



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 780 693

51 Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) A61K 31/397 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01) A61K 31/439 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

A61K 31/439 (2006.01) A
A61K 31/445 (2006.01)
C07D 205/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 14.03.2014 PCT/US2014/027347

(87) Fecha y número de publicación internacional: 25.09.2014 WO14152444

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 14.03.2014 E 14717027 (8)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 12.02.2020 EP 2968251

54 Título: Inhibidores de la histona deacetilasa

(30) Prioridad:

15.03.2013 US 201313843261

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: **26.08.2020**

(73) Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%) 105 Digital Drive Novato, CA 94949, US

(72) Inventor/es:

JACQUES, VINCENT; RUSCHE, JAMES, R.; PEET, NORTON, P. y SINGH, JASBIR

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la histona deacetilasa

5 Campo técnico

10

30

35

40

45

60

En la presente descripción se proporcionan compuestos que tienen una estructura de Fórmula (II) como se describe a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y dichos compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en la inhibición de enzimas histona deacetilasa ("HDAC") (por ejemplo, HDAC1, HDAC2, y HDAC3).

Antecedentes

Hasta la fecha, se han identificado 18 HDAC en humanos y hay cada vez más pruebas de que las 18 histona deacetilasas (HDAC) en humanos no tienen una función redundante. Las HDAC se clasifican en tres grupos principales según su homología con las proteínas de levadura. La clase I incluye HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8 y tiene homología con la levadura RPD3. HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9 pertenecen a la clase IIa y tienen homología con la levadura HDAC1. HDAC6 y HDAC 10 contienen dos sitios catalíticos y se clasifican como clase IIb, mientras que HDAC11 ha conservado residuos en su centro catalítico que comparten las deacetilasas de clase I y clase II y se coloca en clase IV. Estas HDAC contienen zinc en su sitio catalítico y son inhibidas por compuestos como la tricostatina A (TSA) y el vorinostat [ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA)]. Las HDAC de clase III se conocen como sirtuinas. Tienen homología con la levadura Sir2, requieren NAD+ como cofactor y no contienen zinc en el sitio catalítico. En general, los inhibidores de la HDAC de las HDAC dependientes de zinc incluyen un grupo de unión a Zn, así como un dominio de reconocimiento de superficie.

Las HDAC están involucradas en la regulación de una serie de procesos celulares. Las histona acetilatransferasas (HAT) y las HDAC acetilan y desacetilan los residuos de lisina en el extremo N de las proteínas histona, lo que afecta la actividad transcripcional. También se ha demostrado que regulan la acetilación postraduccional de al menos 50 proteínas que no son histonas, como la α-tubulina (véase, por ejemplo, Kahn, N y otros, Biochem J 409 (2008) 581, Dokmanovic, M y otros, Mol Cancer Res 5 (2007) 981).

La alteración de la expresión génica a través de la modificación de la cromatina se puede lograr inhibiendo las enzimas histona deacetilasa (HDAC). Existe evidencia de que la acetilación y desacetilación de histonas son mecanismos por los cuales se logra la regulación transcripcional en una célula, un evento importante en la diferenciación, proliferación y apoptosis celular. Se ha planteado la hipótesis de que estos efectos ocurren a través de cambios en la estructura de la cromatina al alterar la afinidad de las proteínas histonas por el ADN en espiral en el nucleosoma. Se cree que la hipoacetilación de proteínas de histona aumenta la interacción de la histona con la cadena principal de fosfato de ADN. Una unión más estrecha entre la proteína histona y el ADN puede hacer que el ADN sea inaccesible para los elementos y maquinaria reguladores de la transcripción. Se ha demostrado que las HDAC catalizan la eliminación de grupos acetilo de los grupos ε-amino de los residuos de lisina presentes en la extensión N-terminal de las histonas nucleares, lo que conduce a la hipoacetilación de las histonas y al bloqueo de la maquinaria transcripcional y los elementos reguladores.

La inhibición de la HDAC, por lo tanto, puede conducir a la desrepresión transcripcional mediada por histona deacetilasa de genes supresores de tumores. Por ejemplo, las células tratadas en cultivo con inhibidores de la HDAC han mostrado una inducción constante del inhibidor de quinasa p21, que desempeña un papel importante en la detención del ciclo celular. Se cree que los inhibidores de la HDAC aumentan la velocidad de transcripción de p21 al propagar el estado hiperacetilado de las histonas en la región del gen p21, lo que hace que el gen sea accesible a la maquinaria transcripcional. Además, las proteínas no histonas implicadas en la regulación de la muerte celular y el ciclo celular también se someten a acetilación y desacetilación de lisina por las HDAC y la histona acetil transferasas (HAT).

Esta evidencia respalda el uso de inhibidores de la HDAC en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Por ejemplo, el vorinostat (ácido hidroxámico suberoilanilida (SAHA)) ha sido aprobado por la FDA para tratar el linfoma cutáneo de células T y se está investigando para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos. Además, se están desarrollando otros inhibidores de la HDAC para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda, la enfermedad de Hodgkin, los síndromes mielodisplásicos y los cánceres de tumor sólido.

También se ha demostrado que los inhibidores de la HDAC inhiben las citocinas proinflamatorias, como las involucradas en trastornos autoinmunes e inflamatorios (por ejemplo, TNF-α). Por ejemplo, se demostró que el inhibidor de la HDAC MS275 ralentiza la progresión de la enfermedad y la destrucción articular en la artritis inducida por colágeno en modelos de ratas y ratones. Se ha demostrado que otros inhibidores de la HDAC tienen eficacia para tratar o mejorar trastornos o afecciones inflamatorias en modelos *in vivo* o pruebas para trastornos como la enfermedad de Crohn, colitis e inflamación e hiperreactividad de las vías respiratorias. También se ha demostrado que los inhibidores de la HDAC mejoran la inflamación de la médula espinal, la desmielinización y la pérdida neuronal y axonal en la encefalomielitis autoinmune experimental (véase, por ejemplo, Wanf L y otros, Nat Rev Drug Disc 8 (2009) 969).

La expansión de repetición de tripletes en el ADN genómico se asocia con muchas afecciones neurológicas (por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares), incluyendo distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, síndrome

X frágil, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Kennedy, atrofia muscular espinal y bulbar, ataxia de Friedreich y enfermedad de Alzheimer. La expansión de repetición de tripletes puede causar enfermedad al alterar la expresión génica. Por ejemplo, en la enfermedad de Huntington, las ataxias espinocerebelosas, el síndrome X frágil y la distrofia miotónica, las repeticiones expandidas conducen al silenciamiento génico. En la ataxia de Friedreich, la anormalidad del ADN que se encuentra en el 98% de los pacientes con FRDA es una hiperexpansión inestable de una repetición del triplete GAA en el primer intrón del gen de la frataxina (véase Campuzano y otros, Science 271: 1423 (1996)), que conduce a la insuficiencia de frataxina que resulta en una neurodegeneración espinocerebelosa progresiva. Como pueden afectar la transcripción y la desregulación transcripcional potencialmente correcta, los inhibidores de la HDAC han sido probados y han demostrado que afectan positivamente las enfermedades neurodegenerativas (ver Herman D y otros, Nat Chem Bio 2 551 (2006) para la ataxia de Friedreich, Thomas EA y otros, Proc Natl Acad Sci USA 105 15564 (2008) para la enfermedad de Huntington).

Los inhibidores de la HDAC también pueden desempeñar un papel en las afecciones y enfermedades relacionadas con la cognición. De hecho, se ha vuelto cada vez más evidente que la transcripción es probablemente un elemento clave para los procesos de memoria a largo plazo (Alberini CM, Physiol Rev 89 121 (2009)), destacando así otro papel para los inhibidores de HDAC penetrantes del SNC. Aunque los estudios han demostrado que el tratamiento con inhibidores inespecíficos de HDAC como el butirato de sodio puede conducir a la formación de memoria a largo plazo (Stefanko DP y otros, Proc Natl Acad Sci USA 106 9447 (2009)), se sabe poco sobre el papel de las isoformas específicas. Un número limitado de estudios ha demostrado que, dentro de las HDAC de clase I, objetivo principal del butirato de sodio, el inhibidor prototípico utilizado en los estudios de cognición, HDAC2 (Guan JS y otros, Nature 459 55 (2009)) y HDAC3 (McQuown SC y otros, J Neurosci 31 764 (2011)) ha demostrado que regula los procesos de memoria y, como tal, son objetivos interesantes para la mejora o extinción de la memoria en afecciones que afectan la memoria, como la enfermedad de Alzheimer, el trastorno de estrés postraumático o la adicción a las drogas.

- Los inhibidores de la HDAC también pueden ser útiles para tratar enfermedades infecciosas como las infecciones virales. Por ejemplo, el tratamiento de células infectadas por VIH con inhibidores de la HDAC y medicamentos antirretrovirales puede erradicar el virus de las células tratadas (Blazkova j y otros, J Infect Dis. 1 de sept. de 2012; 206 (5): 765-9; Archin NM y otros, Nature 25 de julio de 2012, 487(7408):482-5).
- 30 El documento WO 2012/118782 se refiere a la inhibición general de las enzimas HDAC.

Resumen

10

15

20

35

En un aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

40 Het R^C (II),

en donde R^A es H o F; R^C es H, Cl o F; Het es piperidinilo, y el nitrógeno del anillo está sustituido con R^B; R^B es alquilo C1-C6, hidroxialquilo C1-C6, o alquileno C1-C3-cicloalquilo C3-C6.

En un aspecto adicional, se presentan compuestos de Fórmula (II) específicamente descritos en la presente descripción (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos) (por ejemplo, compuestos **F8, F13, F14 y F15**).

En un aspecto, se presenta una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica), que incluye un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición puede incluir una cantidad efectiva del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición puede incluir además un agente terapéutico adicional.

En otro aspecto, se presenta una forma de dosificación, que incluye de aproximadamente 0,05 miligramos a aproximadamente 2000 miligramos (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 1000 miligramos, de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 500 miligramos, de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 100 miligramos, de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 25 miligramos a aproximadamente 25 miligramos) de un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción. La forma de dosificación puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un agente terapéutico adicional.

65

60

50

En la presente descripción se proporciona un compuesto de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en cualquier parte de la presente descripción para su uso en la inhibición de una (o más) HDAC (por ejemplo, HDAC1 o HDAC2; por ejemplo, HDAC3) o más de una HDAC (por ejemplo, HDAC1 y HDAC2; por ejemplo, HDAC3; por ejemplo, HDAC3; por ejemplo, HDAC3; por ejemplo, HDAC3; por ejemplo, HDAC3, por ejemplo, HDAC3). En algunas realizaciones, los usos pueden incluir, por ejemplo, poner en contacto una (o más) HDAC (por ejemplo, HDAC1 o HDAC2; por ejemplo, HDAC3) en una muestra (por ejemplo, una célula o tejido) con un compuesto de Fórmula (II) o un sal farmacéuticamente aceptable de los mismos como se define en cualquier parte de la presente descripción. En otras realizaciones, los usos pueden incluir la administración de un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en cualquier parte de la presente descripción a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, como un humano). Por consiguiente, en otro aspecto más, se proporciona un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en cualquier parte de la presente descripción para usar en la detección de compuestos que inhiben (por ejemplo, inhiben selectivamente) una o más HDAC (por ejemplo, HDAC1 o HDAC2; por ejemplo, HDAC3, por ejemplo, HDAC1, HDAC2 y HDAC3).

15

20

10

En un aspecto, se presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción para usar en la inhibición selectiva de HDAC3, que incluye poner en contacto una HDAC3 en una muestra (por ejemplo, una célula o tejido) con un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se define en cualquier parte de la presente descripción; o administrar un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en cualquier parte de la presente descripción a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano).

25

En un aspecto, se presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción para usar en la inhibición selectiva de la HDAC1 o HDAC2 (por ejemplo, HDAC1), que incluye poner en contacto la HDAC1 o HDAC2 (por ejemplo, HDAC1) en una muestra (por ejemplo, una célula o tejido) con un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción; o administrar un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en cualquier parte de la presente descripción a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano).

30

En un aspecto, se presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en la presente descripción para su uso en la inhibición selectiva de HDAC1, HDAC2 y HDAC3, que incluye poner en contacto la HDAC1, HDAC2 y HDAC3 en una o más muestras (por ejemplo, una célula o tejido) con un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción; o administrar un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en cualquier parte de la presente descripción a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano).

35

En un aspecto, un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción para su uso en el tratamiento (por ejemplo, control, disminución, mejora, alivio o desaceleración de la progresión) o la prevención (por ejemplo, retrasar el inicio o reducir el riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno mediado por la HDAC1 o HDAC2 en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, como un ser humano) que lo necesite, que incluye la administración de un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción al sujeto.

45

40

En un aspecto, un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción para su uso en el tratamiento (por ejemplo, control, disminución, mejora, alivio o desaceleración de la progresión) o la prevención (por ejemplo, retrasar el inicio o reducir el riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno mediado por la HDAC3 en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, como un ser humano) que lo necesita, que incluyen la administración de un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se define en la presente descripción al sujeto.

50

En un aspecto, un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción para su uso en el tratamiento (por ejemplo, control, disminución, mejora, alivio o desaceleración de la progresión) o la prevención (por ejemplo, retrasar el inicio o reducir el riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno mediado por dos o más HDAC (por ejemplo, HDAC1 y HDAC2; por ejemplo, HDAC1 y HDAC3; por ejemplo, HDAC2 o HDAC3; por ejemplo, HDAC1, HDAC2 y HDAC 3) en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, como un ser humano) que lo necesita, que incluye la administración de un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en la presente descripción al sujeto.

60

65

55

En un aspecto, se presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción para su uso en el tratamiento (por ejemplo, control, disminución, mejora, alivio o desaceleración de la progresión de) o la prevención (por ejemplo, retrasar el inicio o reducir el riesgo de desarrollar) un trastorno neurológico como ataxia de Friedreich, distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, síndrome X frágil, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Kennedy, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal y bulbar y enfermedad de Alzheimer; un cáncer (por ejemplo, linfoma cutáneo de células T, linfomas de células B y cáncer colorrectal); una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, psoriasis, artritis reumatoide y osteoartritis);

una afección de deterioro de la memoria; trastorno de estrés postraumático; una adicción a las drogas; una infección por *Plasmodium falciparum* (por ejemplo, malaria), así como otras infecciones parasitarias en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, como un ser humano) que lo necesite, que incluye la administración de un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción al sujeto.

En un aspecto, se presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción para su uso en medicina.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un sujeto identificado como que necesita dicho tratamiento, como un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una o más de las enfermedades o afecciones descritas en la presente descripción). La identificación de un sujeto que necesita dicho tratamiento puede ser a juicio de un sujeto o un profesional de la salud y puede ser subjetiva (por ejemplo, opinión) u objetiva (por ejemplo, medible por un método de prueba o diagnóstico). En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un mamífero. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un humano.

En un aspecto, se presentan los métodos para fabricar los compuestos descritos en la presente descripción. En las realizaciones, los métodos incluyen tomar uno cualquiera de los compuestos intermedios descritos en la presente descripción y hacer que reaccione con uno o más reactivos químicos en una o más etapas para producir un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en cualquier parte de la presente descripción.

Algunos de los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción tienen mayor estabilidad (por ejemplo, aumentada, por un factor de aproximadamente 2 o más) en ácido. En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (II) tienen resistencias mejoradas a la degradación, por ejemplo, menos de aproximadamente 25% de degradación (por ejemplo, menos de aproximadamente 10% de degradación) cuando se exponen a pH ácido, por ejemplo, condiciones ácidas destinadas a imitar a las del estómago, por ejemplo, incubación (por ejemplo, como una solución de 10 µM) a 50 °C y a un pH de aproximadamente 2,0 durante aproximadamente cuatro horas. La resistencia de los compuestos a la degradación o al metabolismo a pH ácido puede ser una característica útil para un agente farmacéutico (por ejemplo, un fármaco). El aumento de la estabilidad a pH bajo puede permitir, por ejemplo, que ocurran las etapas de preparación del proceso, como la formación de sal, sin una degradación significativa de la sal deseada. Además, es preferible que los productos farmacéuticos administrados por vía oral sean estables al pH ácido del estómago. En algunas realizaciones, los compuestos muestran una estabilidad mejorada cuando se exponen a pH ácido con vidas medias de estabilidad superiores a, por ejemplo, 12 h o, por ejemplo, 18 h o, por ejemplo, 24 h a pH 2 y 50 °C.

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción inhiben selectivamente la HDAC3, por ejemplo, inhiben selectivamente la HDAC3 sobre HDAC1 y HDAC2 (por ejemplo, exhiben una selectividad de 5 veces o mayor). Si bien no desea limitarse a la teoría, se cree que los inhibidores selectivos de la HDAC3 pueden aumentar la expresión de frataxina y, por lo tanto, podrían ser útiles en el tratamiento de afecciones neurológicas (por ejemplo, afecciones neurológicas asociadas con una expresión reducida de frataxina, como la ataxia de Friedreich). También se cree que la inhibición de la HDAC3 juega un papel importante en la consolidación de la memoria (McQuown SC y otros, J Neurosci 31 764 (2011)). Los inhibidores selectivos de la HDAC3 podrían proporcionar ventajas para el tratamiento de afecciones neurológicas sobre el uso de inhibidores de HDAC de amplio espectro al reducir las toxicidades asociadas con la inhibición de otras HDAC. Tales inhibidores específicos de la HDAC3 proporcionarían un índice terapéutico más alto, resultando en una mejor tolerancia por parte de los pacientes durante el tratamiento crónico o a largo plazo.

En algunas realizaciones adicionales, los compuestos inhiben selectivamente la HDAC1 y/o la HDAC2 (por ejemplo, exhibiendo una selectividad de 5 veces o más, por ejemplo, exhibiendo una selectividad de 25 veces o más). La inhibición de la HDAC1 y/o 2 puede ser útil en el tratamiento del cáncer u otra enfermedad como se describe en la presente descripción.

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente inhiben las HDAC1, HDAC2 y HDAC3. Si bien no desea limitarse a la teoría, se cree que los inhibidores selectivos de la HDAC3 pueden aumentar la expresión de frataxina y, por lo tanto, podrían ser útiles en el tratamiento de afecciones neurológicas (por ejemplo, Afecciones neurológicas asociadas con una expresión reducida de frataxina, como la ataxia de Friedreich) y en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas generadas a partir de la línea celular de pacientes con ataxia de Friedreich.

En algunas realizaciones, se ha demostrado que los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción inhiben las histonas deacetilasas de clase I y esta inhibición ha dado como resultado un aumento in vitro de la expresión de ARNm de frataxina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente con ataxia de Friedreich. En otras realizaciones, los compuestos descritos en la presente descripción han demostrado inhibir la proliferación in vitro de células de cáncer colorrectal de una manera dependiente de la dosis. En realizaciones adicionales, se ha demostrado que los compuestos descritos en la presente descripción aumentan la memoria a largo plazo in vivo usando el nuevo paradigma de reconocimiento de objetos.

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción exhiben una penetración cerebral mejorada. Por ejemplo, se observan relaciones cerebro/plasma de más de aproximadamente 0,25 (por ejemplo, más de aproximadamente 0,50, más de aproximadamente 1,0, más de aproximadamente 1,5, o más de aproximadamente 2,0) cuando los ratones reciben una dosis de los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción. Por lo tanto, se espera que tales compuestos sean particularmente adecuados para terapias dirigidas al cerebro (por ejemplo, afecciones neurológicas como ataxia de Friedreich, distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, síndrome X frágil, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Kennedy, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal y bulbar y enfermedad de Alzheimer; una afección de deterioro de la memoria; trastorno de estrés postraumático; una adicción a las drogas).

10

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción inhiben selectivamente la HDAC3, por ejemplo, inhiben selectivamente la HDAC3 sobre HDAC1 y HDAC2 (por ejemplo, exhiben una selectividad de 5 veces o más, por ejemplo, exhiben una selectividad de 25 veces o más) y exhiben una penetración cerebral mejorada (por ejemplo, como se describió anteriormente).

15

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción inhiben selectivamente la HDAC1 y/o la HDAC2, por ejemplo, inhiben selectivamente la HDAC1 y/o HDAC2 sobre HDAC3 (por ejemplo, exhiben una selectividad de 5 veces o más, por ejemplo, exhiben una selectividad de 25 veces o más) y exhiben una penetración cerebral mejorada (por ejemplo, como se describe anteriormente).

20

Definiciones

El término "hepatocito" se refiere a preparaciones disponibles comercialmente de células derivadas de tejido hepático que pueden obtenerse a partir de tejido hepático de ratón, rata, perro, mono o humano.

25

El término "mamífero" incluye organismos, que incluyen ratones, ratas, vacas, ovejas, cerdos, conejos, cabras, caballos, monos, perros, gatos y humanos.

30

"Una cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto que confiere un efecto terapéutico (por ejemplo, trata, por ejemplo, controla, disminuve, mejora, alivia o ralentiza la progresión de: o previene, por ejemplo, retrasa la aparición o reduce el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección o síntomas del mismo) en el sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). Una cantidad eficaz del compuesto descrito anteriormente puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg). Las dosis efectivas también variarán según la vía de administración, así como la posibilidad de uso conjunto con otros agentes.

35

El término "halo" o "halógeno" se refiere a cualquier radical de flúor, cloro, bromo o yodo.

40

En general, y a menos que se indique lo contrario, los nombres de los prefijos de los sustituyentes (radicales) se derivan del hidruro original ya sea por (i) reemplazando el "ano" en el hidruro principal con el sufijo "ilo"; o (ii) reemplazar la "o" en el hidruro original con el sufijo "ilo"; (aquí, el (los) átomo(s) con la valencia libre, cuando se especifica, es(son) números tan bajos como sea consistente con cualquier numeración establecida del hidruro original). Los nombres contratados aceptados, por ejemplo, furilo, piridilo y piperidilo, y los nombres triviales, por ejemplo, fenilo y tienilo también se usan en la presente en todo el documento. Los sistemas de numeración/letras convencionales también se cumplen para la 45 numeración de sustituyentes.

50

Se utilizan las siguientes definiciones, a menos que se describa lo contrario. Los valores específicos y generales que se enumeran a continuación para radicales, sustituyentes e intervalos, son solo ilustrativos; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de intervalos definidos para los radicales y sustituyentes. Alquilo, alcoxi, denota tanto grupos lineales como ramificados.

55

Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado que puede ser de cadena lineal o ramificada. En algunas realizaciones, el grupo alquilo contiene 1 a 12. 1 a 8 o 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de restos alquilo incluyen, pero no se limitan a. grupos químicos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, isobutilo, sec-butilo; homólogos superiores tales como 2-metil-1-butilo, n-pentilo, 3-pentilo, n-hexilo, 1,2,2-trimetilpropilo, n-heptilo, n-octilo. En algunas realizaciones, el resto alquilo es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo o 2,4,4-trimetilpentilo.

60

A lo largo de las definiciones, se usa el término "Cy-Cz" (por ejemplo, C1-C6), en donde y z son enteros e indican el número de carbonos, en donde y-z indica un intervalo que incluye los puntos finales.

65

Como se menciona en la presente, el término "grupo alcoxi" se refiere a un grupo de fórmula O(alquilo). Alcoxi puede ser, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi, pentoxi, 2-pentoxi, 3-pentoxi o hexiloxi.

Como se usa en la presente descripción, el término "arilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un resto hidrocarbonado aromático monocíclico o un resto hidrocarbonado policíclico (por ejemplo, que tiene 2, 3 o 4 anillos unidos fusionados) que incluye al menos un aromático anillo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, indanilo y tetralinilo. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de 6 a 10 átomos de carbono.

5

10

15

30

35

Como se menciona en la presente, "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático monocíclico o bicíclico fusionado que incluye al menos un anillo aromático, cada uno de los cuales contiene al menos uno (típicamente uno a aproximadamente tres) átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo (seleccionados independientemente cuando hay más de uno presente). Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, piridilo, pirazolilo, pirrolilo, 2-oxo-indolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidro-isoquinolinilo, benzofuranilo, indolilo, benzodioxanilo, benzodioxolilo (también conocido como metilendioxifenilo) y análogo de difluoro (CF2) correspondiente, tiazolilo, 2-oxopiridinilo, N-óxido de piridinilo, pirimidinilo, tienilo, furanilo, oxazolilo, isoxazolilo, piridazinilo, imidazolilo, pirazinilo, isotiazolilo, 1,2-tiazinilo-1,1dióxido, bencimidazolilo, tiadiazolilo, benzopiranilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzoxazolilo, benzotienilo, oxadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, dioxoindolilo (isatina), ftalimido: heteroarilos que contienen un átomo de nitrógeno de cabeza de puente en el anillo y opcionalmente otros átomos heteroátomos en el anillo, tales como indolizinilo, pirazolopiridinilo, imidazopiridinilo, imidazopiriazinilo, triazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo, imidazotiazolilo. imidazooxazolilo); y los congéneres dihidro y tetrahidro de los sistemas de anillos completamente insaturados.

Como se usa en la presente descripción, la frase "opcionalmente sustituido" significa no sustituido (por ejemplo, sustituido con un H) o sustituido. Como se usa en la presente descripción, el término "sustituido" significa que un átomo de hidrógeno se elimina y se reemplaza por un sustituyente. Se entiende que la sustitución en un átomo dado está limitada por la valencia. El uso de un nombre de prefijo de sustituyente (radical) tal como alquilo sin el modificador "opcionalmente sustituido" o "sustituido" se entiende que significa que el sustituyente particular no está sustituido. Sin embargo, se entiende que el uso de "fluoro alquilo Cy-Cz" sin el modificador "opcionalmente sustituido" o "sustituido" significa un grupo alquilo, en el que al menos un átomo de hidrógeno está reemplazado por flúor.

A menos que se indique lo contrario, se llega a la nomenclatura de los sustituyentes que no se definen explícitamente en la presente descripción nombrando la parte terminal de la funcionalidad seguida de la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. En general, el punto de unión para un sustituyente está indicado por el último término en el grupo. Por ejemplo, (heterociclil)-alquilo(C1-C6) se refiere a un resto de heteroaril-alquileno, en el que el conector alquileno tiene de 1 a 6 carbonos, y el sustituyente está unido a través del conector alquileno.

Como se usa en la presente descripción, el término "cicloalquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un resto de hidrocarburo cíclico saturado. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "ciano", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de fórmula -CN, en el que los átomos de carbono y nitrógeno están unidos por un triple enlace.

- Como se usa en la presente descripción, el término "haloalquilo Cy-Cz" empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo alquilo que tiene de un átomo de halógeno a 2n+1 átomos de halógeno que pueden ser iguales o diferentes, donde "n" es el número de átomos de carbono en el grupo alquilo. En algunas realizaciones, los átomos de halógeno son átomos de flúor.
- Como se usa en la presente descripción, "haloalcoxi", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de fórmula -O-haloalquilo. Un ejemplo de grupo haloalcoxi es OCF₃. En algunas realizaciones, los átomos de halógeno son átomos de flúor.
- Como se usa en la presente descripción, el término "heterociclilo" empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un sistema de anillo saturado, que tiene átomos de carbono en el anillo y al menos un átomo de heteroátomo en el anillo seleccionado de nitrógeno, azufre y oxígeno (seleccionado independientemente cuando más de uno está presente). Cuando el grupo heterociclilo contiene más de un heteroátomo, los heteroátomos pueden ser iguales o diferentes. Los grupos heterociclilo pueden incluir sistemas de anillos mono o bicíclicos (por ejemplo, que tienen 2 anillos fusionados). Los grupos heterociclilo también pueden incluir grupos heterocicloalquilo cabeza de puente. Como se usa en la presente descripción, "grupo heterociclilo cabeza de puente" se refiere a un resto heterociclilo que contiene al menos un heteroátomo cabeza de puente (por ejemplo, nitrógeno). En algunas realizaciones, los átomos de carbono o hetereoátomos en el o los anillos del grupo heterocicloalquilo pueden oxidarse para formar un grupo carbonilo o sulfonilo (u otro enlace oxidado) o un átomo de nitrógeno puede cuaternizarse.
- 60 En cuanto a cualquiera de los grupos anteriores que contienen uno o más sustituyentes, se entiende, por supuesto, que dichos grupos no contienen ninguna sustitución o patrón de sustitución que sea estéricamente poco práctico y/o sintéticamente inviable. Además, los compuestos descritos en la presente descripción incluyen todos los isómeros estereoquímicos que surgen de la sustitución de estos compuestos.
- A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente descripción tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes

a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o en las pruebas, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

5 Otras características y ventajas serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Se aprecia que ciertas características de la descripción, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. A la inversa, varias características descritas que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Por lo tanto, para facilitar la exposición, también se entiende que cuando en esta descripción, un grupo se define por "como se define en cualquier parte de la presente descripción", las definiciones para ese grupo particular incluyen la primera definición genérica más amplia existente, así como cualquier definición subgenérica y específica delineadas en cualquier parte de esta descripción. Además, para facilitar la exposición, la definición "sustituyente distinto al hidrógeno" se refiere colectivamente a las posibilidades que no son de hidrógeno para esa variable en particular.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra el efecto de los compuestos en la memoria a largo plazo para el reconocimiento de objetos. Los datos se presentan como índice de discriminación entre un objeto conocido y novedoso en función del compuesto y la dosis. En el grupo de barras más a la izquierda, las dosis representadas de izquierda a derecha son (0, 3, 10, 30 mg/kg); en el grupo de barras del centro y más a la derecha, las dosis representadas de izquierda a derecha son (3, 10, 30 mg/kg).

Descripción detallada

10

15

25

30

35

40

45

50

55

Los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden existir como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Aunque se muestra independientemente a la estereoquímica en la Fórmula (II), la presente descripción incluye tales isómeros ópticos (enantiómeros) y diastereómeros; así como los estereoisómeros R y S enantioméricamente puros racémicos y resueltos; así como otras mezclas de los estereoisómeros R y S y sus sales farmacéuticamente aceptables. El uso de estos compuestos está destinado a cubrir la mezcla racémica o cualquiera de los enantiómeros quirales.

Los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción también pueden contener enlaces (por ejemplo, enlaces carbono-carbono, enlaces carbono-nitrógeno tales como enlaces amida) en los que la rotación de enlaces está restringida respecto a ese enlace particular, por ejemplo, restricción resultante de la presencia de un anillo o doble enlace. Por consiguiente, todos los isómeros cis/trans y E/Z e isómeros rotacionales se incluyen expresamente en la presente descripción.

Un experto en la técnica también reconocerá que es posible que existan tautómeros para los compuestos descritos en la presente. La divulgación incluye todos los tautómeros, aunque no se muestran en las fórmulas en la presente descripción. Todas estas formas isoméricas de esos compuestos están expresamente incluidas en la presente descripción.

Los isómeros ópticos se pueden obtener en forma pura mediante procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, formación de sales diastereoméricas, resolución cinética y síntesis asimétrica. Véanse, por ejemplo, Jacques, y otros, Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen, SH, y otros, Tetrahedron 33: 2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, S.H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). También se entiende que esta descripción abarca todos los regioisómeros posibles, y sus mezclas, que pueden obtenerse en forma pura mediante procedimientos de separación estándar conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, cromatografía en columna, cromatografía de capa fina y cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

Los compuestos descritos en la presente descripción también incluyen las diversas formas de hidrato y solvato de los compuestos.

Los compuestos descritos en la presente descripción también pueden incluir todos los isótopos de átomos que se encuentran en los compuestos intermedios o finales. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

La Fórmula (II) se muestra a continuación:

Het
$$\mathbb{R}^{\mathbb{C}}$$
 $\mathbb{N}^{\mathbb{N}}$ $\mathbb{N}^{\mathbb{N}}$

en donde R^A es H o F; R^C es H, Cl, o F; Het es piperidinilo, y el nitrógeno del anillo está sustituido con R^B; R^B es alquilo C1-C6, hidroxialquilo C1-C6, alquileno C1-C3-cicloalquilo C3-C6. En varios casos, R^A es H. En algunos casos, R^A es F. En diversas realizaciones, Het es piperidinilo y R^B puede ser alquilo C1-C6 o hidroxialquilo C1-C6, como CH₂C(CH₃)₃ o CH₂C(OH)(CH₃)₂; o alquileno C1-C3-cicloalquilo C3-C6, tal como ciclopropil CH₂. En varios casos, R^C es H. En algunos casos, R^C es F. En varios casos, R^C es Cl. En los casos en que R^C es F o Cl, R^C puede ser orto o meta al sustituyente Het.

Los compuestos descritos en la presente también incluyen sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal formada por la adición de un ácido o base farmacéuticamente aceptable a un compuesto descrito en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que es aceptable para su uso en aplicaciones farmacéuticas desde una perspectiva toxicológica y no interactúa negativamente con el ingrediente activo. Las sales farmacéuticamente aceptables, que incluyen mono y bisaltos, incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de ácidos orgánicos e inorgánicos tales como, pero no se limitan a, acético, láctico, cítrico, cinámico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, oxálico, propiónico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, glicólico, pirúvico, metanosulfónico, etanosulfónico, toluenosulfónico, salicílico, benzoico y ácidos aceptables conocidos de manera similar. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418; Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977); y "Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use A Handbook; Wermuth, C. G. and Stahl, P. H. (eds.) Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, 2002 [ISBN 3-906390-26-8].

En algunas realizaciones, los compuestos son profármacos. Como se usa en la presente descripción, "profármaco" se refiere a un resto que libera un compuesto descrito en la presente descripción cuando se administra a un paciente. Los profármacos se pueden preparar modificando los grupos funcionales presentes en los compuestos de manera que las modificaciones se escinden, ya sea en manipulación rutinaria o in vivo, a los compuestos originales. Los ejemplos de profármacos incluyen compuestos como se describen en la presente descripción que contienen uno o más restos moleculares unidos a un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo del compuesto, y que cuando se administra a un paciente, se escinden in vivo para formar el grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero son limitarse a, derivados de acetato, formiato y benzoato de grupos funcionales alcohol y amina en los compuestos descritos en la presente descripción. La preparación y el uso de profármacos se discuten en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 de la Serie de Simposios de ACS, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987

Síntesis de compuestos de Fórmula (II)

5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden prepararse de diversas maneras conocidas por un experto en la técnica de síntesis orgánica. Los compuestos descritos en la presente descripción se pueden sintetizar usando los métodos que se describen a continuación en lo sucesivo, junto con métodos sintéticos conocidos en la técnica de la química orgánica sintética o variaciones al respecto, tal como aprecian los expertos en la técnica.

Los compuestos de la presente descripción pueden prepararse convenientemente de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección de Ejemplos, a partir de materiales de partida disponibles en el mercado, compuestos conocidos en la literatura o intermedios fácilmente preparados, empleando métodos sintéticos convencionales y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos y procedimientos sintéticos convencionales para la preparación de moléculas orgánicas y transformaciones y manipulaciones de grupos funcionales se pueden obtener fácilmente de la literatura científica relevante o de los libros de texto estándar en el campo. Se apreciará que, cuando se dan condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, disolventes, presiones), también se pueden usar otras condiciones de proceso a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o disolventes particulares usados, pero tales condiciones pueden ser determinadas por un experto en la técnica mediante procedimientos de optimización de rutina. Los expertos en la técnica de la síntesis orgánica reconocerán que la naturaleza y el orden de las etapas de síntesis presentados pueden variar con el fin de optimizar la formación de los compuestos descritos en la presente descripción.

Las transformaciones de química sintética útiles para sintetizar los compuestos descritos en la presente descripción son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, las descritas en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, 2d.ed., Wiley-VCH Publishers (1999); P.G.M. Wuts and T.W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, 4ª ed., John

Wiley and Sons (2007); L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), y sus ediciones posteriores. La preparación de compuestos puede implicar la protección y desprotección de varios grupos químicos. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Wuts PGM y Greene TW, 2006, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, cuarta edición, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, EE. UU. Los ajustes a los grupos protectores y los métodos de formación y escisión descritos en la presente descripción pueden ajustarse según sea necesario a la luz de los diversos sustituyentes.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente descripción pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados que pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los disolventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del disolvente hasta la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar disolventes adecuados para una etapa de reacción particular.

Los procesos descritos en la presente descripción pueden monitorizarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto puede controlarse por medios espectroscópicos, como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, 1H y/o 13C NMR) espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible), o espectrometría de masas, o por cromatografía como cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de capa fina.

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden separarse de una mezcla de reacción y purificarse adicionalmente mediante un método tal como cromatografía en columna, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) o recristalización.

Un experto en la técnica reconocerá que existen métodos adicionales para producir los compuestos de Fórmula (II) además de los descritos en la sección de Ejemplos.

Uso

20

30

35

40

45

50

55

60

65

Una histona deacetilasa (HDAC), como se describe en la presente descripción, puede ser cualquier polipéptido que tenga características funcionales de los polipéptidos que catalizan la eliminación del grupo acetilo (desacetilación) de las proteínas diana acetiladas. Las características funcionales de las HDAC se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Finnin y otros, 1999, Nature, 401:188). Por lo tanto, una HDAC puede ser un polipéptido que reprime la transcripción génica desacetilando los grupos ε-amino de los residuos de lisina conservados ubicados en el extremo N de las histonas, por ejemplo, H3, H4, H2A y H2B, que forman el nucleosoma. Las HDAC también desacetilan otras proteínas como p53, E2F, α-tubulina y MyoD (véase, por ejemplo, Annemieke y otros, 2003, Biochem. J., 370:737). Las HDAC también se pueden localizar en el núcleo y ciertas HDAC se pueden encontrar tanto en el núcleo como en el citoplasma.

Los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente, pueden interactuar con cualquier HDAC. En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente tendrán al menos aproximadamente 2 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, 10 veces, 15 veces o 20 veces) mayor actividad para inhibir una o más HDAC clase I (por ejemplo, HDAC1, HDAC2 o HDAC3) en comparación con una o más HDAC (por ejemplo, una o más HDAC de clase IIa, IIb o IV).

La descripción presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso para tratar un cáncer en pacientes que lo necesitan. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido, neoplasia, carcinoma, sarcoma, leucemia o linfoma. En algunas realizaciones, las leucemias incluyen leucemias agudas y leucemias crónicas tales como leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia de células pilosas; linfomas como los linfomas cutáneos de células T (CTCL), linfomas periféricos no cutáneos de células T, linfomas asociados con el virus linfotrófico de células T humanas (fITLV) como la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL), enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin, linfomas de células grandes, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL); Linfoma de Burkitt; linfoma primario del sistema nervioso central (CNS); mieloma múltiple; tumores sólidos de la infancia como los tumores cerebrales, neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilm, tumores óseos y sarcomas de tejidos blandos, tumores sólidos comunes de adultos como los cánceres de cabeza y cuello (por ejemplo, cáncer oral, laríngeo y esofágico), cáncer genitor-urinario (por ejemplo, próstata, vejiga, renal, uterino, ovárico, testicular, rectal y de colon), cáncer de pulmón, cáncer de mama.

En algunas realizaciones, el cáncer es (a) cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; (b) pulmón: carcinoma broncogénico (células escamosas, células pequeñas indiferenciadas, células grandes indiferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; (c) gastrointestinal: esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiosarcoma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomiosarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides,

vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma), linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Karposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma, intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma velloso, hamartoma, leiomioma); (d) tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm (nefroblastoma), linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); (e) hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; (f) hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, cordoma tumoral maligno de células gigantes, osteocrondroma (exostosoma osteocartilaginoso), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; (g) sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (pinealoma). (astrocitoma. meduloblastoma. glioma, ependimoma. germinoma glioblastoma oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), médula espinal (neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma); (h) ginecológico: útero (carcinoma endometrial), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pre-tumoral), ovarios (carcinoma de ovario, cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso), carcinoma no clasificado (tumores de células granulosas-tecales, tumores de células Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide), rabdomiosarcoma embrionario, trompas de falopio (carcinoma); (i) hematológico: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma maligno); (j) piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Karposi, lunares nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y (k) glándulas suprarrenales: afecciones de neuroblastoma.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En otro aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio en pacientes que lo necesitan. En algunas realizaciones, el trastorno inflamatorio es una enfermedad inflamatoria aguda y crónica, enfermedad autoinmune, enfermedad alérgica, enfermedad asociada con estrés oxidativo y enfermedades caracterizadas por hiperproliferación celular. Los ejemplos no limitativos son afecciones inflamatorias de una articulación que incluyen artritis reumatoide (AR) y artritis psoriásica; enfermedades inflamatorias del intestino como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa; espondiloartropatías; esclerodermia; psoriasis (incluyendo psoriasis mediada por células T) y dermatosis inflamatorias tales como dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrosante, cutánea e hipersensibilidad); miositis eosinofílica, fascitis eosinofílica; cánceres con infiltración leucocitaria de la piel u órganos, lesión isquémica, incluida isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de trauma, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); VIH, insuficiencia cardíaca, enfermedad hepática crónica, aguda o maligna, tiroiditis autoinmune; lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjorgren, enfermedades pulmonares (por ejemplo, SDRA); pancreatitis aguda; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); enfermedad de Alzheimer; caquexia/anorexia; asma; aterosclerosis; síndrome de fatiga crónica, fiebre; diabetes (por ejemplo, diabetes insulínica o diabetes de inicio juvenil); glomerulonefritis; rechazo de injerto contra huésped (por ejemplo, en trasplante); choque hemorrágico; hiperalgesia: enfermedad inflamatoria intestinal; esclerosis múltiple; miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteínas musculares, especialmente en sepsis); osteoartritis; osteoporosis; enfermedad de Parkinson; dolor; parto prematuro; psoriasis; lesión por reperfusión; toxicidad inducida por citoquinas (por ejemplo, choque séptico, choque endotóxico); efectos secundarios de la radioterapia, enfermedad de la articulación mandibular temporal, metástasis tumoral; o una afección inflamatoria que resulta de tensión, esguince, daño del cartílago, trauma como quemaduras, cirugía ortopédica, infección u otros procesos de enfermedad.

Las enfermedades y afecciones alérgicas incluyen, pero sin limitarse a, enfermedades respiratorias alérgicas como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, neumonías eosinofílicas (por ejemplo, síndrome de Loeffler, neumonía eosinofílica crónica), hipersensibilidad de tipo tardío, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociada con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxia sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a medicamentos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos.

En otro aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno relacionado con la memoria en pacientes que lo necesitan. Los compuestos de Fórmula (II) pueden usarse para tratar pacientes con deterioro de la memoria asociado con trastornos cognitivos directos tales como amnesia, demencia y delirio; trastornos de ansiedad tales como fobias, trastornos de pánico, estrés psicosocial (por ejemplo, como se ve en desastres, catástrofes o víctimas de violencia), trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de estrés postraumático; trastornos del estado de ánimo tales como depresión y trastorno bipolar; y trastornos psicóticos como la esquizofrenia y el trastorno delirante. El deterioro de la memoria, un sello distintivo de las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer, el Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la ataxia espinocerebelosa y el envejecimiento, también puede tratarse mediante el uso de compuestos de Fórmula (II). Además, los compuestos descritos pueden usarse para tratar la adicción a las drogas mediante la extinción del comportamiento de búsqueda de drogas.

Los inhibidores de la HDAC, por ejemplo, los inhibidores selectivos de la HDAC1 y/o la HDAC2, también pueden ser útiles para tratar la enfermedad de células falciformes (SCD) y la β-talasemia (bT). También pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos del estado de ánimo o trastornos cerebrales con neuroplasticidad mediada por cromatina alterada (Schoreder, y otros, PLoS ONE 8(8): e71323 (2013)).

5

En otro aspecto, se proporciona un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno de hemoglobina en pacientes que lo necesitan. Los compuestos de Fórmula (II) se pueden usar para tratar pacientes con anemia falciforme o talasemia β . En varios casos, el compuesto es un inhibidor selectivo de la HDAC 1 y/o la HDAC 2 y se usa para prevenir o tratar el trastorno de hemoglobina (por ejemplo, anemia falciforme o talasemia β).

10

Además, se proporciona un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo o trastornos cerebrales con neuroplasticidad mediada por la cromatina alterada en pacientes que lo necesitan. Los compuestos de Fórmula (II) se pueden usar para tratar pacientes con un trastorno del estado de ánimo.

15

20

En otro aspecto, esta solicitud presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una afección neurológica (por ejemplo, ataxia de Friedreich (FRDA), distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, síndrome X frágil, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Kennedy, esclerosis lateral amiotrófica, Niemann Pick, Pitt Hopkins, atrofia muscular espinal y bulbar, enfermedad de Alzheimer o esquizofrenia, trastorno bipolar y enfermedades relacionadas).

25

En otro aspecto, la solicitud proporciona un kit para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno seleccionado de un trastorno neurológico (por ejemplo, ataxia de Friedreich, distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, síndrome X frágil, enfermedad de Huntington, una ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Kennedy, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal y bulbar, o enfermedad de Alzheimer), una afección o enfermedad que afecta la memoria, un cáncer, un trastorno inflamatorio o una infección por Plasmodium falciparum (por ejemplo, malaria) en un paciente que lo necesite, que comprende (i) un compuesto de Fórmula (II) descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (ii) instrucciones que comprenden una dirección para administrar dicho compuesto a dicho paciente.

30

En algunas realizaciones de los usos anteriores, los usos incluyen además analizar la actividad del compuesto candidato para aumentar la expresión de uno o más genes cuya expresión se reduce en la afección neurológica (por ejemplo, frataxina, huntingtina, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma, coactivador 1, alfa (PGC1A), ataxina, retraso mental X frágil (FMR1), proteína quinasa de distrofia miotónica (DMPK) o receptor de andrógenos). En algunas realizaciones, la actividad del compuesto candidato para aumentar la expresión de uno o más genes cuya expresión se reduce en la afección neurológica se mide en un animal, por ejemplo, un modelo animal de la afección neurológica.

35

En algunas realizaciones de los usos anteriores, el uso se repite para una pluralidad de compuestos de prueba (por ejemplo, al menos 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 1000 compuestos de prueba).

40

En otro aspecto, esta solicitud presenta un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una afección neurológica (por ejemplo, ataxia de Friedreich, distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, síndrome X frágil, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas, enfermedad de Kennedy, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal y bulbar, o enfermedad de Alzheimer) que incluye realizar cualquiera de los usos anteriores, en donde el compuesto está formulado en una composición farmacéutica y administrar la composición farmacéutica a un paciente que tiene una afección neurológica.

45

50

Se ha demostrado que los inhibidores de la HDAC tienen actividad antipalúdica (Andrews y otros, 2000, Int. J. Parasitol., 30: 761-768; Andrews y otros, Antimicrob. Agentes Chemother., 52:1454-61). La presente descripción proporciona un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una infección por Plasmodium falciparum (por ejemplo, malaria) en un paciente que lo necesite.

55

Los inhibidores de la HDAC también pueden ser útiles para tratar enfermedades infecciosas como las infecciones virales. Por ejemplo, el tratamiento de células infectadas por VIH con inhibidores de la HDAC y medicamentos antirretrovirales puede erradicar el virus de las células tratadas (Blazkova j y otros, J Infect Dis. 1 de sept. de 2012; 206 (5): 765-9; Archin NM y otros, Nature 25 de julio de 2012, 487(7408):482-5). La presente descripción proporciona un compuesto de Fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una infección por VIH para quien lo necesita.

60

Composiciones farmacéuticas

65

Los inhibidores de HDAC pueden administrarse puros o formularse como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas incluyen una cantidad apropiada del inhibidor de la HDAC en combinación con un vehículo apropiado y opcionalmente otros ingredientes útiles.

Las sales aceptables de los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, los preparados a partir de los siguientes ácidos: ácidos mono, di y tricarboxílicos de alquilo, alquenilo, arilo, alquilarilo y alquenilarilo de 1 a 20 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con 1 a 4 hidroxilos; ácidos mono, di y trisulfónicos de alquilo, alquenilo, arilo, alquilarilo y alquenilarilo de 1 a 20 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con 1 a 4 hidroxilos; ácidos dibásicos y ácidos minerales. Los ejemplos incluyen los ácidos clorhídrico; hidrobrómico; sulfúrico; nítrico; fosfórico; láctico (incluido (+)-L-láctico, (+/-)-DL-láctico); fumárico glutárico maleico acético; salicíclico; p-toluenosulfónico; tartárico (incluido (+)-L-tartárico); cítrico; metanosulfónico; fórmico; malónico succínico naftaleno-2-sulfónico; y bencenosulfónicos. Además, las sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse como sales de amina, sales de amonio o sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico. Estos se forman a partir de bases de metales alcalinos o alcalinotérreos o de compuestos de amina.

10

15

20

25

30

50

55

60

65

Las composiciones farmacéuticas de los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción adecuados para administración oral pueden estar en forma de (1) unidades distintas tales como cápsulas, bolsitas, tabletas o pastillas donde cada una contiene una cantidad predeterminada del inhibidor de la HDAC; (2) un polvo o gránulos; (3) un bolo, electuario o pasta; (4) una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o (5) una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Las composiciones adecuadas para la administración tópica en la boca, por ejemplo, oral o sublingualmente, incluyen pastillas. Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen suspensiones o soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas. Las composiciones adecuadas para la administración rectal se pueden presentar como un supositorio.

Las composiciones farmacéuticas de los compuestos de Fórmula (II) descritos en la presente descripción pueden formularse usando un vehículo sólido o líquido. El vehículo sólido o líquido debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor. Si la composición farmacéutica está en forma de tableta, entonces el inhibidor de la HDAC se mezcla con un vehículo que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Si la composición está en forma de polvo, el vehículo es un sólido finamente dividido mezclado con el ingrediente activo finamente dividido. Los polvos y tabletas pueden contener hasta el 99% del ingrediente activo. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico. Un vehículo sólido puede incluir una o más sustancias que pueden actuar como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, deslizantes, auxiliares de compresión, aglutinantes o agentes desintegrantes de tabletas. Un vehículo adecuado también puede ser un material encapsulante.

35 Si la composición es una solución, suspensión, emulsión, jarabe, elixir o composición presurizada, entonces se pueden usar vehículos líquidos. En este caso, el inhibidor de HDAC se disuelve o suspende en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable. Ejemplos adecuados de vehículos líquidos para administración oral y parenteral incluyen (1) agua; (2) alcoholes, por ejemplo, alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos tales como glicoles y sus derivados; y (3) aceites, por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de arachis. Para la administración parenteral, el vehículo 40 también puede ser un éster aceitoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos para composiciones presurizadas incluyen hidrocarburos halogenados u otros propulsores farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados, tales como solubilizantes; emulsionantes; tampones conservantes; edulcorantes agentes aromatizantes; agentes de suspensión; agentes espesantes; colores; reguladores de viscosidad; estabilizadores; osmo-reguladores; derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa de 45 sodio; antioxidantes y bacteriostáticos. Otros vehículos incluyen los utilizados para formular pastillas como sacarosa, acacia, tragacanto, gelatina y glicerina, así como los utilizados para formular supositorios como manteca de cacao o polietilenglicol.

Si la composición se va a administrar por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o invección, las soluciones del inhibidor de HDAC se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. La composición adecuada para invección o infusión puede incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo, que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo o portador líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido como se describió anteriormente. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el inhibidor de HDAC en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con algunos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y las técnicas de liofilización, que producen un polvo del inhibidor de la HDAC, más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones estériles filtradas previamente.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosis unitarias o multidosis o en una forma que permita la liberación lenta o controlada del inhibidor de la HDAC. Cada dosis unitaria puede estar en forma de una tableta, cápsula o composición envasada, como, por ejemplo, un polvo envasado, un vial, una ampolla, una jeringa precargada o una bolsita que contiene líquidos. La forma de dosis unitaria también puede ser el número apropiado de cualquiera de tales composiciones en forma de envase. Las composiciones farmacéuticas en forma de dosis múltiples pueden envasarse en recipientes tales como ampollas selladas y viales. En este caso, el inhibidor de la HDAC puede almacenarse en una condición deshidratado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso. Además, las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente.

15 Ejemplos

20

60

Ejemplo de referencia 8: sal hidrocloruro de (*E*)-N-(2-amino-4-fluorofenil)-3-(1-cinamil-1*H*-pirazol-4-il)acrilamida - Compuesto de referencia D2

55 (E)-etil 3-(1H-pirazol-4-il)acrilato:

Se añadió [(etoxicarbonil)metileno]trifenilfosforano (0,836 g, 2,4 mmol) a una solución de 1*H*-pirazol-4-carbaldehído (0,192 g, 2 mmol) en THF (6 ml) a temperatura ambiente. Esta solución se calentó a 70 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 8 h. El análisis por HPLC/MS indicó la finalización de la reacción y se observaron los isómeros E y Z del producto. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó al vacío para obtener el producto crudo. Este crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando EtOAc al 0-80% en hexanos como eluyente para proporcionar, después de la evaporación de las fracciones agrupadas, (*E*)-etil 3-(1*H*-pirazol-4-il)acrilato puro (0,198 g, 60%) como un sólido blanco. ES* (M+H)* 167

65 (E)-etil 3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-il)acrilato: se añadió carbonato de cesio (0,490 g, 1,5 mmol) a una solución de (E)-etil 3-(1H-pirazol-4-il)acrilato (0,167 g, 1 mmol) en ACN (8 ml) a temperatura ambiente. La suspensión se agitó y se añadió 1-

((*E*)-3-bromoprop-1-enil)benceno (0,256 g, 1,30 mmol). La mezcla se calentó a 40 °C durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, los sólidos precipitados se filtraron. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de EtOAc al 0-60% en hexanos para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (0,214 g, 76%). ES+ (M+H)+ 283

Ácido (E)-3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-il)acrílico: El éster etílico del ácido (E)-3-(1-cinamil-1H -pirazol-4-il)acrílico (0,141 g, 0,5 mmol) disuelto en etanol (EtOH, 6 ml) se hidrolizó mediante la adición de una solución de KOH (0,168 g, 3 mmol) en agua (2 ml). La mezcla se calentó a 60 °C y la temperatura se mantuvo durante 6 h. Los disolventes se evaporaron al vacío y se añadió agua (10 ml) al residuo. Esta solución se acidificó cuidadosamente a pH 4 con una solución 3 M de HCl en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera. Se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó para dar el ácido como un sólido blanco (0,118 g, 93%). ES⁺ (M+H)⁺ 255

terc-Butil (2-((E)-3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-il)acrilamido)-5-fluorofenil)carbamato: ácido (E)-3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-il) acrílico (0,110 g, 0,43 mmol) se disolvió en DCM (25 ml). Se añadieron HATU (0,246 g, 0,65 mmol), DIPEA (0,278 g, 2,15 mmol) y terc-butil 2-amino-5-fluorofenilcarbamato (0,147 g, 0,65 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Los residuos se evaporaron y el residuo se recogió en EtOAc (40 ml). A continuación, se lavó con NaHCO $_3$ saturado y salmuera, se secó sobre Na $_2$ SO $_4$, se filtró y se evaporó al vacío para obtener el crudo. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de EtOAc al 0-70% en hexanos para obtener terc-butil(2-((E)-3-(1-cinnamil-1H-pirazol-4-il)acrilamido) -5-fluorofenil)carbamato5 (0,138 g, 76%) como un sólido blanquecino. ES $^+$ (M+Na) $^+$ 485.

Sal de hidrocloruro de (E)-N-(2-amino-4-fluorofenil)-3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-il)acrilamida: una solución 4 M de HCI en dioxano (4 ml) se mezcló bajo nitrógeno con una solución de terc-butil (2-((E)-3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-il)acrilamido)-5-fluorofenil)carbamato (0,138g, 0,30 mmol) en dioxano (12 mL). La mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se observó precipitación de sal. La mezcla heterogénea se diluyó con EtOAc (12 ml) y el precipitado se filtró, se lavó con disolvente y se secó durante la noche al vacío para obtener la sal de hidrocloruro pura de (E)-N-(2-amino-4-fluorofenil)-3-(1-cinamil-1H-pirazol-4-il)acrilamida (0,110 g, 92%) como un sólido blanquecino. 1 H NMR (CD_3OD) δ : 8,08 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,71 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,37 - 7,46 (m, 2H), 7,21 - 7,37 (m, 4H), 6,63 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 6,56 - 6,71 (m, 1H), 6,43 (dt, J = 15,8,6,2 Hz, 1H), 4,96 (dd, J = 6,3,1,1 Hz, 2H); ES $^+$ $(M+H)^+$ 363

Método F

5

10

15

20

25

35

$$R_{1}V, P, \text{ or } H-Cy=O + R_{1} + R_{2} + R_{3} + R_{4} + R_{5} + R_{5$$

En donde R^2 y R^5 son H y R_1 -V corresponde a R^B como se describe en la presente; Cy corresponde a Het como se describe en la presente; y R^3 corresponde a R^A como se describe en la presente descripción.

5

10

15

20

50

65

Los compuestos descritos en la presente descripción pueden prepararse, entre otros enfoques potenciales, mediante el acoplamiento de Wittig o Horner Wadsworth Emmons de unadenden amino heterocíclica mono o bicíclica protegida con N con una 4-α-fosforanili-denemetil o 4-alquilo no sustituido o sustituido con fosfonato o derivado de ácido aralquil benzoico, tal como, pero sin limitación, un éster o amida. El derivado de amina heterocíclica protegida sustituido con alqueno exocíclico se puede desproteger mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica y que se pueden encontrar, por ejemplo, en P.G.M. Wuts and T.W. Greene, 2006, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, cuarta edición, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, EE. UU. La amina puede derivatizarse luego mediante sustituyentes R1-V usando métodos tan diversos como, pero no limitados a, acilación, alquilación, aminación reductora. La saponificación del éster de benzoato, si está presente, permite la reacción del ácido con una *o*-fenilendiamina sustituida o no sustituida protegida o no protegida. Alternativamente, la *o*-fenilendiamina sustituida o no sustituida protegida o no protegida puede introducirse en una etapa anterior en la síntesis. Los compuestos de la descripción se obtienen después de la desprotección del grupo amino usando metodologías bien conocidas por los expertos en la técnica.

Ejemplo de referencia 11: 4-((1-((1*H*-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-N-(2-aminofenil)-3-clorobenzamida - Compuesto de referencia F5

Bromuro de (2-cloro-4-(metoxicarbonil)bencil)trifenilfosfonio: se disolvió metil 3-cloro-4-metilbenzoato (2,20 g, 11,96 mmol) en tetracloruro de carbono (30 ml) y *N*-bromosuccinimida (2,10 g, 11,80 mmol) se añadió seguido de una cantidad catalítica de peróxido de benzoilo (25 mg). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 6 h. (aprox. 90% de conversión). Después de enfriar a temperatura ambiente, se filtró un precipitado. El filtrado se concentró para dar intermedio bromado crudo (3,20 g), que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

El intermedio bromado de arriba (3,20 g, 12,17 mmol) se disolvió en tolueno (100 ml) y se añadió trifenilfosfina (6,50 g, 12,17 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 6 h. La precipitación se observó de inmediato. Al finalizar, tal como se monitorizó por TLC, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con tolueno (100 ml). El precipitado se filtró, se lavó con hexanos y se secó al aire para dar 4,68 g de bromuro de (2-cloro-4-(metoxicarbonil)bencil) trifenilfosfonio como un sólido blanco. ES+ (M+H)+ 445,1

El terc-butil 3-(2-cloro-4-(metoxicarbonil)bencilideno)azetidina-1-carboxilato: (2-cloro-4-(metoxicarbonil)bencil)trifenilfosfonio bromuro (1,04 g, 1,98 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (DMF, 20 ml) y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió una suspensión al 60% de NaH en aceite de parafina (80 mg, 2,00 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 15 minutos. Se añadió una solución de terc-butil 3-oxoazetidina-1-carboxilato (0,32 g, 1,87 mmol) en DMF anhidro (5 ml) y la mezcla de reacción se calentó durante la noche a 65 °C. Después de completar la reacción como se indica por HPLC/MS, la mezcla de reacción enfriada se diluyó con EtOAC (20 ml) y se inactivó con una

solución saturada de NH₄Cl (10 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 x 20 ml) y salmuera (15 ml). Después se secó sobre anhidro Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para obtener el producto bruto. Este producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando EtOAc al 50-80% en hexanos como eluyente para proporcionar *terc*-butil 3-(2-cloro-4-(metoxicarbonil)bencilideno)azetidina-1-carboxilato (0,27 g) como un sólido blanco. ES⁺ (M+Na)⁺ 360.

5

Metil 4-(azetidin-3-ilidenemetil)-3-clorobenzoato: se añadió una solución 4 M de HCl en dioxano (5 ml) a una solución de terc- butil 3- (2-cloro-4-(metoxicarbonil)bencilideno)azetidina-1-carboxilato (0,27 g, 0,66 mmol) en dioxano:DCM (1:1 v/v, 10 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se observó precipitación de sal. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (20 ml). El precipitado se filtró, se lavó con éter y se secó durante la noche para obtener la sal HCl de metil 4-(azetidin-3-ilidenemetil)-3-clorobenzoato (0,12 g) como un sólido blanquecino. ES⁺ (M+H)⁺ 238

10

15

Metil 4-((1-((1H-indol-6-il) metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzoato: una solución de la sal de clorhidrato de metil 4-(azetidin-3-ilidenemetil)-3-clorobenzoato (0,20 g, 0,73 mmol) en THF:DCM (2:1) (25 ml) se neutralizó mediante la adición de trietilamina (0,14 ml, 0,88 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadieron indol-6-carboxaldehído (0,16 g, 1,00 mmol) y triacetoxiborohidruro de sodio (0,50 g, 2,37 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante la noche. Luego se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (3 x 25 ml) y salmuera (1 x 15 ml). La capa orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄) y se filtró. El filtrado se concentró al vacío para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice usando EtOAc al 10-40% en hexanos como eluyente. Las fracciones que contenían el producto puro se agruparon y se evaporaron para dar 0,3 g de metil 4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzoato (0,30 g) como un aceite incoloro. ES⁺ (M+H)⁺ 367

20

Ácido 4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzoico: se añadió una solución acuosa 2 M de KOH (1,5 ml) a una solución de metil 4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzoato (0,3 g, 0,82 mmol) en MeOH (7 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se evaporó luego a presión reducida y se añadió agua (10 ml) al residuo. La solución se acidificó cuidadosamente a pH 5 con una solución acuosa 3 M de HCl. El sólido precipitado se extrajo con acetato de etilo. La capa de EtOAc se lavó con agua (2 x 10 ml) y salmuera (1 x 15 ml). Se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró *al vacío* para dar ácido 4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzoico como un sólido blanco (0,26 g). ES⁺ (M+H)⁺ 353.

25

30

35

terc-Butil(2-(4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzamido)fenil)carbamato:
A una solución de ácido 4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzoico (0,26 g, 0,74 mmol) en DCM (25 ml) DIPEA (0,29 g, 2,22 mmol), terc-butil-2-aminofenilcarbamato (0,27 g, 1,18 mmol) y HATU (0,37 g, 0,96 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de completar la reacción como se indica por HPLC, la mezcla se lavó con bicarbonato de sodio saturado (2 x 20 ml) y salmuera (1 x 15 ml). Se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía en columna (10% MeOH: 90% DCM). Después de la evaporación de las fracciones agrupadas de producto puro, se aisló el terc-butil (2-(4-((1+((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzamido)fenil)carbamato (0,2 g) como un sólido

40

blanquecino. ES+ (M+H)+ 543.

4-((1-((1H-Indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-N-(2-aminofenil)-3-clorobenzamida: una solución 4 M de HCl en dioxano (5 mL) se añadió a una solución de terc-butil (2-(4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-3-clorobenzamido) fenil)carbamato (0,20 g, 0,37 mmol) en dioxano (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se observó precipitación de sal. Después de completar la reacción como se indica por HPLC/MS, la mezcla se diluyó con éter dietílico (20 ml) y la sal se filtró para dar 110 mg de producto aprox. 85% puro. Se purificaron 45 mg mediante autopurificación de fase inversa desencadenada en masa (NH₄OH al 0,1% como aditivo) para dar 8 mg de 4-((1-((1H-indol-6-il)metil)azetidin-3-ilideno)metil)-N-(2-aminofenil)-3-clorobenzamida puro. ¹H ¹H NMR (CD₃OD) δ: 8,03 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,85 (dd, J = 8,2, 1,8 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,30 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,16 (dd, J = 7,8, 1,3 Hz, 1H), 7,07 (ddd, J = 8,1, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,02 (dd, J = 8,1, 1,5 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 6,76 (td, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H), 6,68 (quin, J = 2,3 Hz, 1H), 6,41 (dd, J = 3,2, 1,0 Hz, 1H), 4,23 - 4,34 (m, 2H), 4,10 - 4,19 (m, 2H), 3,93 (s, 2H); ES⁺ (M+H)⁺ 443.

55

60

		Tabla: Método F	do F		
Compuesto	Estructura	R-X o aldehído	diamina	MS	NMR
F1 (compuesto de referencia)	ZHN H		H ₂ N H ₂	ES- (M+H)+ 442	¹ H NMR (CD3OD) & 8,02 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,21 – 7,52 (m, 10H), 6,85 – 7,15 (m, 2H), 6,50 (s, 1H), 5,14 (s, 2H), 3,44-3,71 (m, 4H), 2,32-2,61 (m, 4H)
F2 (compuesto de referencia)	O HIN		HZ NZ	399	¹ H NIMR (CD ₃ OD) δ: 8,52 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 8,45 (dd, J = 4,9, 1,6 Hz, 1H), 7,93 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,86(dt, J = 7,8, 1,9 Hz, 1H), 7,42(ddd, J = 7,8, 4,9, 0,7 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,18 (dd, J = 7,8, 1,3 Hz, 1 H), 7,07 (ddd, J = 8,1 Hz, 2H), 7,07 (ddd, J = 8,0,7,3,1,4 Hz, 1H), 6,90 (dd, J = 8,1,1,2 Hz, 1H), 6,76 (td, J = 7,6,1,4 Hz, 1H), 6,39 (s, 1H), 3,60 (s, 2H), 2,40-2,65 (m, 8H)
F3 (compuesto de referencia)	T N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	T O	H ₂ N ₂ N ₃	409	¹ H RMN (CD ₃ OD) 6: 7,92 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,33 – 7,43 (br. S, 1 H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,22 (d, J = 3,2 Hz, 1 H), 7,17 (dd, J = 7,6, 1,5 Hz, 1 H), 7,07 (td, J = 7,9, 1,5 Hz, 1 H), 7,03 (dd, J = 8,5, 1,5 Hz, 1 H), 7,03 (dd, J = 8,5, 1,5 Hz, 1 H), 6,76 (td, J = 7,7, 1,4 Hz, 1 H), 6,42 (dd, J = 3,2,0,9 Hz, 1 H), 6,34 (quin, J = 1,8 Hz, 1 H), 6,45 (br. S., 2 H), 4,17 (br. S., 2 H), 3,95 (s, 2 H)
F4 (compuesto de referencia)	TX O	ZI TO	H ₂ N ₄	ES' (M+H)*	¹ H NMR (CD ₃ OD) & 7,91 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,39 (br. s., 1H), 7,32 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,26 (t, J = 1,6 Hz, 1 H), 7,17 (d, J = 8,2Hz, 1H), 7,07 (td, J = 8,0, 1,4Hz, 1H), 7,00 (dd, J = 8,2, 1,4 Hz, 1H), 6,90 (dd, J = 8,0, 1,4 Hz, 1H), 6,90 (dd, J = 8,0, 1,4 Hz, 1H), 6,76 (td, J = 7,0,1,9 Hz, 1H), 6,44 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 4,02 (s, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,36 - 3,52 (m, 2H), 2,87 - 3,03 (m, 3H)

		(continuación)	ón)		
Compuesto	Estructura	R-X o aldehido	diamina	MS	NIMR
F5 (compuesto de referencia)	IN O	ZT O	F. No.	ES+ (M+H)+	H NMR (CD ₃ OD) 6: 8,03 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,85 (dd, J = 8,2, 1,8 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,30 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,16 (dd, J = 7,8, 1,3 Hz, 1H), 7,07 (ddd, J = 8,1, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,07 (ddd, J = 8,1, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,07 (dd, J = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 6,76 (td, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H), 6,68 (quin, J = 2,3 Hz, 1H), 6,41 (dd, J = 3,2, 1,0 Hz, 1H), 4,29 (q, J = 1,9 Hz, 2H), 4,16 (t, J = 1,9 Hz, 2H), 3,93 (s, 2H)
F6 (compuesto de referencia)	IN O		H. Boc	406	¹ H NMR (CD ₃ OD) 6: 8,56 (dd, J = 2,2,0,7 Hz, 1H), 8,48 (dd, J = 4,8, 1,5 Hz, 1H), 8,04 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,82-7,91 (m, 2H), 7,45 (ddd, J = 7,7, 4,9,0,8 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,45 (ddd, J = 8,0,1,4Hz, 1H), 7,08 (ddd, J = 8,1, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 8,1, 1,2 Hz, 1H), 6,76 (td, J = 7,6, 1,5 Hz, 1H), 6,70 (quin, J = 2,0 Hz, 1H), 4,31-4,41 (m, 2H), 4,17-4,27 (m, 2H), 3,95 (s, 2H)
F7 (compuesto de referencia)			H ₂ N ₂ H ₃ N ₃ H ₃ H ₃ N ₃ H ₃ H ₃ N ₃ H ₃ H ₃ H ₃ H ₃ N ₃ H	E5+(M+H)+	H NMR (CD ₃ OD) 6: 8,53 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 8,45 (dd, J = 4,9, 1,4 Hz, 1H), 8,04 (br. s, 1H), 7,87 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 8,3,4,9 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,18 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,08 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,76 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 6,37 (s, 1H), 3,62 (s, 2H), 2,62 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,46 - 2,55 (m, 4H), 2,43 (t, J = 5,5 Hz, 2H)
œ	IN NH2	N/A	H ₂ N H _N Boc	ES*(M+H)*	PH NMR (CD3OD) 6: 8,17 (s, 1H), 8,02 (dd, J = 8,4 Hz, 1H), 7,48 (br. m, 4H), 7,43 (dd, J = 8,4 Hz, 1H), 6,74 (br. s, 1H), 4,06 (br., 1H), 3,92 (br., 1H), 3,15-3,0 (m, 2H), 2,84 (s, 3H), 2,8-2,5 (m., 2H), 2,30(br. m,2H), 2,05(dd, 1H), 1,70(dd, 1H)

		(continuación)	ión)		
Compuesto	Estructura	R-X o aldehído	diamina	MS	NMR
F9 (compuesto de referencia)	O HHZ	N/A	H ₂ N HN, Boc	ES* (M+H)	(M+H) ^t H NMR(DMSO-d ₆)ö: 9,50 (s, 1H), 7,70(t, 1H), 7,30 (d, 1H), 7,1-6,9(3m,3H),6,75(d, 1H), 6,58 (t, 1H), 6,30 (br. s, 1H), 5,55 (br. m, 2H), 5,35 (br.m, 2H), 4,95 (br. s, 2H)
F10 (compuesto de referencia)	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C		H ₂ N HN Boc	369 (M+H)	(M+H) ^a H NMR (CD ₂ OD) 6: 8,21 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,43 (br. s, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,27 (br. m, 3H), 6,82 (br. s, 1H), 5,18 (br. s, 2H), 4,94 (2 d, sistema AB, 2H), 3,19 (br. m, 2H), 1,05 (br. m, 1H), 0,56 (br. d, J = 7,8 Hz, 2H), 0,41 (br. m, 2H)
F11 (compuesto de referencia)	CI CI H NH2	N/A	H ₂ N H ₂ Boc	ES* (M+H)	(M+H) ⁴ H NMR (DMSO-4 ₆) 6 : 9,72 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,87 (d, J 117 = 8,1 Hz, 1H), 7,15 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,96 (ddd, J = 7, 7, 1,5 Hz, 1H), 6,74 (dd, J = 8, 8, 1,2, 1H), 6,60-6,53 (2 m, 2H), 5,51 (br.m, 2H), 5,33 (br. m, 2H), 4,93 (s, 2H)
F12 (compuesto de referencia)	O THE	m \	H ₂ N HN Boc	334 (M+H)	(M+H) th H NMR (CD ₂ OD) 6: 8,09 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,48 (br. m, 4H), 7,38 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,65 (br. m, 1H), 5,30 (dd, 2H), 5,05 (dd, 2H), 4,95 (br. m, 2H), 1,12 (br. m, 1H), 0,74 (br. m, 2H), 0,47 (br. m, 2H)
F13	N H NH ₂		H ₂ N Boc	55 (M+H)	(M+H) th H NMR (CD ₃ OD) δ: 8,08 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,50 (br. m, 4H), 7,45 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,65 (br. s, 1H), 3,77 (m, 2H), 3,2-2,9 (br. m, 4H), 2,9-2,5 (br. m, 4H), 1,17 (m, 1H), 0,79 (m, 2H), 0,47 (m, 2H)
F14	NT OF	$\stackrel{\circ}{\nearrow}$	H ₂ N, H ₀ C	378 (M+H)	(M+H) ¹ ¹ H NMR (CD ₂ OD) 5: 8,08 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,51 (br. m, 4H), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,65 (br. s, 1H), 3,72-3,56 (br. m, 2H), 3,3-3,1 (br. m, 2H), 3,05-2,7 (br. m, 6H), 1,17 (s, 9H)

	NMR		⁴ H NMR (CD ₃ OD) δ: 8,10 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,0 (br. m, 1H), 7,51 (br. m, 7H), 7,39 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,67 (br. m, 1H), 5,39 (br. s, 2H), 5,14 (br. s, 2H), 4,9 (br. bajo el pico de disolvente), 2,67 (br. s, 3H)	ES+ (M+H)+ ¹ H NMR (CD ₃ OD) δ. 8,09 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,51 (br. 370 m, 9H), 7,37 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,66 (br. m, 1H), 5,24 (m, sistema AB, 2H), 4,95 (m, bajo el pico de disolvente), 4,59 (s, 2H)		ES* (M+H)* ¹ H NMR (CD ₃ OD) δ. 8,09 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,48 (br. 352 m, 4H), 7,37 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,61 (br. m, 1H), 5,35 (br. m, 2H), 5,05 (m, bajo el pico de disolvente), 3,44 (s, 2H), 1,33 (s, 2H)	¹ H NMR (CD ₃ OD) 6: 8,08 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,46 (m, 1H), 7,38 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,22 (m, 2H), 6,64(br. m, 1H), 5,31 (m, 2H), 5,09(m, 2H), 3,30 (m, 2H), 1,13 (m, 1H), 0,73 (m, 2H), 0,47 (m, 2H)
	MS	ES* (M+H)* 380	85* (M+H)*	SS+(M+H)*	55* (M+H)*	55* (M+H)*	ES+ (М+Н) ⁺ 352
on)	diamina	H ₂ N HN'Boc	H ₂ N HN'Boc	H ₂ N HN'Boc	H.V.Boc	H ₂ N HN'Boc	H ₂ N HN'Boc
(continuación	R-X o aldehído	но	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	Pa Br	Z= M	Но	m _
	Estructura	HO H	N H N H	H NH2	NH O NH	HO HO HO	O THE NH IN THE
	Compuesto	F15	F16 (compuesto de referencia)	F17 (compuesto de referencia)	F18 (compuesto de referencia)	F19 (compuesto de referencia)	F20 (compuesto de referencia)

Inhibición de la enzima HDAC

5

10

15

20

25

30

35

45

50

60

El ensayo de inhibición de la actividad HDAC se realizó de la siguiente manera para determinar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la actividad enzimática de la HDAC. Se prepararon diluciones en serie de inhibidores de la HDAC en tampón de ensayo de HDAC (25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 8) en placas de ensayo de 96 pocillos (Fisher scientific, #07-200-309) y se preincubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia de 125 mg/ml de BSA y HDAC1 purificado (BPS Bioscience, San Diego, CA, #50051), HDAC2 (BPS Bioscience, #50053) o HDAC3/NcoR2 (BPS Bioscience, #50003) a concentraciones de 1,25, 1,32 y 0,167 μg/ml, respectivamente. Después de la incubación previa, se añadió el sustrato Fluor-de-Lys™ (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, BML-KI104-0050) a una concentración final de 10 µM y las placas se incubaron adicionalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de tricostatina A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, #T8552, concentración final: 100 nM) y se añadió tripsina (MP Biomedicals, Solon, OH, 02101179) para alcanzar una concentración final de 100 µg/ml. Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se registró la fluorescencia usando un fluorómetro Spectramax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con excitación a 365 nm y emisión a 460 nm. Los valores de CI50 se calcularon usando una ecuación sigmoidal de dosis-respuesta (pendiente variable) en GraphPad Prism® 5 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA). Los resultados para los compuestos seleccionados de la divulgación en el ensavo de inhibición de la actividad de la HDAC se presentan en las Tablas 1 y 4 (intervalos de CI50: IA > 20μM, A < 1μM, 1 < B < 5μM, 5 < C < 10μM, 10 < D < 20μM, ND: no determinado)

Tabla 1: IC₅₀ para la inhibición de las isoformas HDAC1, 2 y 3

compuesto	HDAC1	HDAC2	HDAC3
D2 (compuesto de referencia)	В	В	Α
F1 (compuesto de referencia)	Α	В	Α
F2 (compuesto de referencia)	Α	Α	А
F3 (compuesto de referencia)	Α	Α	А
F4 (compuesto de referencia)	Α	ND	Α
F5 (compuesto de referencia)	Α	В	Α
F6 (compuesto de referencia)	Α	В	Α
F7 (compuesto de referencia)	Α	Α	Α

40 Determinación de la estabilidad en ácido

Se preparó una solución 100 µM del compuesto de prueba por dilución de una solución madre de DMSO 10 mM en una solución 0,01 M de HCl en agua desionizada. Inmediatamente después de mezclar, una alícuota (100 µl) se muestreó y se analizó por HPLC/UV. Se determinó el área bajo el pico del compuesto y se usó como punto de referencia de tiempo cero. El resto de la muestra de ácido se incubó a 50 °C y las muestras se tomaron después de 2, 4 y 24 horas de incubación. En algunas ocasiones, se tomaron muestras a las 30 horas en lugar de a las 24 horas. Estas se analizaron por el mismo método de HPLC/UV y se midió el área del pico correspondiente al compuesto de prueba. El porcentaje restante en un punto de tiempo dado se calculó luego como la relación del área bajo el pico después de la incubación con respecto al tiempo cero por 100. En aquellos casos en los que se registró un punto de tiempo de 30 horas, el porcentaje restante a las 24 horas se obtuvo por interpolación del porcentaje restante frente a la curva de tiempo suponiendo un proceso unimolecular, es decir, una desintegración monoexponencial. El porcentaje restante después de 24 horas de incubación se presenta en las **Tablas 2** y **4** a continuación, donde A corresponde a más del 60%, B está entre el 40 y el 60%, C cubre del 20 al 40% y D significa menos del 20%.

55 Estudios de penetración cerebral

Los compuestos de prueba se prepararon a 0,5 mg/ml o 5 mg/ml en hidroxipropil- β -ciclodextrina al 30%, acetato de sodio 100 mM, pH 5,5, DMSO al 5%. Los ratones C57/BL6/J se dosificaron s.c. a 5 mg/kg o 50 mg/kg, o i.v. a 5 mg/kg. Los animales fueron sacrificados antes de la dosis, 5, 15, 30 min, 1, 2 y 4 horas después de la dosis y se obtuvo plasma y cerebro. Se utilizaron tres animales por dosis por puntos de tiempo. Los niveles de compuesto en el plasma y el cerebro se determinaron por métodos LC/MS/MS estándar. La relación cerebro/plasma (BPR) se calculó como la relación de la $C_{máx}$ (cerebro)/ $C_{máx}$ (plasma). Los resultados se muestran en las **Tablas 2** y **4**, donde IA corresponde a un BPR menor que 0,1, D está entre 0,1 y 0,2, C es 0,2 a 0,5, B comprende 0,5 a 1 y A es mayor que 1.

65 Ensayo de inhibición de la desacetilasa en la célula (ensayo DAC)

Se sembraron células GM 15850 (línea de células linfoblastoides) en placas de 96 pocillos a una densidad apropiada (100.000 células/pocillo) en 90 µl de medio RPMI1640 que contenía 10% v/v de suero fetal bovino (FBS), 1% v/v de penicilina/estreptomicina y L-glutamina al 1% v/v. Las diluciones del compuesto se realizaron en DMSO al 100% seguido de dilución paralela en medios con DMSO al 2%. Se añadieron 10 µl de las diluciones del compuesto a las células para lograr las concentraciones deseadas. La concentración final de DMSO en cada pocillo fue de 0,2%. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Los sedimentos celulares se lavaron con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se lisaron con 45 µL de tampón de lisis (HDAC tampón de ensayo a pH 8,0 (25 mM Tris/HCI, 137 mM NaCI, 2,7 mM KCI, 1 mM MgCl₂) + 1% v/v Igepal CA-630). Para iniciar la reacción, el sustrato de HDAC KI-104 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) se añadió a una concentración final de 50 µM. La reacción se detuvo después de 30 minutos de incubación mediante la adición de 50 ul de revelador (6 mg/ml de tripsina en tampón de ensayo HDAC). La reacción se dejó desarrollar durante 30 minutos a temperatura ambiente y la señal de fluorescencia se detectó usando un fluorómetro (Spectramax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 470 nm respectivamente. Los datos se ajustaron a una ecuación de respuesta a la dosis sigmoidea con pendiente variable en GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) para determinar la IC50. La parte inferior y la parte superior de la curva se fijaron a la respuesta de fluorescencia promedio de los pocillos de control sin células y con células, pero sin compuesto, respectivamente. Las IC50 se informan en las Tablas 2 y 4, donde A representa IC50 menos de 1 µM, B entre $1 \text{ y} 5 \mu\text{M}$, C de 5 a $10 \mu\text{M}$, D de $10 \text{ a} 20 \mu\text{M}$ e IA para IC50 por encima de $20 \mu\text{M}$.

20 Ensayo de proliferación celular

10

15

25

30

35

Células HCT116 (5000 células/pocillo) en 80 ml de medio McCoy 5A que contenía 10% v/v de FBS, 1% v/v de penicilina/estreptomicina y 1% v/v de L-glutamina se incubaron en placas de 96 pocillos con compuestos a diversas concentraciones durante 72 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las diluciones del compuesto se realizaron en DMSO al 100% seguido de diluciones paralelas en medios. La concentración final de DMSO en cada pocillo fue de 0,05%. Después de 72 h, se añadieron a las células 20 μl de Cell titer 96 una solución acuosa (Promega Corporation, Madison, WI) y la placa se incubó a 37 °C durante otras 4 h. La absorbancia a 490 nm se registró luego en un lector de placas de 96 pocillos (Spectramax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El análisis de datos se realizó en Microsoft Excel (Microsoft Corp, Redmond, WA). ((O.D. Muestra – O.D. promedio control positivo)/(O.D. promedio control negativo - O.D. promedio control positivo))*100, donde O.D. es la absorbancia medida, O.D. control positivo es la absorbancia de las células incubadas con tricostatina A 5 μM y la O.D. control negativo es la absorbancia medida de las células incubadas sin ningún compuesto, se trazó contra la concentración del compuesto y se determinó una Cl50 por interpolación gráfica de la concentración requerida para una inhibición del 50% del crecimiento celular. Las IC50 se presentan en la **Tabla 2**, donde A representa IC50 inferior a 5 μM, B cubre el intervalo entre 5 y 10 μM, C es de 10 a 20 μM e IA se utiliza para IC50 mayor que 20 μM.

Efecto de los inhibidores de la HDAC sobre la expresión de ARNm de frataxina (FXN)

Se recoge sangre de los donantes de pacientes con ataxia de Friedreich en tubos que contienen el EDTA anticoagulante. 40 Los linfocitos primarios se aíslan utilizando un medio de separación de linfocitos (MP Biomedicals, Solon, OH) siguiendo las instrucciones del fabricante e incluyendo algunas modificaciones realizadas por Repligen. Después de un lavado final en solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se distribuyen en una placa de cultivo celular de 6 pocillos en medio de crecimiento celular. El compuesto inhibidor de HDAC de prueba se agrega a las células de una manera creciente de la dosis (generalmente las concentraciones varían de 1 a 10 µM) y se agrega DMSO 0,1% a un pocillo de células como un control sin tratamiento. Las células se incuban durante 48 horas a 37 °C en una incubadora de CO2; los recuentos 45 celulares se toman utilizando un contador celular automático Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se granulan cantidades equivalentes de células para todas las condiciones de tratamiento mediante centrifugación y se resuspenden en tampón de lisis celular. El ARN total se aísla de aproximadamente 1x106 linfocitos primarios utilizando un kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante e incluyendo una etapa opcional de digestión de ADNsa en 50 columna. El aislamiento se realiza manualmente o usando el QIAcube (Qiagen, Valencia, CA), un instrumento que automatiza gran parte del procedimiento de aislamiento. El rendimiento y la concentración de ARN se determinan utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y, según la concentración de ARN, se utiliza uno de los dos protocolos para medir los niveles de transcripción de frataxina (FXN). Para las muestras que contienen al menos 15 ng/ul de ARN se utiliza un método qRT-PCR basado en la sonda TagMan® (Applied Biosystems, 55 Carlsbad, CA), mientras que para las muestras que contienen menos de 15 ng/µl de ARN se utiliza el método SYBR Green qRT-PCR. En el método basado en la sonda TaqMan®, los pares de cebador/sonda específicos para FXN y GAPDH se multiplexan en cada reacción. En el método SYBR Green, FXN y GAPDH se amplifican en reacciones separadas. En ambos métodos, cada muestra de ARN se analiza por triplicado (preferiblemente) o por duplicado (mínimamente) utilizando una mezcla maestra qRT-PCR de un solo paso que contiene todos los componentes necesarios para la síntesis de ADNc y la amplificación por PCR en una única reacción continua. Después de completar el ciclo, se utiliza el software 60 MxPro (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) para analizar los datos recopilados y determinar la cantidad relativa de ARNm FXN en comparación con una muestra de control. Se utiliza un método de línea base adaptativo para la corrección de la línea base mediante el cual un algoritmo selecciona automáticamente los ciclos de línea base apropiados para cada pocillo y cada tinte. Se establece un umbral basado en la amplificación y se obtiene el ciclo umbral correspondiente, o Ct, para calcular la concentración objetivo. Se promedian los valores de Ct para cada gen objetivo (FXN y GAPDH) para cada 65 serie replicada. La cantidad de FXN (o GAPDH) en la muestra se determina como la cantidad relativa al calibrador donde

se asigna a la muestra del calibrador una cantidad arbitraria de 1. Se utiliza la siguiente ecuación: cantidad relativa al calibrador = $2^{-\Delta Ct}$ donde ΔCt = (Ct_gen)desconocido - (Ct_gen)calibrador, el gen es FXN o GAPDH, el calibrador es una muestra de control DMSO y desconocido es una muestra tratada con HDACi. La cantidad relativa de FXN se normaliza con el número de células y la entrada de ARN. Los datos se informan en las **Tablas 2** y **4** a continuación, donde la concentración requerida para un aumento de 2 veces en el ARNm de FXN se informa como A si es inferior a 5 μ M, B si está entre 5 y 10 μ M, C si es superior a 10 μ M.

Tabla 2: Resultados de los ensayos de estabilidad en ácido, DAC, antiproliferación, expresión de ARNm de frataxina y distribución de tejidos

compuesto	estabilidad en ácido	850 DAC	Hct-116	FXN 2x	BPR
F1 (compuesto de referencia)	В	IA			IA
F2 (compuesto de referencia)	В	D	Α	Α	Α
F3 (compuesto de referencia)	В	В	Α	Α	С
F4 (compuesto de referencia)	В	В	Α	Α	В
D2 (compuesto de referencia)		IA	IA	С	С
F5 (compuesto de referencia)		С			
F6 (compuesto de referencia)		D			

Protocolo para la estabilidad del compuesto en hepatocitos

Evaluar la estabilidad y el metabolismo de los compuestos RGFP en los hepatocitos. Este ensayo fue diseñado para evaluar el metabolismo de los compuestos de RGFP, luego de su incubación con hepatocitos humanos, de mono, de perro y de rata mediante el monitoreo de la desaparición de fármacos parentales o la aparición de metabolitos usando HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 4 ((% restante en Hep: IA < 10%, 50% < A, 50% > B > 30%, 30% > C > 10%, ND: no determinado).

Equipo: Applied Biosystem Triple Quadrupole LC/MS/MS; Ice Bucker, temporizador; placas de 96 pocillos; Falcon, Cat# 353072; agitador de placas de 96 pocillos; Varias pipetas: 10 μl, 20 μl, 200 μl y 1000 μl; tubos de ensayo: Catálogo # VWR 47729-572, 13x 100 mm

Tabla 3: Materiales y reactivos

Artículo	Vendedor	Catálogo #
Hepatocitos humanos	Celsis	X008001
Hepatocitos de mono	Celsis	M00350
Hepatocitos de perro	Celsis	M00205
Hepatocitos de rata	Celsis	M00005
Torpedo Antibiotic Mix	Invitro Technologies	Z99000
Medio In VitroGRO HT	Celsis	Z99019
In VitroGRO KHB	Celsis	Z99074
Acetonitrilo	Fisher	A-9981
Metanol	Fisher	A-4521
Solución azul de tripano	Sigma Chemical	T-8154

Procedimiento: Encender el calentador de baño de agua a 37 °C. Tomar el tampón KHB y asegurarse de que esté a temperatura ambiente antes de usarlo. Preparar una concentración de 2,5 mM del compuesto RGFP en patrón de DMSO. Agregar 10 µl del patrón de DMSO anterior a 2490 µl de tampón KHB; la concentración final del compuesto RGFP será de 10 µM. Precalentar 45 ml de medio InVitro HT a 37 °C en un tubo cónico estéril de 50 ml. Agregar 1,0 ml de mezcla Torpedo Antibiotic Mix por 45 ml de medio InVitro HT. Transferir 13 ml de medio HT tibio con mezcla antibiótica a un tubo cónico de 15 ml. Retirar con cuidado los viales de hepatocitos del nitrógeno líquido (fase líquida). Sumergir inmediatamente el vial en un baño de agua a 37 °C. Agitar suavemente hasta que el hielo se derrita por completo. No mantener las células en el baño de agua a 37 °C más tiempo del necesario. Vaciar inmediatamente el contenido del vial

en 13 ml de medio InVitro HT precalentado con antibióticos. Enjuagar el vial con el medio HT al que se acaban de transferir los hepatocitos, para garantizar una transferencia completa. Centrifugar la suspensión celular a 600 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante vertiéndolo en un movimiento (no verter parcialmente y reinvertir el tubo de centrífuga) o aspirarlo con una bomba de vacío. Agregar 1,0 ml de tampón KHB (a temperatura ambiente) al tubo del sedimento de hepatocitos. Aflojar el sedimento celular girando suavemente el tubo de centrífuga. Transferir 100 µl de solución anterior a un tubo diferente y añadir 900 µL de tampón KHB para el recuento de las células. Determinar el recuento total de células y el número de células viables utilizando el método de exclusión de azul de tripano. Una vez que obtenga el recuento celular, multiplicar el número por 10 (atribuyendo al factor de dilución). Ahora agregar el volumen requerido de tampón KHB al tubo que contiene hepatocitos de modo que el recuento final sea de 2 millones de células/ml. Dispensar 50 µl de 2 millones de células/ml en una placa de 96 pocillos y luego agregar 50 µl del patrón de DMSO a los pocillos respectivos (de modo que la concentración de compuestos RGFP sea de 5 µM y el número de células sea de 100000 en cada pocillo). Colocar las placas en un agitador en una incubadora a 37 °C con 5% de CO₂. Se recomiendan placas separadas para cada punto de tiempo (puntos de tiempo: 0h, 1h, 2h y 6 h). Después de cada punto de tiempo, agregar 100 µl de solución de enfriamiento.

La solución de enfriamiento es una solución de acetonitrilo que contiene el estándar interno RGFP531 (10 μM), ácido fórmico al 0,1% y fenilglioxol (400 μM). El ácido fórmico y el fenilglioxal se usan para la identificación y cuantificación de OPD como se mencionó anteriormente. Pipetear hacia arriba y hacia abajo varias veces para garantizar una parada completa de la reacción. Transferir toda la solución a un tubo de 1,5 ml, agitar bien y centrifugar a 14000 RPM a 4 °C durante 5 minutos para precipitar los restos celulares. Transferir los 150 μl de sobrenadante a viales para análisis utilizando HPLC.

_										
	% restante 6h Hum	С	А	IA	В	С	A	В	С	Ą
	Fxn >2X (uM)	QN	QN	QΝ	QN	ND	A	QN	Ą	4
	DAC IC50 (uM)	С	A	А	С	А	A	ND	В	8
	Cmáx cerebro (ng/m)	ND	o	ND	A	А	Ą	A	A	4
	BPR	QN	С	QN	А	А	А	А	A	A
	HDAC3 IC50 (uM)	А	A	A	А	А	A	A	A	4
Tabla 4*	HDAC2 IC50 (uM)	A	A	QN	ND	8	А	А	A	4
	HDAC1 ICS0 (uM)	А	A	А	А	А	A	А	A	Ф
	tPSA	71	58	64	58	64	58	58	58	79
	clogP	3,50	3,52	1,09	3,29	2,07	2,38	3,10	4,15	2,43
	MW	ΙA	A	8	A	A	A	A	Ą	A
	Estructura	C ₂₆ H ₂₆ GIN ₄ O	C22/P3cON3O	C.,7H.5FN2O2	C ₂ ·H ₂₂ ClN ₃ O	C,7H13CIN ₂ O ₂	C ₂ , H ₂ ,N ₃ ,O ₄	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O	C _{2e} H _{2r} N ₂ C	HO N N N N N N N N N N N N N N N N N N N
	Codificación	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15

	Fxn >2X % restante (uM) 6h Hum	C	O C	C	A	A	
	Fxn >2X (uM)	QN	QN	QN	QN	ND	
	DAC IC50 (uM)	QN	QN	QN	QN	QN	
	Cmáx cerebro (ng/m)	QN	QN	ND	ND	ND	
	BPR	ND	ND	ND	ND	ND	
jn)	HDAC3 IC50 (uM)	A	A	A	А	А	
(continuación)	HDAC2 IC50 (uM)	A	A	A	8	8	
	HDAC1 ICS0 (uM)		А	А	А	В	
	tPSA	70,7	58,4	70,7	78,6	58,3	
	clogP	2,37	3,37	1,87	1,71	2,88	de referencia.
	MW	Ą	Ą	A	A	A	estos de
	Estructura	Coathgan.	H H L L L L L L L L L L L L L L L L L L	N H H H H H H H H H H H H H H H H H H H	HOT NOT HE	C ₂ , H ₂ z FN ₃ O	*donde F7, F9 - F12 y F16 - F20 son compuestos
	Codificación	F16	F17	F18	F19	F20	*donde F7, F

Efecto de los compuestos en la memoria a largo plazo para el reconocimiento de objetos

5

10

15

20

Los ratones machos C57BL/6J se manejaron 1-2 minutos durante 5 días y se habituaron al aparato experimental 5 minutos al día durante 4 días consecutivos en ausencia de objetos. Durante la prueba de entrenamiento, los ratones se colocaron en el aparato experimental con dos objetos idénticos y se les permitió explorar estos objetos durante 3 minutos, lo que no da como resultado una memoria a corto o largo plazo (Stefanko y otros, 2009). Inmediatamente después del entrenamiento, los ratones recibieron inyecciones subcutáneas de cualquier vehículo (20% de glicerol, 20% de PEG 400, 20% de propilenglicol y acetato de sodio 100 mM, pH 5,4), compuesto de referencia 1, RGFP109, inhibidor de la HDAC clase I, (3, 10, 30 mg/kg), compuesto de referencia 2, RGFP136 (3, 10, 30 mg/kg) o compuesto **D2** (3, 10, 30 mg/kg). 24 horas después, se evaluó la retención de memoria (5 min) en ratones utilizando la tarea de memoria de reconocimiento de objetos (ORM), en la que se reemplazó un objeto familiar por uno nuevo. Se grabaron en video todos los ensayos de entrenamiento y prueba y se analizaron por personas a ciegas de las condiciones de tratamiento y al genotipo de los sujetos. Se calificó a un ratón como explorando un objeto cuando su cabeza estaba orientada hacia el objeto dentro de una distancia de 1 cm o cuando la nariz tocaba el objeto. El tiempo de exploración relativo se registró y se expresó mediante un índice de discriminación [DI = (tnuevo - tfamiliar)/(tnuevo + tfamiliar) X 100].

Todas las dosis de los compuestos mejoraron significativamente la formación de memoria a largo plazo en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 1). Se observaron efectos dependientes de la dosis con RGFP 109 y 136, pero no hubo efecto de la dosis para **D2**. La falta de un efecto de dosis observado para **D2** probablemente se deba a su mayor penetración cerebral, de modo que 3 mg/kg son suficientes para producir el efecto conductual completo. Ver Figura 1

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

10 Het $\mathbb{R}^{\mathbb{R}^{\mathbb{A}}}$ (II)

en el que

15 R^A es H o F;

25

35

65

R^C es H, Cl o F;

Het es piperidinilo, y el nitrógeno del anillo está sustituido con RB;

R^B es alguilo C1-C6, hidroxialguilo C1-C6 o alguileno C1-C3-cicloalguilo C3-C6.

- 20 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^A es H.
 - 3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que RA es F.
 - 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R^B es alquilo C1-C6 o hidroxialquilo C1-C6.
 - 5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que R^B es CH₂C(CH₃)₃ o CH₂C(OH)(CH₃)₂.
 - 6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que R^B es alquileno C1-C3-cicloalquilo C3-C6.
- 7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que R^B es ciclopropilo CH₂.
 - 8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R^C es H.
 - 9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R^C es F.
 - 10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que R^C es Cl.
 - 11. El compuesto de la reivindicación 9 o 10, en el que R^c es orto al sustituyente Het.
- 40 12. El compuesto de la reivindicación 9 o 10, en el que R^C es meta al sustituyente Het.
 - 13. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

50

CI

NH2,

NH2,

HO

Me

NH2,

HO

Me

NH2,

NH2,

NH2

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15. Un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en medicina.
- 16. Un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de ataxia de Friedreich, distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, síndrome X frágil, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Kennedy, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal y bulbar y enfermedad de Alzheimer; una infección que incluye infección viral; un cáncer; una enfermedad inflamatoria; una afección de deterioro de la memoria y una adicción a las drogas.

10

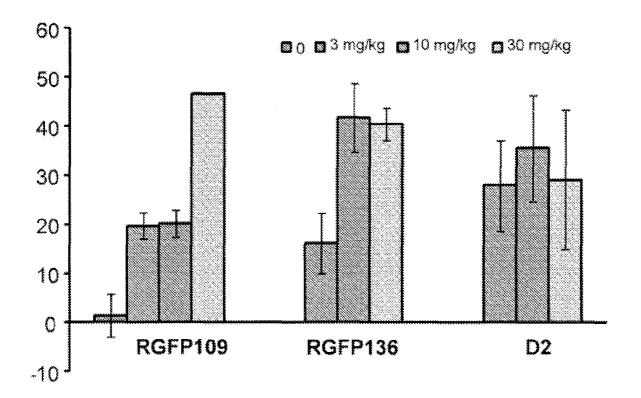


FIGURA 1