponible, ISO-1. TI 17 fue más eficaz a 100  $\mu$ M, reduciendo la producción de TNF- $\alpha$  en aproximadamente un 70 %. Se descubrió que el inhibidor de MIF comercialmente disponible, ISO-1, reducía TNF- $\alpha$  en un promedio del 20 %.

50 Los inventores repitieron también este ensayo utilizando 50  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de cada uno del panel de los inventores de novedosos inhibidores y también ISO-1. La **Figura 2B** muestra que a 50  $\mu$ M, aproximadamente 13 compuestos fueron más eficaces que el patrón comercial ISO-1 (TI 17, 18, 13, 23, 12, 21, 22, 19, 8, 11, 16, 2, 7). De nuevo TI 17 es el más eficaz a 50  $\mu$ M y TI 18 fue muy eficaz sin reducir totalmente TNF- $\alpha$  por completo. Con el pretratamiento del panel de inhibidores e ISO-1 a 10  $\mu$ M, como se puede observar en la **Figura 2C**, la reducción en TNF- $\alpha$  disminuyó, sin embargo, había 13 compuestos (TI - 18, 23, 22, 21, 13, 12, 17, 11, 1, 20, 19, 25, 2) que seguían siendo más

eficaces que ISO-1.

Como se ha indicado anteriormente, de los 5 compuestos ilustrativos que se muestran en la **Figura 3**, TI 19 demostró el mayor porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de MIF. Los resultados del ensayo de TNF- $\alpha$  muestran también que TI 19 es más eficaz en la reducción de TNF- $\alpha$  que el ISO-1 comercialmente disponible. TI 19 es uno de los 25 compuestos más pequeños, lo que le proporciona una mayor posibilidad de poder introducirse en la célula. Su estructura tiene numerosas conformaciones diferentes que puede adoptar para encajar correctamente dentro del sitio activo.

#### **Efectos de los compuestos sobre la producción de PGE-2 en células tratadas con LPS**

Se ha mostrado que MIF regula en exceso COX-2 y a la vez la producción de PGE<sub>2</sub>. Un estudio sobre la artritis reumatoide mostró que el tratamiento de sinoviocitos análogos a fibroblastos (FLS) con MIF recombinante aumentó significativamente la cantidad de actividad de COX-2 y, a su vez, la cantidad de producción de PGE<sub>2</sub> en las células. Otro estudio prestó atención a la expresión de COX-2 inducida por LPS y también a la liberación de PGE<sub>2</sub> en macrófagos deficientes en MIF; en este sentido, se notificó una reducción significativa en la liberación de PGE<sub>2</sub> en macrófagos deficientes en MIF en comparación con la producción de PGE<sub>2</sub> procedente de los macrófagos naturales.

Se ha mostrado también que MIF tiene un papel en la regulación de los glucocorticoides en los monocitos activados. Se muestra que los macrófagos que se trataron con LPS tienen un aumento en la expresión de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub>. Esto puede sustituirse con la adición de la dexametasona antiinflamatoria. Esto se contrarrestó por la adición de MIF recombinante a este ensayo que se observó que restauraba la producción de PGE<sub>2</sub> al nivel observado por el tratamiento de LPS solo. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que inhibir MIF disminuirá sus efectos antiinflamatorios y también sus efectos antitumorales. Se había mostrado anteriormente que los inhibidores específicos de MIF inhibían la producción de COX-2 inducida y la liberación de PGE<sub>2</sub>. Lubetsky et al (J Biol Chem, 2002. 277(28): pág. 24976-82) mostraron que concentraciones crecientes de ISO-1 tenían la capacidad de reducir la producción de PGE-2 de una manera dependiente de la dosis.

Se ha mostrado anteriormente que el nivel de liberación de PGE-2 mediada por LPS es 10 veces menor en macrófagos deficientes en MIF en comparación con el de los macrófagos naturales, y que la adición de MIF recombinante a estos macrófagos deficientes en MIF puede ayudar a restaurar la liberación de PGE-2 mediada por LPS. Inhibir por tanto la actividad enzimática de MIF con los posibles inhibidores de los inventores debería disminuir el nivel de PGE-2 liberado de las células tratadas con LPS.

La adición de LPS aplicado exógenamente aumenta significativamente la producción de PGE-2 en comparación con las células sin tratar como puede observarse a partir de la **Figura 4**.

La capacidad de TI 19 de disminuir el nivel de PGE-2 liberado de las células tratadas con LPS se analizó mediante ELISA. El pretratamiento con TI 19 e ISO-1 reduce significativamente este aumento en la producción de PGE-2 mediada por LPS. El tratamiento con TI 19 produjo una mayor reducción en PGE-2 que ISO-1 a esta concentración. A una concentración de 100  $\mu$ M, TI 19 redujo los niveles de PGE-2 a niveles comparables en células sin tratar.

#### **MIF Y CÁNCER DE PULMÓN**

##### **Efecto de la actividad de la tautomerasa de MIF sobre la proliferación en células tumorales de Lewis en cáncer de pulmón**

Se sabe también que MIF tiene un papel en la proliferación celular. Los estudios han mostrado que MIF tiene un papel en la diferenciación celular en el desarrollo de la lente ocular de los pollos. Otros estudios encontraron que MIF se encuentra en las células basales de la epidermis humana, que son muy proliferativas.

Se ha investigado también el papel de MIF en la proliferación de linfocitos T. Tras la activación, los linfocitos T que producen MIF y neutralizan MIF con anticuerpos específicos de MIF pueden inhibir la proliferación de linfocitos T. Este estudio también descubrió que MIF se liberaba en respuesta a la estimulación con glucocorticoides donde se descubrió que anulaba la inhibición por los glucocorticoides de la proliferación de linfocitos T que indican el papel antagonista de MIF y de los glucocorticoides en la proliferación (Bacher et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1996. 93: págs. 7849-7854).

Meyer-Siegler *et al* descubrieron una expresión potenciada de MIF en células de cáncer de próstata primarias y metastásicas (Urology, 1996. 48(3): págs. 448-52). Tras este hallazgo, Takahashi *et al* continuaron observando la implicación de MIF en el mecanismo del crecimiento tumoral. Descubrieron que MIF se localizaba principalmente en el citoplasma de las células tumorales y que transfectando las células con un plásmido de MIF de sentido contrario, pudieron inhibir significativamente la proliferación celular (Mol. Med., 1998. 4(11): págs. 707-14).

rMIF añadido a los fibroblastos induce una proliferación significativa mientras que la adición de un anticuerpo monoclonal dirigido contra MIF reduce esta proliferación (J Biol Chem, 1999. 274(25): págs. 18100-6). A continuación se llevaron a cabo investigaciones para determinar si la actividad enzimática de MIF estaba implicada en este proceso. Meyer- Siegler *et al* utilizaron el inhibidor de MIF, ISO-1 para mostrar que la inhibición de la

actividad enzimática de MIF daba como resultado una disminución en la proliferación celular en células de cáncer de próstata (J Immunol, 2006. 177(12): págs. 8730-9).

5 Los inventores deseaban investigar el papel de la actividad enzimática de MIF en la proliferación de una línea de células tumorales. Los inventores observaron células de Lewis de carcinoma de pulmón (LLC) que se utilizarán en su estudio del modelo tumoral. Se ha mostrado en numerosos estudios que MIF tiene la capacidad de inhibir la apoptosis. Se ha mostrado también que los anticuerpos dirigidos contra MIF tienen la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales. Los inventores teorizaron que la inhibición de la actividad enzimática de MIF reduciría significativamente la proliferación de estas células tumorales LLC-1.

#### **MIF-KO y MIF-P1G muestran un tamaño reducido del tumor en comparación con ratones WT**

10 A fin de establecer si la actividad enzimática de MIF tuvo un papel en este modelo de cáncer de pulmón concreto, los inventores observaron la comparación del crecimiento tumoral en ratones que expresan niveles normales de MIF (WT) con los que expresan una actividad enzimática que carece de MIF mutante (P1G) y ratones MIF inactivados genéticamente que carecen completamente de MIF (MIF KO). Esto permitió una comparación directa del crecimiento tumoral en un entorno que tiene actividad enzimática de MIF y un entorno sin actividad enzimática de MIF.

15 La **Figura 7** muestra que se descubrió que el grupo MIF WT tenía un marcado aumento en el tamaño del tumor desde el día 16 al 24 como se esperaba. El tamaño promedio del tumor del grupo MIF KO fue un 60 % menor en el día 24 en comparación con el grupo MIF WT. El grupo MIF P1G con la tautomerasa nula tuvo un tamaño tumoral promedio el día 24 que era un 45 % menor que el del grupo MIF WT. La presencia del MIF con la tautomerasa nula en el modelo P1G muestra una marcada reducción en el tamaño tumoral en comparación con los animales MIF-WT.  
20 Este resultado es similar a la reducción observada en ratones MIF-KO completos, lo que sugiere que la actividad enzimática tiene un papel sustancial en el crecimiento del tumor en este modelo.

#### **Efecto de los compuestos sobre la proliferación celular**

25 Se examinó también la capacidad de los compuestos candidatos para reducir la proliferación celular. Para este ensayo, se sembraron en placas células LLC a una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células/ml. A continuación se pretrataron las células con TI 19 o ISO-1 a una concentración de 100  $\mu$ M. A continuación se trataron las células con 100 ng/ml de MIF recombinante. Se incubaron las células a 37 °C en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % y después de 48 horas, las células se recogieron y contaron. Con respecto a la Figura 5 puede observarse que MIF promueve la proliferación de células de Lewis de carcinoma de pulmón significativamente en relación con las células sin tratar. ISO-1 redujo la proliferación inducida por MIF, pero TI 19 redujo la proliferación a niveles comparables con  
30 las células sin tratar.

#### **Efecto de los compuestos sobre el crecimiento de tumores subcutáneos en el modelo de cáncer de pulmón**

35 MIF se ha implicado en la patogénesis de muchos tipos de cánceres y se sabe que se expresa en exceso en tumores. Se ha sugerido que muchas funciones biológicas únicas de MIF contribuyen probablemente a un entorno *in vivo* que favorece el crecimiento y la capacidad de invasión de los tumores. Kamimura *et al* observaron los modelos de tinción de la proteína MIF en tejido normal de pulmón en comparación con adenocarcinoma de pulmón. Mostraron que hubo un aumento de la proteína MIF en el adenocarcinoma de pulmón en comparación con el tejido pulmonar normal (Cancer, 2000. 89(2): págs. 334-41). Además, niveles crecientes de MIF en pacientes con cáncer de pulmón se asocian con un pronóstico peor en pacientes con cáncer de pulmón.

40 A fin de evaluar la eficacia de los inhibidores de MIF en el cáncer de pulmón, los inventores seleccionaron la línea de células de Lewis de carcinoma de pulmón (LLC) en el modelo *in vivo*. Estas células se establecieron procedentes del pulmón de un ratón C57BL que tenía un tumor a partir del implante de un carcinoma primario de Lewis de pulmón. Esta línea de células se utiliza habitualmente en el estudio de la metástasis y para estudiar potenciales compuestos terapéuticos contra el cáncer. Numerosos estudios han utilizado células LLC a fin de caracterizar el comportamiento del cáncer de pulmón *in vivo*.

45 A fin de evaluar la actividad antitumoral de los novedosos inhibidores de la tautomerasa *in vivo*, se configuró un modelo de células LLC-1 subcutáneo. El modelo subcutáneo se configuró para que los tumores pudieran visualizarse y medirse fácilmente durante el experimento y para permitir la evaluación del crecimiento del tumor en tiempo real. Se inyectaron células de Lewis de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6. Se tomaron mediciones con el calibre dos veces a la semana y se calculó el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) como  $0,5 \times L \times W^2$ . Se descubrió que el volumen del tumor aumentaba con el tiempo, con un crecimiento exponencial después del día 22. El punto de corte de este modelo fue cuando el tumor medía 15 mm de diámetro. Este modelo proporcionó a los inventores una indicación del crecimiento normal del tumor en este modelo subcutáneo. Se puede observar a partir de este modelo que desde el día 22 al día 28 el tamaño del tumor crece considerablemente.

#### **Efecto de los compuestos candidatos sobre el tamaño del tumor en el modelo LLC-1**

Una vez que se determinó que la actividad enzimática jugaba un papel en el crecimiento de los tumores, el modelo

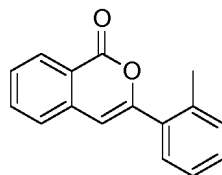
LLC subcutáneo se usó a continuación para evaluar la eficacia de los inhibidores de peso molecular pequeño. Ratones C57/B16 recibieron por vía intraperitoneal 35 mg/kg de cada uno de los inhibidores 30 minutos antes de la inoculación subcutánea del tumor y de nuevo dos veces a la semana durante 4 semanas. Los animales se controlaron diariamente y se tomaron mediciones del tumor hasta que el tumor midió 15 mm de diámetro.

- 5 Como se puede observar en la **Figura 8** se observó una reducción significativa en el tamaño del tumor con el novedoso inhibidor de la tautomerasa (TI 19) en comparación con el grupo sin tratar o el grupo tratado con vehículo (DMSO). TI 19 redujo el crecimiento del tumor en casi el 90 % ( $116,1 \pm 30,41$ ) en comparación con los ratones silvestres ( $1145 \pm 115,7$ ). Estos novedosos hallazgos resaltan la importancia de la actividad de la tautomerasa en este modelo.
- 10 De los dos compuestos ensayados, los inventores pueden observar que TI 19 es más eficaz, con aproximadamente un 90 % de reducción en el crecimiento del tumor en el día 28, con ISO-1 (un inhibidor de MIF bien conocido) dando como resultado una reducción aproximada del 50 % en el tamaño del tumor. El novedoso compuesto de los inventores fue aproximadamente dos veces más eficaz en la reducción del tamaño tumoral que ISO-1 en el modelo a 28 días.
- 15 Se observó una tendencia similar en el modelo de tratamiento de 7 días (**Figura 9**). En este modelo, se dejó progresar el tumor hasta que llegó a ser palpable sobre el flanco del ratón antes de que se iniciara el tratamiento. De nuevo, se muestra una reducción significativa en el volumen del tumor después del día 28 del estudio en comparación con ISO-1.

### **ESTUDIOS DE RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD Y LA ESTRUCTURA**

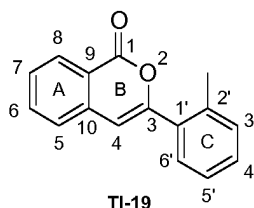
- 20 Con un potente inhibidor de la tautomerasa de MIF en la mano, los inventores llevaron a cabo estudios de relación entre la actividad y la estructura a fin de discernir la actividad subyacente de esta clase de compuesto y para investigar también si podrían sintetizarse compuestos con actividad potenciada.

A continuación se muestra la estructura de TI 19:



TI-19

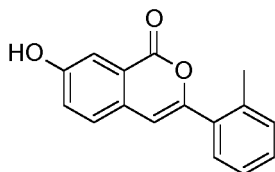
- 25 Se representa a continuación la numeración del sistema del anillo:



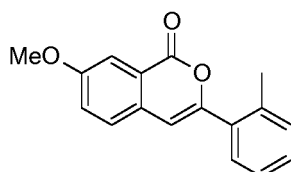
TI-19

Basándose en los resultados de los estudios de modelización molecular llevados a cabo inicialmente, al inicio de los estudios SAR de los inventores, el interés se puso en la sustitución del anillo aromático en la posición 7 del anillo A.

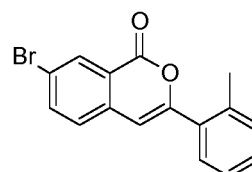
Se sintetizaron los siguientes análogos de TI 19



SDG-22

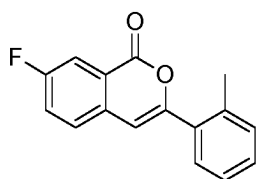


SDG-23

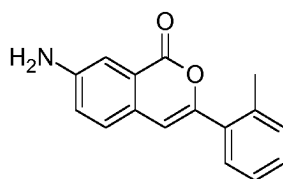


SDG-24

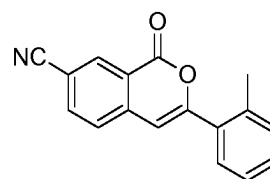
30



SDG-25



SDG-39

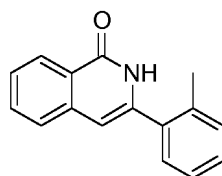


SDG-41

Cuando se examinó la eficacia de los compuestos anteriores en el ensayo de inhibición de la tautomerasa, SDG-22 demostró que era un inhibidor muy eficaz de la tautomerasa de MIF.

- 5 SDG-22 difiere de TI 19 en que tiene un grupo hidroxilo en la posición 7. Sin embargo, la presencia de otros sustituyentes en la posición 7 demostró ser menos eficaz que el compuesto TI 19 para inhibir la actividad de la tautomerasa de MIF.

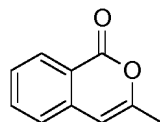
Se investigó la importancia del oxígeno en la posición 2, sintetizando el análogo de amino de TI 19, el compuesto SDG-42.



SDG-42

- 10 La presencia del oxígeno demostró ser crítica para la actividad de inhibición de la tautomerasa ya que el compuesto SDG-42 demostró ser ineficaz como inhibidor de la tautomerasa.

De forma similar, se investigó la importancia de la presencia del anillo C aromático sintetizando SDG-40 a continuación

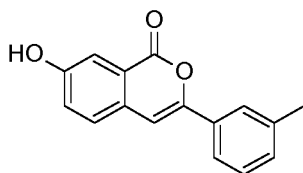


SDG-40

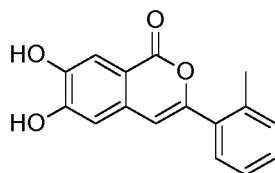
- 15 La eliminación del anillo C aromático dio como resultado una pérdida drástica de actividad inhibitora.

Demostrando el compuesto SDG-22 ser el inhibidor de la tautomerasa más eficaz identificado hasta la fecha, se sintetizaron algunos análogos de SDG-22.

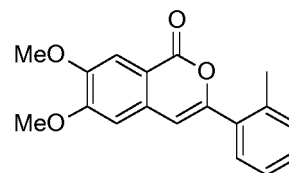
Se sintetizaron los siguientes compuestos:



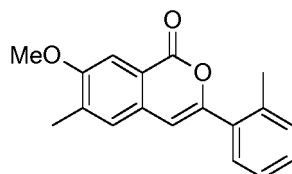
SDG-47



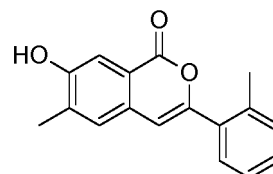
SDG-54



SDG-53



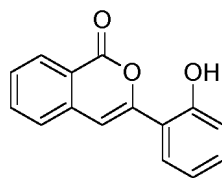
SDG-51



SDG-52

- 20 Mientras que SDG-52 presentaba alguna actividad inhibitora, SDG-47 y SDG-54 demostraron una inhibición casi completa de la actividad tautomerasa de MIF. Por el contrario, SDG-51, 53 y 23, que comprenden un grupo metoxi en la posición 7 no inhibieron significativamente la tautomerasa de MIF.

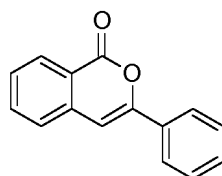
SDG-50, un análogo de TI 19 a continuación demuestra el efecto de sustituir el grupo alquilo en la posición 2' del anillo C con un grupo hidroxilo. Se observó una pérdida drástica en la actividad de inhibición de la tautomerasa.



SDG-50

5 Como es evidente en referencia a la actividad inhibidora de la tautomerasa de SDG-22 y SDG 47, la presencia de un grupo alquilo tanto en la posición 2' como en la posición 3' del anillo C es importante para la actividad inhibidora de la tautomerasa. La sustitución del metilo en 2' con un grupo hidroxilo y la eliminación del grupo 7-hidroxilo dio como resultado una pérdida completa en la actividad inhibidora.

Como se puede observar con respecto a la inactividad de SDG-46, la eliminación de un sustituyente alquilo de las posiciones 2' y 3' del anillo C produce una clase de compuesto que no inhibe la actividad de la tautomerasa de MIF.



SDG-46

10

### **CONCLUSIÓN**

15 En el presente documento, los inventores divulgan una nueva clase de inhibidor de MIF. Tras una batería de cribado informático y estudios de acoplamiento, y la evaluación biológica de los compuestos principales en dichos estudios de acoplamiento, el compuesto de isocumarina TI 19 se identificó como un potente inhibidor de la tautomerasa de MIF que demostró ser significativamente más potente que el inhibidor de molécula pequeña de MIF, ISO-1, comercialmente disponible.

20 Se mostró que TI 19 inhibía la actividad tautomerasa de MIF en un 74 % y conducía a una reducción en la producción de TNF- $\alpha$  en las células estimuladas por LPS. TI 19 redujo la proliferación celular en una línea de células de cáncer de pulmón y condujo a una significativa reducción en el volumen tumoral cuando se evaluó en un modelo de murino para el cáncer de pulmón. Estudios posteriores de relaciones de actividad de la estructura identificaron el compuesto SDG-22, un compuesto significativamente más potente que TI 19, que inhibió la actividad de la tautomerasa de MIF en >90 % y produjo una significativa reducción en la producción de TNF- $\alpha$  en células RAW macrófagas de murino estimuladas con LPS. En un análisis comparativo SDG-22 redujo la producción de TNF- $\alpha$  en células RAW macrófagas de murino estimuladas con LPS en un 97 %, que demostró ser un 80 % más eficaz que el inhibidor de MIF ISO-1 conocido y un 10 % más eficaz que TI 19 en el mismo ensayo.

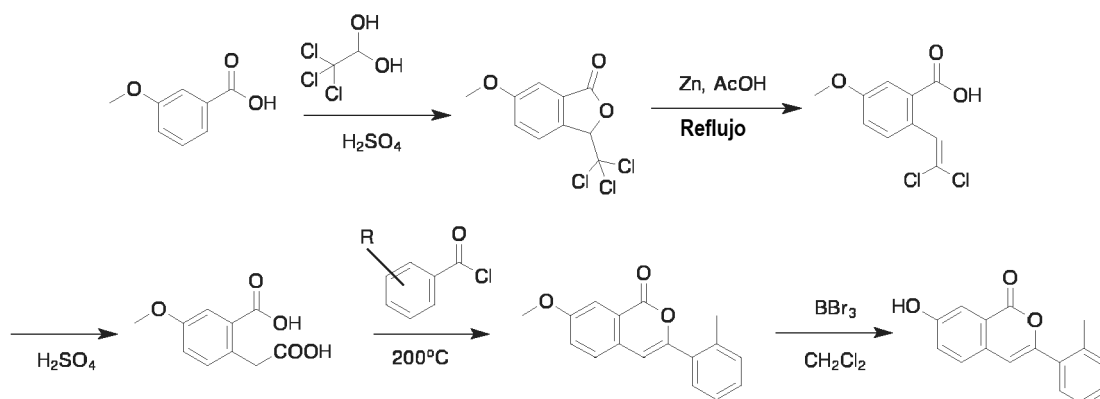
25 Los estudios de relación entre actividad y estructura identificaron el grupo 7-hidroxilo de SDG-22 como esencial para su actividad potenciada. La mera sustitución de dicho grupo 7-hidroxilo con un grupo metoxi en la misma posición conduce a una pérdida casi completa en la actividad inhibidora de la tautomerasa.

30 La presencia de un grupo 6-hidroxilo demostró también ser tolerable y SDG-54 demostró inhibir la tautomerasa de MIF en un 86 %.

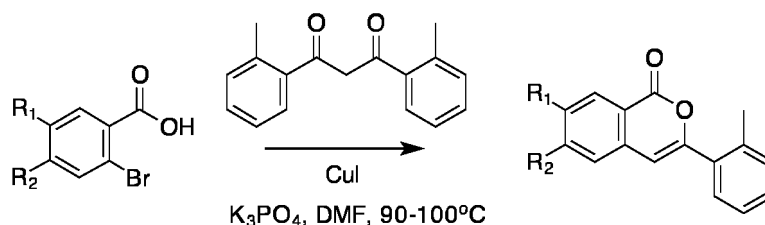
35 La investigación dada la importancia de la sustitución alrededor del anillo C de la estructura de la isocumarina, desveló la importancia de la presencia de un grupo alquilo en la posición 2' o 3' además en el grupo hidroxilo en la posición 7. La sustitución de dicho grupo alquilo en 2', con un grupo hidroxilo, en ausencia de un sustituyente 3', conduce a una pérdida casi completa en la actividad. Cuando el 2' y el 3' son hidrógeno, Se observó una pérdida drástica en la actividad.

### **SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE ISOCUMARINA REPRESENTATIVOS**

#### **Ruta del ácido homoftálico:**



### Ruta del ácido o-halobenzoico:



- 5 Se sintetizaron las isocumarinas ya sea mediante la ruta descrita por Cai et al. (JOC, 2012,77, 2331-2336) o bien a través de la reacción directa de los ácidos homoftálicos en el derivado de cloruro de acilo correspondiente. La 7-metoxiisocumarina se sintetizó mediante la ruta descrita por Cornaggia et al. (Org Lett, 2012, 14, 1850-1853, véase anteriormente)

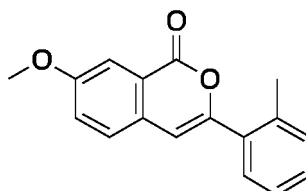
### **Procedimiento general para la síntesis de isocumarinas:**

#### **Método A:**

- 10 Ácido homoftálico (0,5 mmol, 1 equiv.) y cloruro de acilo (2 mmol, 4 equiv.) se agitaron a 200 °C durante 6 h. La reacción se dejó enfriar y se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua. Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> (sat.), salmuera y se secaron con MgSO<sub>4</sub>. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Hex: EtOAc, 9:1) para dar el compuesto deseado.

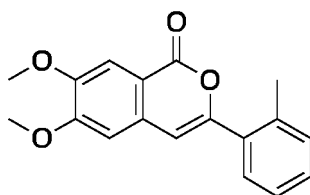
- 15 **Método B:** (JOC, 2012, 77, 2331-2336)

- 20 Un vial de microondas se cargó con la mezcla de ácido o-halobenzoico (0,5 mmol), 1,3-dicetona 2 (0,5 mmol), CuI (0,05 mmol), y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 mmol), y a continuación se agitó la mezcla en DMF (1 ml) El tubo se precintó y la mezcla se calentó en un microondas durante 1-2 horas. Después de que se completara, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A continuación se añadió agua, y se extrajo la mezcla con EtOAc, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. La primera purificación del residuo proporcionó el compuesto de isocumarina deseado.

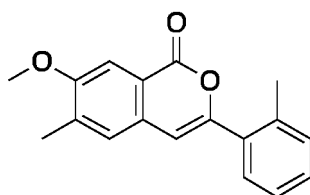


- 25 **3-(2'-metilfenil)-7-metoxiisocumarina (SDG-21)** sintetizada mediante el método B (46 mg, rendimiento del 35 %); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,72 (s, 1H), 7,48 (d, J 7,2 Hz, 1H), 7,39 (d, J 8,3 Hz, 1H), 7,30 (d, J 7,3 Hz, 1H), 7,25 (d, J 7,3 Hz, 1H), 6,55 (s, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,48 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158,17, 136,43, 132,82, 131,06, 130,97, 129,44, 129,09, 127,66, 125,92, 119,29, 107,75, 105,68, 55,84, 20,53; IEP-EMAR calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub> 267,1021, encontrado m/z 267,1012 [M+H]<sup>+</sup>.

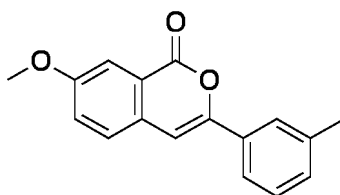




5 **3-(2'-metilfenil)-6,7-dimetoxiisocumarina (SDG-53)** Sintetizada mediante el método B (29 mg, rendimiento del 20 %); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.68 (s, 1H), 7.49 (d, *J* 7,7 Hz, 1H), 7.35 - 7.29 (m, 1H), 7.28 - 7.21 (m, 3H), 6.84 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.99 (s, 4H), 2.49 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,4, 155,1, 149,7, 136,6, 132,7, 130,9, 129,5, 129,1, 125,9, 113,4, 109,4, 106,3, 105,6, 56,3, 56,2, 20,7; IEP-EMAR calculado para C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub> 297,1126, encontrado *m/z* 297,1124 [M+H]<sup>+</sup>.

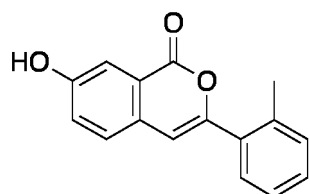


10 **3-(2'-metilfenil)-6-metil-7-metoxiisocumarina (SDG-51)** Sintetizada mediante el método B (35 mg, rendimiento del 25 %) RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.64 (s, 1H), 7.49 (d, *J* 7,5 Hz, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.24 (m, 3H), 6.52 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.34 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158,1, 136,4, 132,8, 131,0, 130,9, 129,4, 129,0, 127,6, 125,8, 119,2, 107,7, 105,6, 55,8, 20,5, 16,8; IEP-EMAR calculado para C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub> 281,1177 encontrado *m/z* 281,1170 [M+H]<sup>+</sup>.

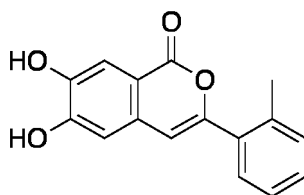


15 **3-(3'-metilfenil)-7-metoxiisocumarina (SDG-43)** Sintetizada mediante el método A (66 mg, rendimiento del 50 %); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,28 (s, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,48 (m, 2H), 7,33 (t, *J* 7,7 Hz, 1H), 7,27 - 7,18 (m, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 2,41 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,3, 153,7, 138,5, 137,5, 134,8, 131,8, 130,7, 129,6, 128,6, 128,0, 125,8, 122,3, 120,4, 101,6, 55,7, 21,4; IEP-EMAR calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub> 267,1021, encontrado *m/z* 267,1018 [M+H]<sup>+</sup>.

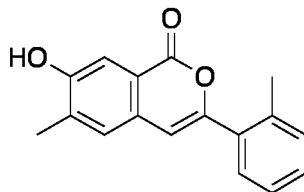
20 **Procedimiento general para la escisión del metil éter:** Se añadió una solución de tribromuro de boro (0,6 mmol, 1M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) a un derivado de isocumarina (0,1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,5 ml) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sat.) y la reacción se diluyó con EtOAc. Se separaron las fases y se acidificó la fase acuosa con HCl 1M, se extrajo en EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron con MgSO<sub>4</sub> y los disolventes se eliminaron a presión reducida. La purificación ultrarrápida del residuo (Hex:EtOAc 6:1) proporcionó los compuestos deseados.



25 **3-(2'-metilfenil)-7-hidroxisocumarina (SDG-22)** (20 mg, rendimiento del 85 %) RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,95 (s, 1H), 7,48 (d, *J* 7,4 Hz, 1H), 7,41 - 7,28 (m, 4H), 7,24 (s, 2H), 6,60 (s, 1H), 2,48 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158,1, 136,4, 132,8, 131,1, 130,9, 129,4, 129,09, 127,6, 126,0, 119,3, 107,7, 105,6, 20,5; IEP-EMAR calculado para C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub> 253,0864, encontrado *m/z* 253,0872 [M+H]<sup>+</sup>.

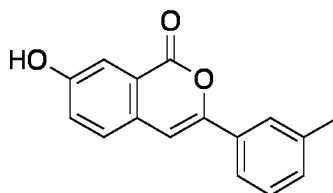


**3-(2'-metilfenil)-6,7-hidroxiisocumarina (SDG-54)** (2 mg, rendimiento del 83 %); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,58 (s, 1H), 7,49 (d,  $J$  7,5 Hz, 1H), 7,32 (tt,  $J$  14,3, 7,4 Hz, 3H), 6,96 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 2,47 (s, 3H); IEP-EMAR calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_4$  269,0813, encontrado  $m/z$  269,0824  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



5

**3-(2'-metilfenil)-6-metil-7-hidroxiisocumarina (SDG-52)** (6 mg, rendimiento del 80 %); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,55 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,39 (d,  $J$  7,6 Hz, 1H), 7,26 - 7,14 (m, 5H), 6,55 (s, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,28 (s, 3H); IEP-EMAR calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_3$  267,1021, encontrado  $m/z$  267,1028  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

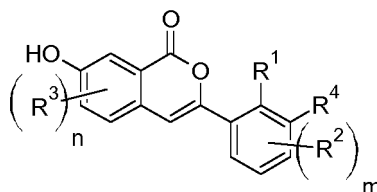


10 **3-(3'-metilfenil)-7-hidroxiisocumarina (SDG-47)** (15 mg, rendimiento del 84 %); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,90 (s, 1H), 7,49 - 7,26 (m, 5H), 7,24 (s, 2H), 6,60 (s, 1H), 2,45 (s, 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158,2, 136,3, 132,5, 131,3, 130,7, 129,2, 129,0, 127,2, 126,1, 120, 107,2, 105,3, 20,65; IEP-EMAR calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_3$  253,0864, encontrado  $m/z$  253,0866  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

15 Las palabras "comprende/que comprende" y las palabras "que tiene/que incluye", cuando se usan en el presente documento con referencia a la presente invención, se usan para especificar la presencia de características indicadas, números enteros, etapas o componentes, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula



en la que n es 0; m es 0 a 3;

5 R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

en la que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> pueden estar independientemente no sustituidos o sustituidos con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

15 en la que, independientemente, cualquier R<sup>2</sup> puede estar no sustituido, o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

20 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> no son simultáneamente hidrógeno;

o una sal farmacéuticamente aceptable o un hidrato del mismo.

25 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> es un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; que puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en el que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>4</sup> es hidrógeno.

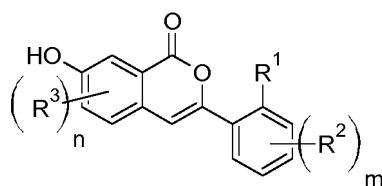
30 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>4</sup> es un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; que puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en el que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; y R<sup>1</sup> es hidrógeno.

35 4. Un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; en el que alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>; en el que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

40 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo y R<sup>4</sup> es hidrógeno.

45 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo y R<sup>1</sup> es hidrógeno.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



en la que n es 0; m es 0 a 3;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

en la que R<sup>1</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo;

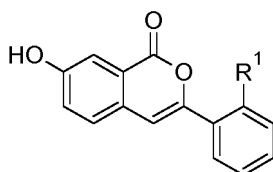
en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

en la que, independientemente, cualquier R<sup>2</sup> puede estar no sustituido, o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

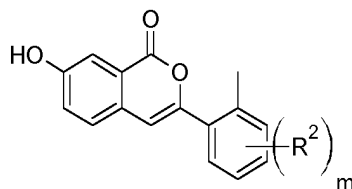
y sales farmacéuticamente aceptables e hidratos del mismo.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene la fórmula:



en la que, R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; en la que alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

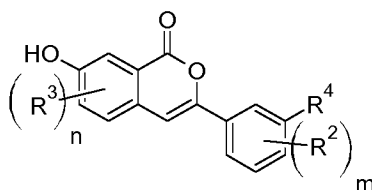
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula



en la que cualquier R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

en la que R<sub>be</sub> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que cualquier R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



en la que n es 0; m es 0 a 3;

R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, un grupo amino, un halógeno, un grupo ciano,

5 un grupo nitro, un grupo nitroso, un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

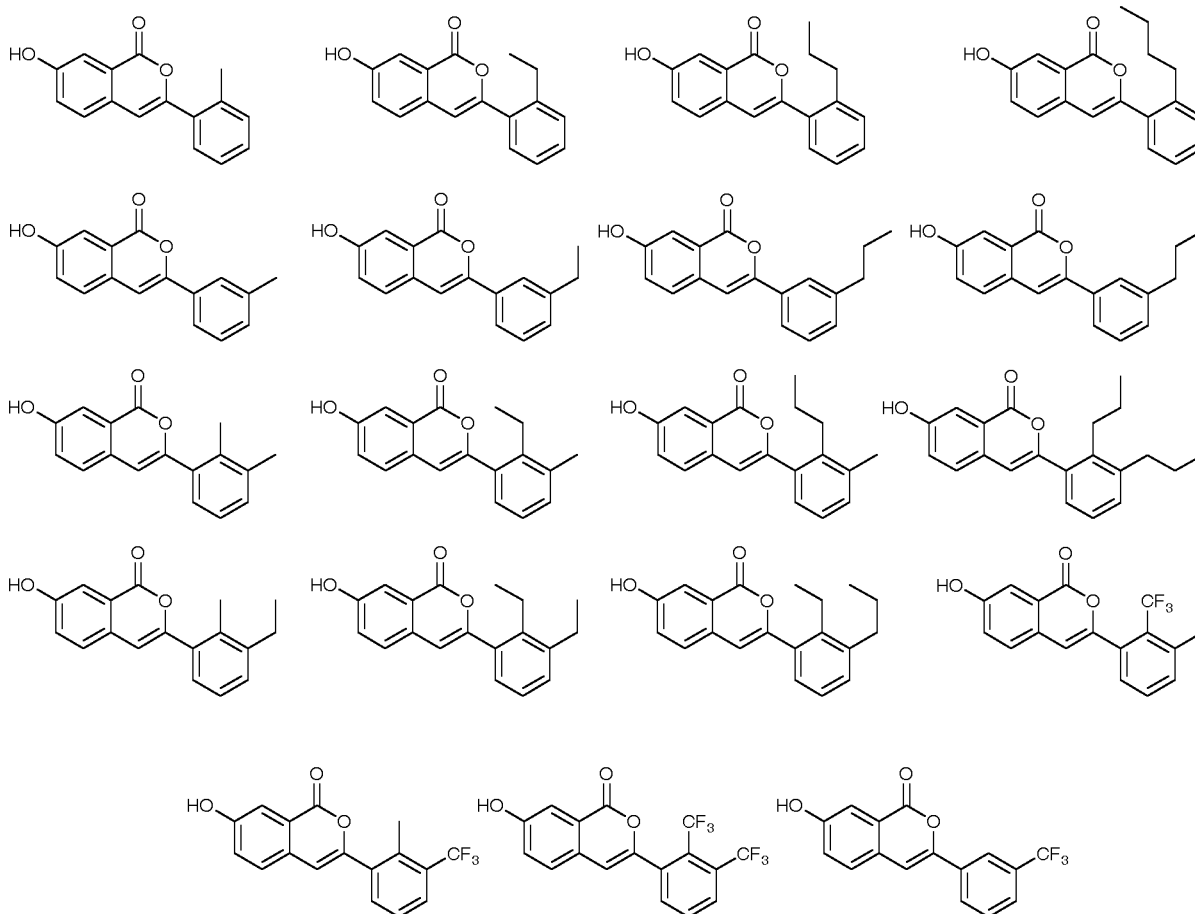
en la que, independientemente, cualquier R<sup>2</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que R' se selecciona independientemente, cada vez que aparece, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un alifático de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;

15 en la que R<sup>4</sup> puede estar no sustituido o sustituido con al menos uno de un halógeno, un hidroxilo, un grupo amino, un grupo sulfonilo, un grupo sulfonamida, un tiol, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un tioéter C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una cetimina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una sulfona C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un sulfóxido C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> primaria, una amida C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> secundaria, un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, un grupo carboxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo nitroso, -C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(O)NR'R', -N(R')C(O)NR'R', -N(R')C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, oxo; en la que cada R' se selecciona independientemente, entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

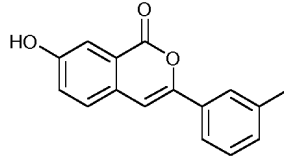
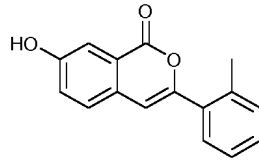
en la que R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup> no son simultáneamente hidrógeno.

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



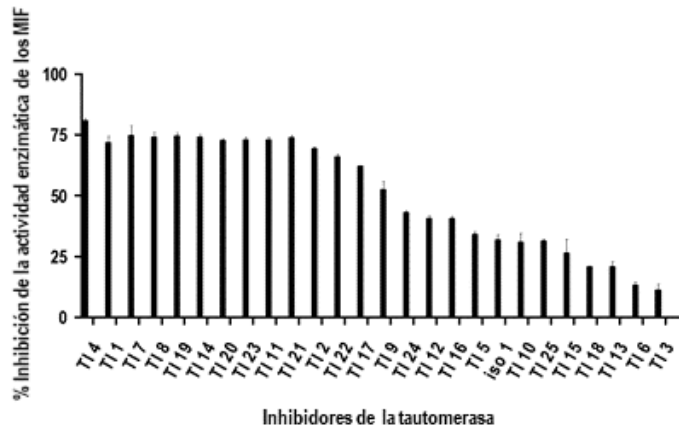
o una sal farmacéuticamente aceptable o un hidrato del mismo.

12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 11, que tiene la fórmula:



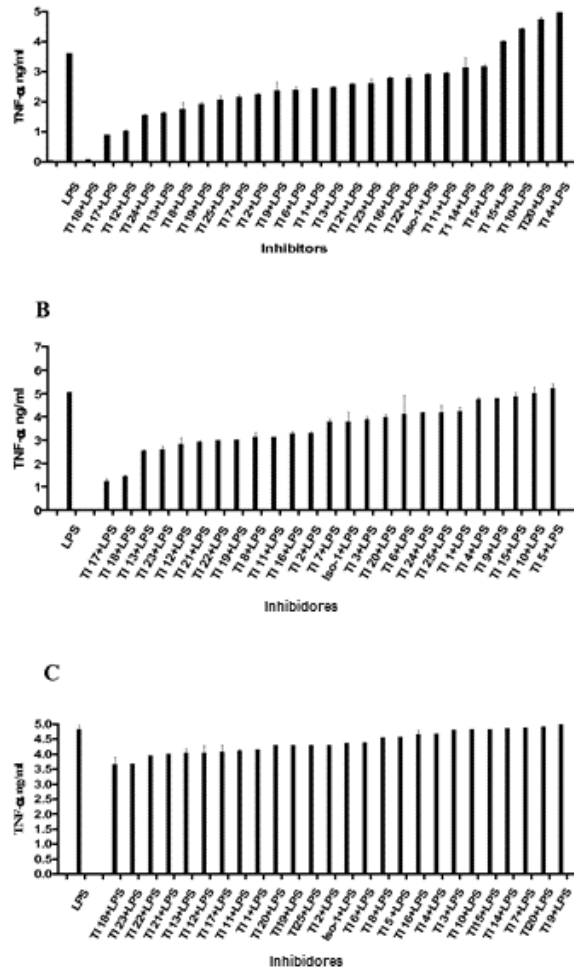
o una sal farmacéuticamente aceptable o un hidrato del mismo.

- 5 13. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 15. Un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en: cáncer pulmonar, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de cuello de útero de células escamosas, cáncer de páncreas, glioblastomas, cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y melanoma maligno, cáncer gástrico, glioma y cáncer nasofaríngeo.



**Figura 1:** Inhibición de la actividad enzimática de la tautomerasa de MIF

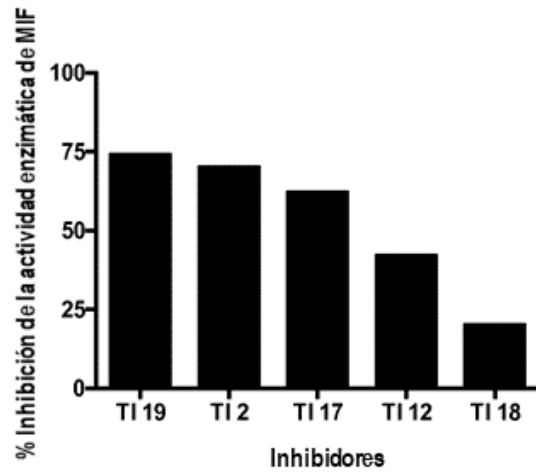
Se calculó la inhibición como la reducción de la tasa de cambio de la reacción de la tautomerasa con la adición del inhibidor promediada durante cinco minutos.



**Figura 2:** La inhibición de LPS indujo la producción de TNF- $\alpha$

**A** Células RAW macrófagas se sembraron en placas a  $1 \times 10^5$  por pocillo y se pretrataron con los inhibidores a  $100 \mu\text{M}$  durante 30 minutos antes de la estimulación con  $100 \text{ ng/ml}$  de LPS. Tras 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron para determinar los niveles de TNF- $\alpha$  usando un kit ELISA de TNF- $\alpha$ . **B** Las células Raw se pretrataron con  $50 \mu\text{M}$  de cada inhibidor 30 minutos antes de la estimulación con LPS y los sobrenadantes se evaluaron tras 16 horas para determinar el nivel de TNF- $\alpha$ . **C** Las células RAW se pretrataron con  $10 \mu\text{M}$  de inhibidores de la tautomerasa 30 minutos antes de la estimulación con LPS. Los datos se presentan como media y SEM (n=6).





**Figura 3:** Inhibición de la actividad enzimática de la tautomerasa de MIF de 5 compuestos ilustrativos

La inhibición observada con 100 ng/ml de MIF con su sustrato L-dopacromo incubado con cada uno de los inhibidores a 100  $\mu$ M se midió con un espectrofotómetro durante 20 minutos.

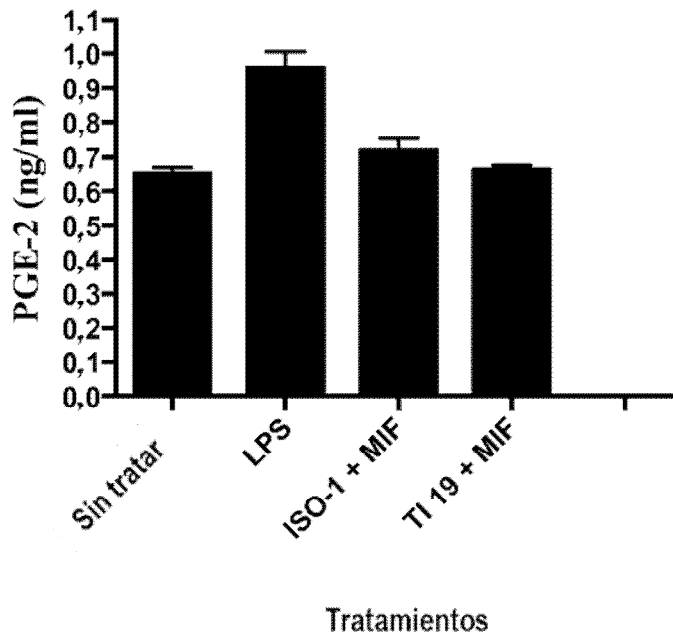
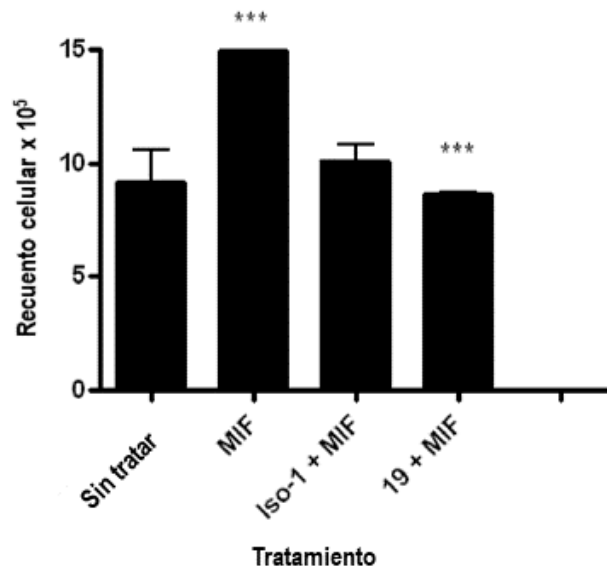


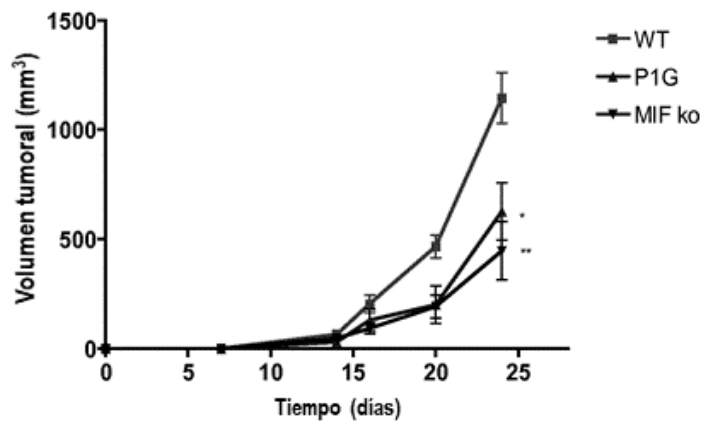
Figura 4: Inhibición de MIF inducida por PGE-2.

Las células RAW macrófagas se sembraron en placas a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  por pocillo y se pretrataron con cuatro de los inhibidores de la tautomerasa y a continuación se trataron con 100 ng/ml de LPS durante la noche a 37 °C en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células RAW se trataron con 100  $\mu$ M de inhibidores como se ha indicado. Los sobrenadantes se evaluaron usando el kit ELISA PGE-2. También se incluyó ISO-1, el inhibidor de MIF comercialmente disponible. ( $p < 0,05$ ,  $p > 0,01$ , Los datos se presentan como media y SEM (n=6)).



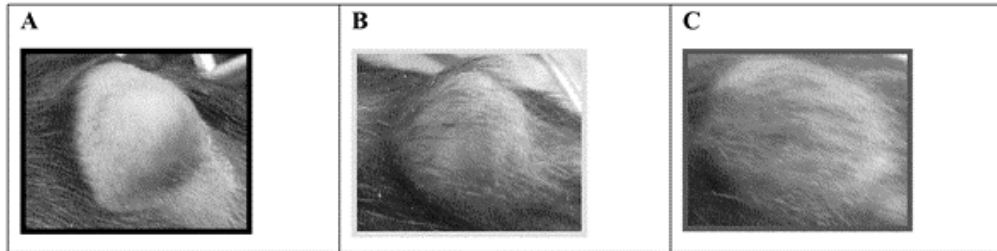
**Figura 5:** La inhibición de la actividad enzimática de MIF reduce la proliferación celular.

100 ng/ml de rMIF promueve significativamente la proliferación de LLC en comparación con las células LLC sin tratar. La proliferación se inhibe significativamente en presencia de 100  $\mu$ M de TI 19, pero menos que en presencia de ISO-1. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , Los datos se presentan como media + SEM, n=6)

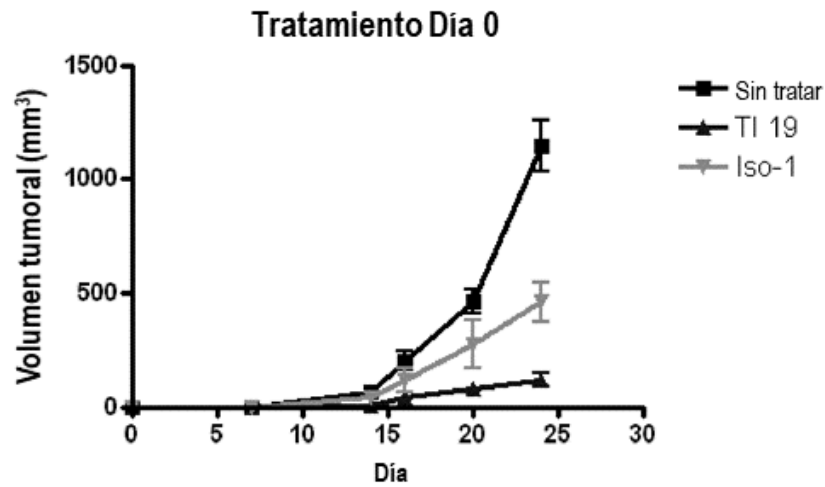


**Figura 6:** El volumen tumoral de células de Lewis pulmonares es significativamente menor en ratones MIF-KO y MIF-P1G en comparación con los silvestres.

Se inyectaron células de Lewis de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 WT, ratones P1G y MIF KO. Las mediciones de calibre se tomaron dos veces semanalmente y el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) se calculó como  $0,5 \times L \times W^2$  ( $n=4$ ).

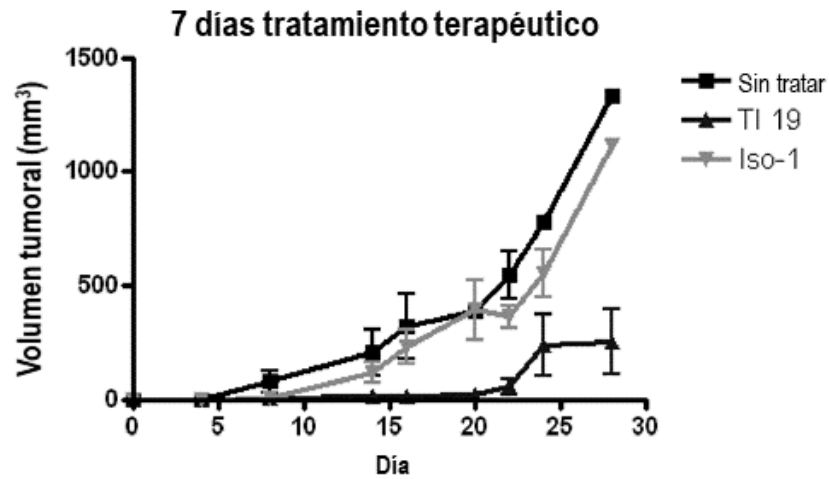


**Figura 7** muestra la apariencia gruesa de tumores subcutáneos. Apariencia de los tumores subcutáneos en el día 24 del modelo. **(A)** No tratado **(B)** vehículo DMSO al 5%; y **(C)** tratamiento con TI 19 (35 mg/kg).



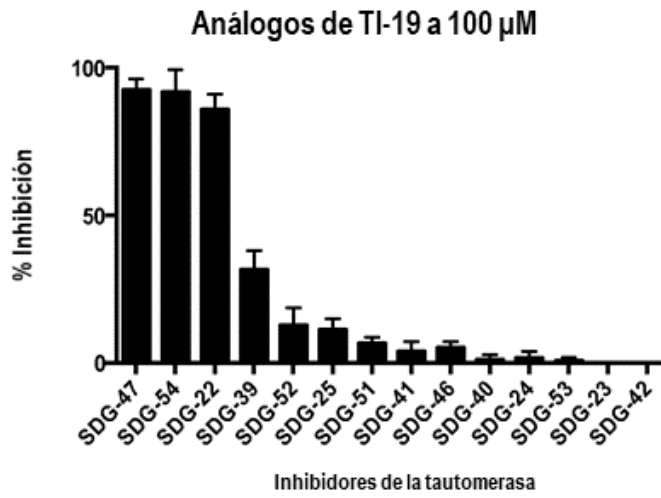
**Figura 8:** La inhibición de la actividad de la tautomerasa de MIF atenúa el crecimiento tumoral.

Se inyectaron células de Lewis de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6. Se inyectaron los animales por vía intraperitoneal 30 min antes de la inoculación del tumor y dos veces a la semana posteriormente, con 35 mg/kg de TI (inhibidor de la tautomerasa solubilizado en DMSO) o como se ha indicado. Se tomaron mediciones con el calibre dos veces a la semana y se calculó el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) como  $0,5 \times L \times W^2$ . (\*\* $p < 0,01$ ,  $n=4$ ).



**Figura 9:** La inhibición de la actividad de la tautomerasa de MIF atenúa el crecimiento tumoral.

Se inyectaron células de Lewis de carcinoma de pulmón ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6. Una vez que el tumor ha llegado a ser palpable en el flanco del ratón (7-8 días después de la inoculación), se inyectaron los animales por vía intraperitoneal y dos veces a la semana posteriormente, con 35 mg/kg de TI (inhibidor de la tautomerasa solubilizado en DMSO) o como se ha indicado. Se tomaron mediciones con el calibre dos veces a la semana y se calculó el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) como  $0,5 \times L \times W^2$ . (\*\*p < 0,01, n=4).



**Figura 10:** Inhibición de la actividad enzimática de la tautomerasa de MIF.

Se calculó la inhibición como la reducción de la tasa de cambio de la reacción de la tautomerasa con la adición del inhibidor promediada durante cinco minutos.



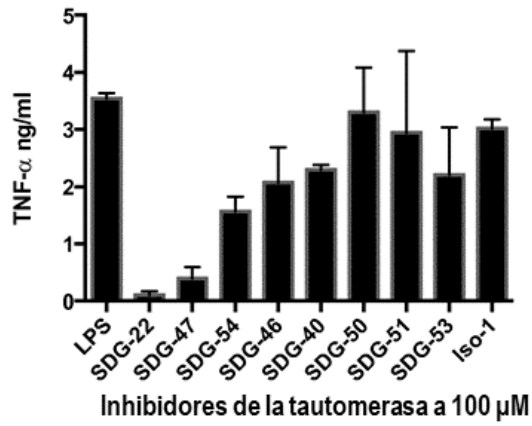


Figura 11: La inhibición de LPS indujo la producción de TNF- $\alpha$ .

Células RAW macrófagas se sembraron en placas a  $1 \times 10^5$  por pocillo y se pretrataron con los inhibidores a  $100 \mu\text{M}$  durante 30 minutos antes de la estimulación con  $100 \text{ ng/ml}$  de LPS. Tras 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron para determinar los niveles de TNF- $\alpha$  usando un kit ELISA de TNF- $\alpha$ .