

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 305**

51 Int. Cl.:

A01N 55/02 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 16171555 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3092901**

54 Título: **Análogos de quinolona y métodos relacionados con los mismos**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 978042 P

21.03.2008 US 38681 P

17.04.2008 US 45933 P

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

03.11.2020

73 Titular/es:

**SENHWA BIOSCIENCES, INC (100.0%)
10F, No. 225, Sec. 3, Peihsin Rd., Hsintien Dist.
New Taipei City 23143, TW**

72 Inventor/es:

**NAGASAWA, JOHNNY YASUO;
PIERRE, FABRICE;
HADDACH, MUSTAPHA;
SCHWAEBE, MICHAEL;
DARJANIA, LEVAN y
WHITTEN, JEFFREY, P.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 791 305 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de quinolona y métodos relacionados con los mismos

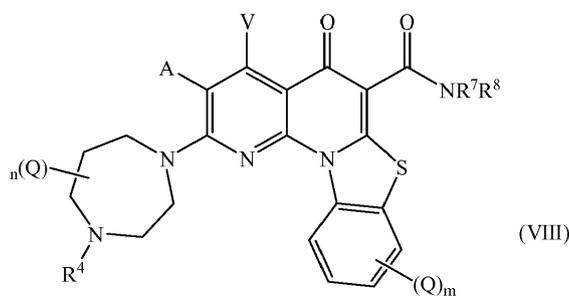
Campo de la invención

5 La invención se refiere a nuevos compuestos de quinolona y composiciones farmacéuticas de los mismos. La invención también se refiere a métodos para usar y preparar tales compuestos y composiciones de quinolona para inhibir la proliferación celular y/o inducir la apoptosis celular. El documento WO2006/034113 analiza análogos de quinolona que pueden inhibir la proliferación celular y/o inducir apoptosis celular. El documento WO2006/034113 también discute métodos para preparar análogos de quinolona, y métodos para usar los mismos.

Resumen de la invención

10 La presente invención proporciona nuevos compuestos de quinolona y composiciones farmacéuticas de los mismos que pueden inhibir la proliferación celular y/o inducir la apoptosis celular. La presente invención también proporciona métodos para preparar tales compuestos y composiciones de quinolona, y métodos para tratar trastornos de proliferación celular mediante la administración de los mismos.

La invención proporciona un compuesto de Fórmula (VIII),



15

o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo; donde:

A y V independientemente son H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰, o -L-N(R)-W⁰;

20 cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰, o -L-N(R)-W⁰;

en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como miembro del anillo;

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, o =O;

25 R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alqueno C2-C10 o heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-7 miembros opcionalmente sustituido;

R³ es un alquilo C1-C10, alqueno C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de estos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-6 miembros opcionalmente sustituido;

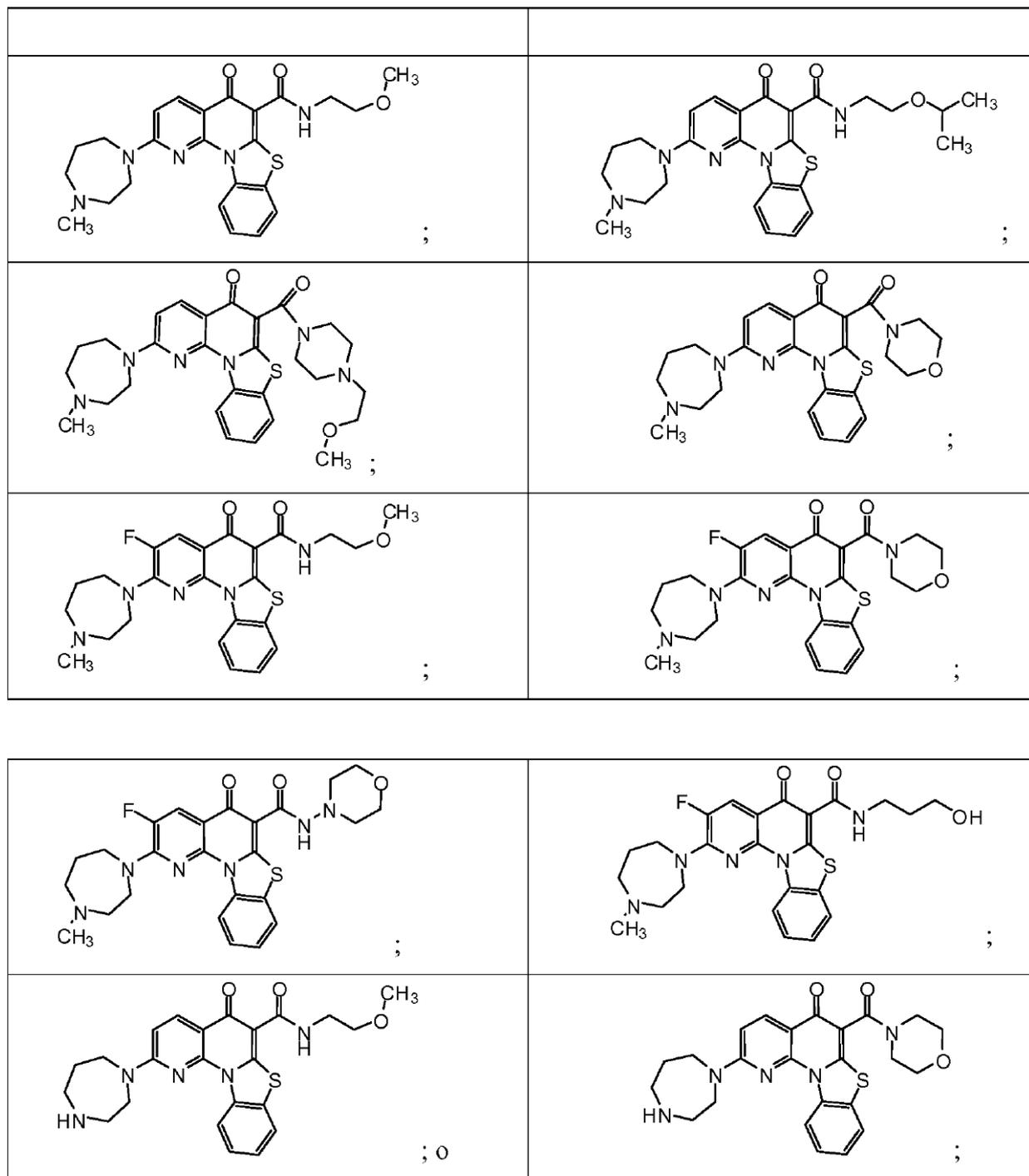
30 cada R⁴ es independientemente H o alquilo C1-C6, cada R es independientemente H o alquilo C1-C6;

R⁷ es H y R⁸ es alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alqueno C2-C10 o heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-7 miembros opcionalmente sustituido; o en -NR⁷R⁸, R⁷ y R⁸ junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que opcionalmente contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como miembro del anillo;

35 m es 0;

n es 0;

- L es un alquileo C1-C10, heteroalquileo C1-C10, alqueniileo C2-C10 o un conector heteroalqueniileo C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, oxo (=O), o alquilo C1-C6;
- 5 W es un anillo azacíclico de 4-7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como miembro del anillo; y
- W⁰ es un anillo carbocíclico de 3-4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de 1 a 4 átomos de flúor.
- 10 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (VIII), como se describe adicionalmente aquí o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para administración oral. En otras realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (VIII) como se describe adicionalmente aquí para usar en un método para tratar un trastorno de proliferación celular.
- 15 En algunas realizaciones, el trastorno de proliferación celular es un tumor o cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano o animal.
- En ciertas realizaciones de Fórmula (VIII), A y V son independientemente H y halo, preferiblemente flúor. En algunas realizaciones preferidas, A y V son cada uno H. En otras realizaciones preferidas, A es flúor y V es H.
- En los compuestos de Fórmula (VIII) de la presente invención, m es 0 y n es 0. Por lo tanto, se entenderá que cada posición que de otro modo estaría sustituida por un grupo Q está sustituida por hidrógeno.
- 20 En una realización preferida de Fórmula (VIII), R⁴ es alquilo C1-C4. En una realización particularmente preferida, R⁴ es metilo. En otra realización preferida, R⁴ es H.
- En algunas realizaciones de fórmula (VIII), R⁸ es un alquilo C₁₋₄ sustituido con un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones preferidas, R⁸ es un alquilo C₁₋₄ sustituido con un anillo de imidazol, piridina, pirimidina, piridazina o pirazina opcionalmente sustituidos. En otras realizaciones, R⁷ y R⁸ junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como un miembro del anillo.
- 25 En algunas realizaciones, R⁷ es H y R⁸ es un alquilo C₁₋₄ sustituido con un anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido. En algunas de tales realizaciones, el anillo heterocíclico aromático opcionalmente sustituido se selecciona de piridina, pirimidina, pirazina, imidazol, pirrolidina y tiazol.
- 30 En ciertas realizaciones preferidas de Fórmula (VIII), R⁷ es H y R⁸ se selecciona de -CH₂CH₂OCH₃, -CH₂CH₂OCH(CH₃)₂, -CH₂-(piridina), -CH₂-(metil piridina), -CH₂-(metil pirimidina), -CH₂-(pirimidina), -CH₂-(pirazina), -CH₂-(metil pirazina), -CH₂-(imidazol); -CH₂-(N-metil imidazol); -CH₂-(pirrolidina); -CH₂-(N-metil pirrolidina); -CH₂-(tiazol); y CH₂-(N-metil tiazol).
- En algunas realizaciones preferidas de Fórmula (VIII), R⁷ y R⁸ junto con N en -NR⁷R⁸ forman un anillo de morfolina, tiomorfolina, piperidina o piperazina opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones preferidas de Fórmula (VIII), R⁷ y R⁸ junto con N en -NR⁷R⁸ forman un anillo de morfolina o piperazina opcionalmente sustituido.
- 35 En ciertas realizaciones particularmente preferidas, el compuesto de Fórmula (VIII) comprende dos o más características preferidas, a veces tres o más características preferidas.
- Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen los compuestos mostrados en las Tablas 1-8 y en todos los Ejemplos.
- 40 En ciertas realizaciones particularmente preferidas, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:



o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto que tiene la Fórmula (VIII) anterior, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, la composición comprende un compuesto que tiene cualquiera de las fórmulas anteriores, polietilenglicol y propilenglicol en una solución reguladora.

5

Los compuestos de la divulgación ejercen actividad biológica en los ensayos descritos en este documento. Por ejemplo, los compuestos de la divulgación pueden inhibir la biogénesis de ARN y pueden suprimir el crecimiento tumoral. Aunque no se limita la divulgación por ninguna teoría de su operación, se cree que los compuestos pueden funcionar en parte al interactuar con regiones de ácidos nucleicos que forman cuádruplex y modulan la transcripción de ARN ribosómico. Los compuestos de la divulgación también pueden modular la interacción de ácidos nucleicos formadores de cuádruplex con nucleolina, una proteína que está asociada con la apoptosis; así, la modulación de la actividad, localización o estabilidad

10

de la nucleolina también puede contribuir a la capacidad de estos compuestos para inducir apoptosis. La presente divulgación también proporciona métodos para preparar estos compuestos, y métodos para usar los mismos.

5 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere en parte a métodos para reducir la proliferación celular y/o inducir la muerte celular, que comprende poner en contacto un sistema con una cantidad efectiva de un compuesto que tenga cualquiera de las fórmulas anteriores, o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente en combinación con un agente quimioterapéutico, reduciendo así la proliferación celular y/o induciendo la muerte celular, como la apoptosis o la muerte celular apoptótica, en dicho sistema. El sistema puede ser una célula o un tejido. En una realización, el sistema incluye una célula pancreática, tal como una célula de un sujeto o una célula cultivada (por ejemplo, in vitro o ex vivo). En realizaciones particulares, el sistema incluye una célula de cáncer pancreático. En una realización, el sistema es una línea celular como PC3, HCT116, HT29, MIA Paca-2, HPAC, Hs700T, Panc10.05, Panc 02.13, PL45, SW 190, Hs 766T, CFPAC-1, PANC-1, MV-4-11, THP-1 y K-562.

15 La presente divulgación también proporciona métodos para tratar o mejorar un trastorno proliferativo celular, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente en combinación con un agente quimioterapéutico, tratando o mejorando dicho trastorno de proliferación celular. Por ejemplo, la proliferación celular puede reducirse y/o puede inducirse la muerte celular, como la apoptosis o la muerte celular apoptótica. El trastorno de proliferación celular puede ser un tumor o un cáncer en un sujeto humano o animal. En una realización particular, el cáncer es cáncer pancreático, que incluye tumores no endocrinos y endocrinos. Ejemplos ilustrativos de tumores no endocrinos incluyen, entre otros, adenocarcinomas, carcinomas de células acinares, carcinomas adenocarcinosos, tumores de células gigantes, neoplasias mucinosas papilares intraductales, cistadenocarcinomas mucinosos, pancreatoblastomas, cistadenomas serosos, tumores sólidos y pseudopapilares. Un tumor endocrino puede ser un tumor de células de islote.

25 Los métodos anteriores para reducir la proliferación celular y/o inducir la muerte celular también se pueden practicar en combinación con un procedimiento y/o un agente quimioterapéutico. Ejemplos de procedimientos que pueden usarse en combinación con los métodos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, radioterapia y cirugía. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación se administran en combinación con un agente quimioterapéutico, y se usan para reducir la proliferación celular, inducir la muerte celular y/o mejorar un trastorno proliferativo celular.

La divulgación también proporciona métodos para reducir o inhibir la proliferación celular, que comprende poner en contacto un sistema o un sujeto que lo necesita con una cantidad efectiva del compuesto de Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo, reduciendo o inhibiendo así la proliferación celular.

30 Además, la presente divulgación proporciona métodos para reducir los títulos microbianos, que comprenden poner en contacto un sistema con una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente antimicrobiano, reduciendo así los títulos microbianos. El sistema puede ser una célula o un tejido. La presente divulgación también proporciona métodos para mejorar una infección microbiana, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto que tenga cualquiera de las fórmulas anteriores, o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente antimicrobiano, mejorando de ese modo dicha infección microbiana. El sujeto puede ser humano o un animal. Los títulos microbianos pueden ser títulos virales, bacterianos o fúngicos.

40 La presente divulgación también se refiere a métodos para determinar la selectividad de interacción entre un compuesto que tiene cualquiera de las fórmulas anteriores, y ácidos nucleicos capaces de formar una estructura cuádruple, que comprende: a) poner en contacto un compuesto en ausencia de una molécula competidora con tres o más ácidos nucleicos capaces de formar una estructura cuádruple, en donde cada ácido nucleico no es un ácido nucleico de telómero; b) medir una interacción directa entre el compuesto y dichos tres o más ácidos nucleicos; y c) determinar la selectividad de interacción a partir de una comparación de las medidas de interacción. En un ejemplo, tres o más ácidos nucleicos comprenden una secuencia de nucleótidos localizada en 5' de una secuencia de nucleótidos oncogénica. El oncógeno puede ser MYC, HIF, VEGF, ABL, TGF, PDGF α , MYB, SPARC, HER, VAV, RET, H-RAS, EGF, SRC, BCL-1, BCL-2, DHFR o HMGA. Al determinar la selectividad de interacción, el compuesto puede ponerse en contacto por separado con cada uno de dichos tres o más ácidos nucleicos en un recipiente diferente. Además, la selectividad de interacción puede determinarse a partir de una comparación de los valores de IC₅₀.

50 Los compuestos de la presente divulgación pueden o no interactuar con regiones de ADN que pueden formar cuádruplex. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación pueden unirse y/o estabilizar una hélice cuádruplex. Ejemplos de cuádruplex de hélice incluyen, entre otros, H-RAS, RET, BCL-1, DHFR, TGF- β , HIF-1 α , VEGF, c-Myc o PDGF α . En otra realización, el compuesto puede unir y/o estabilizar un cuádruplex en silla-acodada o una cesta. Por ejemplo, el compuesto puede unirse y/o estabilizar BCL-2.

55 La presente divulgación también proporciona métodos para inducir la muerte celular, tales como la muerte celular apoptótica (apoptosis), que comprende administrar a un sistema o sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un

compuesto que tiene la Fórmula (VIII), o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente quimioterapéutico. La presente divulgación también proporciona métodos para tratar o mejorar un trastorno mediado por sobreexpresión de oncogenes, tal como sobreexpresión de c-Myc, que comprende administrar a un sistema o sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto que tenga cualquiera de las fórmulas, o una composición farmacéutica del mismo y opcionalmente con un agente quimioterapéutico. El sujeto puede ser humano o animal, y el sistema puede ser una célula o un tejido.

Los compuestos de las fórmulas anteriores también pueden ser capaces de modular las actividades de varias proteínas quinasa, ya que contienen características estructurales que se sabe que se unen a las proteínas quinasa y, por consiguiente, son útiles para la identificación de moduladores de proteína quinasa utilizando métodos de detección conocidos en la técnica. En este documento se proporcionan métodos de detección representativos para ciertas quinasa. En consecuencia, la divulgación proporciona un método para identificar un modulador de una proteína quinasa, cuyo modulador a veces es un potente modulador de una o más proteínas quinasa particulares. Este método comprende la exploración de una biblioteca de compuestos descritos en el presente documento que contiene al menos 10 compuestos diferentes, cada uno de los cuales es de Fórmula (VIII), y con frecuencia al menos 100 de dichos compuestos, por su capacidad para modular la actividad de una proteína quinasa.

Como alternativa, el método comprende seleccionar un conjunto de proteínas quinasa, tales como al menos tres o al menos diez proteínas quinasa, con un compuesto de Fórmula (VIII), para determinar un perfil de actividad diferencial. Estos métodos permiten al usuario identificar un compuesto que tiene un nivel deseado de actividad y/o selectividad como un modulador de la actividad de la proteína quinasa, compuesto que puede usarse para iniciar un programa de desarrollo de fármacos. Por lo tanto, en otra realización, la divulgación proporciona una composición que comprende una proteína quinasa aislada en un complejo con un compuesto de Fórmula (VIII). Tales complejos son útiles por la información que proporcionan sobre el sitio de unión de un compuesto modulador a la quinasa particular, y como una herramienta de investigación para analizar la estructura de la quinasa. Dichos complejos también son útiles porque pueden cristalizarse más fácilmente que la quinasa no complejada, permitiendo la cristalización y la determinación de la estructura cristalina donde no sería posible sin el compuesto modulador unido.

En el presente documento también se proporciona un método para identificar una molécula que modula una interacción entre un ácido nucleico ribosómico y una proteína que interactúa con el ácido nucleico, que comprende: (a) poner en contacto un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos y proteína con una molécula de prueba que tiene cualquiera de las estructuras descritas anteriormente, donde el ácido nucleico es capaz de unirse a la proteína, y (b) detectar la cantidad de ácido nucleico unido o no unido a la proteína, por lo que se identifica la molécula de prueba como una molécula que modula la interacción cuando una cantidad diferente del ácido nucleico se une a la proteína en presencia de la molécula de prueba en ausencia de la molécula de prueba. En algunas realizaciones, la proteína se selecciona del grupo que consiste en Nucleolina, Fibrilarina, RecQ, QPN1 y fragmentos funcionales de los anteriores.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para identificar una molécula que causa desplazamiento de nucleolina, que comprende (a) poner en contacto un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos y una proteína de nucleolina con una molécula de prueba de Fórmula (VIII), donde el ácido nucleico es capaz de unirse a la proteína nucleolina, y (b) detectar la cantidad de ácido nucleico unido o no unido a la proteína nucleolina, por lo que la molécula de prueba se identifica como una molécula que causa el desplazamiento de la nucleolina cuando menos del nucleico el ácido se une a la proteína de nucleolina en presencia de la molécula de prueba que en ausencia de la molécula de prueba. En algunas realizaciones, la proteína de nucleolina está asociada con un marcador detectable, y la proteína de nucleolina a veces está asociada con una fase sólida. El ácido nucleico a veces está asociado con un marcador detectable, y el ácido nucleico puede estar asociado con una fase sólida en ciertas realizaciones. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o un análogo del mismo, y puede comprender una secuencia de nucleótidos descrita anteriormente en realizaciones específicas. También se proporciona una composición que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos ribosómica proporcionada en este documento, o una secuencia sustancialmente idéntica de los mismos, y/o una proteína que se une a la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, Nucleolina, Fibrilarina, RecQ, QPN1 y fragmentos funcionales de los anteriores), y un compuesto de Fórmula (VIII).

También se proporciona un método para identificar una molécula que se une a un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos, que comprende: (a) poner en contacto un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos descrita aquí, un compuesto que se une al ácido nucleico y una molécula de prueba de Fórmula (VIII), y (b) detectar la cantidad del compuesto unido o no unido al ácido nucleico, por lo que la molécula de prueba se identifica como una molécula que se une al ácido nucleico cuando menos del compuesto se une al ácido nucleico en presencia de la molécula de prueba que en ausencia de la molécula de prueba. El compuesto a veces está asociado con un marcador detectable y, a veces, está radiomarcado. El ácido nucleico puede estar asociado con una fase sólida en ciertas realizaciones. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o un análogo del mismo, y puede

comprender una secuencia de nucleótidos descrita anteriormente en realizaciones específicas. El ácido nucleico puede formar un cuádruplex, tal como un cuádruplex intramolecular, en ciertas realizaciones.

5 En el presente documento también se proporciona un método para identificar un modulador de síntesis de ácido nucleico, que comprende poner en contacto un ácido nucleico plantilla, un oligonucleótido cebador que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de ácido nucleico plantilla, nucleótidos de extensión, una polimerasa y una prueba molécula de Fórmula (VIII), en condiciones que permiten que el oligonucleótido cebador hibrida con el ácido nucleico plantilla, en donde el ácido nucleico plantilla comprende una secuencia de nucleótidos ribosómicos humanos, y detecta la presencia, ausencia o cantidad de un producto cebador alargado sintetizado por extensión del ácido nucleico cebador, mediante el cual la molécula de prueba se identifica como un modulador de la síntesis de ácido nucleico cuando se sintetiza menos del producto cebador alargado en presencia de la molécula de prueba que en ausencia de la molécula de prueba.

10 En ciertas realizaciones, el método está dirigido a identificar un modulador de síntesis de ARN, y en ciertas realizaciones, identificar un modulador de síntesis de ARN nucleolar. El ácido nucleico plantilla a veces es ADN y a veces es ARN, y la plantilla puede incluir a modo de ejemplo cualquiera o más de las secuencias de nucleótidos ribosómicos descritas en el presente documento. La polimerasa a veces es una ADN polimerasa y a veces es una ARN polimerasa. En ciertas realizaciones, las células se ponen en contacto con un compuesto de prueba de Fórmula (VIII) y se detectan niveles de ARN en las células, por lo que un compuesto de prueba que reduce la cantidad de ARN en comparación con las células no tratadas con el compuesto de prueba se identifica como una molécula que modula la síntesis de ARN. En las últimas realizaciones, se pueden evaluar los niveles totales de ARN, y en algunas realizaciones, se puede evaluar la cantidad total de ARN recién sintetizado, tal como mediante la incorporación y detección de un nucleótido detectable en el ARN (por ejemplo, nucleótido marcado radiactivamente (por ejemplo, nucleótido tritiado)), por ejemplo.

15 En una realización de ensayo específica, se proporciona aquí un método para identificar una molécula que modula la síntesis de ARN ribosómico (ARNr), que comprende: poner en contacto las células con una molécula de prueba de Fórmula (VIII), poner en contacto una secuencia de nucleótidos ribosómicos con uno o más cebadores que amplifican una porción de la misma y una sonda marcada que se hibrida con el producto de amplificación, y detectar la cantidad del producto de amplificación por hibridación de la sonda marcada, por lo que una molécula de prueba que reduce o aumenta la cantidad de producto de amplificación se identifica como molécula que modula la síntesis de ARNr. La sonda marcada en algunas realizaciones se agrega después de que se agregan los cebadores y se amplifica el ARNr, y en ciertas realizaciones, la sonda marcada y los cebadores se agregan al mismo tiempo. La porción de la secuencia de nucleótidos ribosómicos amplificada a veces se encuentra en el extremo 5' del ADNr.

20 En ciertas realizaciones, la invención proporciona una biblioteca de compuestos, biblioteca que comprende al menos 10 compuestos de Fórmula (VIII). La biblioteca contiene preferiblemente al menos 100 de tales compuestos. Esta biblioteca se puede usar para identificar compuestos que tienen una o más de las actividades descritas en el presente documento, o una combinación específica de tales actividades usando métodos conocidos en la técnica. El método es particularmente útil para identificar moléculas que tienen un nivel umbral de actividad biológica, que incluyen, pero no se limitan a (a) unión a ácido nucleico cuádruplex o inhibición de la formación de ácido nucleico cuádruplex (ADNr o ARNr), (b) actividad contra una proteína quinasa específica o conjunto de proteínas quinasa y (c) actividad como un modulador de la unión de un ácido nucleico a una proteína, como la nucleolina, por ejemplo.

Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 muestra una comparación de los valores de casete y AUC individuales para la administración oral de compuestos RBI.

Definiciones

45 La presente divulgación puede entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la divulgación y los Ejemplos incluidos en el presente documento. Debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones específicas solamente y no pretende ser limitante.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación.

Como se usa en el presente documento, "uno" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más".

50 Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" significa que el valor numérico es aproximado y que pequeñas variaciones no afectarían significativamente la práctica de la divulgación. Cuando se usa una limitación numérica, a menos que el contexto indique lo contrario, "aproximadamente" significa que el valor numérico puede variar en $\pm 10\%$ y permanecer dentro del alcance de la divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un compuesto que contiene carbono. Los grupos "alquilo" pueden ser lineales o ramificados. Los grupos alquilo cíclicos se denominan en el presente documento "cicloalquilo". "Heteroalquilo" se refiere a un compuesto en donde al menos un átomo de carbono de la cadena principal de alquilo ha sido reemplazado por un heteroátomo, típicamente N, O u S. Sustituyentes opcionales cuando están presentes en una unidad estructural alquilo, alquenoilo o alquinoilo, o una heteroforma de uno de estos, incluyen pero no se limitan a OH, alcoxi C₁₋₆, amino opcionalmente sustituido, amido, CN, carboxi, halo, =O, arilo, anillos heterocíclicos o carbocíclicos opcionalmente sustituidos, o sustituyentes inorgánicos.

Como se usa en el presente documento, el término "carbociclo" se refiere a un compuesto cíclico que contiene solo átomos de carbono en el anillo, mientras que un "heterociclo" se refiere a un compuesto cíclico que comprende un heteroátomo como miembro del anillo. Las estructuras carbocíclicas y heterocíclicas abarcan compuestos que tienen sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos o múltiples, y pueden ser saturados, parcialmente insaturados o aromáticos. Los anillos carbocíclicos y heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con grupos sustituyentes adecuados para su estructura.

Como se usa en el presente documento, el término "azacíclico" o "anillo azacíclico" se refiere a un anillo monocíclico saturado, parcialmente insaturado o aromático de 3-7 miembros o un sistema de anillo bicíclico fusionado de 8-12 miembros que contiene al menos un átomo de nitrógeno. Tales anillos azacíclicos pueden contener opcionalmente de 1-2 heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S como miembros del anillo, y pueden estar opcionalmente sustituidos en la medida en que dicha sustitución tenga sentido químico.

Como se usa en este documento, el término "arilo" se refiere a un sustituyente hidrocarbonado poliinsaturado, típicamente aromático, mientras que un "heteroarilo" o "heteroaromático" se refiere a un anillo aromático que contiene un heteroátomo como miembro del anillo. Las estructuras arilo y heteroarilo abarcan compuestos que tienen sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos o múltiples, y pueden estar opcionalmente sustituidos.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" se refiere a cualquier átomo que no sea carbono o hidrógeno, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre.

"Heteroformo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo en donde uno o más átomos de carbono de una unidad estructural hidrocarbilo se han reemplazado con un heteroátomo, típicamente N, O u S. Por ejemplo, heteroarilo es el heteroformo de arilo y heteroalquilo es el heteroformo de alquilo.

Ejemplos ilustrativos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrofurano, 1,3-dioxolano, 2,3-dihidrofurano, pirano, tetrahidropirano, benzofurano, isobenzofurano, 1,3-dihidro-isobenzofurano, isoxazol, 4,5-dihidroisoxazol, piperidina, pirrolidina, pirrolidin-2-ona, pirrol, piridina, pirimidina, octahidro-pirrol[3,4-b]piridina, piperazina, pirazina, morfolina, tiomorfolina, imidazol, imidazolidina-2,4-diona, 1,3-dihidrobencimidazol-2-ona, indol, tiazol, benzotiazol, tiadiazol, tiofeno, tetrahidro-tiofeno 1,1-dióxido, diazepina, triazol, guanidina, diazabicyclo[2.2.1]heptano, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, 2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-carbolina, oxirano, oxetano, tetrahidropirano, dioxano, lactonas, aziridina, azetidina, piperidina, lactamas, y también puede abarcar heteroarilos. Otros ejemplos ilustrativos de heteroarilos incluyen, entre otros, furano, pirrol, piridina, pirimidina, imidazol, bencimidazol y triazol.

Ejemplos ilustrativos de anillos azacíclicos incluyen, pero sin limitación, aziridina, azetidina, imidazol, imidazolina, pirrol, pirrolina, pirrolidina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, piridina, dihidropiridina, tetrahidropiridina, piperidina, piperazina, pirimidina, piridazina, pirazina, morfolina, tiomorfolina, homopiperazina, homomorfolina, homotiomorfolina, benzimidazol y anillos de indol.

Los sustituyentes preferidos cuando están presentes en un anillo azacíclico o heterocíclico incluyen halo, =O, acilo, aroilo, carbamoilo, o un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido; o alquilo C₁₋₆, alquenoilo C₂₋₆, alquinoilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido o heteroformas de estos; u -OR⁵, -NR⁵R⁶, -COOR⁵ o -C(O)NR⁵R⁶, donde cada uno de R⁵ y R⁶ es independientemente H, o alquilo, arilo o arilalquilo C₁-C₆, o una heteroforma de uno de estos; y en donde en cada -NR⁵R⁶, R⁵ y R⁶ junto con N pueden formar un anillo de 5-6 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como un miembro del anillo.

Los sustituyentes particularmente preferidos cuando están presentes en un anillo azacíclico aromático incluyen uno o más grupos halo o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituidos, en donde dichos sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en halo, hidroxilo y oxo (=O).

Los sustituyentes preferidos cuando están presentes en un anillo arilo o heteroarilo incluyen alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquenoilo C₂₋₆, alquinoilo C₂₋₆; halo, -CN, -CF₃, -OCF₃, NO₂; u -OR⁵, -NR⁵R⁶, -COOR⁵ o -C(O)NR⁵R⁶, -SO₂NR⁵R⁶, -NC(O)R⁵ o -NSO₂R⁵, donde cada uno de R⁵ y R⁶ es independientemente H, o alquilo C₁-C₆, arilo, o arilalquilo, o una heteroforma de uno de estos; y en donde en cada -NR⁵R⁶, R⁵ y R⁶ junto con N pueden formar un anillo de 5-7 miembros

opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como miembro del anillo.

5 Como se usa en el presente documento, el término "sustituyente inorgánico" se refiere a sustituyentes que no contienen carbono o que contienen carbono unido a elementos distintos del hidrógeno (por ejemplo, carbono elemental, monóxido de carbono, dióxido de carbono y carbonato). Ejemplos de sustituyentes inorgánicos incluyen, pero no se limitan a, nitro, halógeno, sulfonilos, sulfinilos, fosfatos, etc.

10 Los términos "tratar", "tratamiento" y "efecto terapéutico" tal como se usan en el presente documento se refieren a reducir o detener una tasa de proliferación celular (por ejemplo, ralentizar o detener el crecimiento tumoral) o reducir el número de células cancerosas en proliferación (por ejemplo, eliminar parte o la totalidad de un tumor). Estos términos también son aplicables para reducir el título de un microorganismo en un sistema (es decir, célula, tejido o sujeto) infectado con un microorganismo, reduciendo la tasa de propagación microbiana, reduciendo el número de síntomas o el efecto de un síntoma asociado con la infección microbiana, y/o eliminar cantidades detectables del microbio del sistema. Ejemplos de microorganismos incluyen, entre otros, virus, bacterias y hongos.

15 Como se usa en el presente documento, el término "agente quimioterapéutico" se refiere a un agente terapéutico que puede usarse para tratar o mejorar un trastorno de proliferación celular tal como tumores o cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, un agente antineoplásico, un agente alquilante, un alcaloide vegetal, un agente antimicrobiano, una sulfonamida, un agente antiviral, un agente de platino y otros agentes anticancerígenos conocidos en la técnica. Ejemplos particulares de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, cisplatino, carboplatino, busulfano, metotrexato, daunorrubicina, doxorrubicina, ciclofosfamida, mephalan, vincristina, vinblastina, clorambucil, paclitaxel, gemcitabina y otros conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics (9th Ed) (Goodman, et al., eds.) (McGraw-Hill) (1996); y 1999 Physician's Desk Reference (1998)).

25 Como se usa en este documento, el término "apoptosis" se refiere a un programa de autodestrucción o suicidio de células intrínsecas. En respuesta a un estímulo desencadenante, las células experimentan una cascada de eventos que incluyen la contracción celular, la formación de ampollas en las membranas celulares y la condensación y fragmentación cromática. Estos eventos culminan en la conversión celular en grupos de partículas unidas a la membrana (cuerpos apoptóticos), que luego son engullidos por los macrófagos.

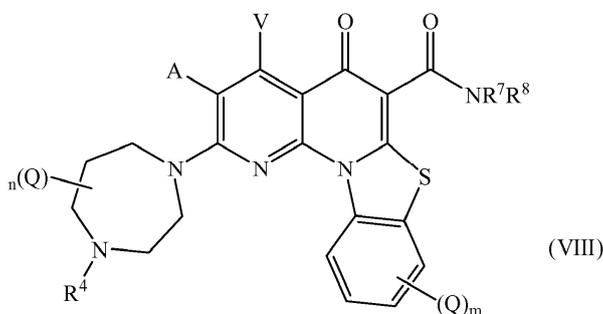
Como se usa en el presente documento, "sujeto" se refiere a un sujeto humano o animal. En ciertas realizaciones preferidas, el sujeto es humano.

Descripción de la invención.

30 La presente invención se refiere a compuestos que tienen la Fórmula ((VIII)), y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. La invención proporciona análogos de quinolona oralmente activos que pueden inhibir la proliferación celular y/o inducir apoptosis celular. La presente divulgación también proporciona métodos para preparar tales análogos de quinolona activos por vía oral, y métodos para tratar trastornos de proliferación celular mediante la administración de los mismos.

35 Los compuestos de la presente invención pueden o no interactuar con regiones de ADN que pueden formar cuádruplex.

Los compuestos de la presente invención que tienen la Fórmula (VIII) se reproducen más adelante:



en donde A, V, R⁴, R⁷, R⁸, Q, m y n se definen como se describió adicionalmente aquí.

40 Los compuestos de la presente invención pueden ser quirales. Como se usa en el presente documento, un compuesto quiral es un compuesto que es diferente de su imagen especular y tiene un enantiómero. Además, los compuestos pueden ser racémicos, o un enantiómero o estereoisómero aislado. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para sintetizar compuestos quirales y resolver una mezcla racémica de enantiómeros. Véase, por ejemplo, March, "Advanced Organic Chemistry", John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, (1985).

Los compuestos de la presente invención pueden probarse usando ensayos de detección tales como los descritos en este documento.

5 Los compuestos descritos en el presente documento pueden interactuar con regiones de ácidos nucleicos que pueden formar cuádruplex. Debido a que las regiones de ADN que pueden formar cuádruplex son reguladores de procesos biológicos como la transcripción de oncogenes, los moduladores de la actividad biológica cuádruplex pueden utilizarse como terapéuticos contra el cáncer. Las moléculas que interactúan con regiones de ADN que pueden formar cuádruplex pueden ejercer un efecto terapéutico sobre ciertos trastornos proliferativos celulares y afecciones relacionadas. Particularmente, la expresión anormalmente elevada de oncogenes puede causar trastornos proliferativos celulares, y las estructuras cuádruplex típicamente regulan negativamente la expresión de oncogenes. Ejemplos de oncogenes incluyen, entre otros, MYC, HIF, VEGF, ABL, TGF, PDGFA, MYB, SPARC, HUMTEL, HER, VAV, RET, H-RAS, EGF, SRC, BCL1, BCL2, DHFR, HMGA y otros oncogenes conocidos por un experto en la materia. Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden inducir la muerte celular (por ejemplo, apoptosis) y no interactuar con regiones de ADN que pueden formar cuádruplex.

15 Las moléculas que se unen a regiones de ADN que pueden formar cuádruplex pueden ejercer un efecto biológico de acuerdo con diferentes mecanismos, que incluyen, por ejemplo, estabilizar una estructura cuádruplex nativa, inhibir la conversión de un ADN cuádruplex nativo a dúplex bloqueando la división de la cadena, y estabilizando una estructura cuádruplex nativa que tiene una sustitución de nucleótidos desestabilizadora cuádruplex y otras interacciones específicas de secuencia. Por lo tanto, los compuestos que se unen a regiones de ADN que pueden formar cuádruplex descritos en este documento pueden administrarse a células, tejidos u organismos con el propósito de regular a la baja la transcripción de oncogenes y, por lo tanto, tratar los trastornos proliferativos celulares.

25 Determinar si la actividad biológica del ADN nativo que puede formar cuádruplex está modulada en una célula, tejido u organismo puede lograrse monitorizando la actividad biológica cuádruplex. Las regiones de formación cuádruplex de la actividad biológica del ADN pueden monitorizarse en células, tejidos u organismos, por ejemplo, detectando una disminución o aumento de la transcripción génica en respuesta al contacto del ADN de formación cuádruplex con una molécula. La transcripción puede detectarse observando directamente transcripciones de ARN u observando polipéptidos traducidos por transcripciones, que son métodos bien conocidos en la técnica.

30 Las moléculas que interactúan con el ADN de formación cuádruplex y los ácidos nucleicos de formación cuádruplex pueden utilizarse para tratar muchos trastornos proliferativos celulares. Los trastornos de proliferación celular incluyen, por ejemplo, cánceres colorrectales y trastornos neoplásicos hematopoyéticos (es decir, enfermedades que involucran células hiperplásticas/neoplásicas de origen hematopoyético tales como las que surgen de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos). Las enfermedades pueden surgir de leucemias agudas poco diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides adicionales incluyen, entre otros, leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (LMC) (Vaickus, Crit. Rev. in Oncol./Hematol. 11: 267-297 (1991)). Los tumores malignos linfoides incluyen, entre otros, leucemia linfoblástica aguda (LLA), que incluye LLA de linaje B y LLA de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Las formas adicionales de linfomas malignos incluyen, entre otros, el linfoma no Hodgkin y sus variantes, linfomas periféricos de células T, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg. Los trastornos de proliferación celular también incluyen cáncer colorrectal, de mama, pulmón, hígado, páncreas, ganglios linfáticos, colon, próstata, cerebro, cabeza y cuello, piel, hígado, riñón y corazón. Los compuestos que interactúan con regiones de ADN que pueden formar cuádruplex también se pueden utilizar para atacar procesos y afecciones relacionadas con el cáncer, como el aumento de la angiogénesis, al inhibir la angiogénesis en un sujeto.

45 La presente divulgación proporciona un método para reducir la proliferación celular o para tratar o aliviar trastornos proliferativos celulares, que comprende poner en contacto un sistema que tiene un ADN nativo capaz de formar una región cuádruplex con un compuesto que tiene cualquiera de las fórmulas anteriores. El sistema puede ser un grupo de células o uno o más tejidos. En una realización, el sistema es un sujeto que necesita un tratamiento de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un mamífero como un ratón, rata, mono o humano). La presente divulgación también proporciona un método para tratar el cáncer colorrectal mediante la administración de un compuesto que interactúa con una región de formación cuádruplex de c-MYC a un sujeto que lo necesite, reduciendo así la proliferación de células de cáncer colorrectal. Además, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la angiogénesis y opcionalmente tratar un cáncer asociado con la angiogénesis, que comprende administrar un compuesto que interactúa con una región de formación cuádruplex del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a un sujeto que lo necesite, reduciendo así la angiogénesis y opcionalmente tratamiento de un cáncer asociado con angiogénesis.

55 Los compuestos que interactúan con regiones de ADN que forman cuádruplex también pueden usarse para reducir una infección microbiana, tal como una infección viral. Los retrovirus ofrecen una gran cantidad de objetivos potenciales para

la terapéutica dirigida G-cuádruplex. Las estructuras G-cuádruplex se han implicado como elementos funcionales en al menos dos estructuras secundarias formadas por ARN viral o ADN en el VIH, la estructura del conector dímero (DLS) y el colgajo central de ADN (CDF). Además, los aptámeros de ADN que pueden adoptar estructuras cuádruplex intermoleculares o intramoleculares pueden inhibir la replicación viral. En un ejemplo, los aptámeros de ADN pueden inhibir la replicación viral dirigiéndose a la glucoproteína de la envoltura (supuestamente). En otro ejemplo, los aptámeros de ADN inhiben la replicación viral apuntando a la integrasa del VIH respectivamente, lo que sugiere la participación de estructuras cuádruplex nativas en interacción con la enzima integrasa.

Las estructuras enlazadoras de dímero, que son comunes a todos los retrovirus, sirven para unir dos copias del genoma viral mediante una interacción no covalente entre los dos extremos 5' de las dos secuencias de ARN viral. El dímero genómico está asociado de forma estable con la proteína gag en la partícula de virus maduro. En el caso del VIH, el origen de esta unión no covalente puede rastrearse hasta una secuencia de 98 pares de bases que contiene varias extensiones de al menos dos guaninas consecutivas (por ejemplo, el 3' para la formación de dímeros de ARN in vitro). Una dependencia observada de cationes (potasio) para la formación y estabilidad del dímero in vitro, además del fracaso de una secuencia antisentido para dimerizar efectivamente, ha revelado que la estructura de unión más probable es un G-cuádruplex intermolecular.

Antes de la integración en el genoma del huésped, el ADN viral de transcripción reversa forma un complejo de preintegración (PIC) con al menos dos proteínas virales principales, integrasa y transcriptasa reversa, que posteriormente se transporta al núcleo. El colgajo de ADN central (CDF) se refiere a la cola monocatenaria de 99 bases de longitud de la cadena +, que se presenta cerca del centro del ADN viral dúplex, del que se sabe que juega un papel en la importación nuclear del PIC. Se ha demostrado que los imitadores oligonucleotídicos del CDF forman estructuras intermoleculares G-cuádruplex en sistemas libres de células.

Por lo tanto, los compuestos que reconocen las regiones de formación cuádruplex se pueden usar para estabilizar la estructura del conector dímero y así evitar el desacoplamiento de las dos cadenas de ARN. Además, al unirse a la estructura cuádruplex formada por el CDF, el reconocimiento de proteínas y/o los eventos de unión para el transporte nuclear del PIC pueden verse afectados. En cualquier caso, puede existir una ventaja sustancial sobre otras terapias antivirales. Los regímenes terapéuticos antirretrovirales altamente activos actuales (HAART) dependen del uso de combinaciones de medicamentos dirigidos a la proteasa del VIH y la integrasa del VIH. El requisito para los regímenes de múltiples medicamentos es minimizar la aparición de resistencia, que generalmente se desarrollará rápidamente cuando los agentes se usan de forma aislada. La fuente de tal resistencia rápida es la infidelidad de la enzima transcriptasa reversa que produce una mutación aproximadamente una vez cada 10.000 pares de bases. Una ventaja de apuntar a estructuras cuádruplex virales sobre objetivos proteicos es que el desarrollo de resistencia es lento o imposible. Una mutación puntual del cuádruplex objetivo puede comprometer la integridad de la estructura cuádruplex y conducir a una copia no funcional del virus. Un único agente terapéutico basado en este concepto puede reemplazar los múltiples regímenes farmacológicos actualmente empleados, con los beneficios concomitantes de la reducción de costes y la eliminación de las interacciones perjudiciales entre medicamentos.

La presente divulgación proporciona un método para reducir un título microbiano en un sistema, que comprende poner en contacto un sistema que tiene una región de formación cuádruplex de ADN nativo con un compuesto que tiene cualquiera de las fórmulas anteriores. El sistema puede ser una o más células o tejidos. Ejemplos de títulos microbianos incluyen, entre otros, títulos virales, bacterianos o fúngicos. En una realización particular, el sistema es un sujeto que necesita un tratamiento para una infección viral (por ejemplo, un mamífero como un ratón, rata, mono o humano). Ejemplos de infecciones virales incluyen infecciones por un virus de hepatitis (por ejemplo, Hepatitis B o C), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), rinovirus, virus herpes-zoster (VZV), virus herpes simple (por ejemplo, HSV-1 o HSV-2), citomegalovirus (CMV), virus vaccinia, virus de la gripe, virus de la encefalitis, hantavirus, arbovirus, virus del Nilo Occidental, virus del papiloma humano (VPH), virus de Epstein-Barr y virus sincicial respiratorio. La presente divulgación también proporciona un método para tratar la infección por VIH administrando un compuesto que tiene cualquiera de las fórmulas anteriores a un sujeto que lo necesita, reduciendo así la infección por VIH.

Identificación de compuestos que pueden unirse a regiones de ADN que forman cuádruplex

Los compuestos descritos en el presente documento pueden unirse a regiones de ADN de formación cuádruplex donde una actividad biológica de esta región, con frecuencia expresada como una "señal", producida en un sistema que contiene el compuesto es diferente de la señal producida en un sistema que no contiene el compuesto. Si bien las señales de fondo se pueden evaluar cada vez que se analiza una nueva molécula mediante el ensayo, no se requiere detectar la señal de fondo cada vez que se analiza una nueva molécula.

Además de determinar si una molécula de prueba o un ácido nucleico de prueba da lugar a una señal diferente, se puede cuantificar la afinidad de la interacción entre el ácido nucleico y el compuesto. Los valores umbral de IC_{50} , K_d o K_i pueden compararse con los valores medidos de IC_{50} o K_d para cada interacción, y de ese modo identificar una molécula de prueba como una molécula de interacción cuádruplex o un ácido nucleico de prueba como un ácido nucleico formador de

cuádruplex. Por ejemplo, con frecuencia se utilizan valores umbral de IC_{50} o K_d de 10 μM o menos, 1 μM o menos y 100 nM o menos. En otro ejemplo, se pueden utilizar valores umbral de 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, y 10 pM o menos para identificar moléculas que interactúan en cuádruplex y ácidos nucleicos que forman cuádruplex.

5 Se dispone de muchos ensayos para identificar compuestos que tienen afinidad por las regiones de ADN que forman cuádruplex. En algunos de estos ensayos, la actividad biológica es la unión cuádruple de ácido nucleico a un compuesto y la unión se mide como una señal. En otros ensayos, la actividad biológica es una función de detención de la polimerasa de un cuádruplex y el grado de detención se mide como una disminución en una señal. En ciertos ensayos, la actividad biológica es la transcripción y los niveles de transcripción pueden cuantificarse como una señal. En otro ensayo, la actividad biológica es la muerte celular y se cuantifica el número de células que experimentan la muerte celular. Otro
10 ensayo monitoriza las tasas de proliferación de las células cancerosas. Ejemplos de ensayos son ensayos de unión a fluorescencia, ensayos de desplazamiento de movilidad de gel (véase, por ejemplo, Jin & Pike, Mol. Endocrinol. (1996) 10: 196-205), ensayos de detención de polimerasa, ensayos de indicador de transcripción, ensayos de proliferación de células cancerosas y ensayos de apoptosis (véase, por ejemplo, Amersham Biosciences (Piscataway, Nueva Jersey)), y las realizaciones de dichos ensayos se describen más adelante en el Ejemplo 8. Además, los ensayos de topoisomerasa se pueden utilizar para determinar si las moléculas de interacción cuádruplex tienen una actividad de ruta de
15 topoisomerasa (véase, por ejemplo, TopoGEN, Inc. (Columbus, Ohio)).

Formulación de compuestos

Como se usa en el presente documento, el término "sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo" incluye, pero no se limita a, sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos y ésteres de los compuestos, así como sus formas
20 zwitteriónicas, que son conocidas por aquellos expertos en la materia como adecuados para su uso con humanos y animales (véase, por ejemplo, Gerge, S.M., et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. (1977) 66: 1-19.)

Se puede preparar cualquier formulación adecuada de los compuestos descritos en el presente documento. En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales o bases no tóxicas estables, la administración de los compuestos en forma de sales puede ser apropiada. Ejemplos de sales farmacéuticamente
25 aceptables son las sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de hidrocioruro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Las sales farmacéuticamente aceptables se obtienen usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener sales farmacéuticamente
30 aceptables haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se fabrican sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

Un compuesto puede formularse como una composición farmacéutica y administrarse a un huésped mamífero que necesite dicho tratamiento. En una realización, el huésped mamífero es humano. Se puede usar cualquier vía de
35 administración adecuada, incluidas, entre otras, las vías oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica y subcutánea.

En una realización, un compuesto se administra sistémicamente (por ejemplo, por vía oral) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en tabletas o incorporarse directamente con los alimentos de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con
40 uno o más excipientes y usarse en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos un 0.1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

45 Las tabletas, los trociscos, las píldoras, las cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede agregar un agente edulcorante como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente aromatizante como menta, aceite de gaulteria o sabor a cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, las tabletas, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante como el sabor
50 a cereza o naranja. Cualquier material utilizado para preparar cualquier forma de dosificación unitaria es

farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

5 El compuesto activo también puede administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales pueden prepararse en una solución regulada, con frecuencia solución salina regulada con fosfato, opcionalmente mezclada 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. El compuesto a veces se prepara como una formulación que contiene polimatriz para dicha administración (por ejemplo, un liposoma o microsoma). Los liposomas se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,703,055 (Feigner, et al.) y Gregoriadis, Liposome Technology vols. I a III (2ª ed. 1993).

10 Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que están adaptadas para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusionables 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 vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula 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 y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, reguladores 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.

15 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtro. En el caso de los 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 ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente esterilizadas por filtración.

20 Para la administración tópica, los presentes compuestos pueden aplicarse en forma líquida. Los compuestos con frecuencia se administran como composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido. Se conocen ejemplos de composiciones dermatológicas útiles utilizadas para administrar compuestos a la piel (véase, por ejemplo, Jacquet, et al. (Patente de los Estados Unidos No. 4,608,392), Geria (Patente de los Estados Unidos No. 4,992,478), Smith, et al (Estados Unidos Patente No. 4,559,157) y Wortzman (Patente de los Estados Unidos No. 4,820,508).

25 Los compuestos pueden formularse con un vehículo sólido, que incluye sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que los presentes compuestos pueden disolverse o dispersarse a niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden agregar adyuvantes como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de almohadillas absorbentes, usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o asperjarse sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol. Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados también pueden emplearse con vehículos líquidos para formar pastas para untar, geles, pomadas, jabones y similares, para su aplicación directa a la piel del usuario.

30 En general, la concentración del compuesto en una composición líquida con frecuencia es de aproximadamente 0.1% en peso a aproximadamente 25% en peso, a veces de aproximadamente 0.5% en peso a aproximadamente 10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo con frecuencia es de aproximadamente el 0.1% en peso a aproximadamente el 5% en peso, a veces de aproximadamente el 0.5% en peso a aproximadamente el 2.5% en peso. Una composición de compuesto puede prepararse como una forma de dosificación unitaria, que se prepara de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la industria farmacéutica. En términos generales, tales técnicas incluyen asociar un compuesto con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) y/o excipiente(s) en forma líquida o en forma sólida finamente dividida, o ambos, y luego moldear el producto si es necesario.

35 En un ejemplo particular, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 2% p/p de un compuesto que tiene la fórmula (VIII), aproximadamente 4% de manitol y aproximadamente 0.5% de sacarosa. En ejemplos particulares, la formulación tiene un pH de aproximadamente 3.5. Para formulaciones inyectables, se puede agregar agua al peso final.

5 La composición del compuesto puede formularse en cualquier forma de dosificación, tal como tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad, que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener uno o más estabilizadores.

La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, requerida para su uso en el tratamiento variará no solo con la sal particular seleccionada sino también con la ruta de administración, la naturaleza de la afección a tratar y la edad y condición del paciente y será en última instancia a discreción del médico o clínico asistente.

10 Una dosis de compuesto útil con frecuencia se determina evaluando su actividad in vitro en un sistema celular o tisular y/o actividad in vivo en un sistema animal. Por ejemplo, los métodos para extrapolar una dosis efectiva en ratones y otros animales a humanos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,938,949). Tales sistemas pueden usarse para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) de un compuesto. La relación de dosis entre un efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DE_{50}/DL_{50} . La dosificación compuesta con frecuencia se encuentra dentro de un rango de concentraciones circulantes para las cuales la DE_{50} está asociada con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos descritos en este documento, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. A veces se formula una dosis para lograr un rango de concentración plasmática circulante que cubre la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de síntomas media máxima) como se determina en los ensayos in vitro, ya que dicha información con frecuencia se usa con mayor precisión determinar dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

25 Otro ejemplo de determinación de dosis efectiva para un sujeto es la capacidad de analizar directamente los niveles de compuesto "libre" y "unido" en el suero del sujeto de prueba. Dichos ensayos pueden utilizar imitadores de anticuerpos y/o "biosensores" generados por técnicas de impresión molecular. El compuesto se usa como plantilla, o "molécula de impresión", para organizar espacialmente los monómeros polimerizables antes de su polimerización con reactivos catalíticos. La posterior eliminación de la molécula impresa deja una matriz polimérica que contiene una "imagen negativa" repetida del compuesto y es capaz de volver a unir selectivamente la molécula en condiciones de ensayo biológico (véase, por ejemplo, Ansell, et al., Current Opinion in Biotechnology (1996), 7: 89-94 y en Shea, Trends in Polymer Science (1994) 2: 166-173). Dichas matrices de afinidad "impresas" son susceptibles de ensayos de unión a ligando, por lo que el componente de anticuerpo monoclonal inmovilizado se reemplaza por una matriz adecuadamente impresa (véase, por ejemplo, Vlatakis, et al., Nature (1993) 361: 645-647). Mediante el uso del etiquetado de isótopos, la concentración "libre" del compuesto puede ser fácilmente monitorizada y utilizada en los cálculos de IC_{50} . Dichas matrices de afinidad "impresas" también pueden diseñarse para incluir grupos fluorescentes cuyas propiedades de emisión de fotones cambian de manera considerable con la unión local y selectiva del compuesto. Estos cambios se pueden analizar fácilmente en tiempo real utilizando dispositivos de fibra óptica apropiados, lo que a su vez permite optimizar rápidamente la dosis en un sujeto de prueba en función de su IC_{50} individual. Un ejemplo de dicho "biosensor" se discute en Kriz, et al., Analytical Chemistry (1995) 67: 2142-2144.

40 En algunas realizaciones, los compuestos y composiciones proporcionados demuestran biodisponibilidad oral en un ratón o sujeto humano. En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones que comprenden el compuesto de Fórmula (VIII) que son al menos 15% biodisponibles por vía oral en un ratón o un sujeto humano. En otras realizaciones, las composiciones son biodisponibles al menos 20%, 30%, 40% o 50% por vía oral en un ratón o un sujeto humano. En una realización preferida, el sujeto es humano. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la biodisponibilidad oral demostrada por los compuestos de la presente invención puede deberse al menos en parte al estado de protonación de la unidad estructural básica presente en el grupo representada como -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰.

50 Los compuestos de ejemplo de la presente invención pueden seleccionarse de modo que el ácido conjugado de la unidad estructural básica presente en el grupo representada como -W, -L-W o -L-N(R)-W⁰ tenga un pKa de entre aproximadamente 7 y 9, de modo que el grupo está protonado en aproximadamente un 50% en un rango de pH de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 9.0. En algunas realizaciones, el anillo de homopiperazina en la fórmula (VIII), puede servir como la unidad estructural básica, como se describió anteriormente.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas en forma de dosificación unitaria, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de Fórmula (VIII).

55 En realizaciones específicas, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria, que comprende un compuesto de o Fórmula (VIII), en donde una administración oral única de la forma de dosificación a un sujeto proporciona un AUC (8 h) de al menos 1000 ng/ml *h, preferiblemente mayor que 2000 ng/ml *h, más preferiblemente mayor que 10.000 ng/ml *h.

5 La biodisponibilidad (F) es una medida del grado en que una dosis administrada de un fármaco alcanza la circulación sistémica o el sitio de acción previsto. La biodisponibilidad depende tanto de la velocidad de absorción como del grado en que el fármaco se elimina o metaboliza antes de alcanzar la circulación sistémica. Por ejemplo, un medicamento administrado por vía oral pasa a través del hígado antes de alcanzar la circulación sistémica y puede estar sujeto al metabolismo de primer paso por el hígado o la excreción biliar.

Para ciertas indicaciones terapéuticas, la dosificación oral es la vía de administración preferida, debido a su seguridad, conveniencia y ventajas económicas. El desarrollo de compuestos altamente biodisponibles por vía oral es con frecuencia una consideración importante en el desarrollo de moléculas bioactivas como agentes terapéuticos.

10 La escasa biodisponibilidad oral puede dar como resultado una exposición variable al fármaco activo, y puede conducir a la falta de eficacia o a la sobreexposición a un agente particular. Por ejemplo, la variabilidad polimórfica en las enzimas metabolizadoras de fármacos, como el citocromo P450 o las metiltransferasas, o la administración conjunta con fármacos que inhiben tales enzimas, puede reducir la eliminación del primer pase y aumentar la exposición al fármaco a niveles no deseados o tóxicos.

15 La absorción, que describe la tasa y el grado en que un fármaco abandona su sitio de administración, está influenciada por una serie de variables que incluyen propiedades fisicoquímicas del fármaco que afectan el transporte a través de las membranas y la forma de dosificación seleccionada. Para los compuestos administrados por vía oral, la absorción ocurre predominantemente en el tracto gastrointestinal (GI), y está influenciada por factores que incluyen el área de superficie disponible para la absorción, la extensión del flujo sanguíneo, el estado físico del medicamento y la concentración local del medicamento en el sitio de absorción. En particular, la solubilidad acuosa influirá tanto en la velocidad como en el sitio
20 de absorción. Los fármacos de baja solubilidad con frecuencia muestran una biodisponibilidad deficiente o una absorción irregular, con el grado de absorción afectado por factores como el nivel de dosis, el estado alimentado del paciente y la forma de dosificación. En formas de dosificación sólidas, la tasa de disolución puede ser el factor limitante para determinar la absorción.

25 La solubilidad del fármaco se ve afectada por el gradiente de pH en el tracto GI. Por ejemplo, los medicamentos básicos que son solubles en el ambiente de pH bajo del estómago (pH ~1.2) pueden volverse menos solubles cuando el medicamento alcanza el ambiente de pH más alto del intestino delgado (pH 5 a 7, típicamente alrededor de 6.5), dependiendo del pKa de la droga. Si bien la forma no ionizada de un fármaco se absorberá más rápidamente que la forma ionizada en una ubicación particular en el tracto gastrointestinal, la tasa general de absorción del intestino es mayor que la del estómago, independientemente del estado de ionización, debido a la mayor superficie disponible. (Véase, por
30 ejemplo, Goodman & Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9th Ed.) (Goodman, et al., eds.) (McGraw-Hill) (1996).

Muchos fármacos están compuestos por ácidos débiles o bases débiles, que están presentes en solución como un equilibrio entre sus formas ionizadas (es decir, cargadas) y no ionizadas. El grado de ionización está determinado por el pKa del fármaco, así como por el pH de la solución. El pH influye en la tasa de disociación de los ácidos débiles y las bases débiles. Los ácidos débiles se disocian y se ionizan en un ambiente alcalino, mientras que las bases débiles se ionizan en un ambiente ácido.

El porcentaje de ionización puede calcularse usando la ecuación 1 para los ácidos HA y la ecuación 2 para ácidos BH⁺:

$$\% \text{ ionización} = 100 / (1 + 10^{(pK_a - pH)}) \text{ (Ecuación 1)}$$

$$\% \text{ ionización} = 100 / (1 + 10^{(pH - pK_a)}) \text{ (Ecuación 1)}$$

40 Cuando el pH es igual al pKa, el compuesto estará ionizado al 50%; es decir, la proporción de fármaco ionizado a no ionizado será 50:50. En la ecuación de Henderson-Hasselbalch, pKa = pH cuando el log [base conjugada]/[ácido] = 1. Un aumento en una unidad de pH de pKa (es decir, un aumento en la alcalinidad de la solución) provoca una disminución en el porcentaje ionización de un ácido BH⁺ a solo 9.1%, y hace que un ácido HA se convierta en 90.9% en la forma de base de conjugado ionizado. Un aumento de dos unidades de pH esencialmente desplaza un ácido BH⁺ a la forma de base
45 conjugada no iónica (0.99%), mientras que el ácido HA se ioniza casi por completo (99%). Lo contrario se ve cuando la solución se vuelve más ácida en relación con el valor de pKa del fármaco. (Véase, por ejemplo, Block, en *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* (10th Ed.) (Delgado & Remers, eds.) (Lippincott-Raven) (1998).

50 En un aspecto, se selecciona un compuesto de composición oralmente activo de la presente invención de modo que los compuestos estén ionizados en aproximadamente un 50% a un pH que varía de aproximadamente 7 a aproximadamente 9. Tales compuestos pueden demostrar una biodisponibilidad y eficacia oral óptimas.

En ciertas realizaciones, los grupos preferidos para -W, -L-W y -L-N(R)W⁰ son aquellos que exhiben una constante de disociación, pKa, en soluciones acuosas de tal magnitud que al menos una porción de la amina está ionizada a valores

de pH fisiológicos, por ejemplo, a valores de pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9. Las aminas que exhiben un pKa de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10, preferiblemente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, pueden ser especialmente adecuadas.

Farmacocinética

5 Con base en la cantidad de un compuesto en muestras tomadas en diferentes puntos de tiempo, se pueden determinar los parámetros farmacocinéticos. El experto en la materia puede seleccionar adecuadamente los tipos de parámetros farmacocinéticos y la metodología para determinar los parámetros. Ejemplos de parámetros farmacocinéticos que pueden evaluarse incluyen, pero no se limitan a, la concentración máxima (pico) de fármaco en plasma (C_{max}) (típicamente expresada en ng/ml); el momento en que se produce la concentración máxima de fármaco en plasma (tiempo pico; T_{max});
10 y el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) de fluido (por ejemplo, plasma). El experto en la materia es capaz de calcular dichos parámetros (por ejemplo, Mei et al., AAPS Journal (2006) 8(3), artículo 58 (dirección <http://www.aapsj.org>)).

La biodisponibilidad oral se puede evaluar midiendo el "área bajo la curva" (AUC) o la C_{max} , ambos parámetros bien conocidos en la técnica. El AUC se determina trazando la concentración sérica o plasmática del fármaco a lo largo de la ordenada (eje Y) frente al tiempo a lo largo de la abscisa (eje X). En general, los valores para AUC representan una
15 cantidad de valores tomados de todos los sujetos en una población de prueba y, por lo tanto, son valores medios promediados en toda la población de prueba.

AUC₀₋₈ (ng.h/ml) es el área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo desde el tiempo cero a 8 horas, y puede calcularse usando la regla trapezoidal lineal de acuerdo con Gibaldi, M. and Perrier, D. Pharmacokinetics, segunda edición, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1982). AUC_{0-inf} es el área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo, extrapolada desde el tiempo cero hasta el infinito (expresado en ng.h/ml).
20

Se pueden determinar otros parámetros farmacocinéticos. Por ejemplo, $T_{1/2}$ es la vida media terminal (expresada en h); V_{dss} es el volumen de distribución en estado estacionario (expresado en L/kg); y Cls es el aclaramiento sistémico (expresado en L/h/kg).
25

Dosificaciones

Una dosificación de compuesto útil con frecuencia se determina evaluando su actividad in vitro en un sistema celular o tisular y/o actividad in vivo en un sistema animal. Por ejemplo, los métodos para extrapolar una dosis efectiva en ratones y otros animales a humanos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,938,949). Dichos sistemas pueden usarse para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀
30 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) de un compuesto. La relación de dosis entre un efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DE₅₀/DL₅₀. La dosificación compuesta con frecuencia se encuentra dentro de un rango de concentraciones circulantes para las cuales la DE₅₀ está asociada con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos descritos en este documento, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. A veces se formula una dosis para lograr un rango de concentración plasmática circulante que cubre la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de síntomas media máxima) como se determina en los ensayos in vitro, ya que dicha información con frecuencia se usa con mayor precisión para determinar dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.
35

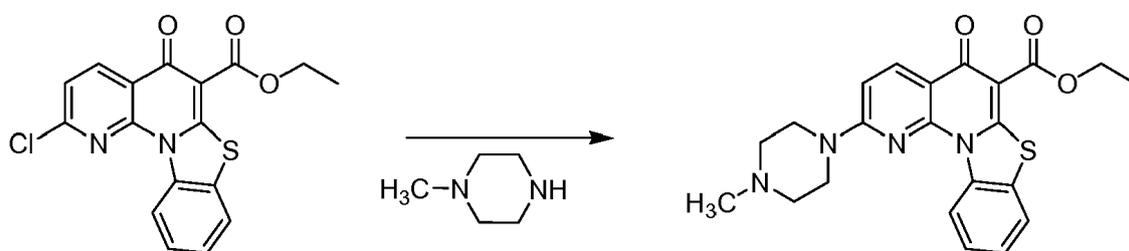
Otro ejemplo de determinación efectiva de dosis para un sujeto es la capacidad de analizar directamente los niveles de compuesto "libre" y "unido" en el suero del sujeto de prueba. Dichos ensayos pueden utilizar imitadores de anticuerpos y/o "biosensores" generados por técnicas de impresión molecular. El compuesto se usa como plantilla, o "molécula de impresión", para organizar espacialmente los monómeros polimerizables antes de su polimerización con reactivos catalíticos. La posterior eliminación de la molécula impresa deja una matriz polimérica que contiene una "imagen negativa" repetida del compuesto y es capaz de volver a unir selectivamente la molécula en condiciones de ensayo biológico (véase, por ejemplo, Ansell, et al., Current Opinion in Biotechnology (1996). 7: 89-94 and in Shea, Trends in Polymer Science (1994) 2: 166-173).
40
45

Dichas matrices de afinidad "impresas" son susceptibles de ensayos de unión a ligando, por lo que el componente de anticuerpo monoclonal inmovilizado se reemplaza por una matriz adecuadamente impresa (véase, por ejemplo, Vlatakis, et al., Nature (1993) 361: 645-647). Mediante el uso del etiquetado de isótopos, la concentración "libre" del compuesto puede ser fácilmente monitorizada y utilizada en los cálculos de IC₅₀. Dichas matrices de afinidad "impresas" también pueden diseñarse para incluir grupos fluorescentes cuyas propiedades de emisión de fotones cambian de manera considerable con la unión local y selectiva del compuesto. Estos cambios se pueden analizar fácilmente en tiempo real utilizando dispositivos de fibra óptica apropiados, lo que a su vez permite optimizar rápidamente la dosis en un sujeto de
50

prueba en función de su IC_{50} individual. Un ejemplo de dicho "biosensor" se discute en Kriz, et al., *Analytical Chemistry* (1995) 67: 2142-2144.

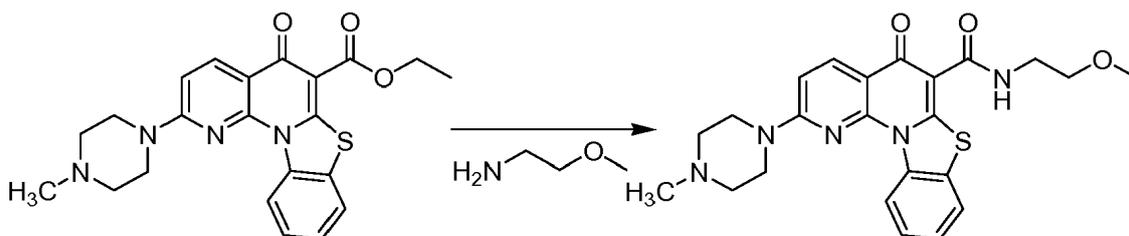
- Las dosis de ejemplo incluyen cantidades de miligramos o microgramos del compuesto por kilogramo de sujeto o peso de muestra, por ejemplo, aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. Se entiende que las dosis apropiadas de una molécula pequeña dependen de la potencia de la molécula pequeña con respecto a la expresión o actividad a modular. Cuando una o más de estas moléculas pequeñas se van a administrar a un animal (por ejemplo, un humano) para modular la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico descrito aquí, un médico, veterinario o investigador puede, por ejemplo, recetar una dosis relativamente baja al principio, luego aumentar la dosis hasta obtener una respuesta adecuada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de medicamentos y el grado de expresión o actividad que se modula.
- Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar la divulgación.

Ejemplo 1



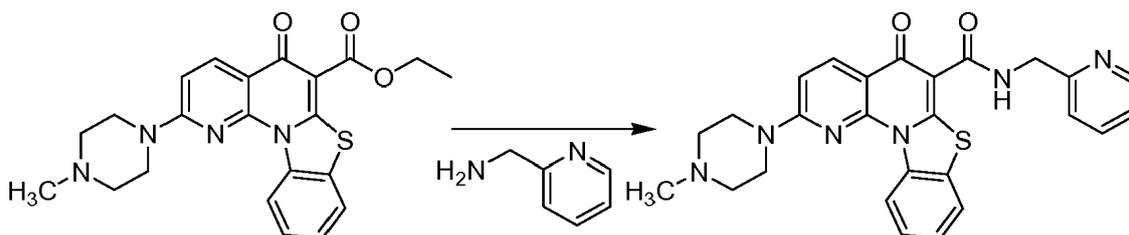
- A una suspensión del cloroéster (5.00 g, 13.94 mmol) en ACN (50 ml) se añadió N-metilpiperazina (3.10 ml, 27.95 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se recogió por filtración para producir el producto deseado como un sólido de color bronce (4.7 g, 80%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 9.47 (d, 1H), 8.62 (d, 1H), 7.74 (dd, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 6.89 (d, 1H), 4.50 (q, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.62 (t, 4H), 2.40 (s, 3H), 1.49 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 423 $[M+1]^+$.

Ejemplo 2



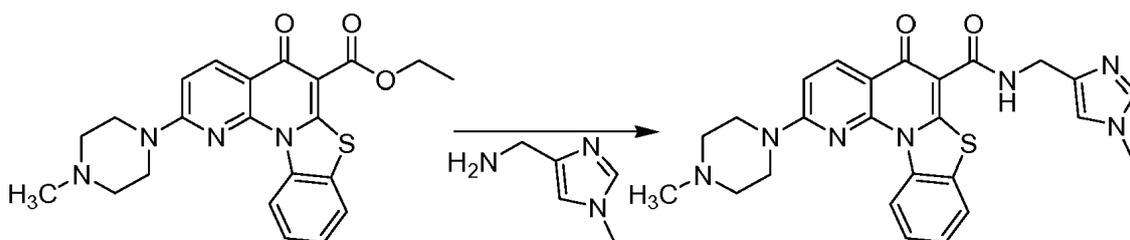
- A una solución del éster (150 mg, 0.34 mmol) y 2-metoxietilamina (0.50 ml, 5.80 mmol) en DCM (10 ml) se añadió $AlCl_3$ (150 mg, 1.12 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y NaOH 6N (25 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 470 $[M+1]^+$.

Ejemplo 3



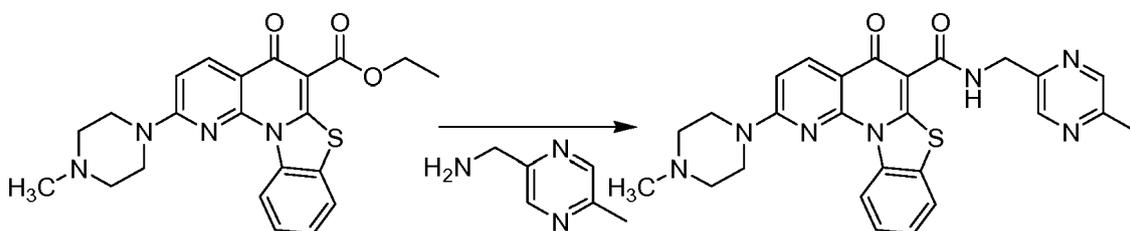
A una solución del éster (1.45 g, 3.44 mmol), piridin-2-ilmetanamina (1.00 ml, 9.78 mmol) y DBU (1.50 ml, 10.03 mmol) en DCM (40 ml) se añadió AlCl_3 (475 mg, 7.31 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (400 ml) y NaOH 1N (200 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x100 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (1.07 g, 64%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 11.24 (t, 1H), 9.50 (d, 1H), 8.62 (m, 2H), 7.77 (dd, 1H), 7.65 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.49 (m, 2H), 6.93 (d, 1H), 4.89 (d, 2H), 3.88 (t, 4H), 2.63 (t, 4H), 2.41 (s, 3H). LCMS (ES): m/z 485 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 4



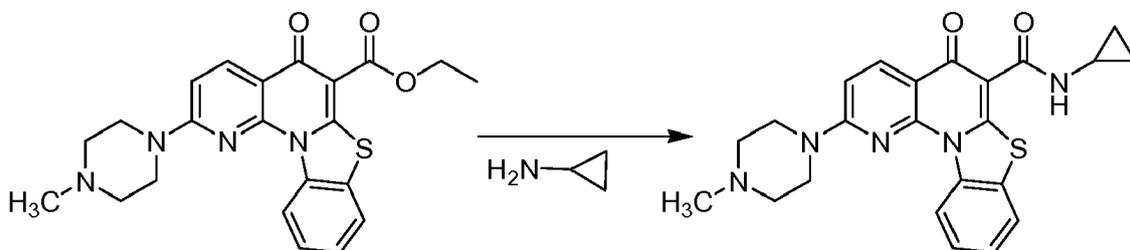
A una solución del éster (150 mg, 0.34 mmol), (1-metil-1H-imidazol-4-il)metanamina (0.15 ml, 1.35 mmol) y DBU (2.00 ml, 1.33 mmol) en DCM (10 ml) se añadió AlCl_3 (130 mg, 0.97 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y NaOH 6N (25 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y la reacción en bruto se purificó en TLC de preparación de sílice (10% MeOH/DCM) para producir el producto deseado. LCMS (ES): m/z 506 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 5



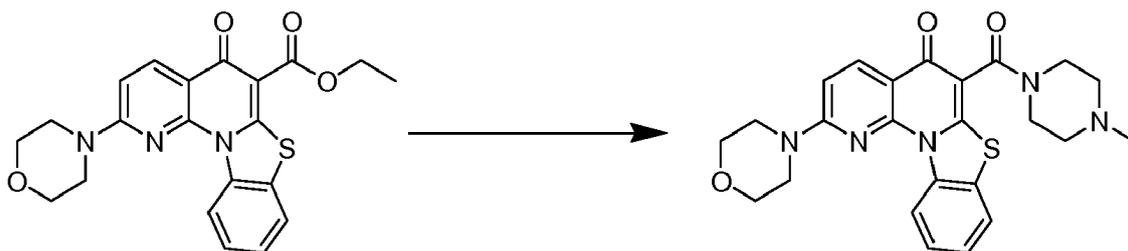
A una solución del éster (72 mg, 0.17 mmol), (5-metilpirazin-2-il)metanamina (0.10 ml, 0.81 mmol) y DBU (0.20 ml, 1.34 mmol) en DCM (10 ml) se añadió AlCl_3 (80 mg, 0.60 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y NaOH 3N (25 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (60 mg, 71%). LCMS (ES): m/z 500 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 6



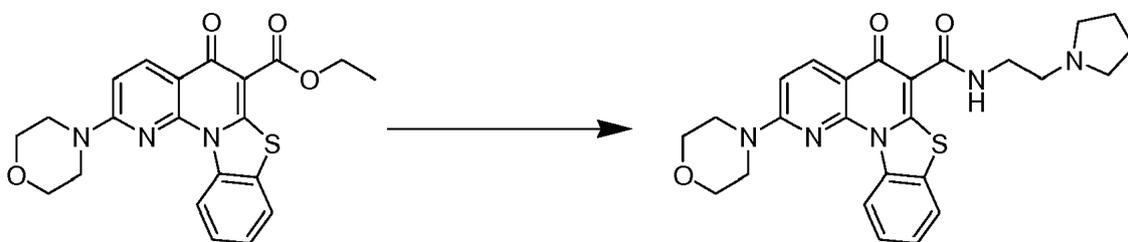
A una solución del éster (100 mg, 0.238 mmol) y ciclopropilamina (37.7 mg, 0.66 mmol) en DCM (10 ml) se añadió DBU (0.35 ml) y AlCl_3 (130 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se diluyó con DCM (30 ml) y NaOH 6N (10 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x10 ml), salmuera (20 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en acetato de etilo para dar el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 431 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 7



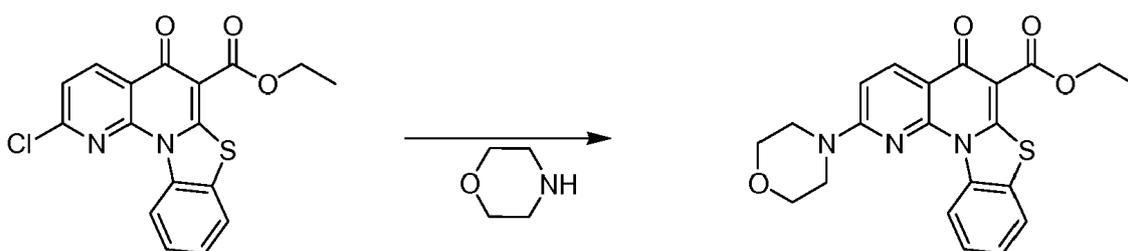
5 A una suspensión del éster de morfolino (1.0 g, 2.44 mmol) en cloruro de metileno (20 ml) se añadió 1-metilpiperazina (370 mg, 3.66 mmol) y cloruro de aluminio (487 mg, 3.66 mmol) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó al vacío y se añadió HCl 1N (10 ml) seguido de 2 ml de una solución saturada de ácido tartárico y la mezcla se agitó durante 30 minutos, hasta que se volvió homogénea y se diluyó con 50 ml de agua. La mezcla resultante se extrajo 3 veces con 20 ml de acetato de etilo (desechado) y luego se basificó con NaOH 1N. El sólido resultante se recogió por filtración, se secó y se trituró con acetonitrilo (20 ml). La filtración proporcionó el compuesto final como un sólido blanco (1.184 g, ligeramente húmedo con acetonitrilo). LCMS (ES): m/z 464 $[M+1]^+$.

Ejemplo 8



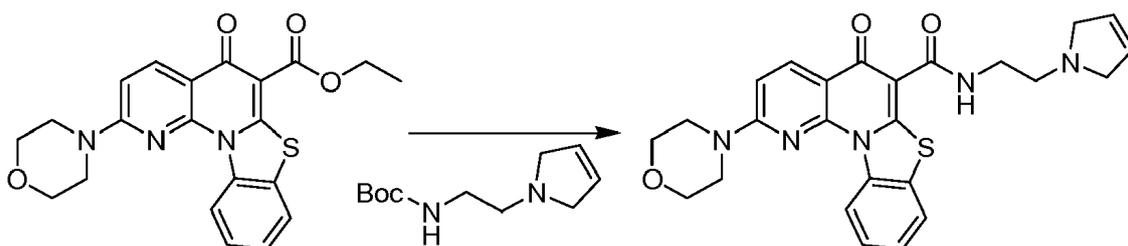
10 A una suspensión del éster de morfolino (1.0 g, 2.44 mmol) en cloruro de metileno (20 ml) se añadió 1-2,aminoetilpirrolidina (418 mg, 3.66 mmol) y cloruro de aluminio (487 mg, 3.66 mmol) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó al vacío y se añadió HCl 1N (10 ml) seguido de 2 ml de una solución saturada de ácido tartárico y la mezcla se agitó durante 30 minutos, hasta que se volvió homogénea y se diluyó con 50 ml de agua. La mezcla resultante se extrajo 3 veces con 20 ml de acetato de etilo (desechado) y luego se basificó con NaOH 1N. El sólido resultante se recogió por filtración, se secó y se trituró con acetonitrilo (20 ml). La filtración proporcionó el compuesto final como un sólido blanco (900 mg, 77%). LCMS (ES): m/z 478 $[M+1]^+$.

Ejemplo 9



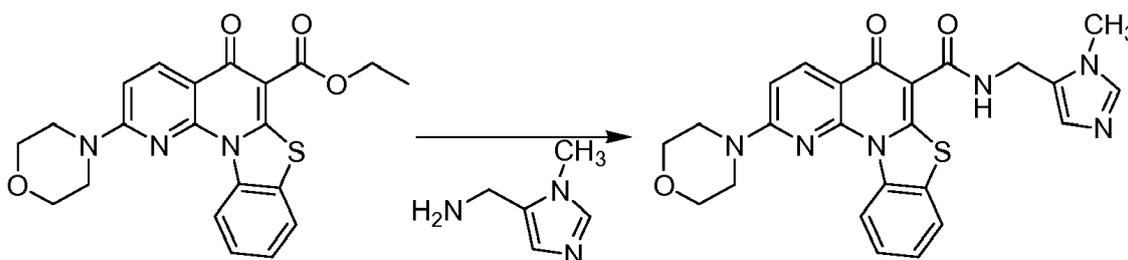
20 A una suspensión del cloroéster (15.00 g, 41.81 mmol) en ACN (150 ml) se añadió morfolina (7.5 ml, 85.74 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se recogió por filtración. El sólido se disolvió luego en $CHCl_3$ (600 ml) y se pasó a través de una almohadilla de CELITE™. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanquecino (14.00 g, 82%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 9.36 (d, 1H), 8.60 (d, 1H), 7.70 (dd, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 6.84 (d, 1H), 4.51 (q, 2H), 3.92 (t, 4H), 3.77 (t, 4H), 1.49 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 410 $[M+1]^+$.

Ejemplo 10



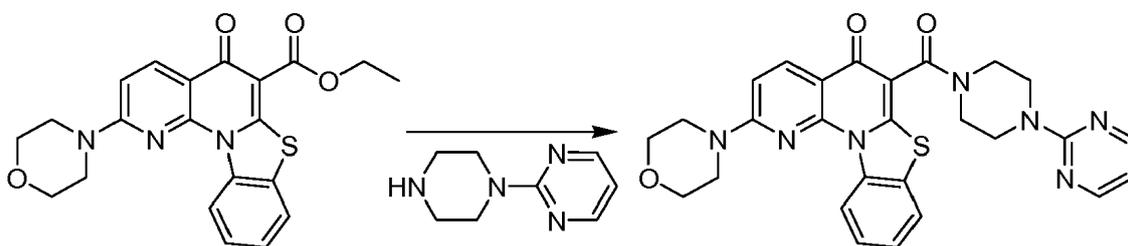
5 A una solución de t-butil 2-(2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etilcarbamato (160 mg, 0.75 mmol) en DCM (1 ml) se añadió HCl (2.0 ml, 4 M en dioxano). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y se volvió a disolver en DCM (10 ml) y DBU (0.56 ml, 3.74 mmol). El éster (150 mg, 0.37 mmol) se añadió a la reacción seguido de AlCl_3 (150 mg, 1.12 mmol) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y NaOH 3N (50 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y la reacción en bruto se purificó en una columna de gel de sílice (0-10% MeOH/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (130 mg, 75%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 10.60 (t, 1H), 9.44 (d, 1H), 8.62 (d, 1H), 7.75 (dd, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 6.91 (d, 1H), 5.78 (s, 2H), 3.94 (t, 4H), 3.81 (t, 4H), 3.66 (q, 2H), 3.63 (s, 4H), 2.96 (t, 2H). LCMS (ES): m/z 476 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 11



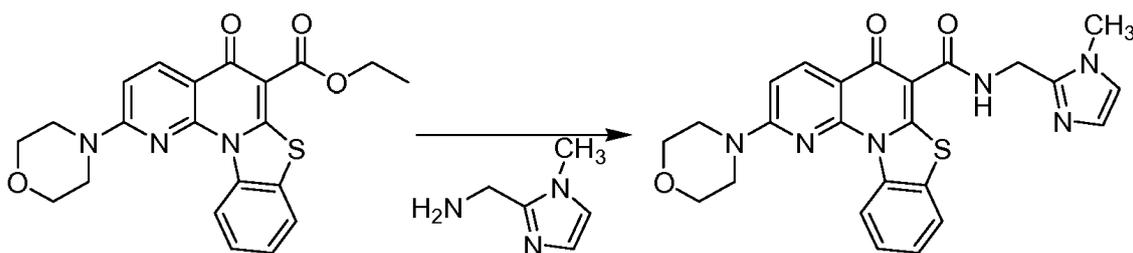
15 A una solución del éster (150 mg, 0.37 mmol), (1-metil-1H-imidazol-5-il)metanamina (0.15 mL, 1.35 mmol) y DBU (0.20 mL, 1.34 mmol) en DCM (10 ml) se añadió AlCl_3 (150 mg, 1.12 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se añadió más DBU (0.30 ml, 2.01 mmol) y se agitó durante 30 minutos adicionales. La reacción se diluyó con DCM (150 ml) y NaOH 6N (25 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto de reacción se purificó en TLC de preparación de sílice (10% MeOH/DCM) para producir el producto deseado (100 mg, 58%). LCMS (ES): m/z 475 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 12



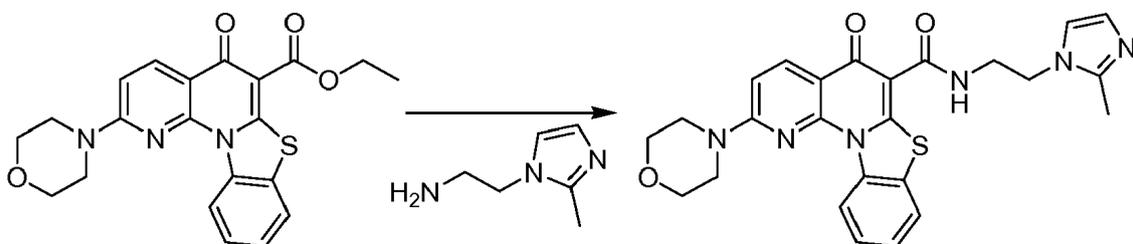
25 A una solución del éster (100 mg, 0.24 mmol), se añadió 2-(piperazin-1-il)pirimidina (0.10 mL, 0.61 mmol) y DBU (0.10 mL, 0.67 mmol) en DCM (10 mL) AlCl_3 (100 mg, 0.75 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se diluyó con DCM (150 ml) y NaOH 6N (25 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto de reacción se purificó en una columna de sílice (MeOH al 0-5%/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (80 mg, 63%). LCMS (ES): m/z 528 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 13



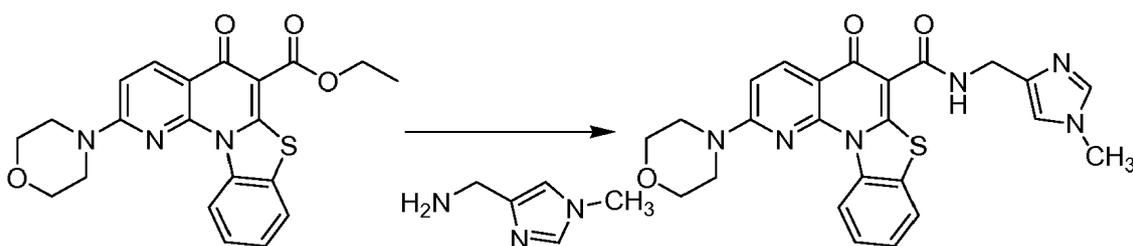
5 A una solución del éster (750 mg, 1.83 mmol), (1-metil-1H-imidazol-2-il)metanamina (0.50 mL, 4.50 mmol) y DBU (0.80 mL, 5.35 mmol) en DCM (50 ml) se añadió AlCl_3 (750 mg, 5.62 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se diluyó con DCM (200 ml) y NaOH 3N (100 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x100 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto de reacción se purificó en columna de sílice (0-5% MeOH/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (275 mg, 32%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 11.0 (t, 1H), 9.45 (d, 1H), 8.61 (d, 1H), 7.76 (dd, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.45 (m, 1H), 6.99 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 6.83 (d, 1H), 4.82 (d, 2H), 3.93 (t, 4H), 3.81 (t, 4H), 3.70 (s, 3H). LCMS (ES): m/z 475 $[\text{M}+1]^+$.

10 Ejemplo 14



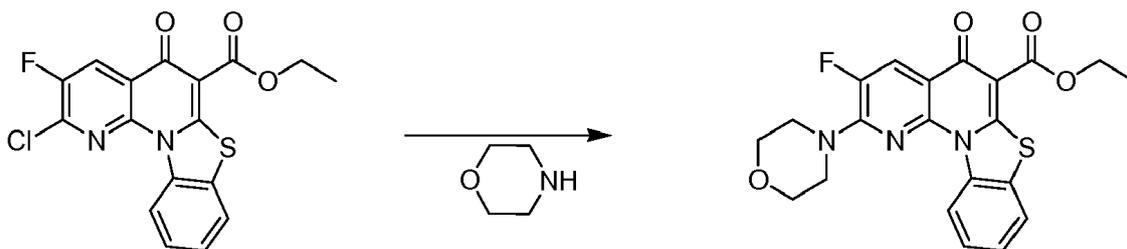
15 A una solución del éster (500 mg, 1.22 mmol), 2-(2-metil-1H-imidazol-1-il)etanamina (325 mg, 260 mmol) y DBU (1.00 ml, 6.69 mmol) en DCM (18 ml) se añadió AlCl_3 (350 mg, 262 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (200 ml) y NaOH 3N (50 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanquecino (360 mg, 60%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 10.77 (t, 1H), 9.47 (d, 1H), 8.60 (d, 1H), 7.78 (dd, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 6.93 (m, 3H), 4.15 (t, 2H), 3.94 (t, 4H), 3.83 (t, 4H), 3.79 (q, 2H), 2.42 (s, 3H). LCMS (ES): m/z 489 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 15



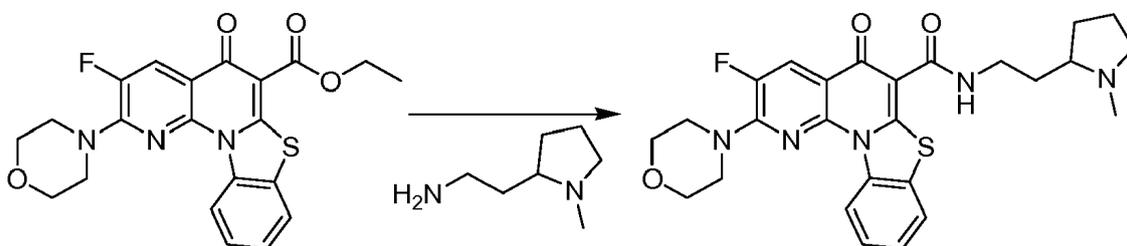
20 A una solución del éster (105 mg, 0.26 mmol), (1-metil-1H-imidazol-4-il)metanamina (0.10 mL, 0.90 mmol) y DBU (0.10 mL, 0.71 mmol) en DCM (10 mL) se añadió AlCl_3 (75 mg, 0.56 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (100 ml), NaOH 6N (50 ml) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto de reacción se purificó en TLC de preparación de sílice (MeOH al 5%/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco (40 mg, 33%). LCMS (ES): m/z 475 $[\text{M}+1]^+$.

25 Ejemplo 16



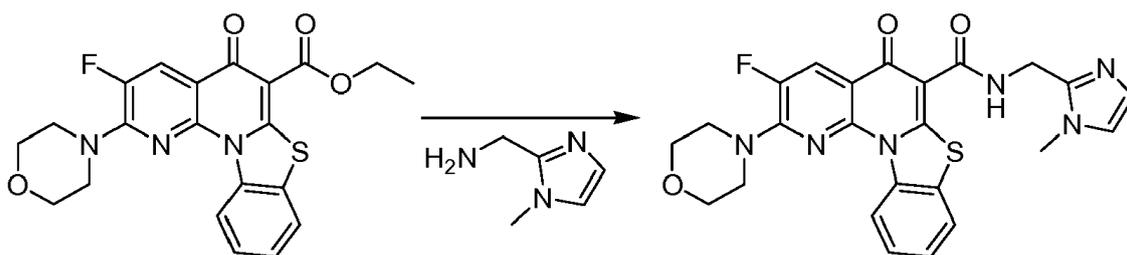
5 A una suspensión del cloroéster (6.08 g, 16.14 mmol) en ACN (100 ml) se añadió morfolina (2.8 ml, 32.01 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se recogió por filtración. El sólido se disolvió luego en CHCl_3 (200 ml) y se pasó a través de una almohadilla de CELITE™. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (5.00 g, 73%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 9.37 (d, 1H), 8.29 (d, 1H), 7.72 (dd, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 4.50 (q, 2H), 3.94 (t, 4H), 3.81 (t, 4H), 1.48 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 428 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 17



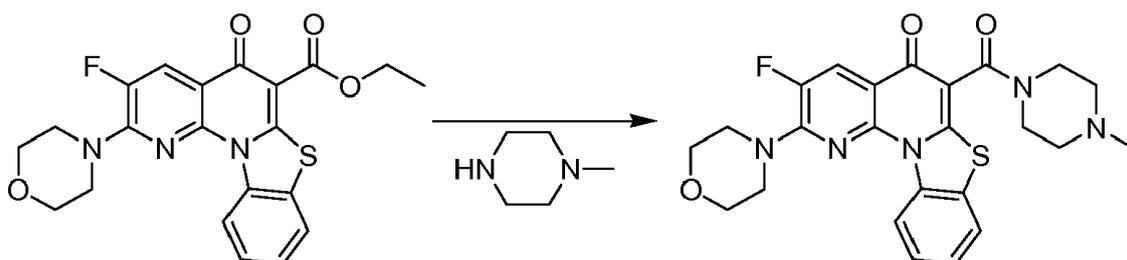
10 A una solución del éster (700 mg, 1.64 mmol) y 2-(1-metilpirrolidin-2-il)etanamina (0.70 ml, 4.83 mmol) en DCM (25 ml) se añadió AlCl_3 (645 mg, 4.84 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se diluyó con DCM (150 ml), NaOH 6N (50 ml) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 ml) y se agitó durante 10 minutos.
 15 Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOAc}$ (1:1) para dar el producto deseado como un sólido blanco (690 mg, 83%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 10.45 (t, 1H), 9.41 (d, 1H), 8.29 (d, 1H), 7.76 (dd, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.49 (m, 1H), 3.96 (t, 4H), 3.85 (t, 4H), 3.55 (m, 2H), 3.06 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.17 (m, 1H), 2.08 (m, 3H), 1.80 (m, 2H), 1.56 (m, 2H). LCMS (ES): m/z 510 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 18



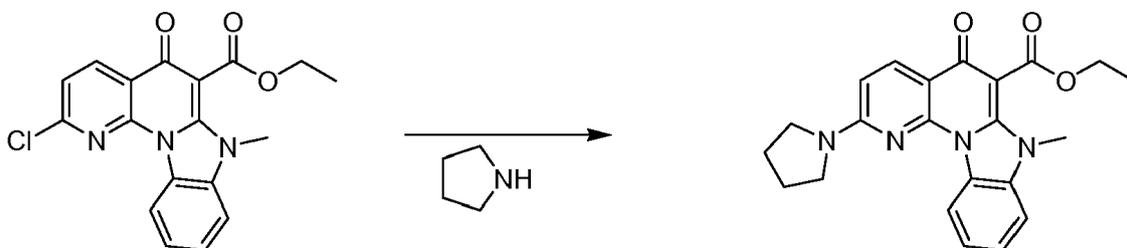
20 A una solución del éster (515 mg, 1.20 mmol) y C-(1-metil-1H-imidazol-2-il)-metilamina (199.5, 1.79 mmol) en DCM (40 mL) se añadió DBU (0.98 mL) y AlCl_3 (352.3 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y NaOH 6N (25 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en acetato de etilo para dar el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 493 $[\text{M}+1]^+$
 25

Ejemplo 19



5 A una solución del éster (300 mg, 0.70 mmol) y 1-metilpiperazina (0.25 ml, 2.25 mmol) en DCM (15 ml) se añadió AlCl_3 (305 mg, 2.29 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se diluyó con DCM (100 ml), NaOH 6N (50 ml) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOAc}$ (1:1) para dar el producto deseado como un sólido blanco (280 mg, 83%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 9.37 (d, 1H), 8.29 (d, 1H), 7.65 (dd, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.40 (m, 1H), 3.95 (t, 4H), 3.88 (m, 2H), 3.82 (t, 4H), 3.48 (m, 2H), 2.54 (m, 2H), 2.44 (m, 2H), 2.32 (s, 3H). LCMS (ES): m/z 482 $[\text{M}+1]^+$.

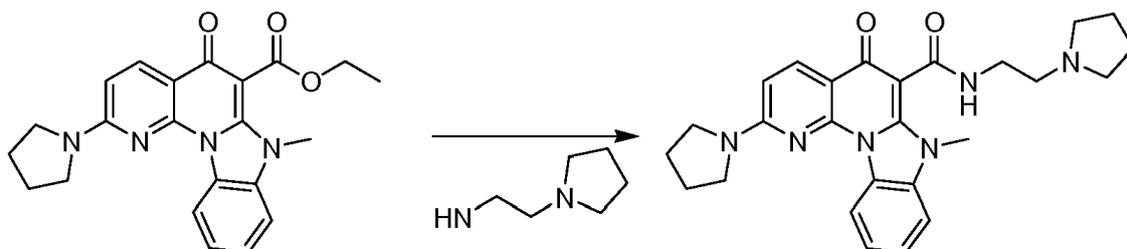
Ejemplo 20



10

Una suspensión de cloroéster (800 mg, 2.25 mmol) y pirrolidina (0.40 ml, 4.79 mmol) en DMF (5.0 ml) se calentó a 65°C durante 15 minutos en microondas. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración para producir el producto deseado. LCMS (ES): m/z 391 $[\text{M}+1]^+$

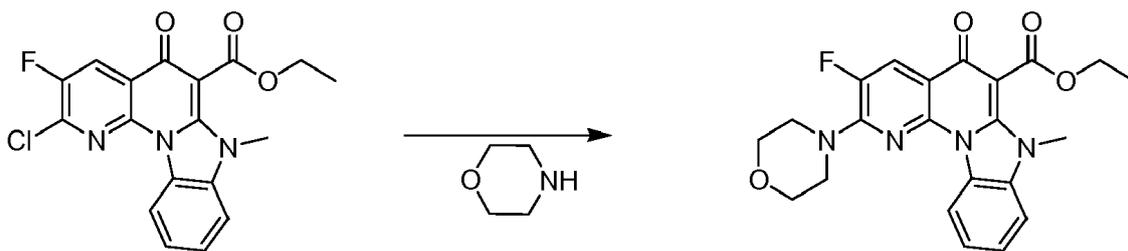
Ejemplo 21



15

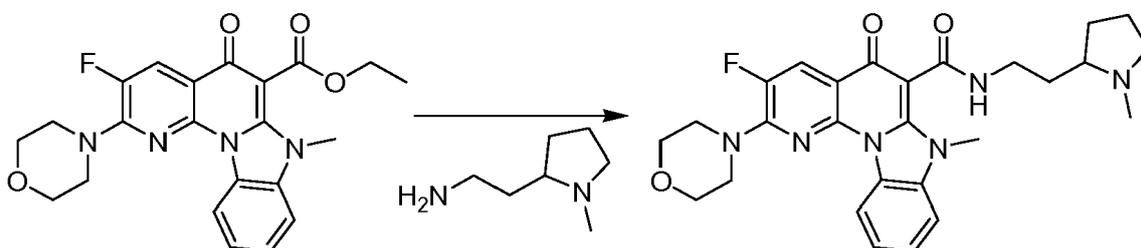
20 A una solución del éster (675 mg, 1.73 mmol), 2-(pirrolidin-1-il)etanamina (0.65 ml, 5.13 mmol) y DBU (0.75 ml, 5.02 mmol) en DCM (30 ml) AlCl_3 añadido (680 mg, 5.10 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La reacción se diluyó con DCM (100 ml), NaOH 6N (50 ml) y tartrato de sodio y potasio saturado (50 ml) y se agitó durante 15 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x100 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto de reacción se purificó en una columna de gel de sílice (5% MeOH/2% TEA/DCM) para dar el producto deseado como un sólido blanco (538 mg, 68%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 9.91 (t, 1H), 8.90 (d, 1H), 8.45 (d, 1H), 7.37 (m, 3H), 6.52 (d, 1H), 4.00-3.40 (br s, 4H), 3.81 (s, 3H), 3.65 (q, 2H), 2.79 (t, 2H), 2.63 (m, 4H), 2.14 (m, 4H), 1.81 (m, 4H). LCMS (ES): m/z 459 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 22



5 El cloroéster (1.0 eq, 250 mg, 2.67 mmol) se hizo reaccionar con morfolina (0.29 ml) en NMP (1 ml) con calentamiento por microondas a 100°C durante 5 min. El sólido que se formó al enfriar se filtró y se lavó con NMP. El material se sometió a sonicación en AcOEt caliente y se filtró después de enfriar. El producto 2 se aisló como un sólido blanco (173 mg, 62% de rendimiento). LCMS (ES): 95% puro, m/z 425 [M+1]⁺.

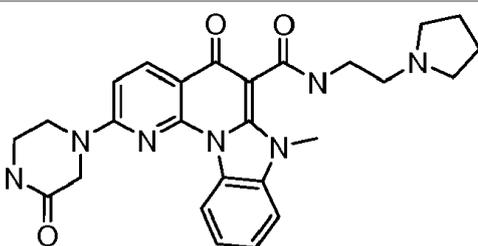
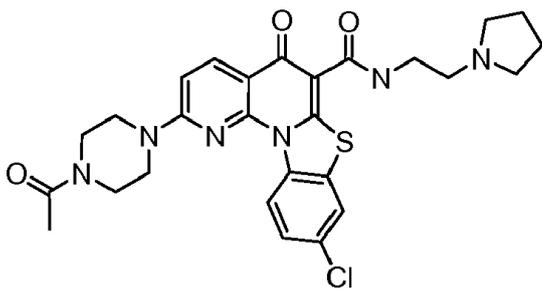
Ejemplo 23

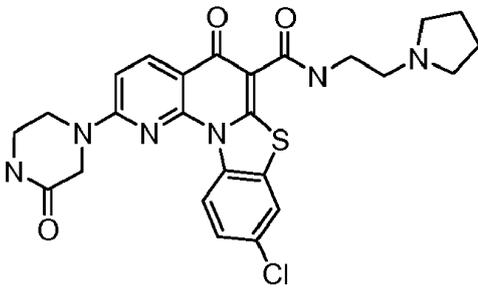
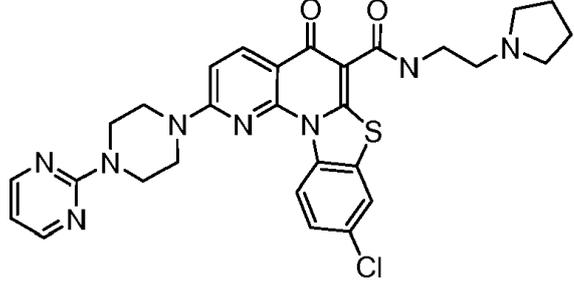
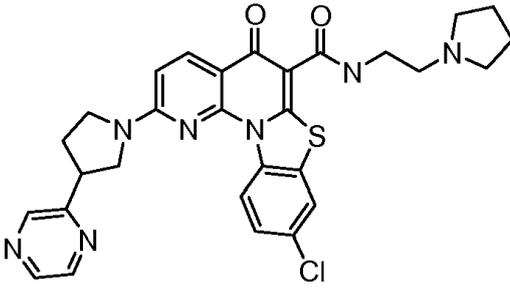
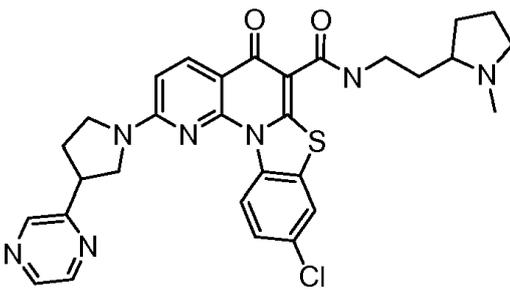
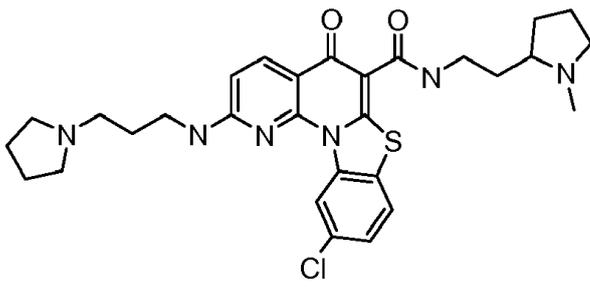


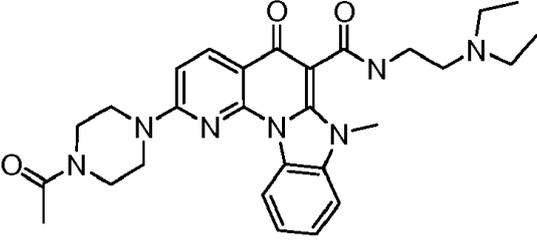
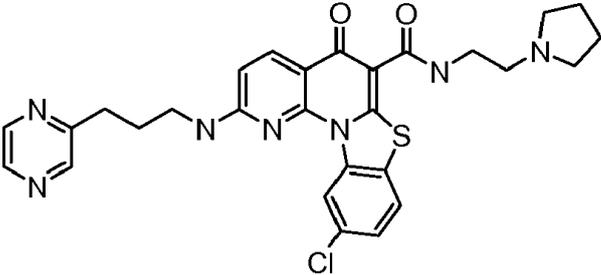
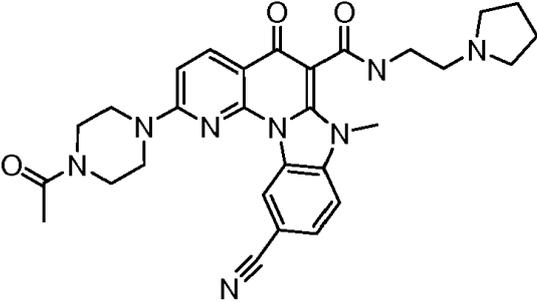
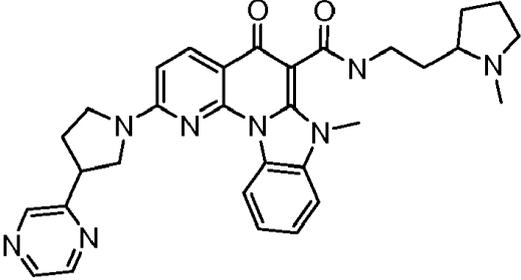
10 Se mezclaron éster (1.0 eq, 312 mg, 0.73 mmol) y 2-(1-metilpirrolidin-2-il)etanamina (2.0 eq, 0.21 ml, 1.45 mmol) con DBU (4.0 eq, 0.44 ml, 2.94 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml). Se añadió cloruro de aluminio (2.0 eq, 196 mg, 1.47 mmol) y la reacción se agitó a 45°C durante 5 horas. El disolvente se eliminó al vacío y el sólido se trató con una solución acuosa saturada de ácido tartárico durante una hora. Después de la adición de agua, el pH se ajustó a 12-14 mediante la adición de NaOH. El producto se extrajo con CH₂Cl₂ (4x). Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se trituró en una mezcla de AcOEt y hexanos, se filtró y se secó para proporcionar el compuesto deseado como un sólido blanquecino (318 mg, 85% de rendimiento). LCMS (ES): 95% puro, m/z 507 [M+1]⁺.

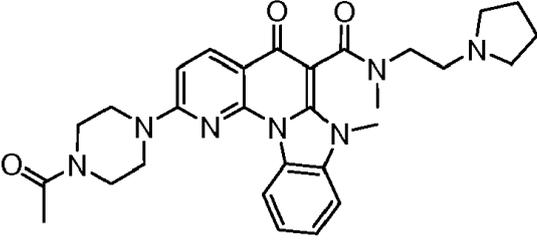
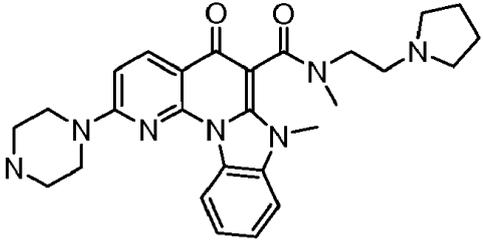
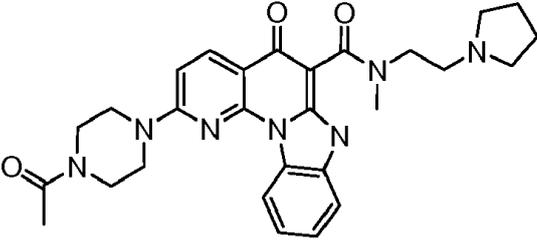
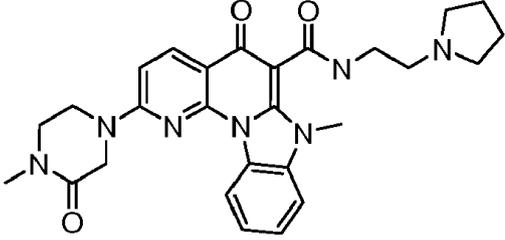
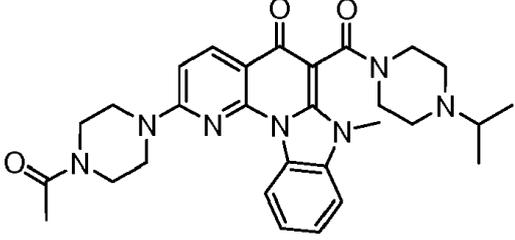
15 Los siguientes compuestos en la Tabla 1 se prepararon por el mismo método, usando las aminas y los ésteres etílicos de quinolona apropiados.

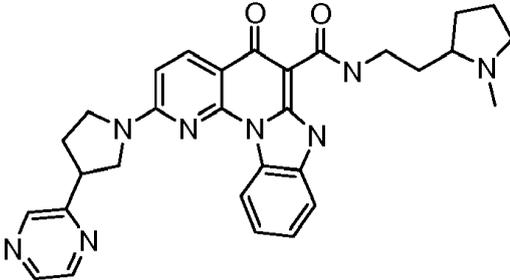
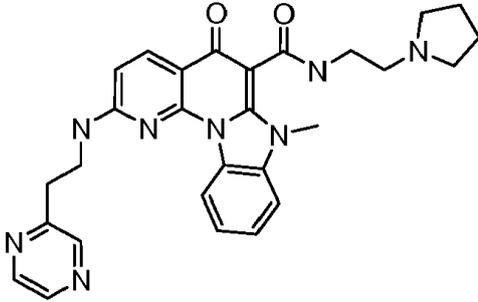
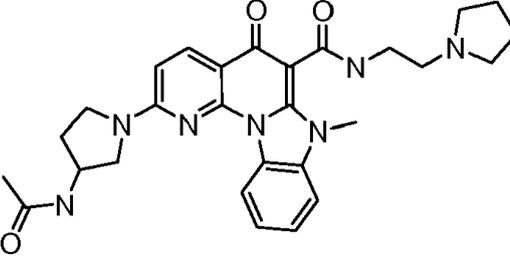
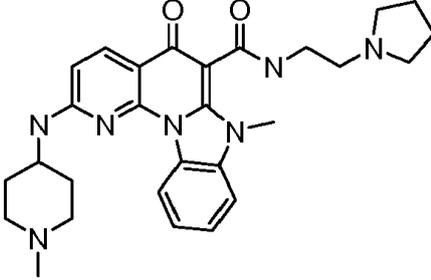
Tabla 1

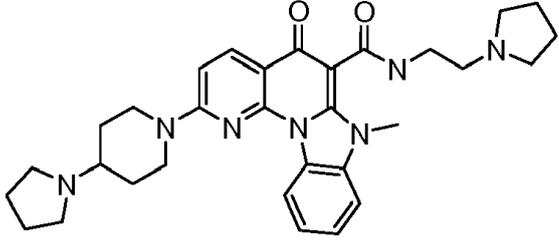
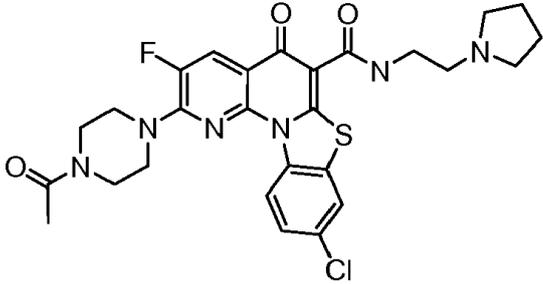
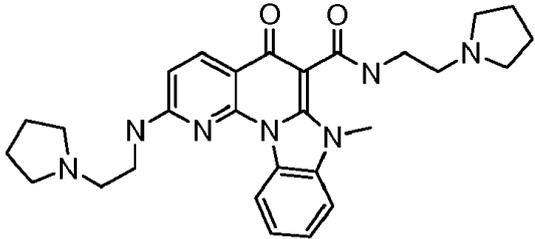
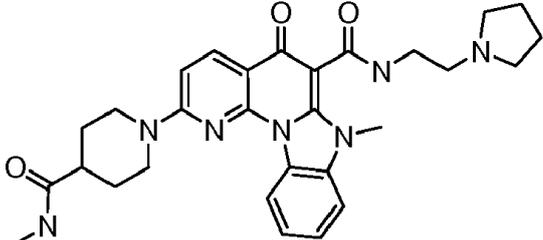
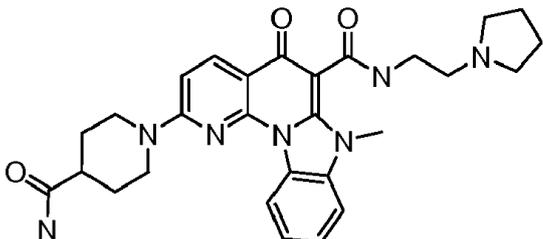
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	487.55	488
	553.08	553

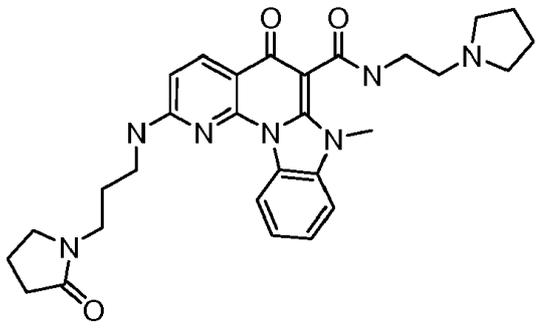
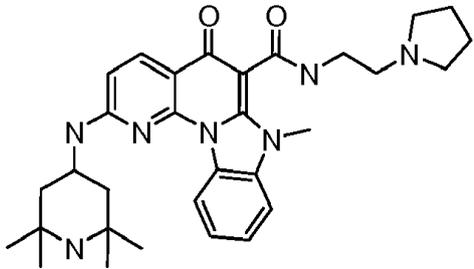
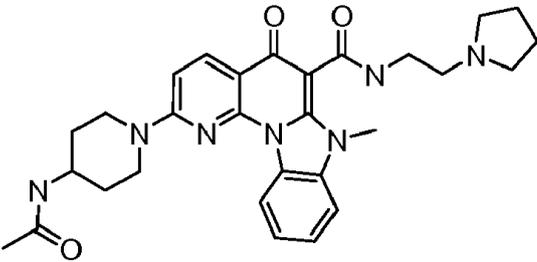
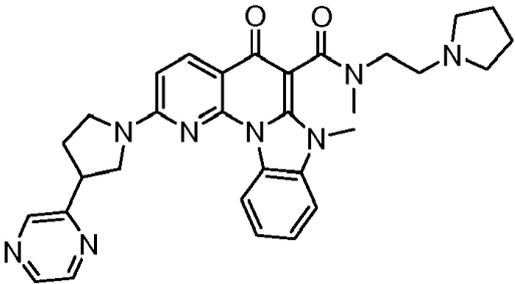
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	525.02	525
	589.19	589
	574.10	574
	588.12	588
	567.15	567

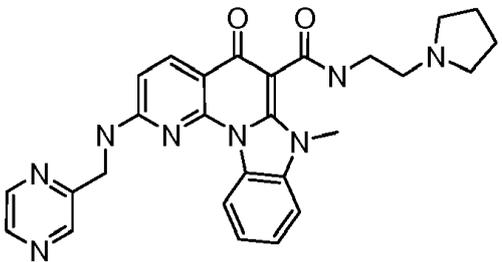
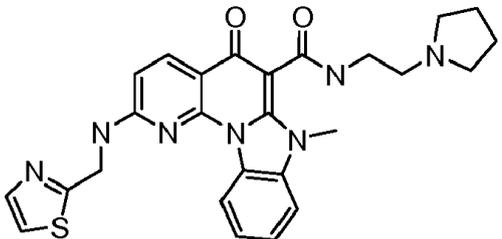
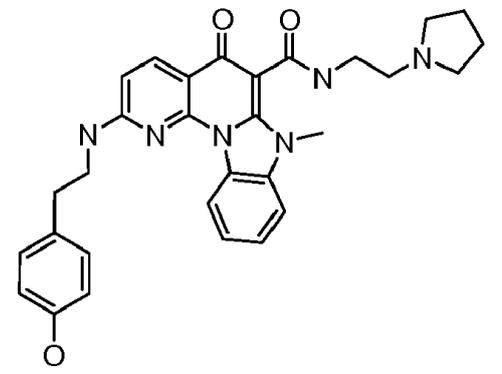
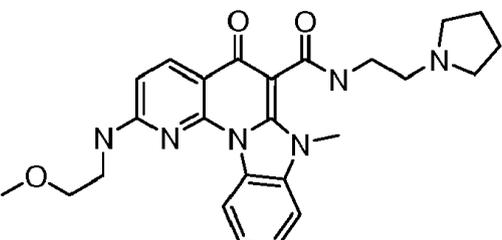
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	517.62	518
	562.09	562
	540.62	541
	550.65	551

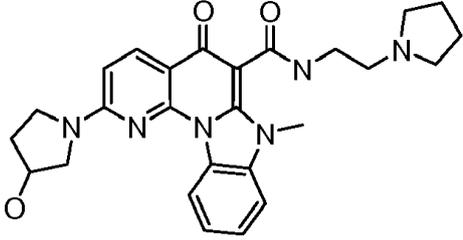
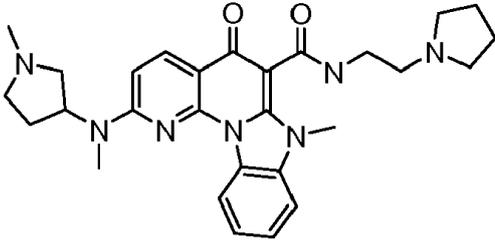
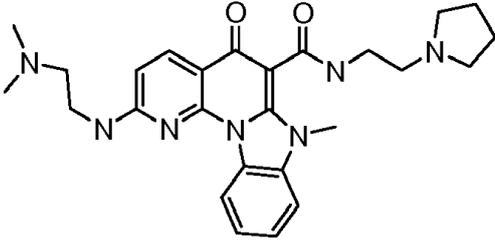
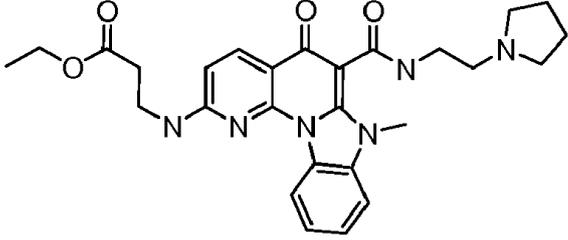
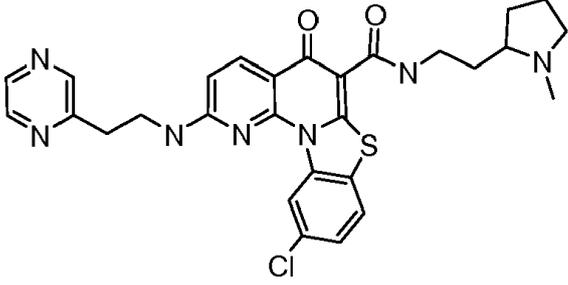
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	529.63	530
	487.60	488
	515.61	516
	501.58	502
	529.63	530

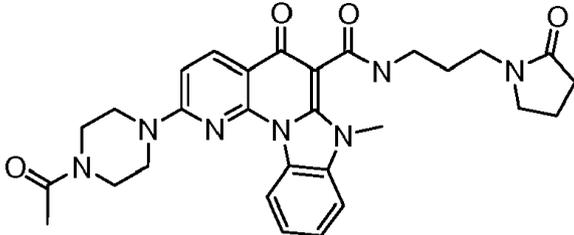
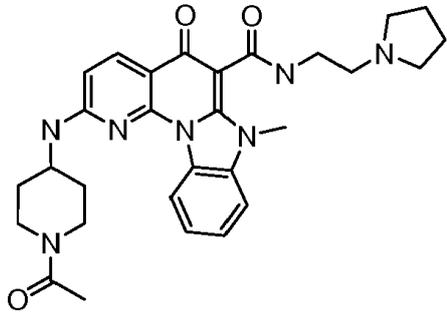
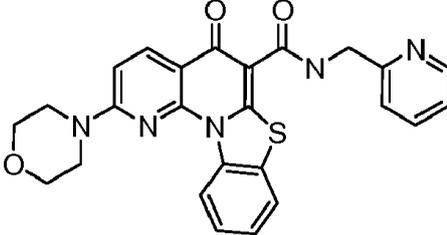
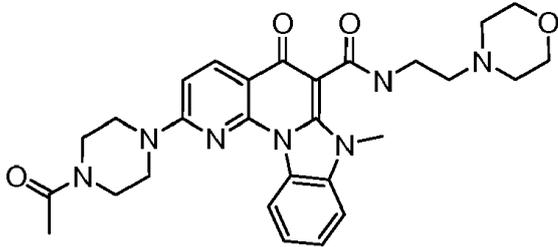
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	536.63	537
	510.59	511
	515.61	516
	501.62	502

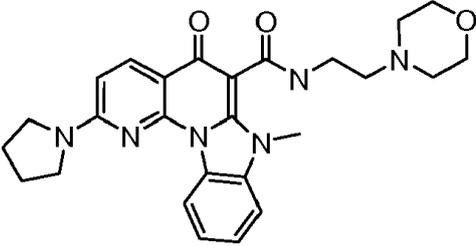
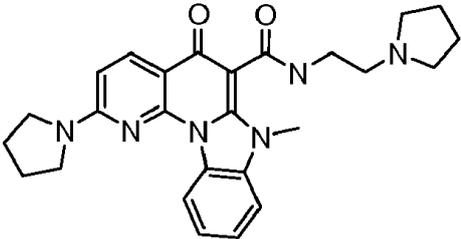
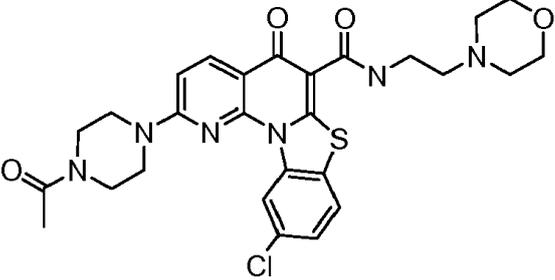
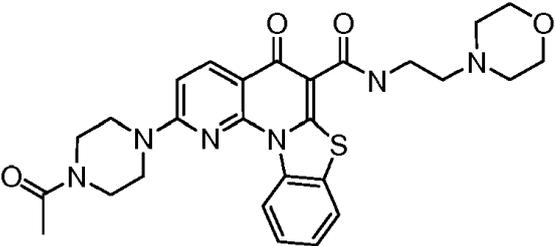
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	541.69	542
	571.07	571
	501.62	502
	529.63	530
	515.61	516

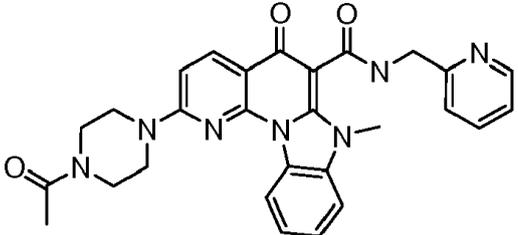
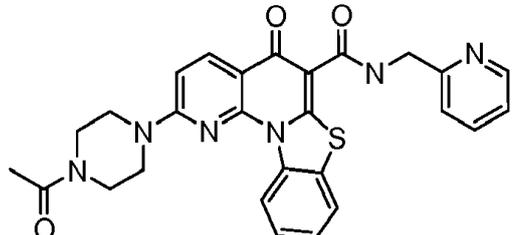
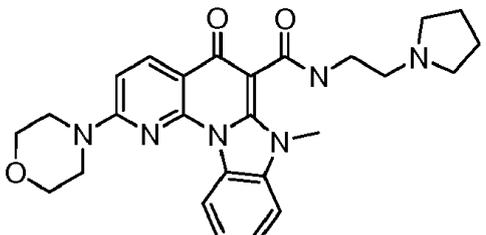
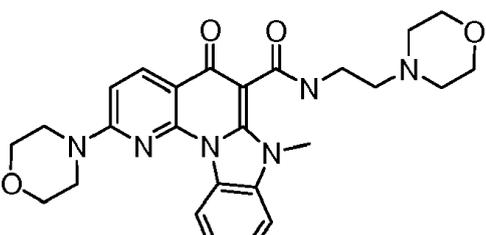
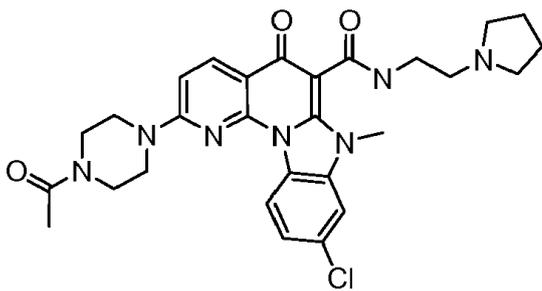
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	529.63	530
	543.70	544
	529.63	530
	550.65	551

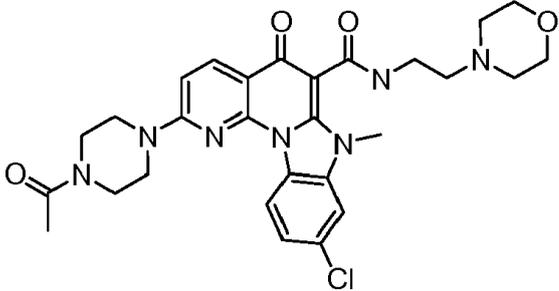
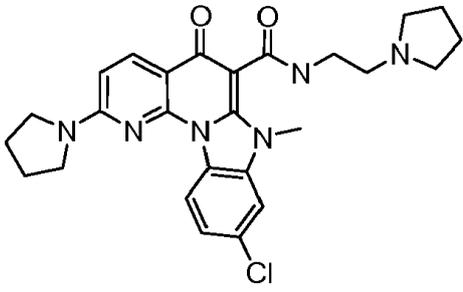
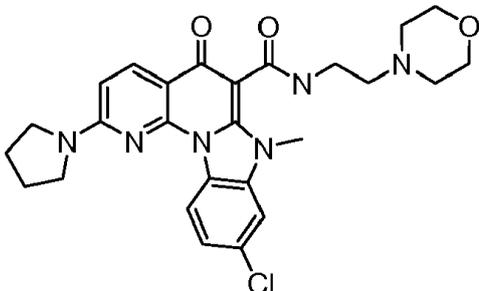
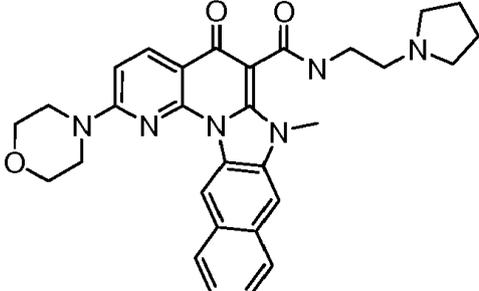
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <p>Chemical structure of a pyridine derivative. The pyridine ring is substituted at the 2-position with a benzimidazole core. The benzimidazole core has a methyl group on the nitrogen and a benzene ring fused to it. The pyridine ring is also substituted at the 5-position with a pyrrolidine group via a propyl chain.</p>	496.56	497
 <p>Chemical structure of a thiazole derivative. The thiazole ring is substituted at the 2-position with a benzimidazole core. The benzimidazole core has a methyl group on the nitrogen and a benzene ring fused to it. The thiazole ring is also substituted at the 5-position with a pyrrolidine group via a propyl chain.</p>	501.60	502
 <p>Chemical structure of a 4-chlorophenyl derivative. The phenyl ring is substituted at the 4-position with a benzimidazole core. The benzimidazole core has a methyl group on the nitrogen and a benzene ring fused to it. The phenyl ring is also substituted at the 1-position with a pyrrolidine group via a propyl chain.</p>	524.61	525
 <p>Chemical structure of a methoxy derivative. The methoxy group is attached to the benzimidazole core. The benzimidazole core has a methyl group on the nitrogen and a benzene ring fused to it. The pyridine ring is also substituted at the 5-position with a pyrrolidine group via a propyl chain.</p>	462.54	463

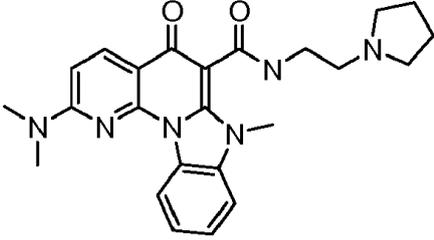
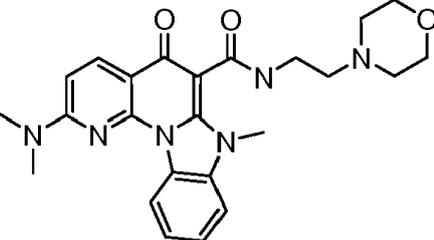
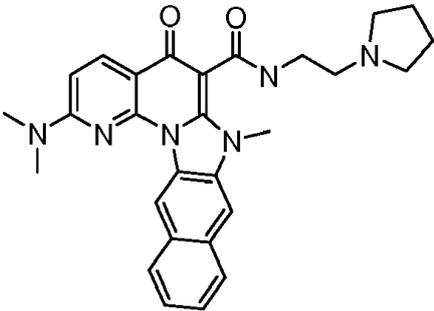
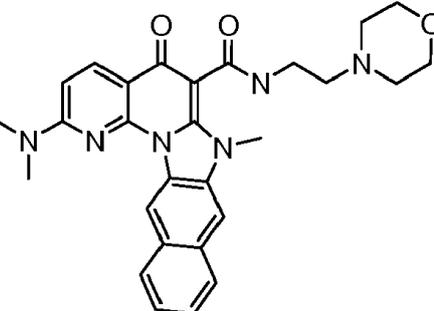
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	474.55	475
	501.62	502
	475.59	476
	504.58	505
	562.09	562

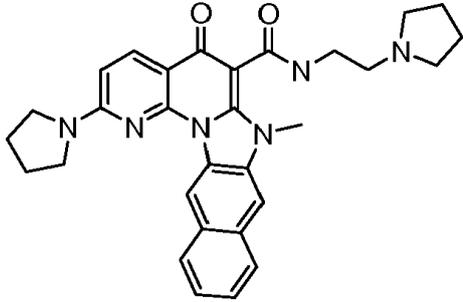
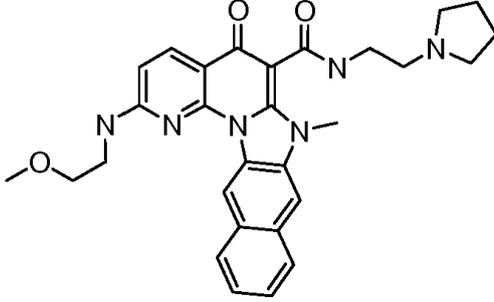
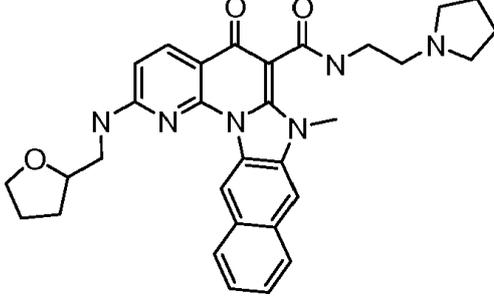
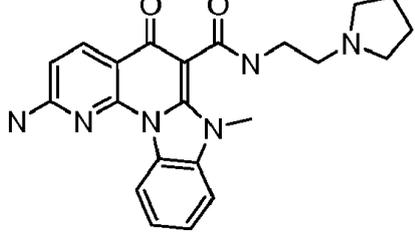
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	543.62	544
	529.63	530
	471.53	472
	531.61	532

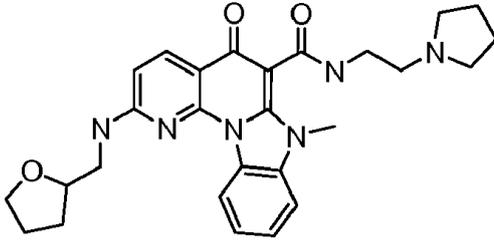
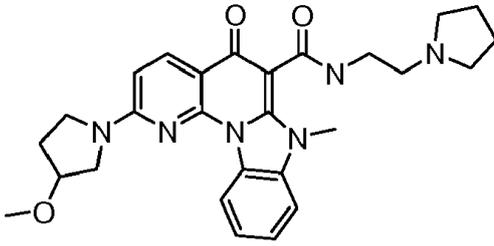
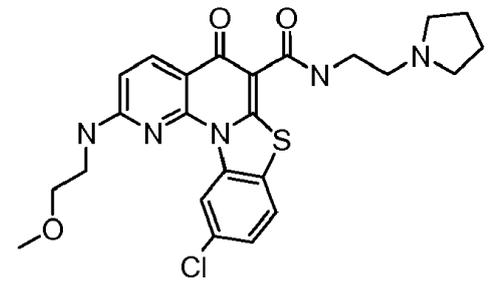
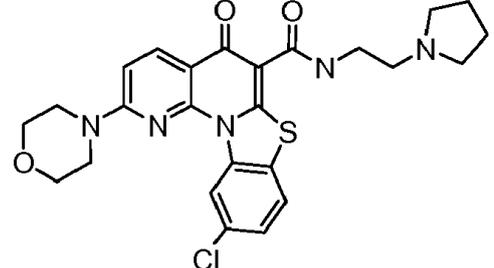
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	474.55	475
	458.56	459
	569.07	569
	534.63	535

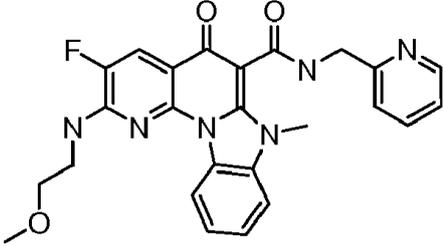
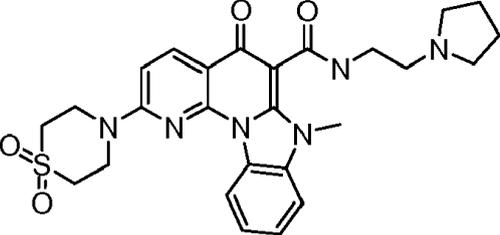
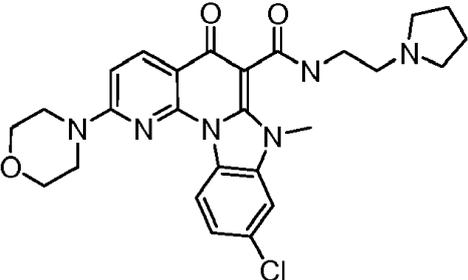
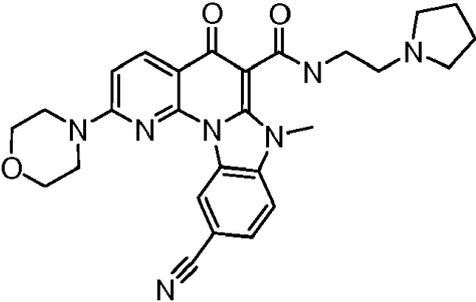
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	509.56	510
	512.58	513
	474.55	475
	490.55	491
	550.05	550

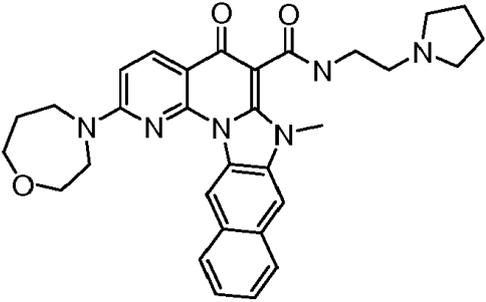
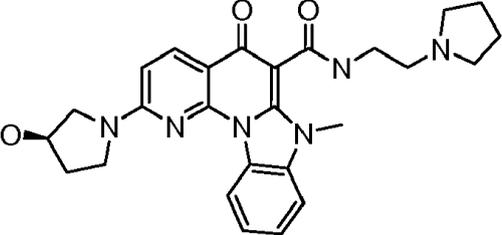
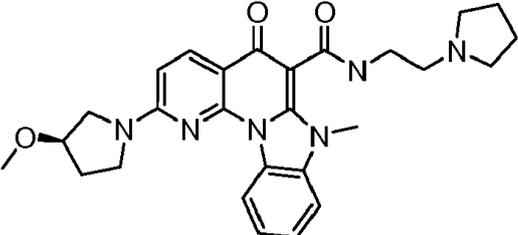
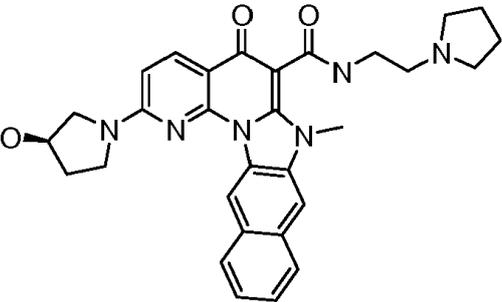
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	566.05	566
	493.00	493
	509.00	509
	524.61	525

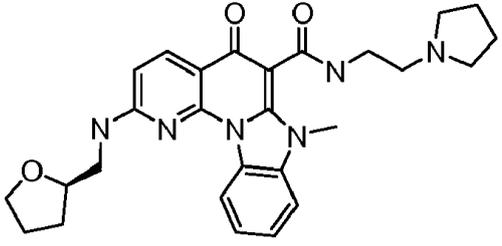
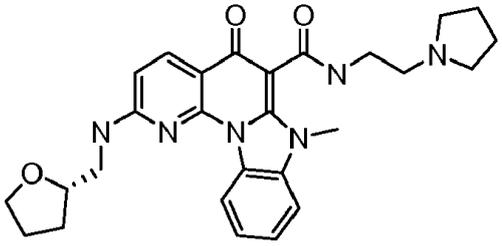
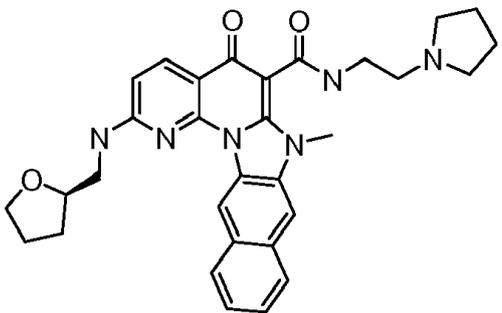
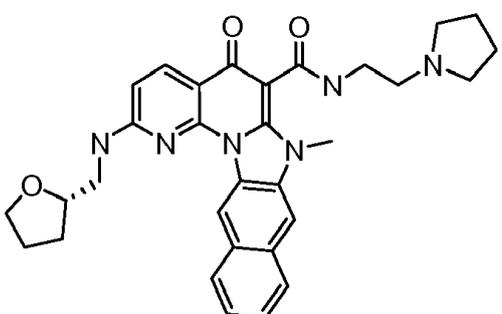
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <p>Chemical structure of a pyridine-pyrazole derivative. The pyridine ring is substituted with a dimethylamino group at the 2-position. The pyrazole ring is substituted with a dimethylamino group at the 3-position and a benzene ring at the 4-position. The pyridine and pyrazole rings are fused at the 5-position. A carbonyl group is attached to the 6-position of the pyridine ring, and another carbonyl group is attached to the 2-position of the pyrazole ring. The latter carbonyl group is further substituted with a 2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl group.</p>	432.52	433
 <p>Chemical structure of a pyridine-pyrazole derivative, similar to the first structure, but with a morpholine group instead of a pyrrolidine group attached to the 2-position of the pyrazole ring.</p>	448.52	449
 <p>Chemical structure of a pyridine-pyrazole derivative, similar to the first structure, but with a naphthalene ring instead of a benzene ring attached to the 4-position of the pyrazole ring.</p>	482.58	483
 <p>Chemical structure of a pyridine-pyrazole derivative, similar to the first structure, but with a morpholine group instead of a pyrrolidine group attached to the 2-position of the pyrazole ring, and a naphthalene ring instead of a benzene ring attached to the 4-position of the pyrazole ring.</p>	498.58	499

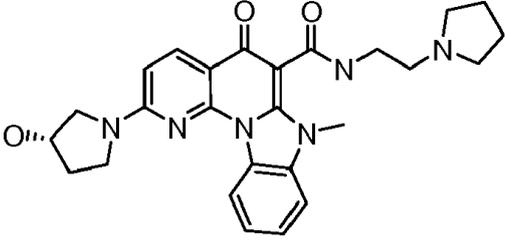
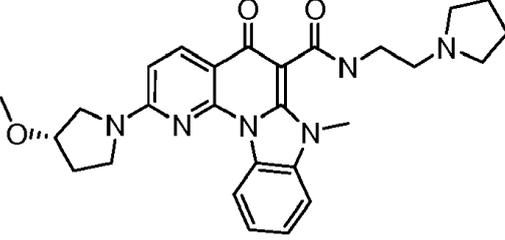
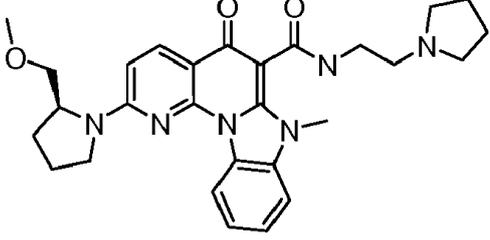
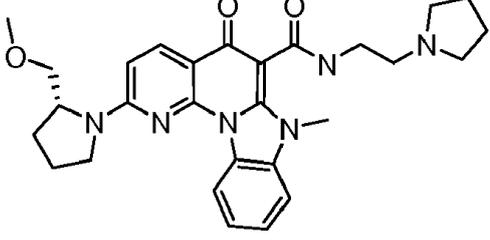
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	508.61	509
	512.60	513
	538.64	539
	404.46	405

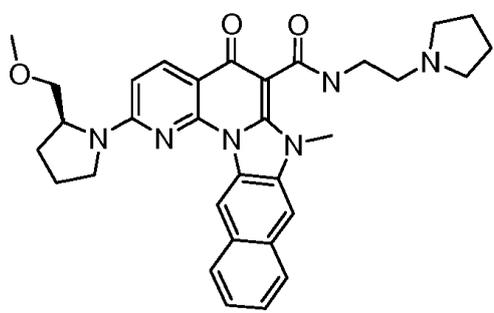
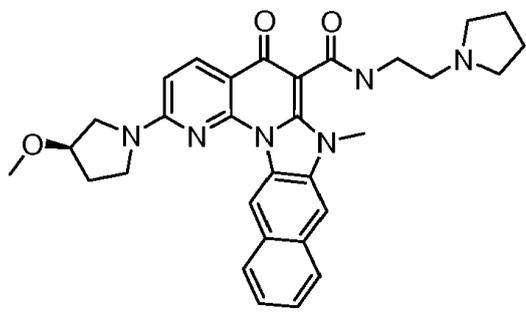
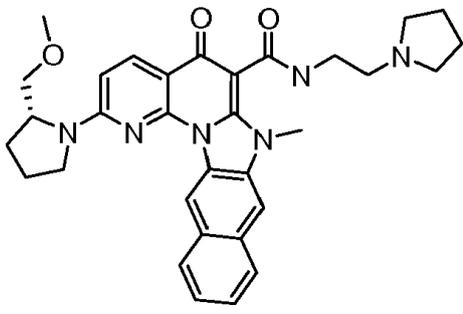
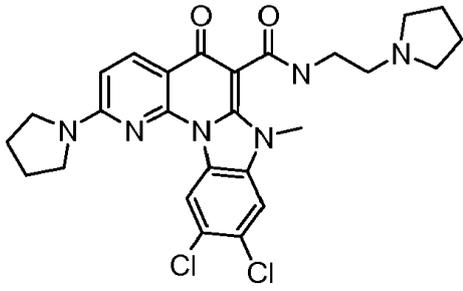
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	488.58	489
	488.58	489
	500.01	500
	512.02	512

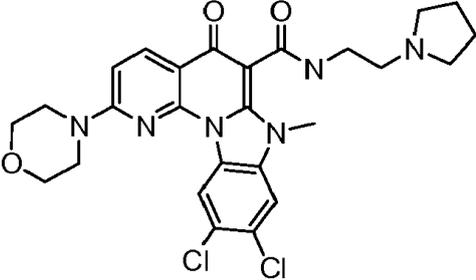
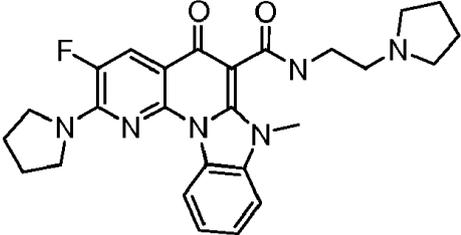
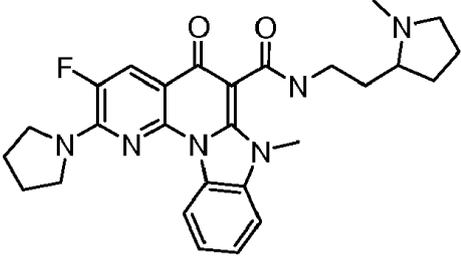
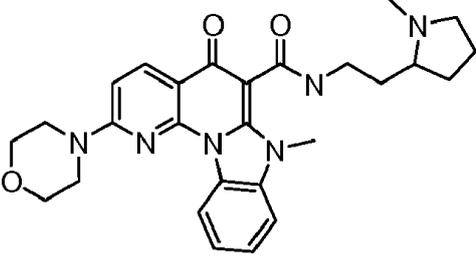
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	474.79	475
	522.62	523
	509.00	509
	499.56	500

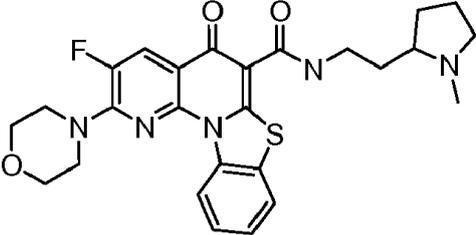
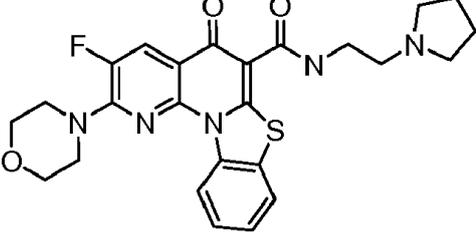
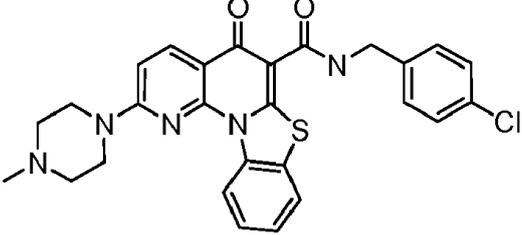
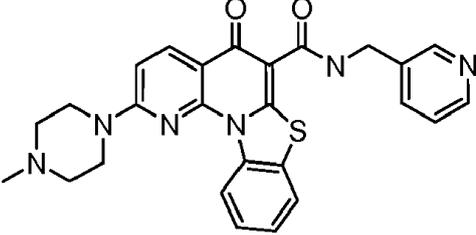
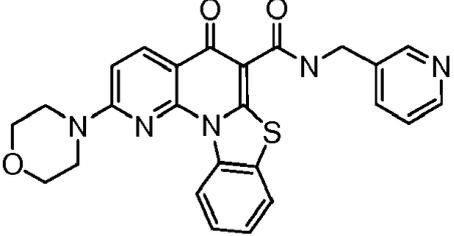
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	538.64	539
	474.55	475
	488.58	489
	524.61	525

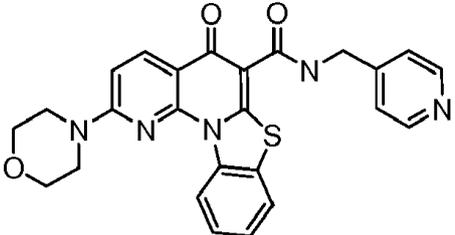
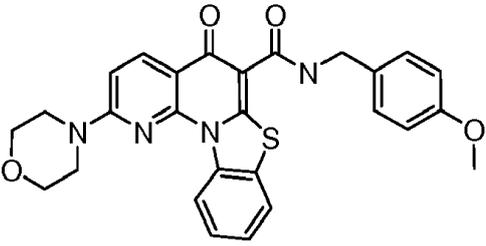
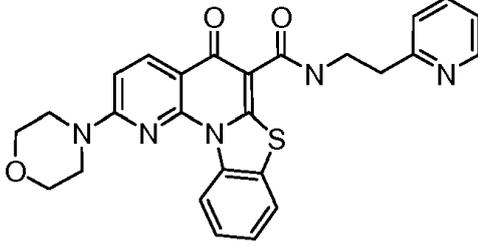
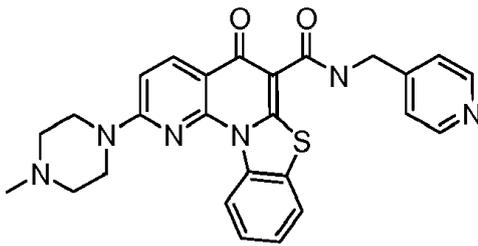
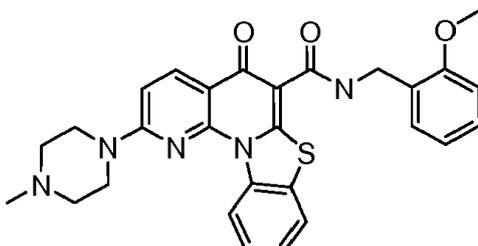
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <chem>CN1C(=O)c2c(c1n3c2c4ccccc43)nc5ccn(c5)NCC6OCCO6</chem>	488.58	489
 <chem>CN1C(=O)c2c(c1n3c2c4ccccc43)nc5ccn(c5)NCC6OCCO6</chem>	488.58	489
 <chem>CN1C(=O)c2c(c1n3c2c4c5ccccc453)nc5ccn(c5)NCC6OCCO6</chem>	538.64	539
 <chem>CN1C(=O)c2c(c1n3c2c4c5ccccc453)nc5ccn(c5)NCC6OCCO6</chem>	538.64	539

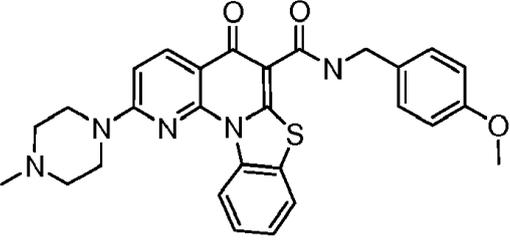
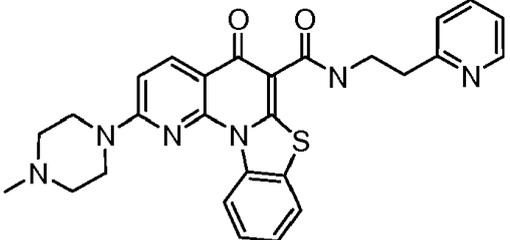
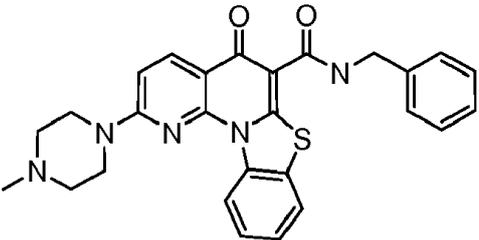
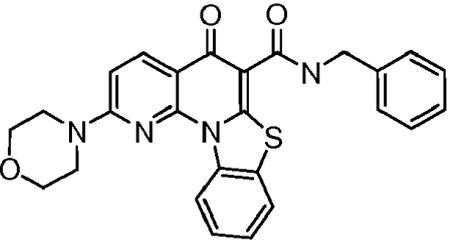
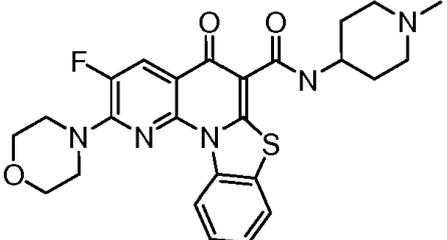
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	474.55	475
	488.58	489
	502.61	503
	502.61	503

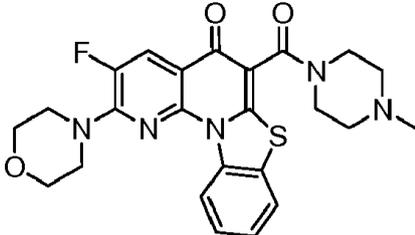
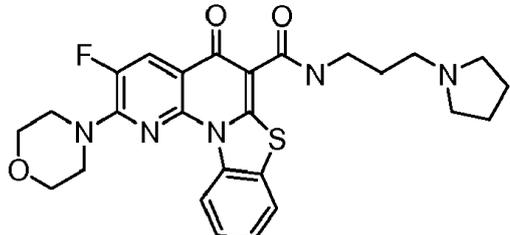
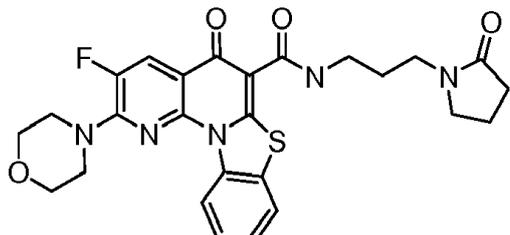
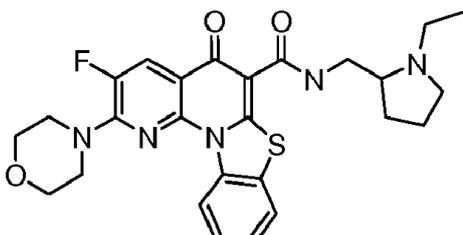
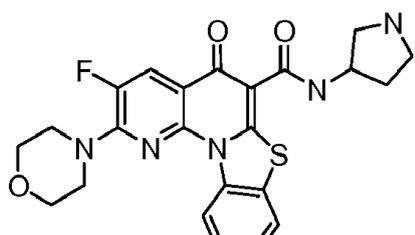
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	552.67	553
	538.64	539
	552.67	553
	527.45	527

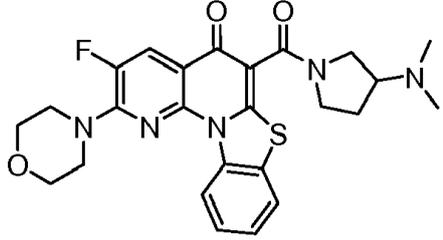
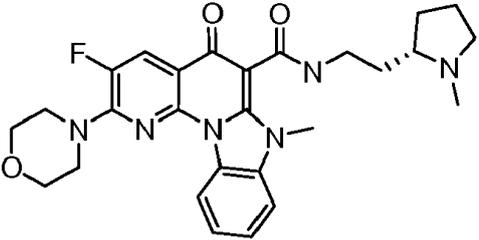
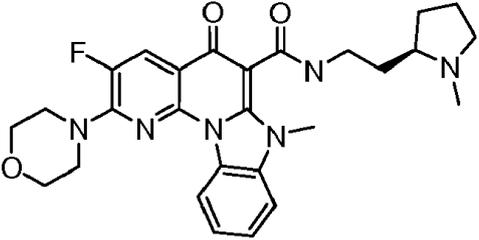
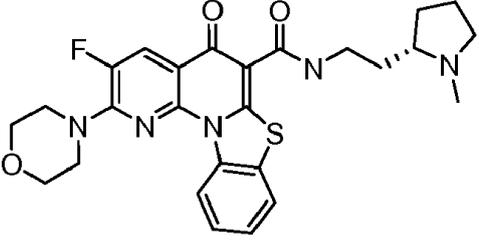
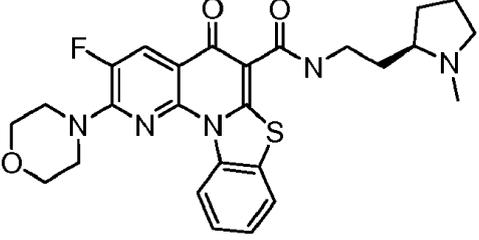
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	543.44	543
	476.55	477
	490.57	491
	488.58	489

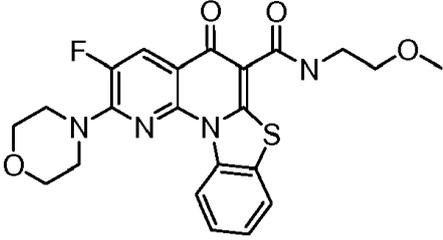
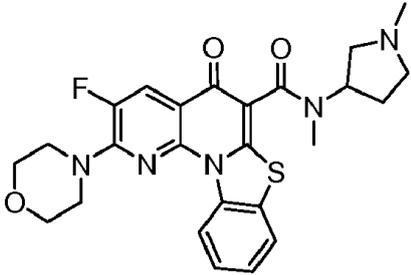
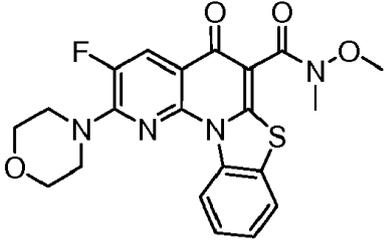
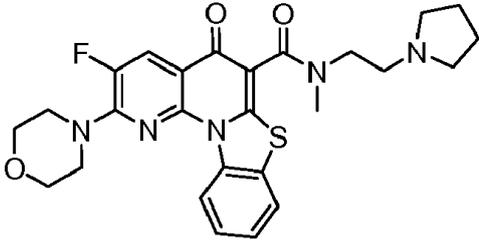
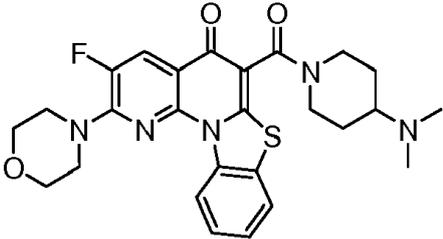
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	509.60	510
	495.57	496
	518.03	518
	484.57	485
	471.53	472

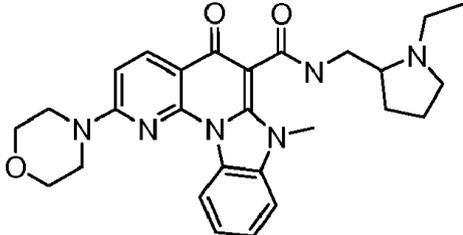
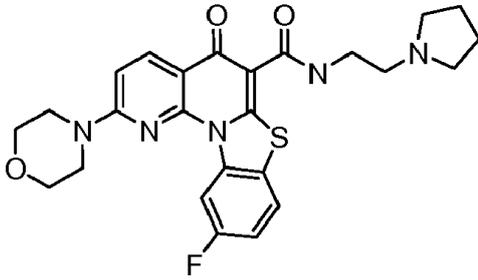
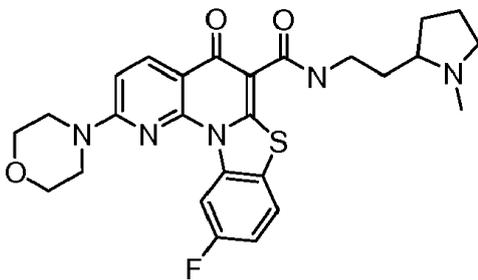
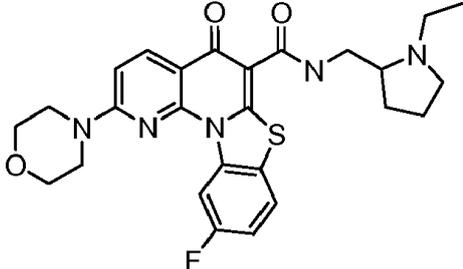
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	471.53	471.53
	500.57	501
	485.56	486
	484.57	485
	513.61	514

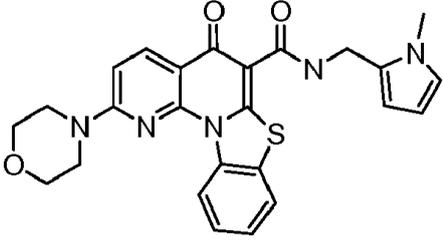
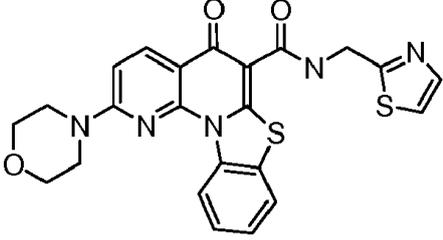
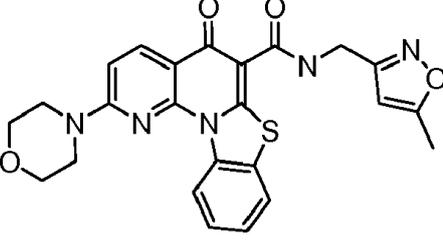
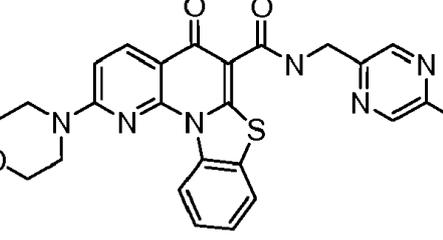
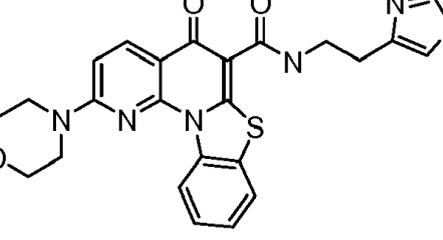
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	513.61	514
	498.60	499
	483.58	484
	470.54	471
	495.57	496

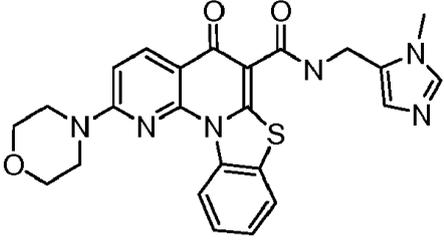
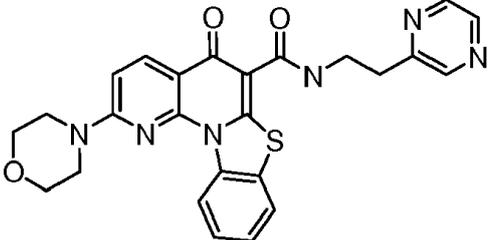
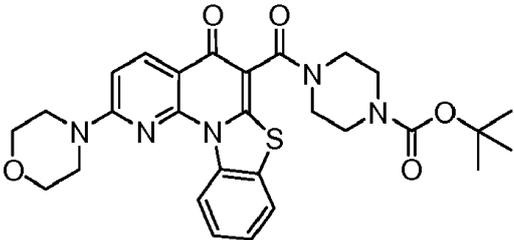
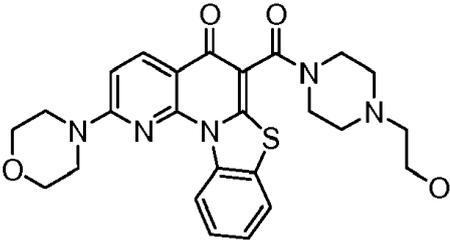
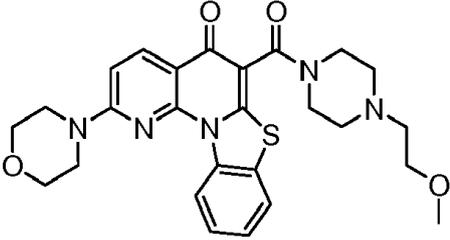
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	481.54	482
	509.60	510
	523.58	524
	509.60	510
	467.52	468

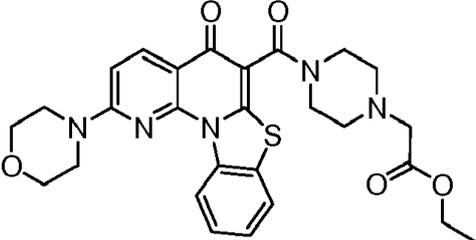
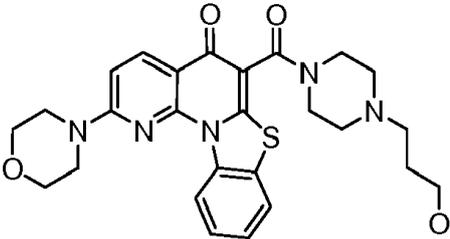
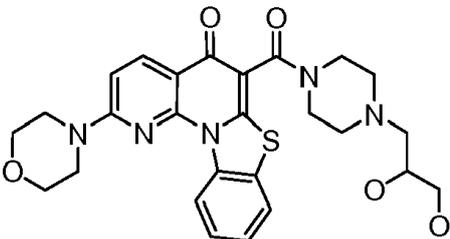
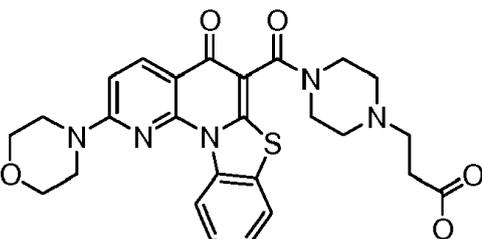
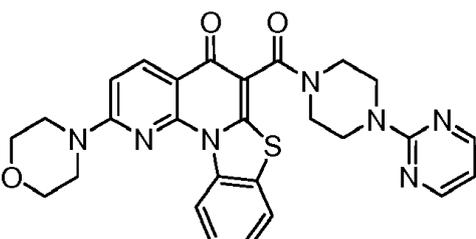
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	495.57	496
	506.57	507
	506.57	507
	509.60	510
	509.60	510

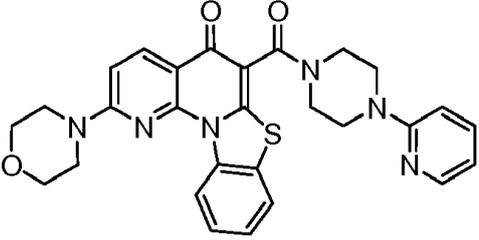
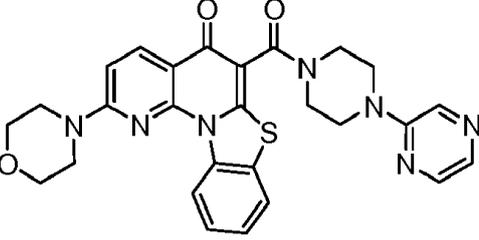
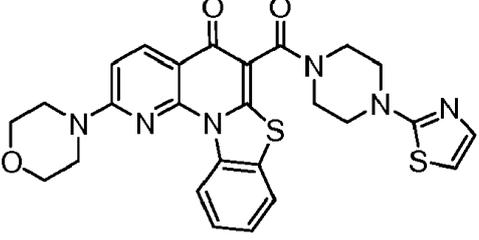
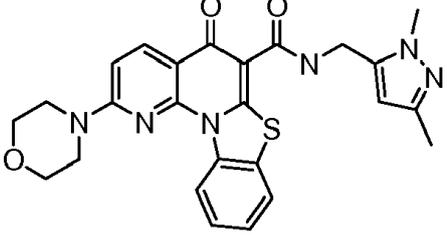
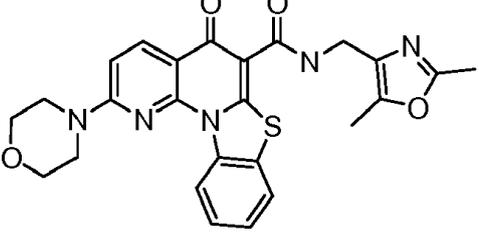
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	456.49	457
	495.57	496
	442.46	443
	509.60	510
	509.60	510

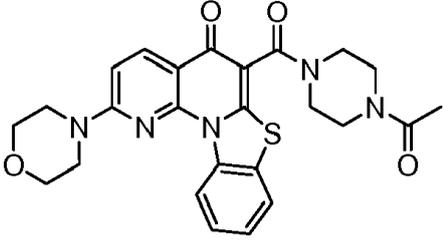
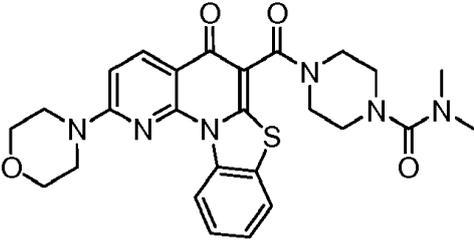
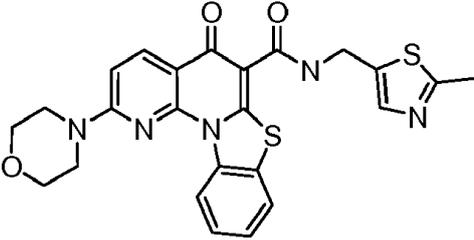
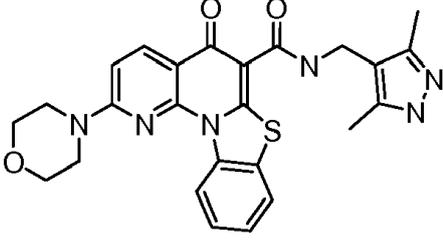
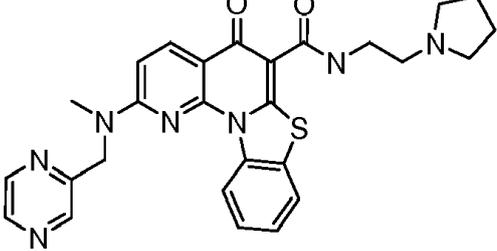
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	488.58	489
	495.57	496
	509.60	510
	509.60	510

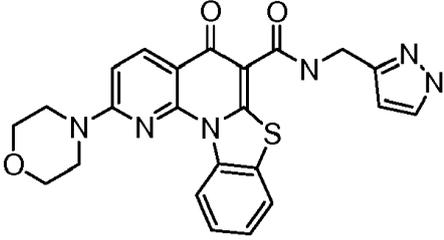
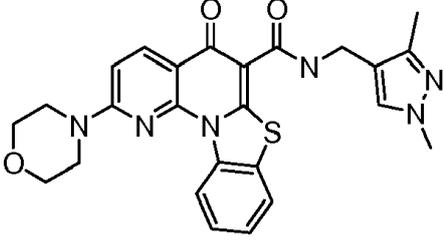
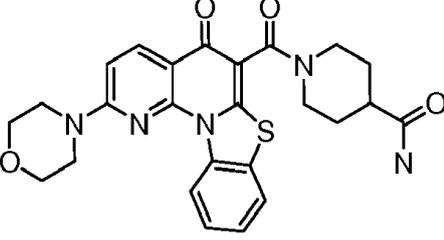
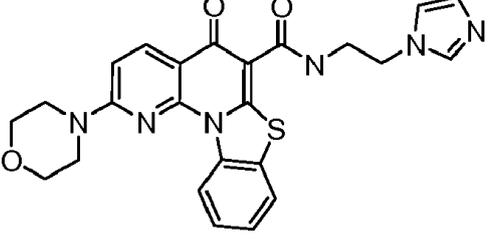
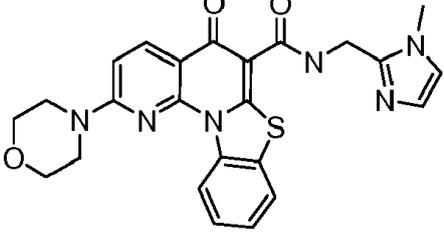
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	473.55	474
	477.56	478
	475.52	476
	486.55	487
	474.53	475

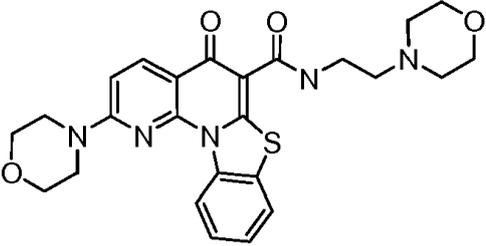
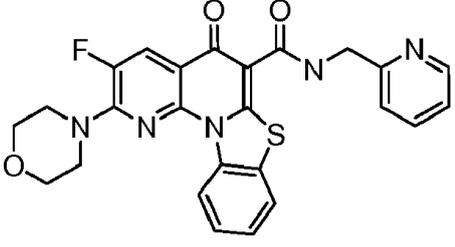
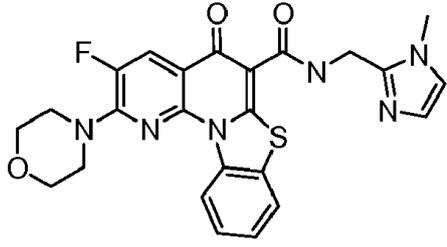
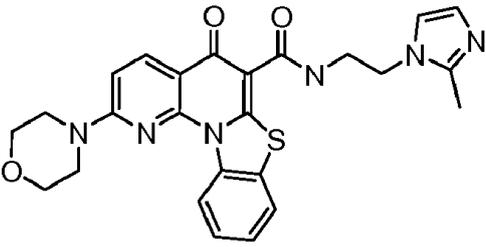
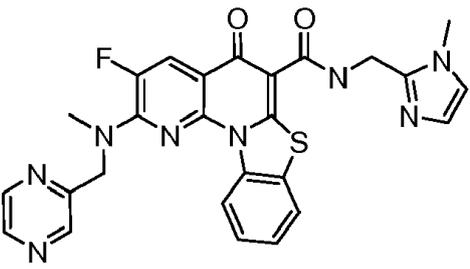
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	474.53	475
	486.55	487
	549.64	550
	493.58	494
	507.60	508

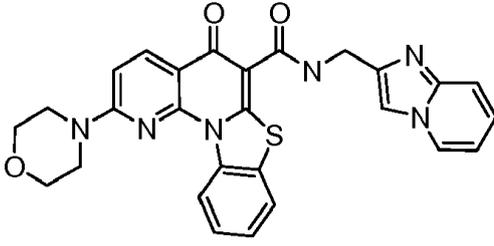
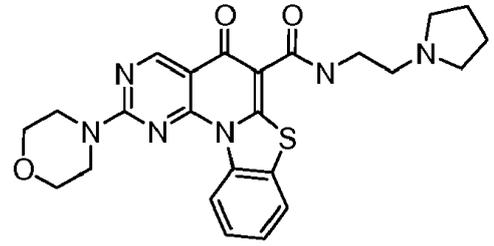
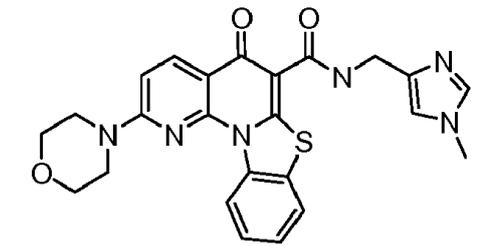
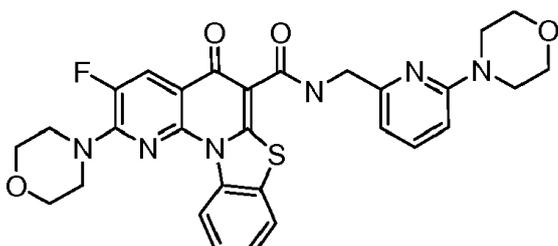
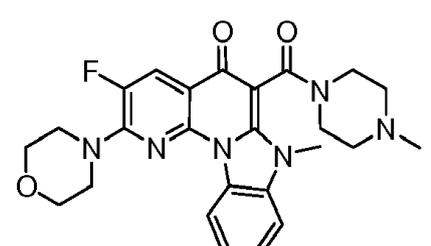
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	535.61	536
	507.60	508
	523.60	524
	521.59	522
	527.60	528

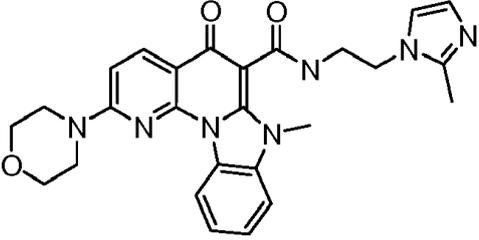
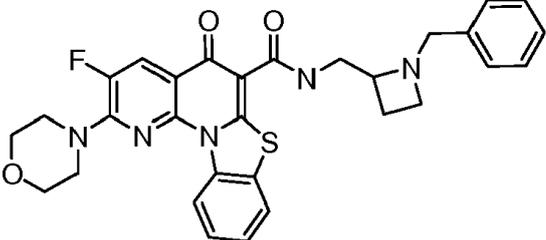
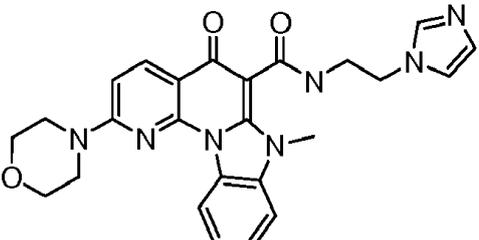
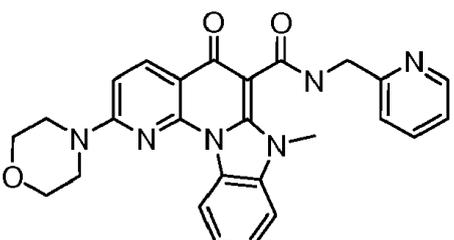
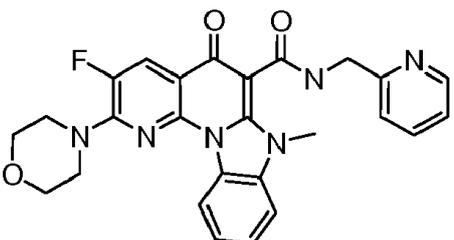
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	526.61	527
	527.60	528
	532.64	533
	488.56	489
	489.55	490

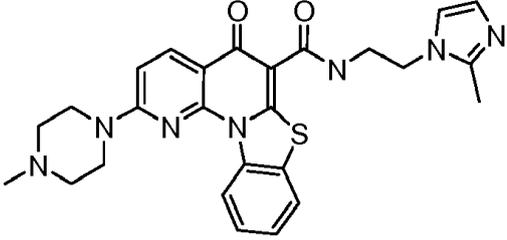
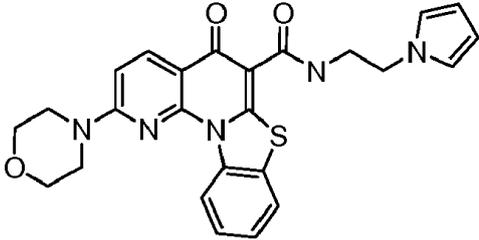
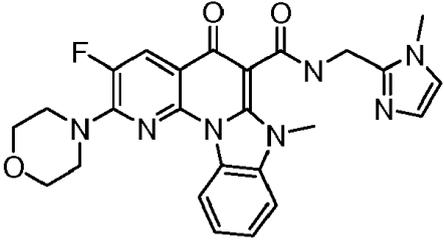
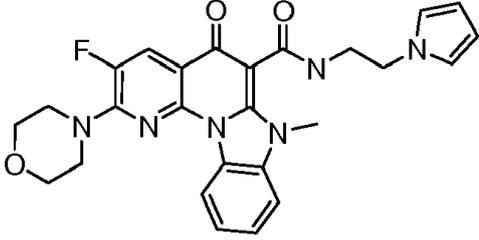
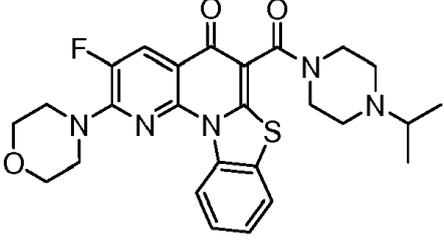
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	491.56	492
	520.60	521
	491.59	492
	488.56	489
	513.61	514

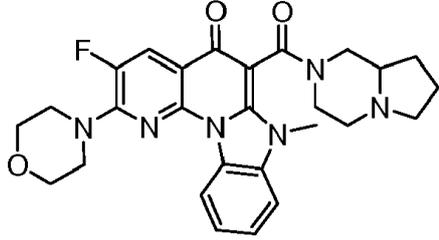
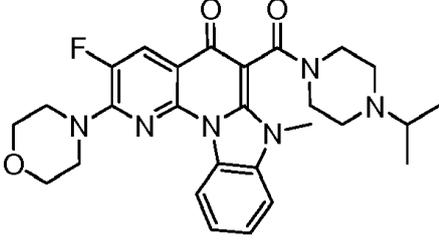
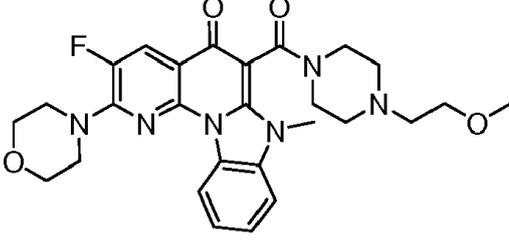
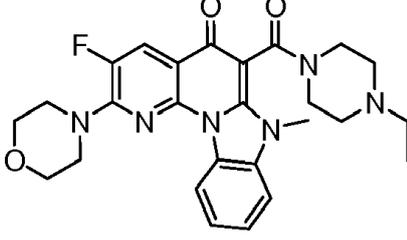
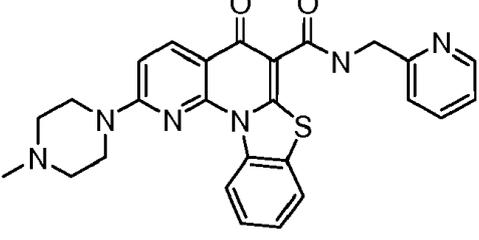
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	460.51	461
	488.56	489
	491.56	492
	474.53	475
	474.53	475

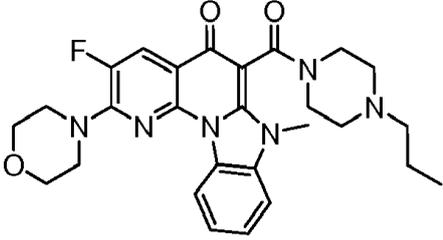
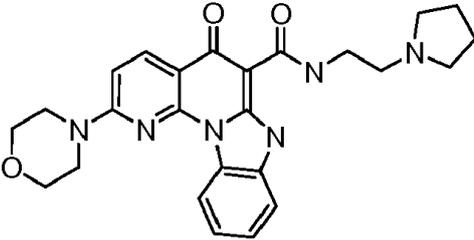
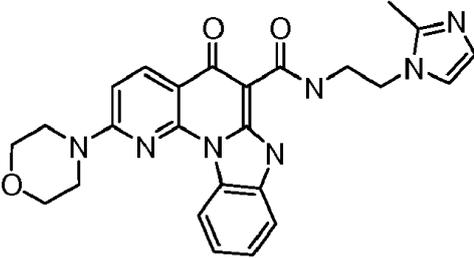
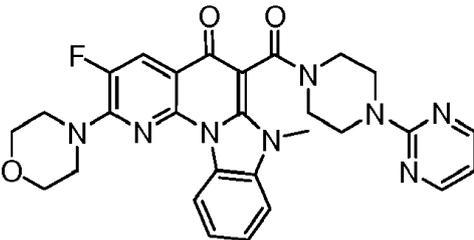
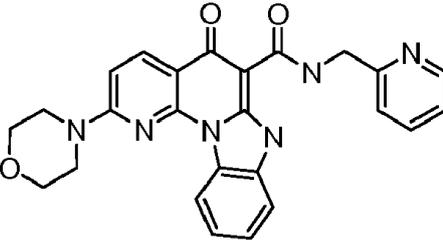
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	493.58	494
	489.52	490
	492.53	493
	488.56	489
	528.56	529

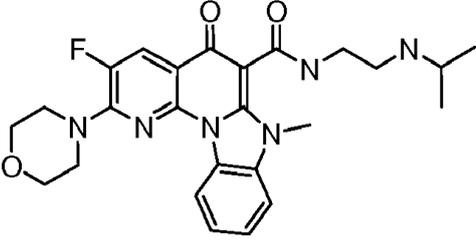
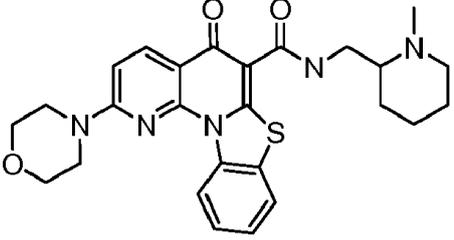
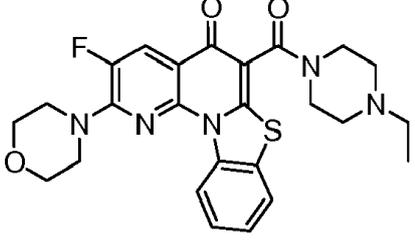
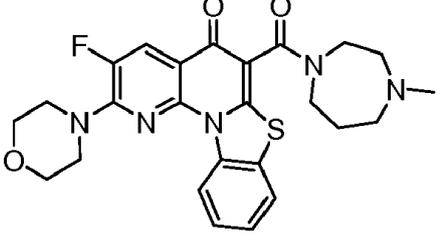
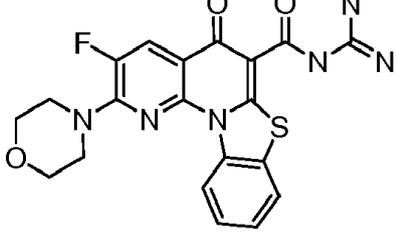
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	510.57	511
	478.57	479
	474.53	475
	574.63	575
	478.52	479

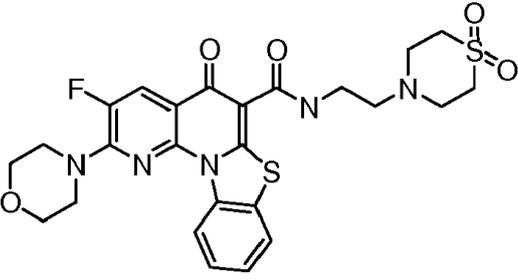
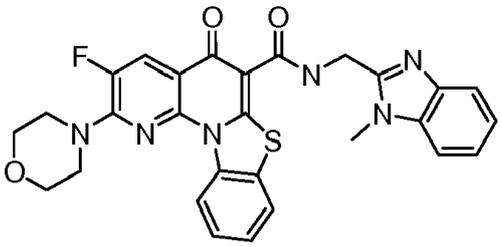
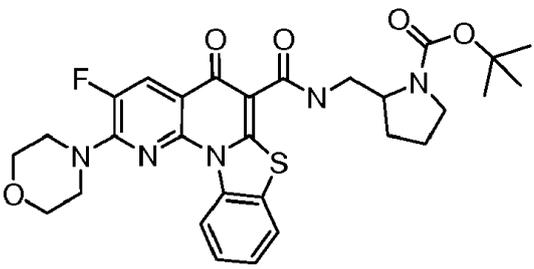
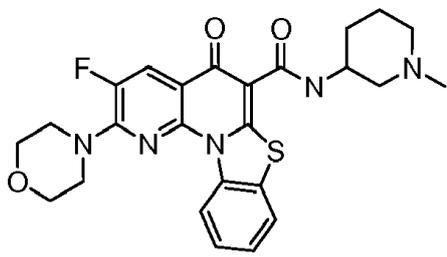
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	485.54	486
	557.64	558
	471.51	472
	468.51	469
	486.50	487

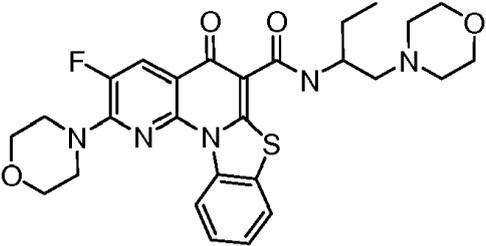
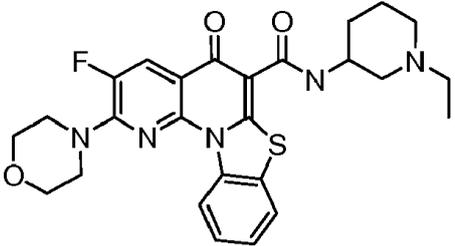
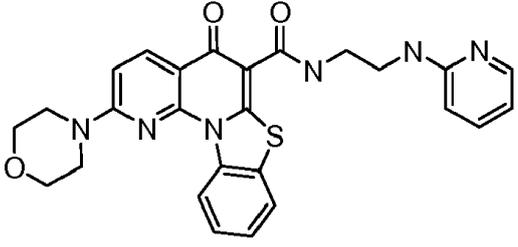
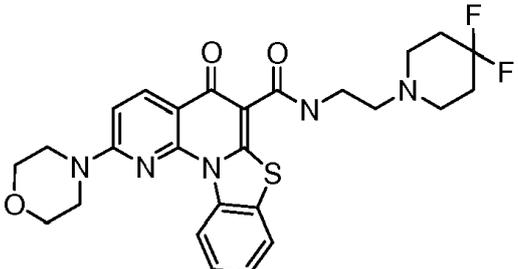
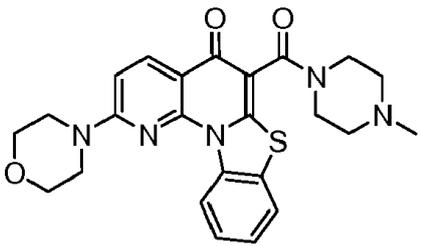
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	501.60	502
	473.55	474
	489.50	490
	488.51	489
	509.60	510

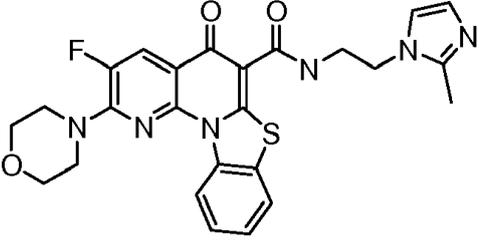
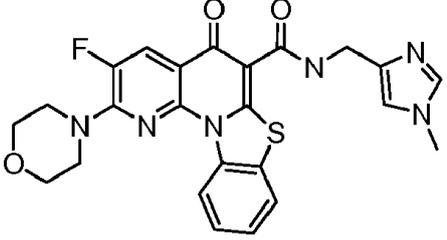
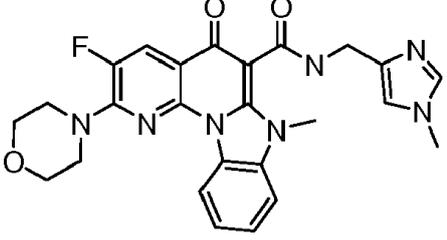
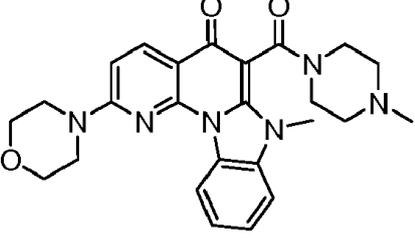
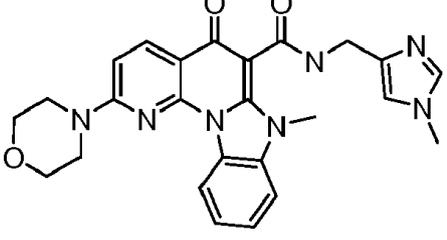
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	504.56	505
	506.57	507
	522.57	523
	492.55	493
	484.57	485

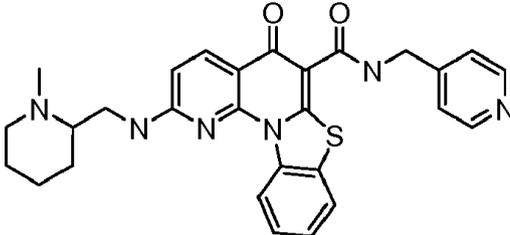
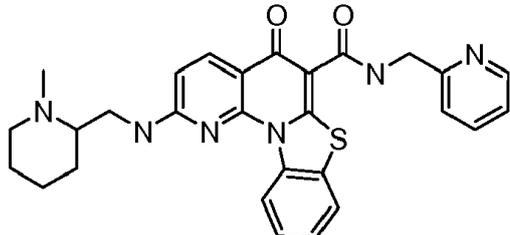
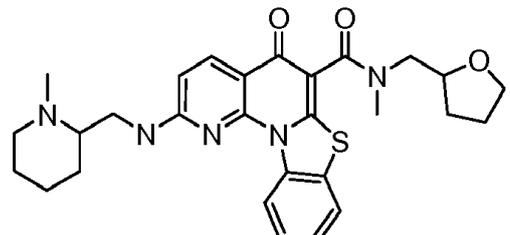
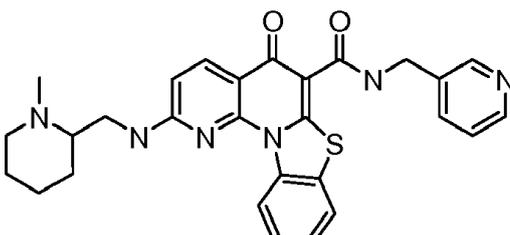
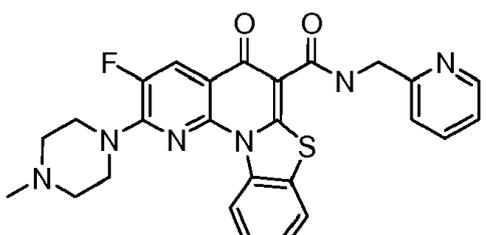
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	506.57	507
	460.53	461
	471.51	472
	542.56	543
	454.58	455

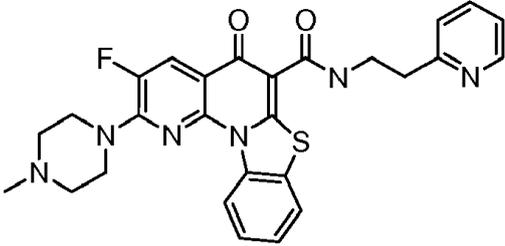
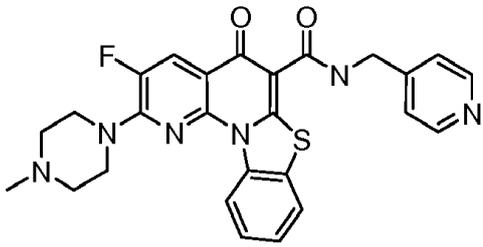
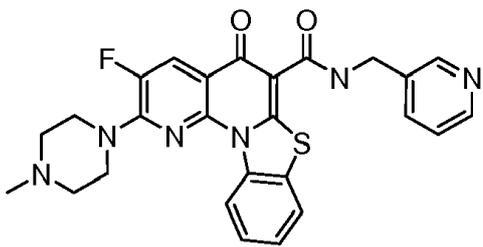
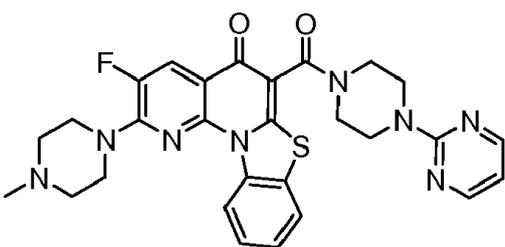
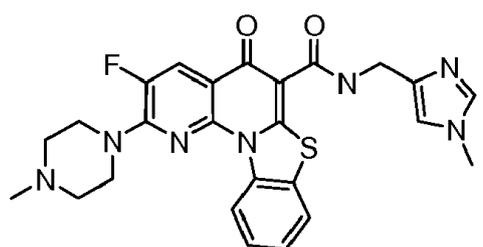
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	480.53	481
	491.61	492
	495.57	496
	495.57	496
	440.45	441

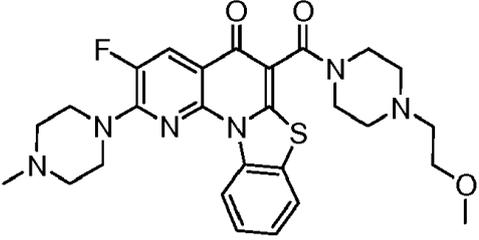
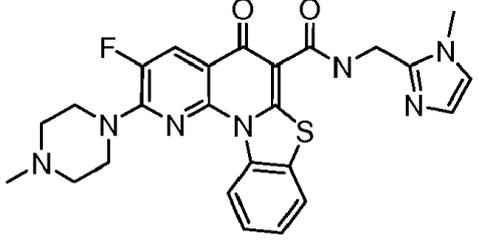
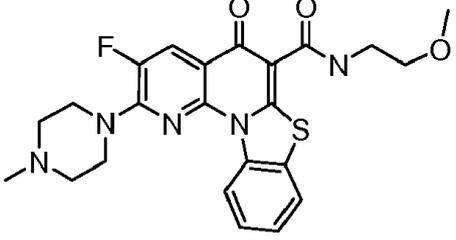
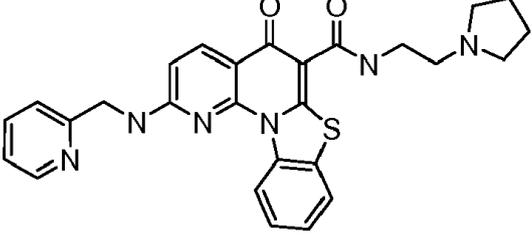
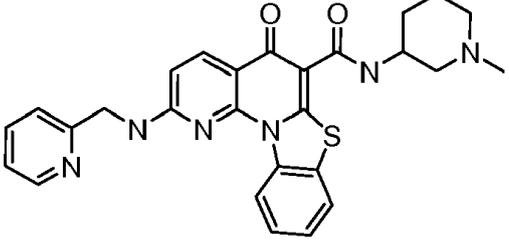
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <chem>C1CN(C1)C(=O)C2=C(C(=O)N2CCN3CCOCC3)C=C(F)C=C4N(C4)N5CCOCC5</chem>	559.63	560
 <chem>CN1C=NC2=CC=CC=C12C(=O)C3=C(C(=O)N3CCN4CCOCC4)C=C(F)C=C5N(C5)N6C=CC=CC=C6</chem>	542.58	543
 <chem>CC(C)(C)OC(=O)N1CCN1C(=O)C2=C(C(=O)N2CCN3CCOCC3)C=C(F)C=C4N(C4)N5C=CC=CC=C5</chem>	581.66	582
 <chem>C1CCN(C1)C(=O)C2=C(C(=O)N2CCN3CCOCC3)C=C(F)C=C4N(C4)N5C=CC=CC=C5</chem>	495.55	496

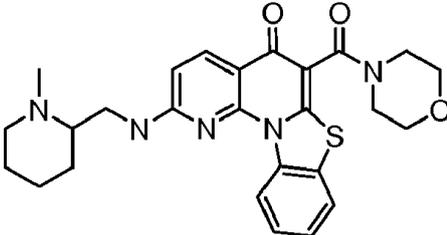
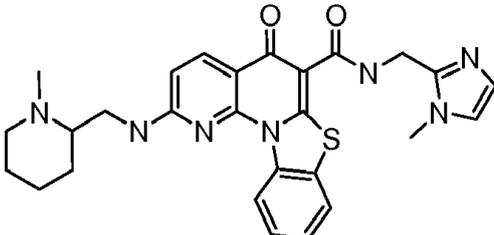
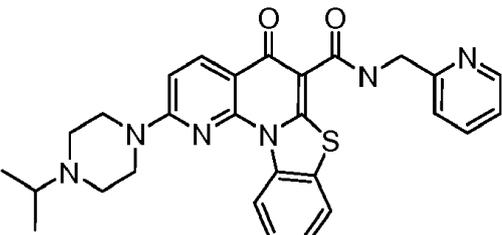
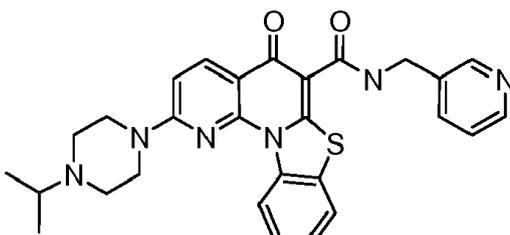
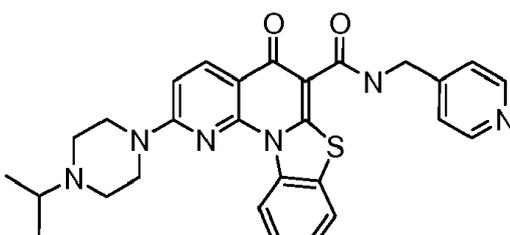
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	539.62	540
	509.60	510
	500.57	501
	527.59	528
	463.55	464

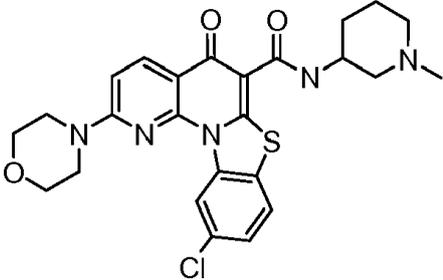
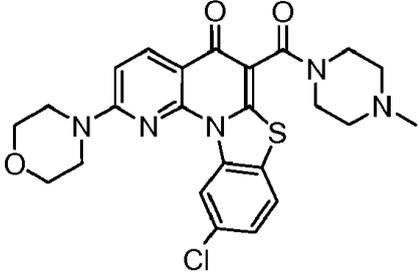
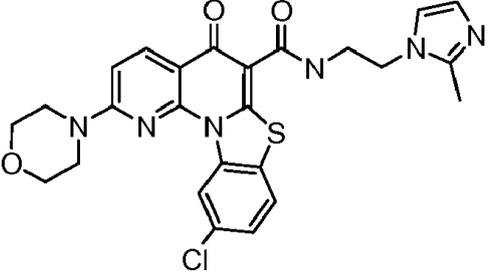
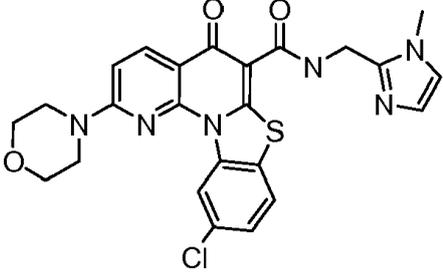
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	506.55	507
	492.53	493
	489.50	490
	460.53	461
	471.51	472

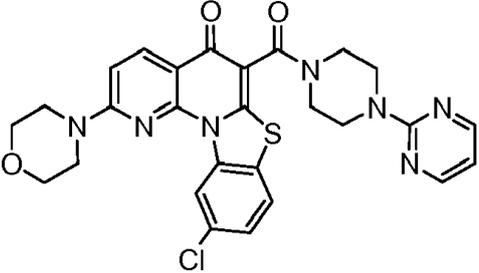
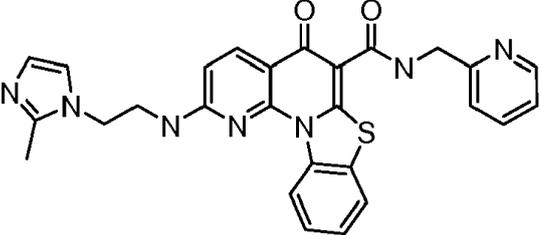
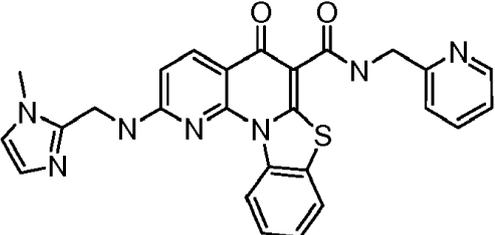
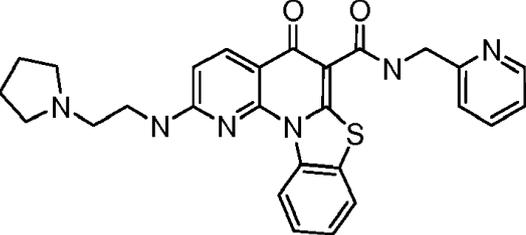
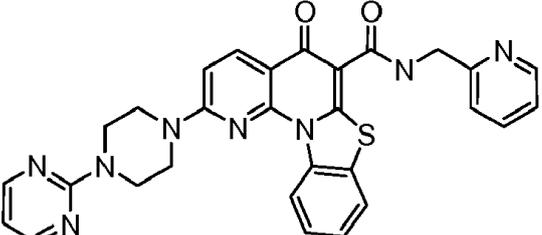
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	512.63	513
	512.63	513
	519.66	520
	512.63	513
	502.56	503

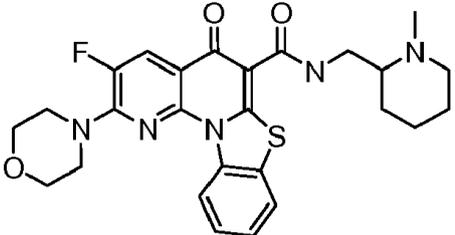
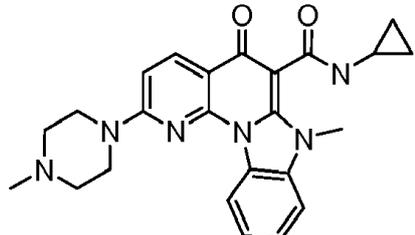
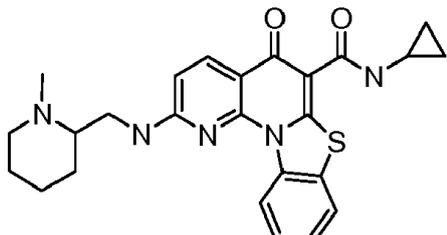
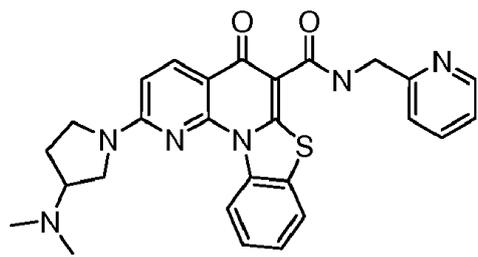
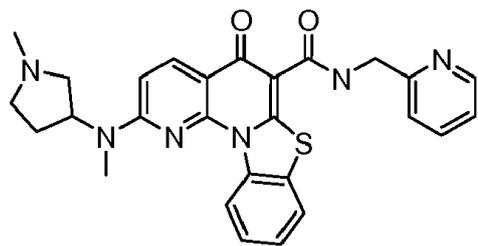
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	516.59	517
	502.56	503
	502.56	503
	558.63	559
	505.57	506

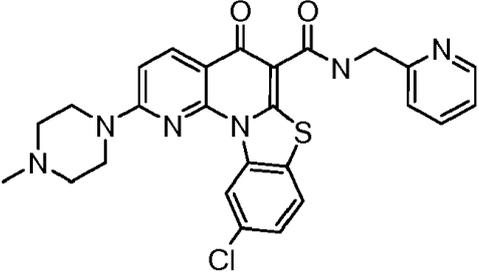
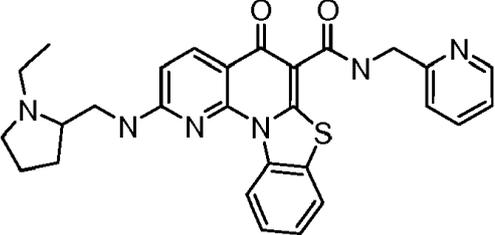
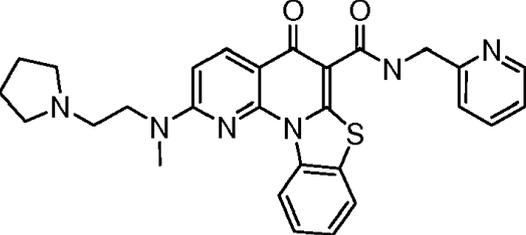
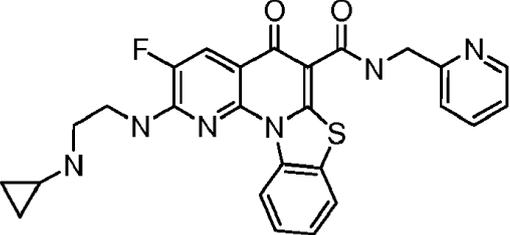
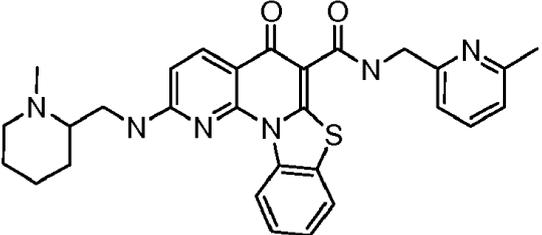
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	538.64	539
	505.57	506
	469.53	470
	498.60	499
	498.60	499

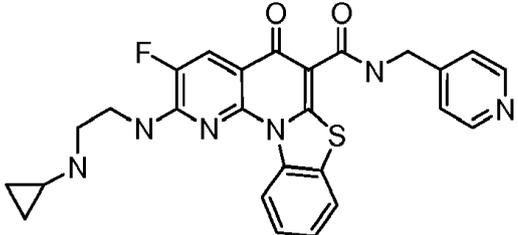
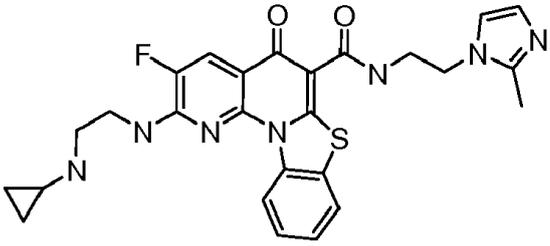
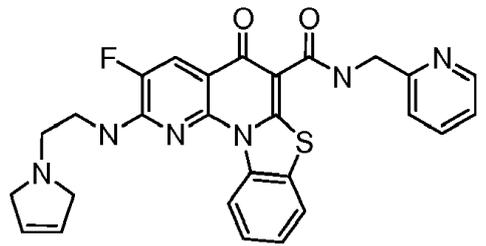
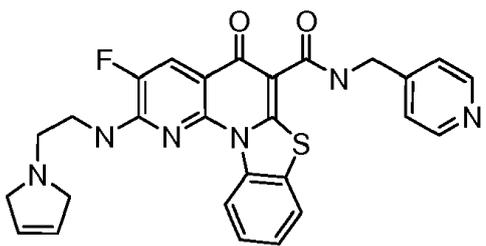
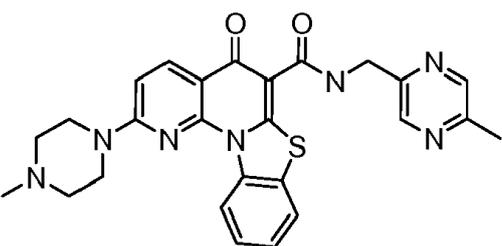
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	491.61	492
	515.63	516
	512.63	513
	512.63	513
	512.63	513

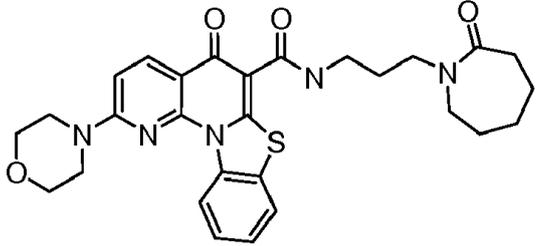
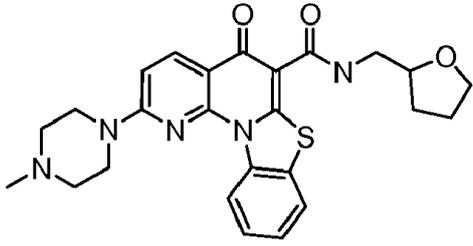
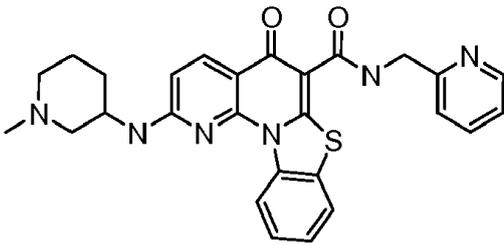
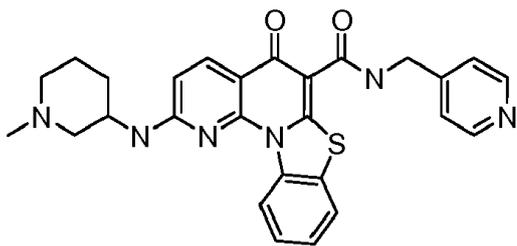
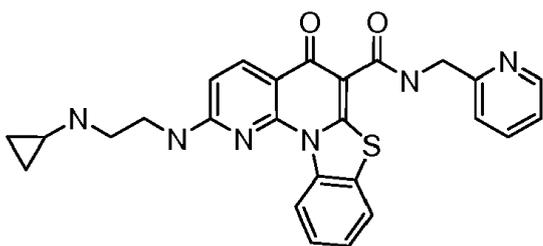
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	512.02	512
	498.00	498
	523.01	523
	508.98	509

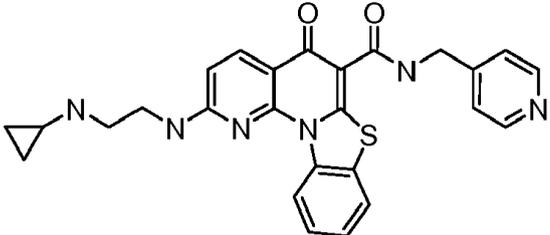
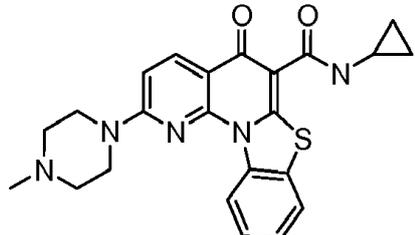
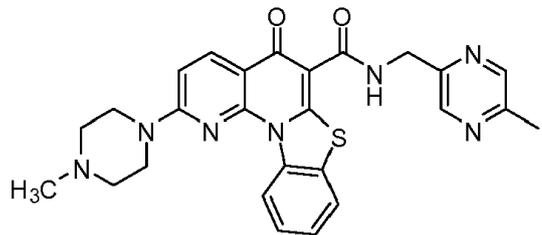
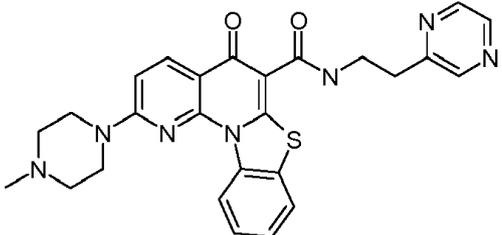
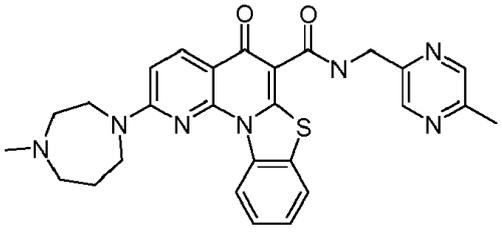
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	562.04	563
	509.58	510
	495.56	496
	498.60	499
	548.62	549

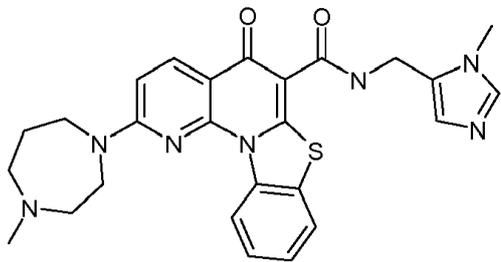
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	509.60	510
	430.50	431
	461.58	462
	498.60	499
	498.60	499

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <chem>CN1CCN(C1)c2nc3c(nc(=O)n3s2)c4ccc(Cl)cc4C(=O)NCC5=CC=CC=N5</chem>	519.02	519
 <chem>CCN1CC1c2nc3c(nc(=O)n3s2)c4c5ccccc45C(=O)NCC6=CC=CC=N6</chem>	512.63	513
 <chem>CN1CC1CCN2C(=O)c3nc4c(nc(=O)n4s3)C5=CC=CC=C5C(=O)NCC6=CC=CC=N6</chem>	512.63	513
 <chem>C1CC1CN2C(=O)c3nc(F)c4c(nc(=O)n4s3)C5=CC=CC=C5C(=O)NCC6=CC=CC=N6</chem>	502.56	503
 <chem>CN1CCN(C1)CCN2C(=O)c3nc4c(nc(=O)n4s2)c5ccccc53C(=O)NCC6=CC=C(C)N6</chem>	526.65	527

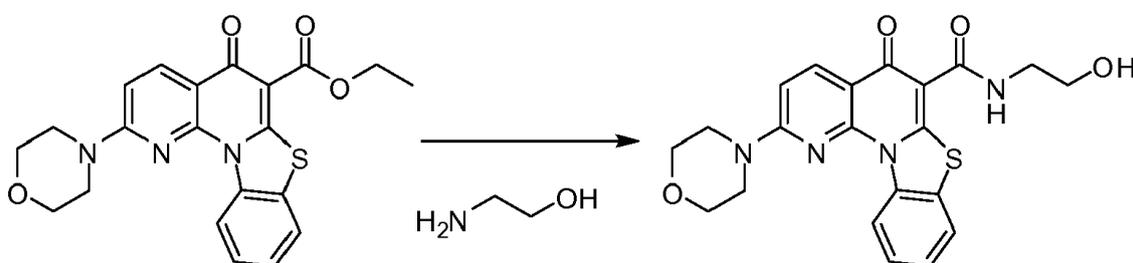
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	502.56	503
	519.59	520
	514.57	515
	514.57	515
	499.59	500

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	533.64	534
	477.58	478
	498.60	499
	498.60	499
	484.57	485

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	484.57	485
	433.53	434
	499.6	500
	499.6	500
	513.62	514

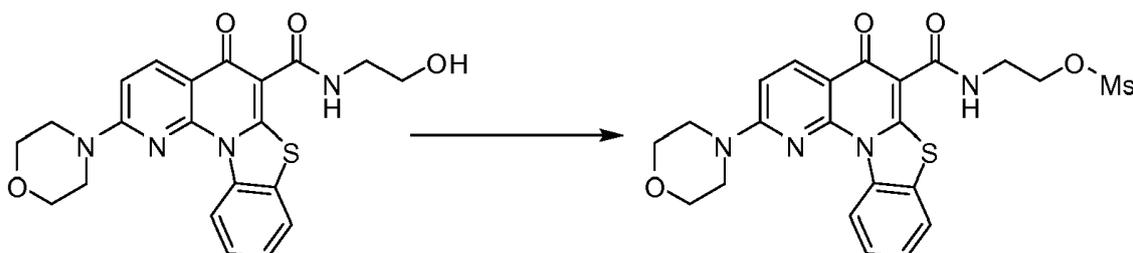
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	501.61	502

Ejemplo 24



5 Una solución de éster (6.53 g, 15.97 mmol) en etanolamina (30 ml) se agitó a 150°C durante la noche. La reacción se diluyó con H₂O (100 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración. El sólido se lavó con H₂O (2x) y ACN (2x) para producir el producto deseado como un sólido blanco (5.75 g, 85%). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 10.57 (t, 1H), 9.32 (d, 1H), 8.36 (d, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.18 (d, 1H), 4.85 (t, 1H), 3.82 (t, 4H), 3.75 (t, 4H), 3.56 (q, 2H), 3.43 (q, 2H). LCMS (ES): m/z 425 [M+1]⁺.

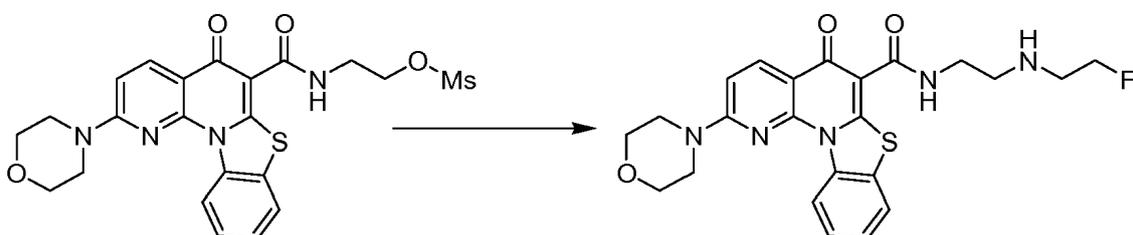
Ejemplo 25



10

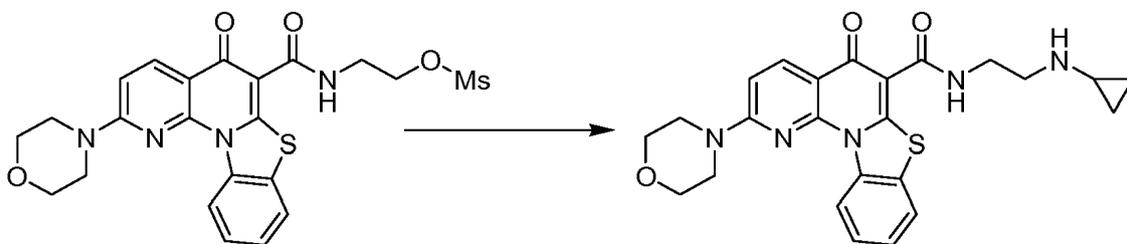
15 A una solución de alcohol (500 mg, 1.18 mmol) y TEA (0.50 ml, 3.58 mmol) en DCM (30 ml) se añadió MsCl (0.20 ml, 2.58 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se diluyó con DCM (100 ml) y NH₄Cl saturado (50 ml). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H₂O (100 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo de reacción se trituró en ACN para producir el producto deseado como un sólido amarillo pálido (400 mg, 68%). El material se usó tal cual sin más purificación. LCMS (ES): m/z 503 [M+1]⁺.

Ejemplo 26



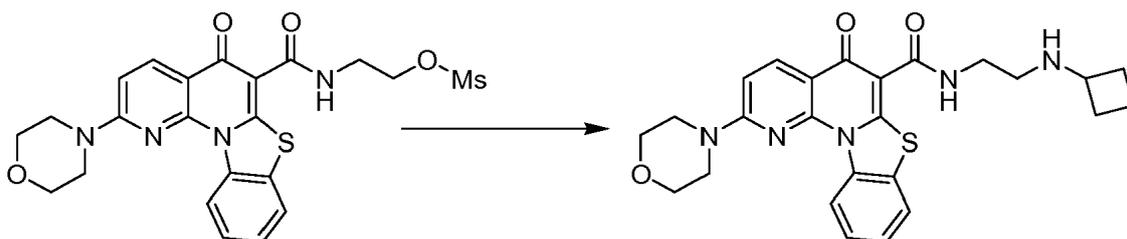
Una solución de mesilato (90 mg, 0.18 mmol), 2-fluoroetanamina (40 mg, 0.40 mmol) y TEA (0.05 ml) en NMP (1.5 ml) se calentó a 130°C durante 20 minutos en microondas. La reacción se diluyó con ACN (5 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración. La reacción en bruto se purificó en TLC sobre gel de sílice (10% MeOH/DCM) para producir el producto deseado. LCMS (ES): m/z 470 [M+1]⁺.

5 Ejemplo 27



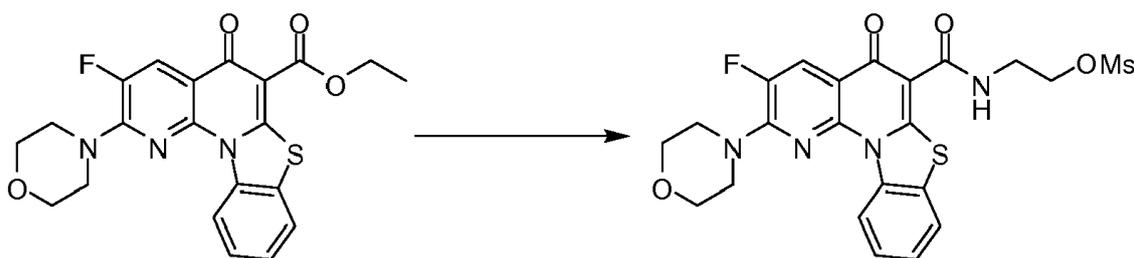
10 Una solución de mesilato (50 mg, 0.10 mmol), ciclopropilamina (0.10 ml, 1.75 mmol), HCl (1N, 0.05 ml) y TEA (0.05 ml) en NMP (1.5 ml) se calentó a 130°C durante 20 min en microondas. La reacción cruda se purificó en HPLC de fase inversa para producir el producto deseado. ¹H RMN (CDCl₃) δ: 10.64 (t, 1H), 9.45 (d, 1H), 8.63 (d, 1H), 7.77 (dd, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 6.92 (d, 1H), 3.94 (t, 4H), 3.82 (t, 4H), 3.66 (q, 2H), 3.01 (t, 2H), 2.00 (m, 1H), 0.43 (m, 4H). LCMS (ES): m/z 464 [M+1]⁺

Ejemplo 28



15 Una solución de mesilato (100 mg, 0.20 mmol), ciclobutilamina (0.10 ml, 1.41 mmol), HCl (1N, 0.05 ml) y TEA (0.05 ml) en ACN (2.0 ml) se calentó a 120°C durante 15 min en microondas. El precipitado resultante se recogió por filtración y se purificó en TLC sobre gel de sílice (15% MeOH/DCM) para producir el producto deseado (65 mg, 98%). LCMS (ES): m/z 478 [M+1]⁺.

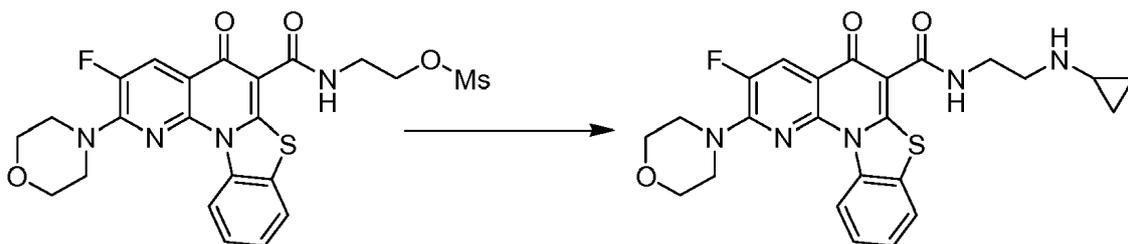
Ejemplo 29



20

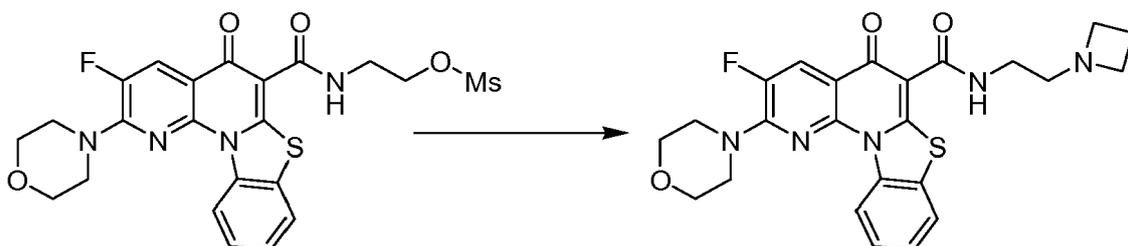
25 El éster (0.5 g, 1.16 mmol) y el etanol amina (0.7 ml, 11.63 mmol) en 3 ml de NMP se calentaron a 160°C durante 20 min (microondas). El sólido formado se filtró, se lavó varias veces con MeOH y se secó al aire al vacío. El alcohol se obtuvo como un sólido blanquecino y se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. Al alcohol (0.204 g, 0.46 mmol) y trietilamina en DCM (10 ml) se añadió MsCl a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió diclorometano (100 ml) y la solución resultante se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (2x100 ml), salmuera (100 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró al vacío hasta obtener el mesilato como un sólido amarillo.

Ejemplo 30



Una solución de mesilato (50 mg) y ciclopropilamina (0.2 ml) en ACN (1 ml) se calentó a 100°C durante 20 min (microondas). El disolvente se eliminó al vacío y el compuesto se trituró con acetato de etilo para dar un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 482 [M+1]⁺

5 Ejemplo 31

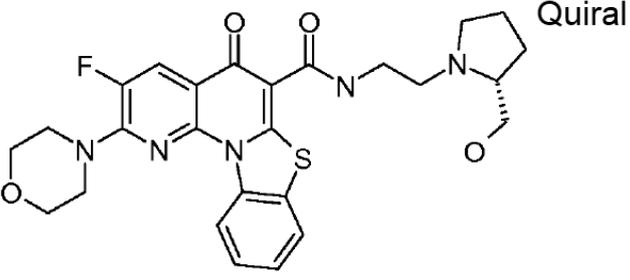
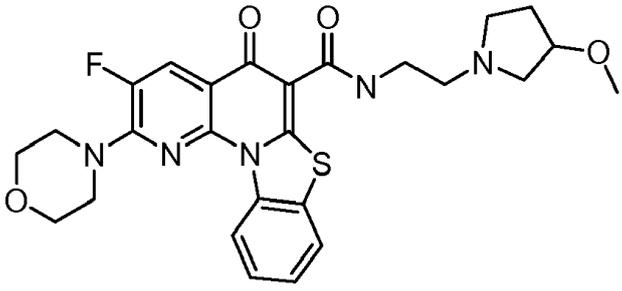
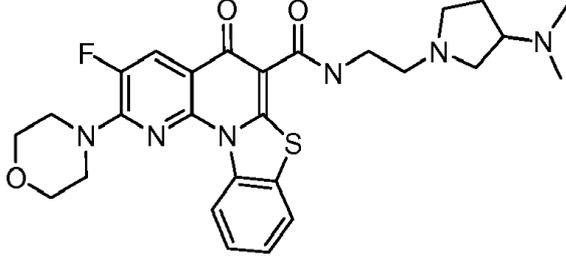
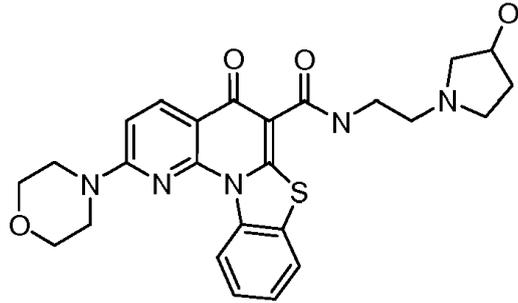
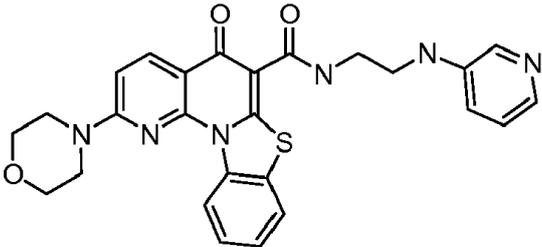


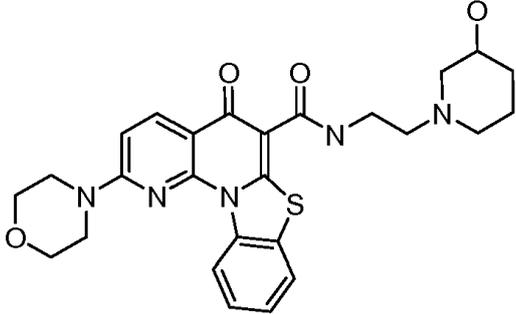
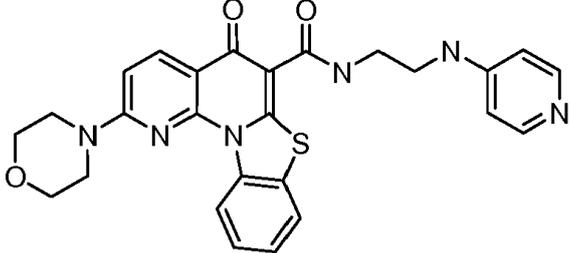
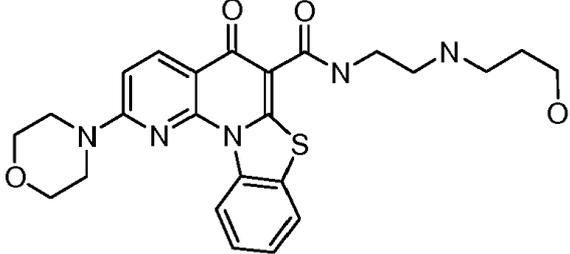
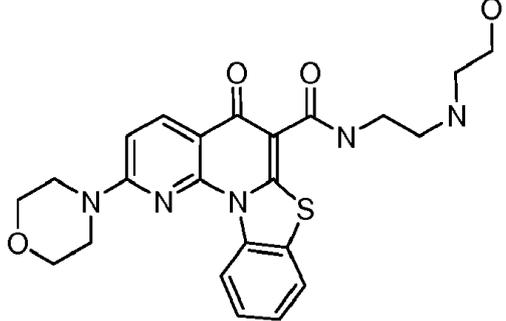
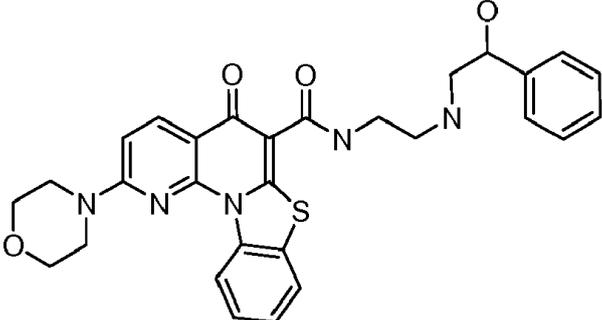
Una solución de mesilato (54 mg) y clorhidrato de ciclobutilamina (0.2 g) y TEA (0.2 ml) en ACN (1 ml) se calentó a 90°C durante 1 h (microondas). El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por TLC en gel de sílice (10% MEH/DCM) para dar un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 482 [M+1]⁺

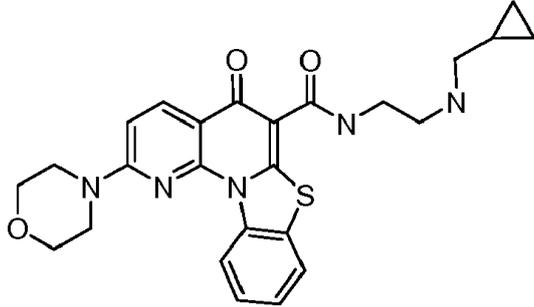
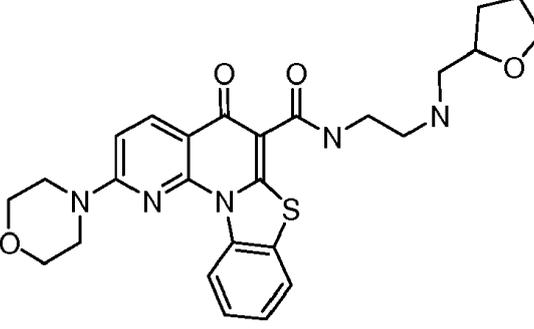
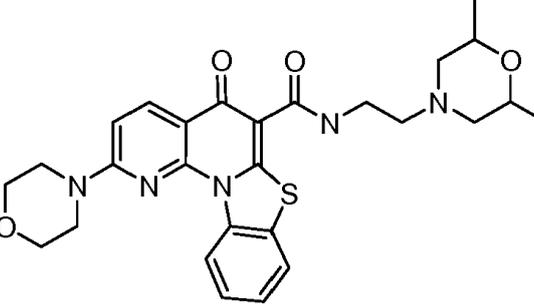
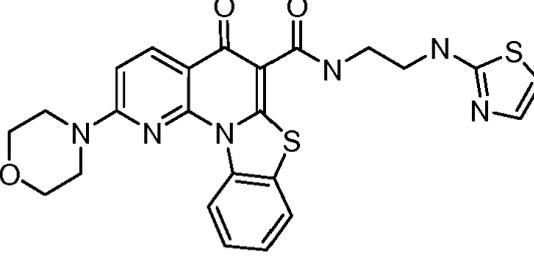
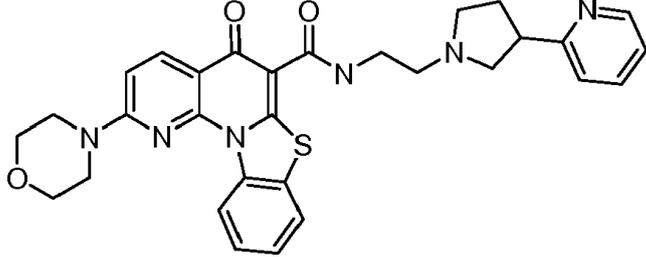
10 Los siguientes análogos en la Tabla 2 se prepararon por el mismo método, usando las aminas y el mesilato apropiados.

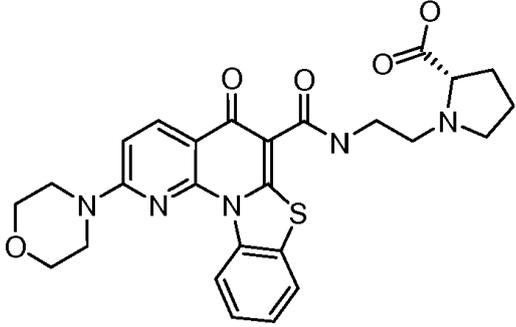
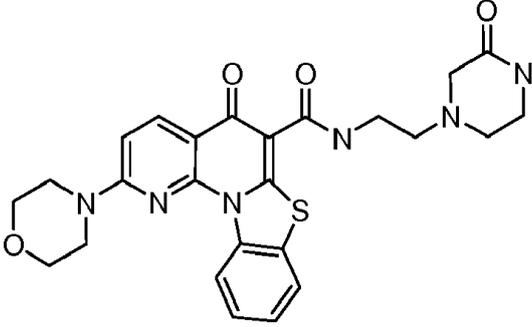
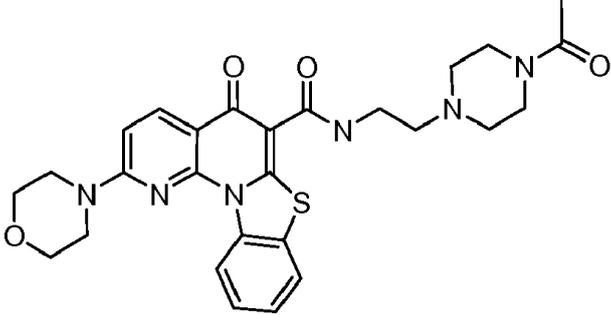
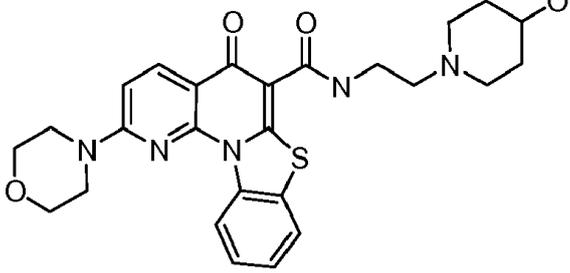
Tabla 2

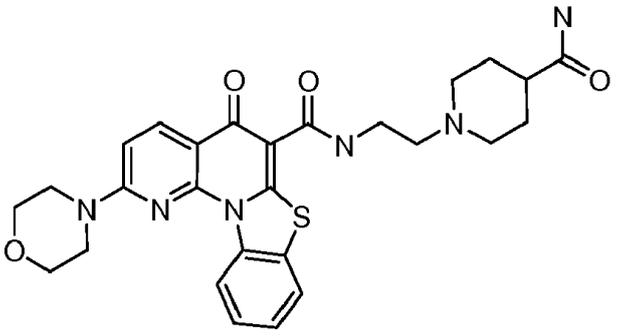
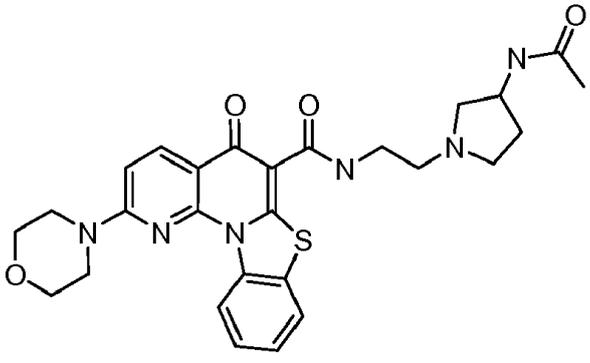
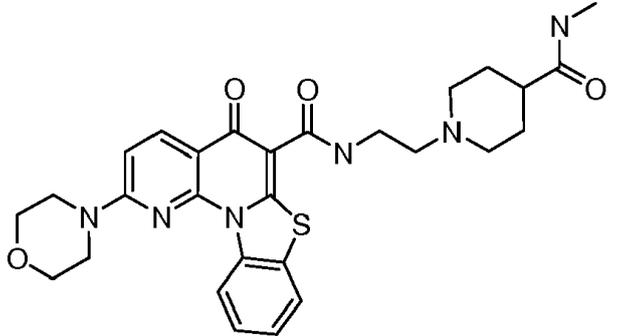
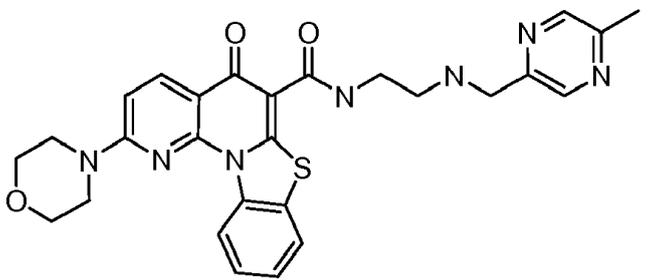
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	511.58	512
	539.62	540

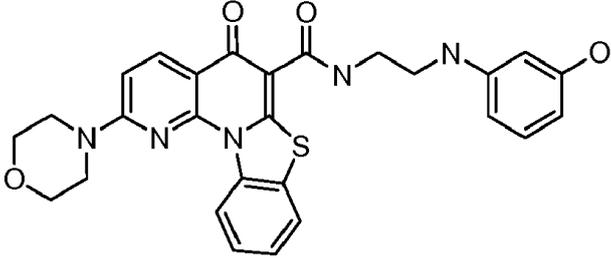
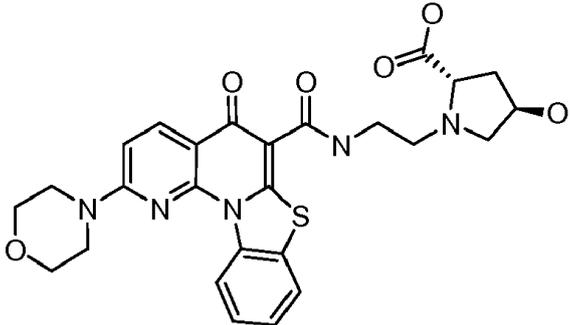
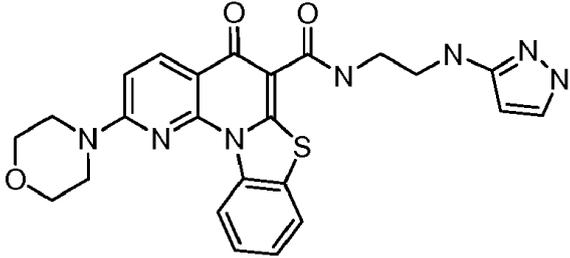
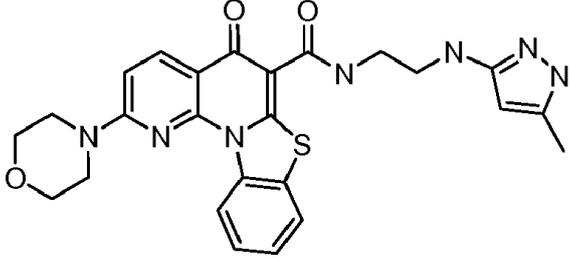
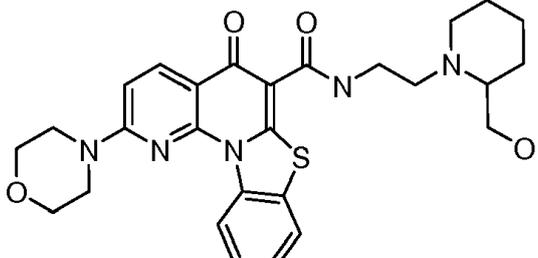
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <p>Quiral</p>	525.60	526
	525.60	526
	538.64	539
	493.58	494
	500.57	501

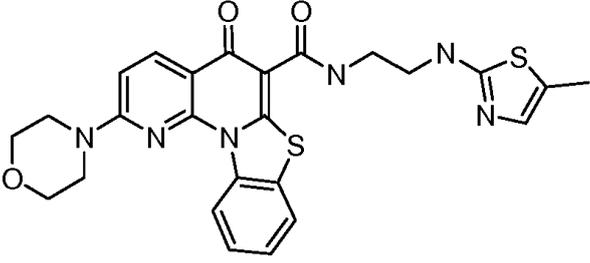
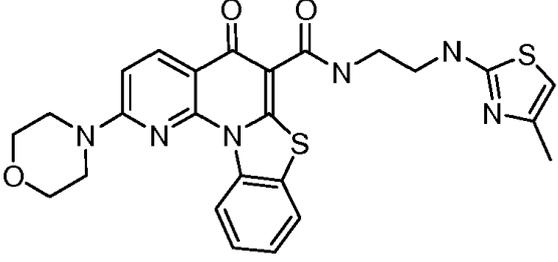
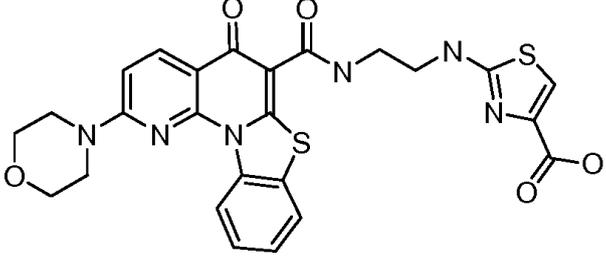
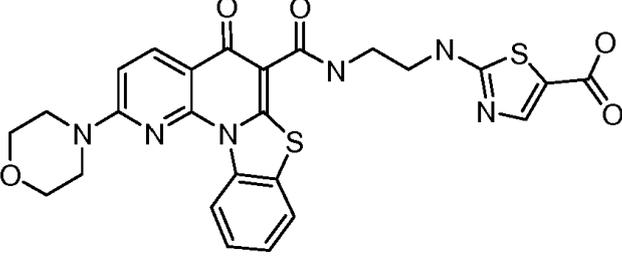
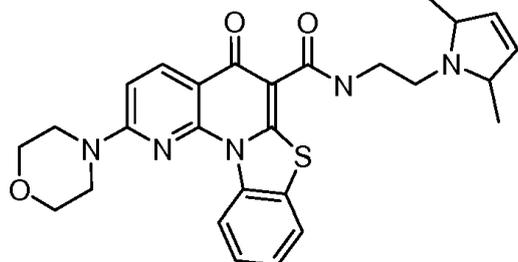
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	507.60	508
	500.57	501
	481.57	482
	467.54	468
	543.64	544

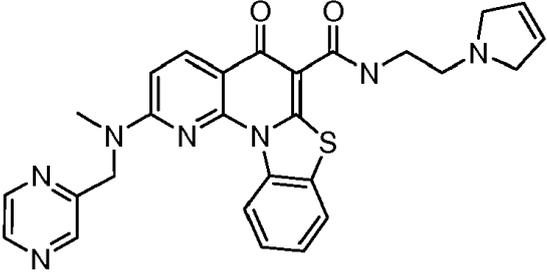
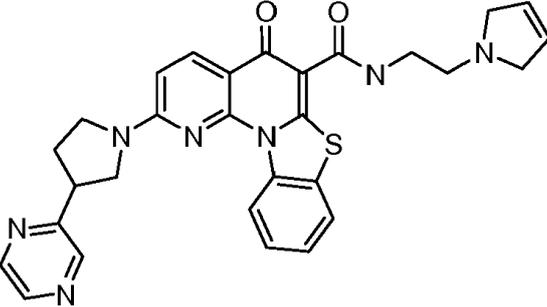
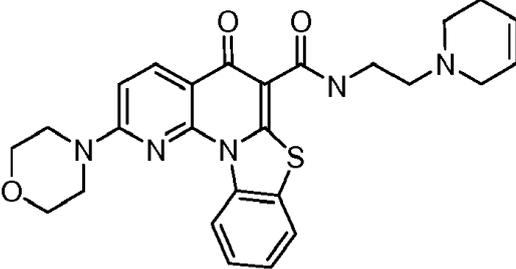
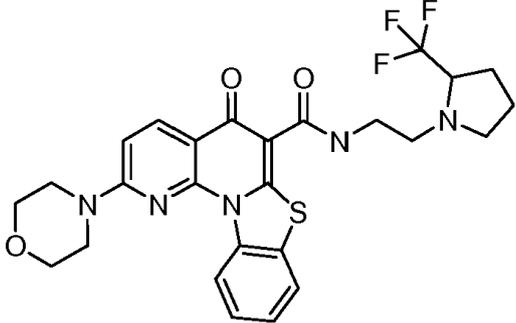
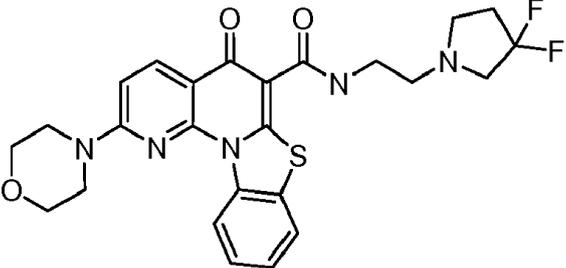
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	477.58	478
	507.60	508
	521.63	522
	506.60	507
	554.66	555

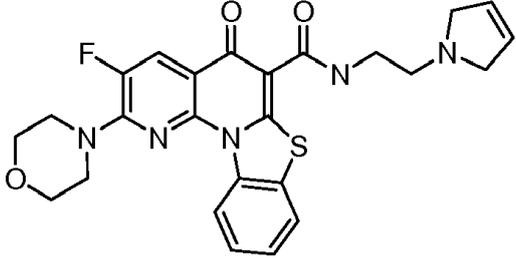
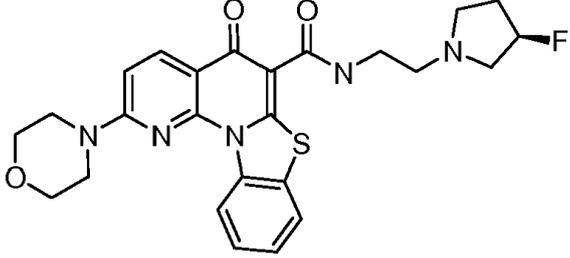
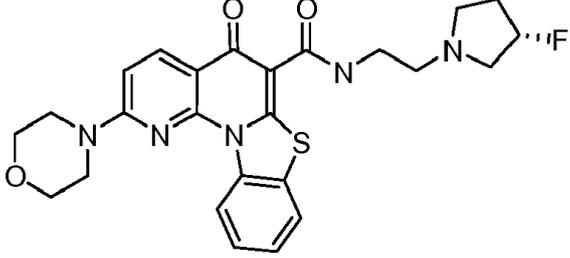
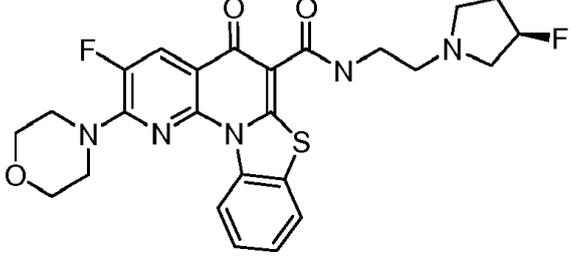
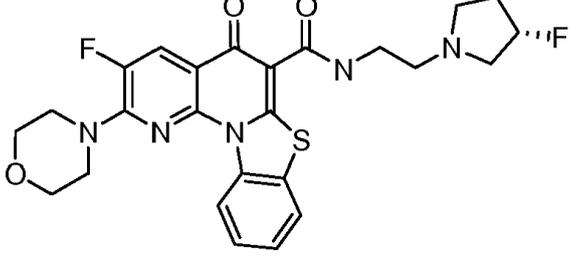
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	521.59	522
	506.58	507
	534.63	535
	507.60	508

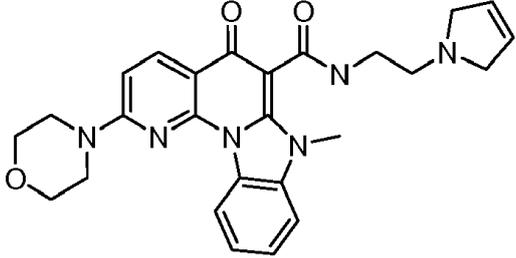
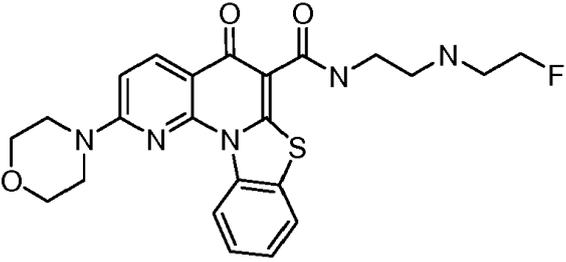
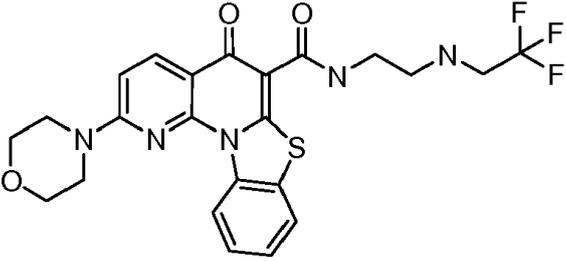
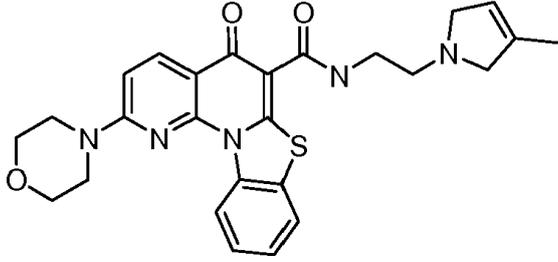
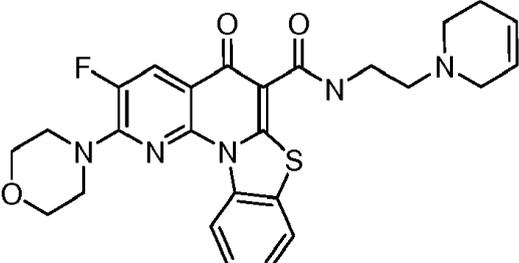
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <chem>CN(C)C(=O)NCCN1CCN(C1)c2c3c(nc4c2c5ccccc5s4)nc6ccn(c6)N7CCOCC7</chem>	534.63	535
 <chem>CC(=O)N1CCN1CCN(C(=O)c2c3c(nc4c2c5ccccc5s4)nc6ccn(c6)N7CCOCC7)</chem>	534.63	535
 <chem>CN(C)C(=O)N1CCN(C1)c2c3c(nc4c2c5ccccc5s4)nc6ccn(c6)N7CCOCC7</chem>	548.66	549
 <chem>Cc1ncnc(CCN(C(=O)c2c3c(nc4c2c5ccccc5s4)nc6ccn(c6)N7CCOCC7)n1)</chem>	529.61	530

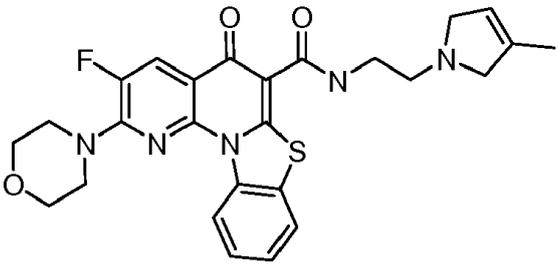
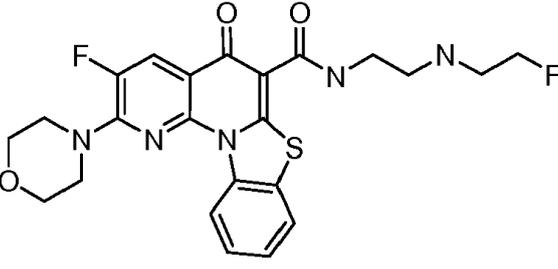
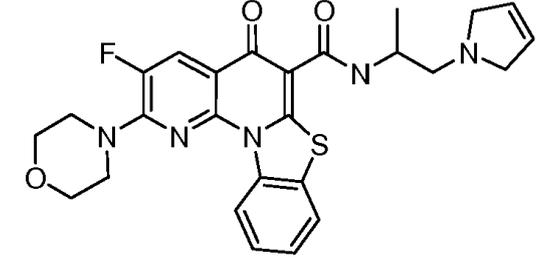
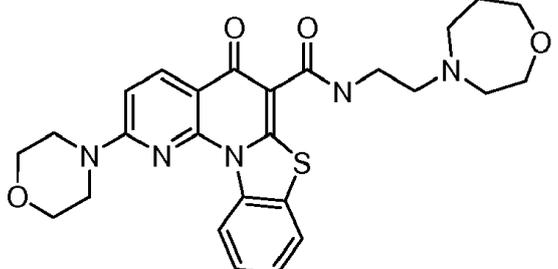
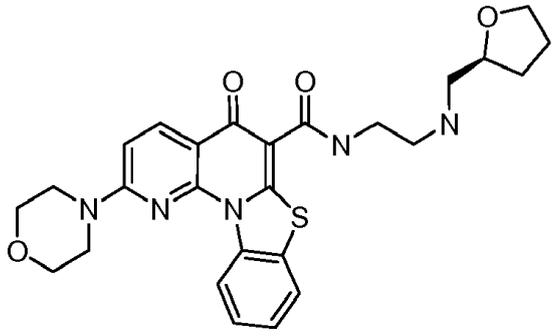
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	515.58	516
	537.59	538
	489.55	490
	503.58	504
	521.63	522

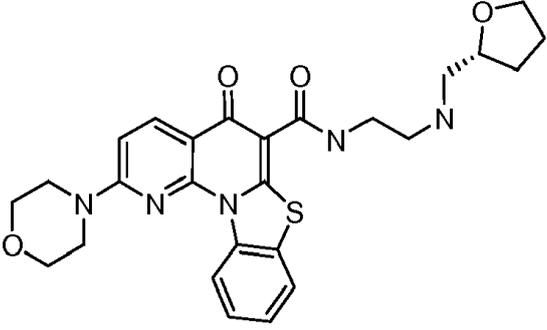
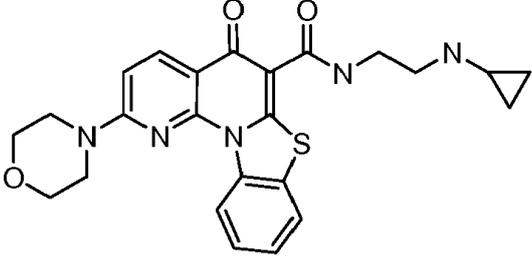
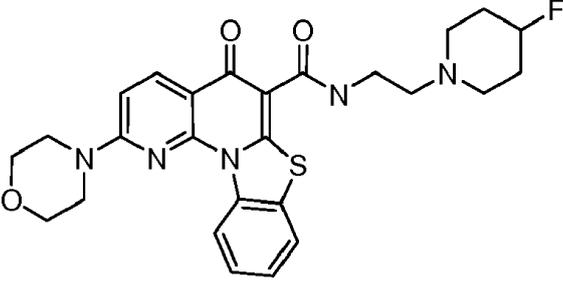
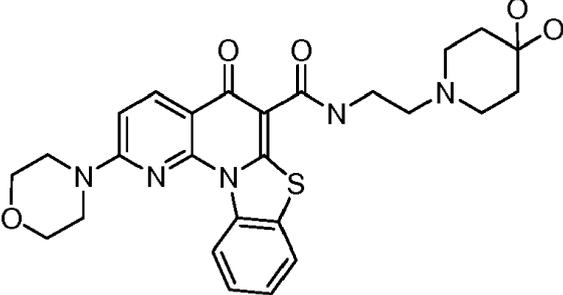
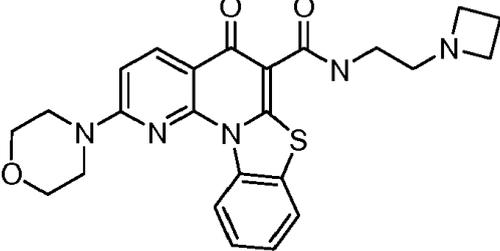
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	520.63	521
	520.63	521
	550.61	551
	550.61	551
	503.62	504

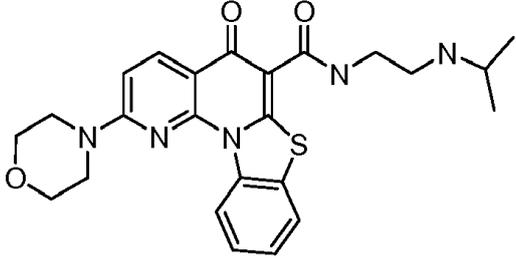
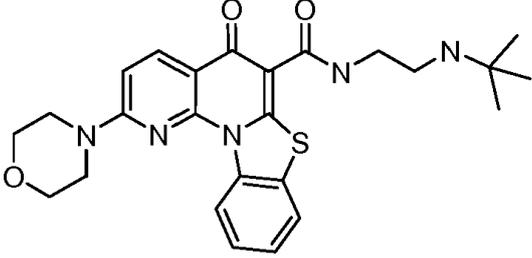
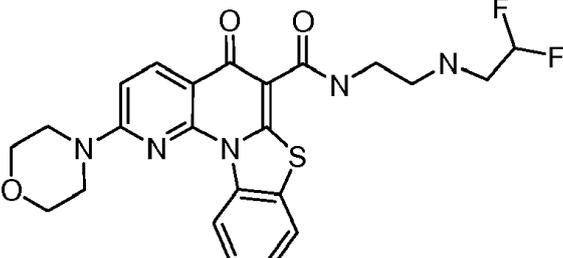
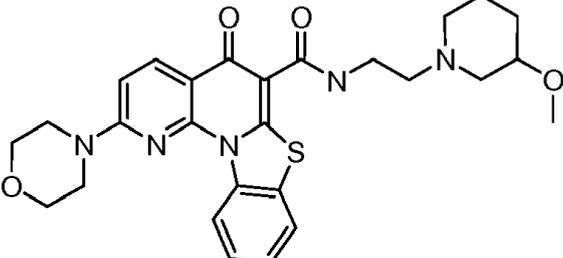
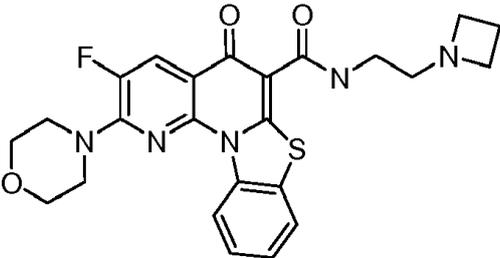
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	511.60	512
	537.64	538
	489.59	490
	545.58	546
	513.56	514

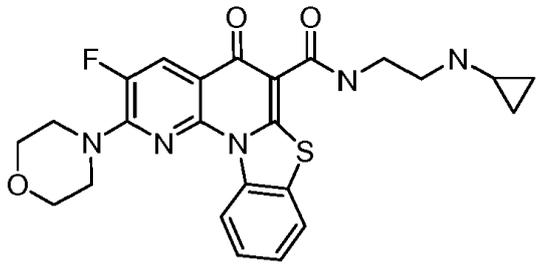
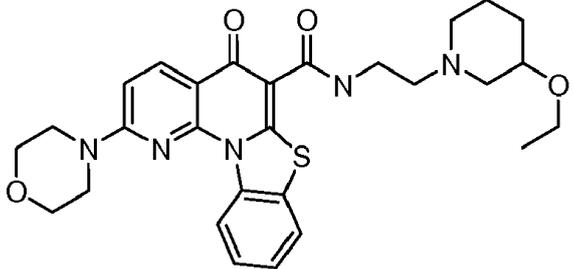
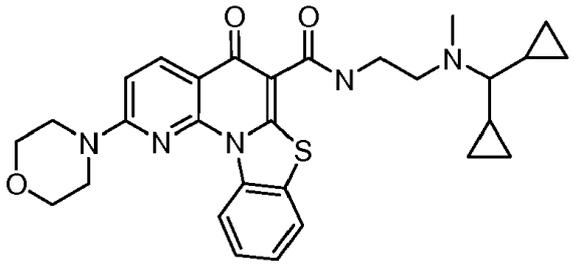
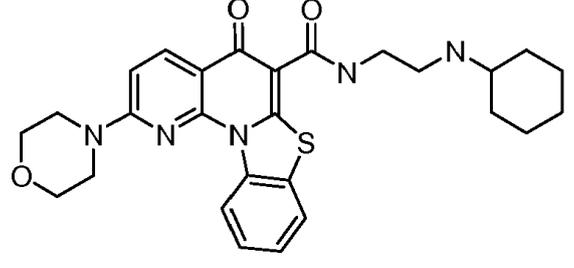
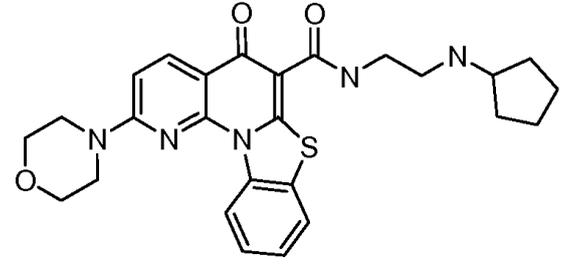
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	493.55	494
	495.57	496
	495.57	496
	513.56	514
	513.56	514

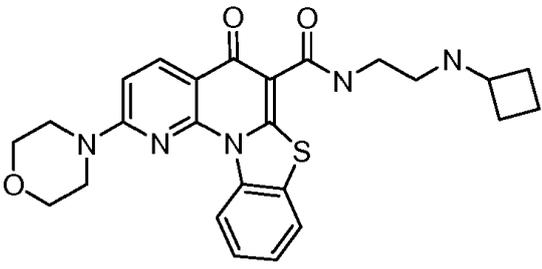
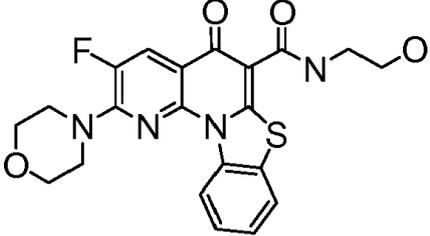
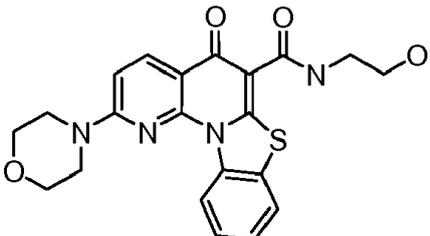
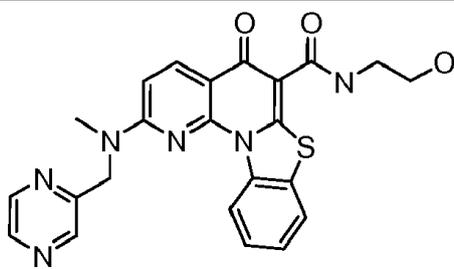
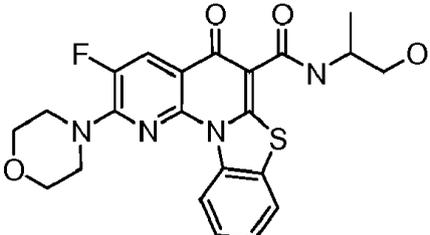
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	472.54	473
	469.53	470
	505.51	506
	489.59	490
	507.58	508

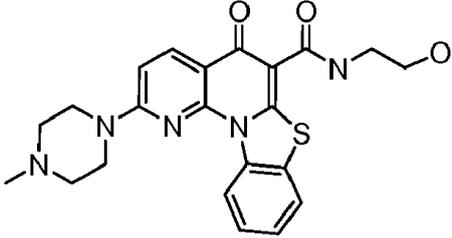
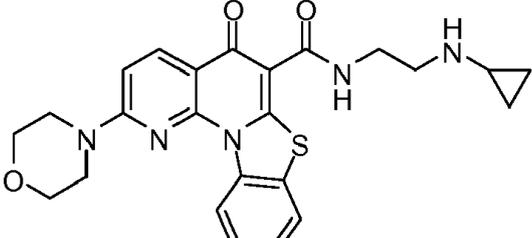
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	507.58	508
	487.52	488
	507.58	508
	507.60	508
	507.60	508

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	507.60	508
	463.55	464
	509.60	510
	523.60	524
	463.55	464

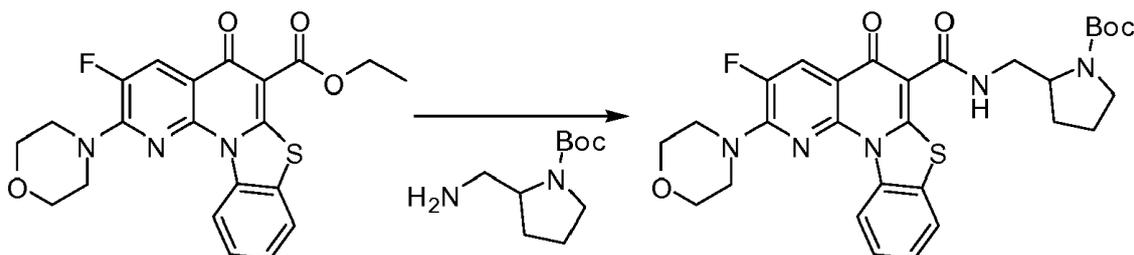
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	465.57	466
	479.59	480
	487.52	488
	521.63	522
	481.54	482

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <chem>C1CCN1CCNC(=O)C2=C(N3C(=O)N(C4=CC=CC=C4S3)N5C=CC(=C5)N6CCOCC6)C(=O)N2C(F)=C</chem>	481.54	482
 <chem>CCOCCN1CCN1CCNC(=O)C2=C(N3C(=O)N(C4=CC=CC=C4S3)N5C=CC(=C5)N6CCOCC6)C(=O)N2</chem>	535.66	536
 <chem>C1CC2(C1)C(C2)N(C)CCNC(=O)C3=C(N4C(=O)N(C5=CC=CC=C4S4)N6C=CC(=C6)N7CCOCC7)C(=O)N3</chem>	531.67	532
 <chem>C1CCN1CCNC(=O)C2=C(N3C(=O)N(C4=CC=CC=C4S3)N5C=CC(=C5)N6CCOCC6)C(=O)N2N7CCCCC7</chem>	505.63	506
 <chem>C1CCN1CCNC(=O)C2=C(N3C(=O)N(C4=CC=CC=C4S3)N5C=CC(=C5)N6CCOCC6)C(=O)N2N7CCCC7</chem>	491.61	492

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <chem>C1CCN1CCNC(=O)c2c(=O)c3c(c2)nc4c3c5ccccc5n4C6=CC=CC=C6N7CCOCC7</chem>	477.58	478
 <chem>CCOCCNC(=O)c2c(=O)c3c(c2)nc4c3c5ccccc5n4C6=CC=C(F)C=C6N7CCOCC7</chem>	442.46	443
 <chem>CCOCCNC(=O)c2c(=O)c3c(c2)nc4c3c5ccccc5n4C6=CC=CC=C6N7CCOCC7</chem>	424.47	425
 <chem>CCOCCNC(=O)c2c(=O)c3c(c2)nc4c3c5ccccc5n4C6=CC=CC=C6N(C)C7=CN=CN=C7</chem>	460.51	461
 <chem>CC(C)COCCNC(=O)c2c(=O)c3c(c2)nc4c3c5ccccc5n4C6=CC=C(F)C=C6N7CCOCC7</chem>	456.49	457

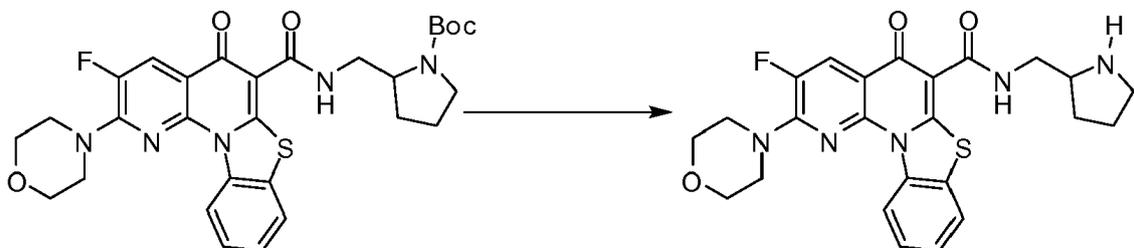
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	437.51	438
	463.58	464

Ejemplo 32



- 5 A una solución del éster (1.00 g, 2.34 mmol), (1-metilpirrolidin-2-il)metanamina (1.20 g, 5.99 mmol) y DBU (1.80 ml, 12.06 mmol) en DCM (40 ml) AlCl_3 (650 mg, 4.87 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DCM (150 ml) y NaOH 1N (50 ml) y se agitó durante 15 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x100 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES):
- 10 m/z 582 [M+1]⁺.

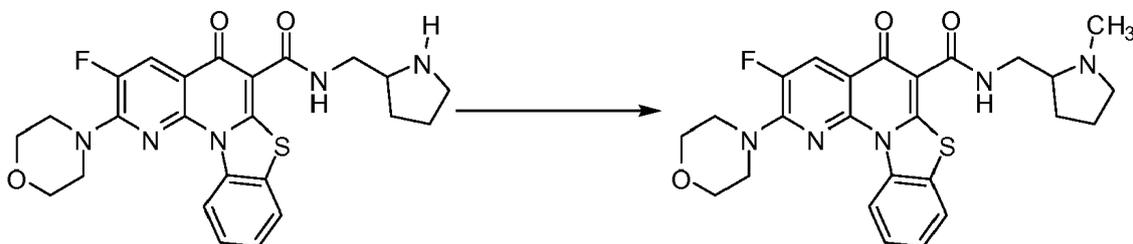
Ejemplo 33



- 15 A una solución de Boc-amina (321 mg, 0.55 mmol) en DCM (3.0 ml) se añadió HCl (3.0 ml, 4 M en dioxano) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se diluyó con DCM (150 ml) y NaOH 6N (50 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para producir el producto deseado como un sólido blanco (250 mg, 94%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 10.63 (t, 1H), 9.44 (d, 1H), 8.33 (d, 1H), 7.77 (dd, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 3.91 (t, 4H), 3.86 (t, 4H), 3.61 (m,

1H), 3.43 (m, 2H), 3.03 (m, 1H), 2.94 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.52 (m, 1H). LCMS (ES): m/z 482 [M+1]⁺.

Ejemplo 34

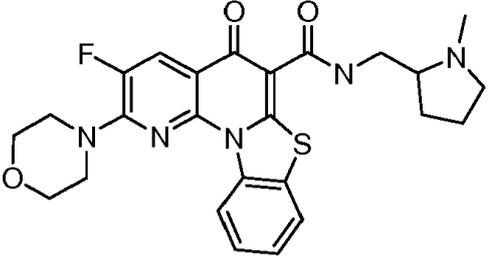
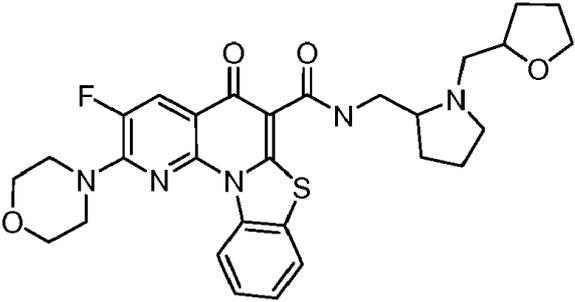
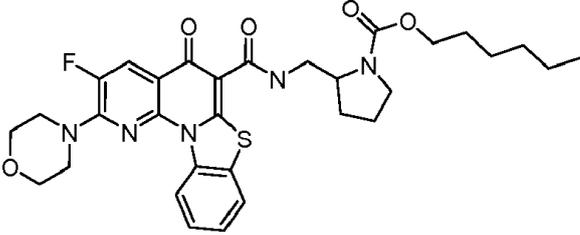
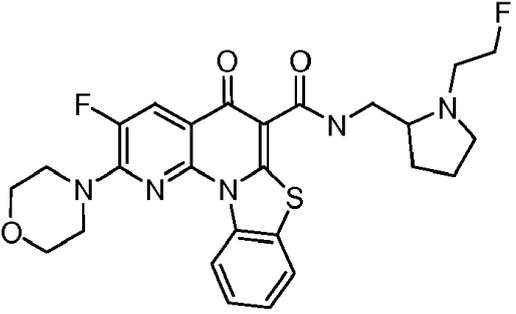
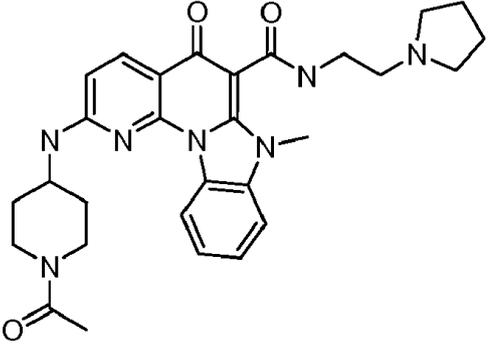


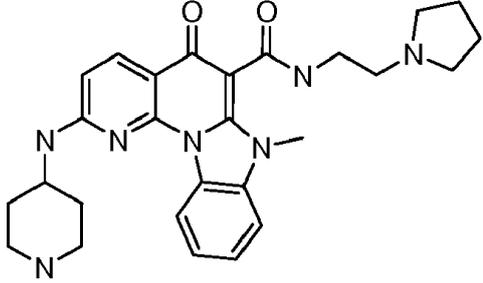
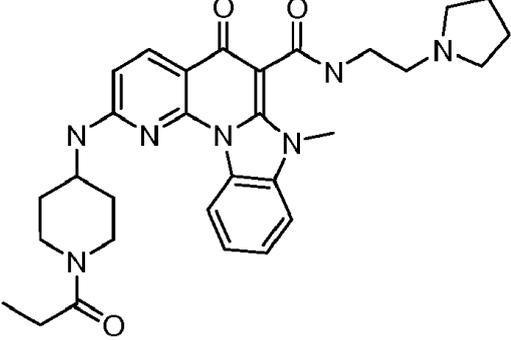
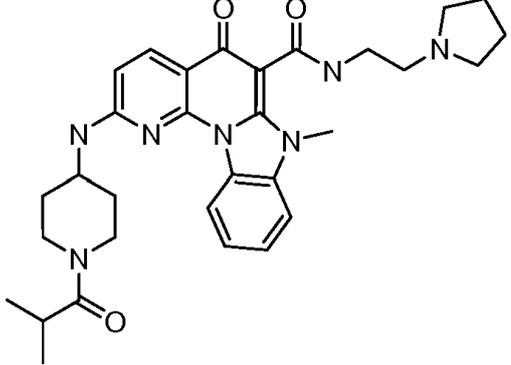
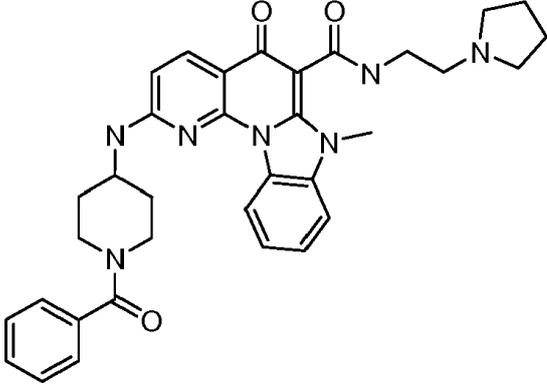
- 5 A una solución de amina (40 mg, 0,08 mmol) en DCM (5.0 ml) y TEA (0.05 ml) se añadió yodometano (0.05 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN. El producto bruto de reacción se purificó en TLC sobre gel de sílice (10% MeOH/DCM) para producir el producto deseado como un sólido blanco. LCMS (ES): m/z 496 [M+1]⁺.

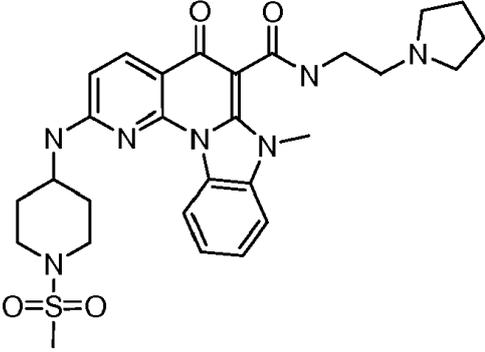
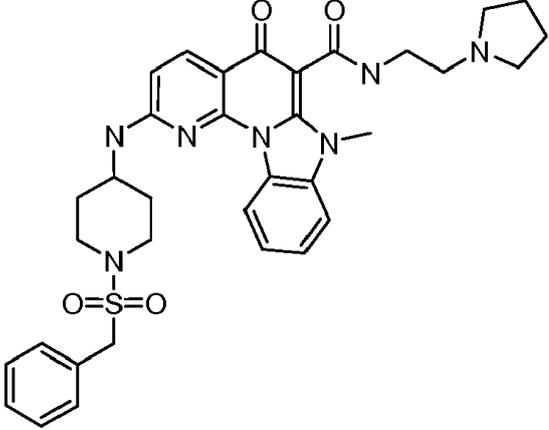
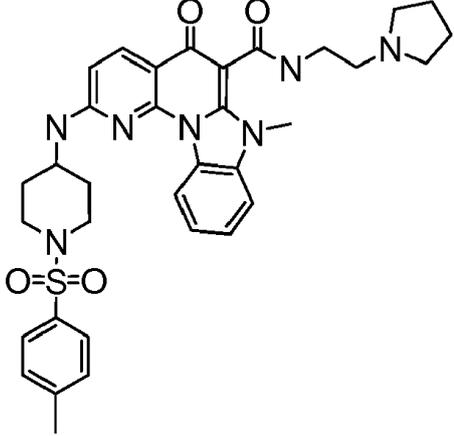
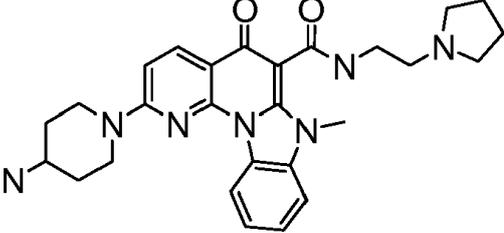
- 10 Los siguientes análogos en la Tabla 3 se prepararon por el mismo método, usando las aminoquinolonas y haluro de alquilo, haluro de acilo o anhídrido apropiados.

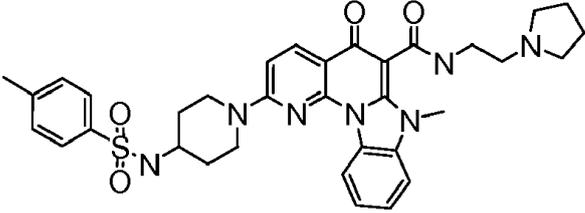
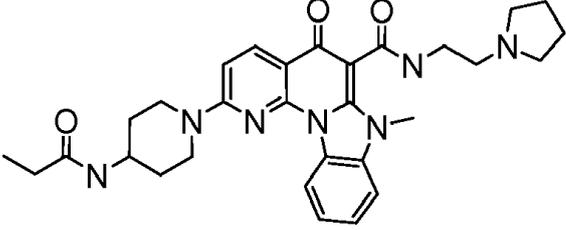
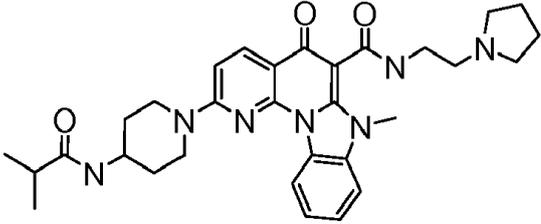
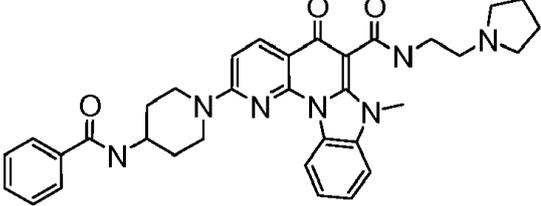
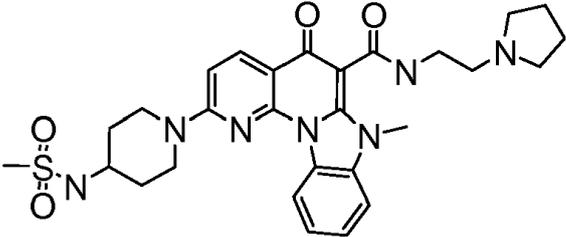
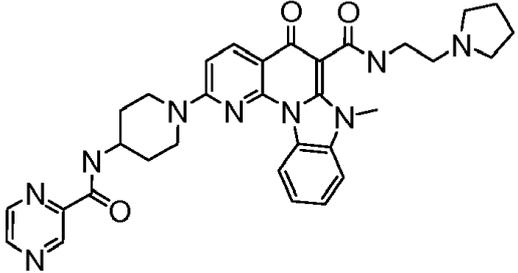
Tabla 3

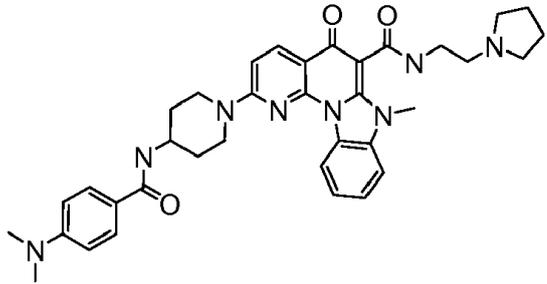
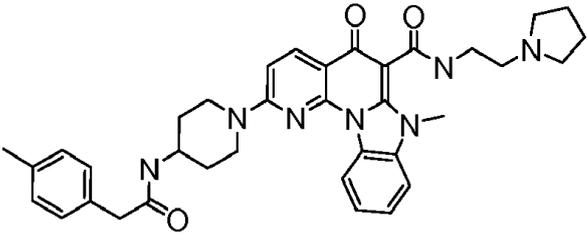
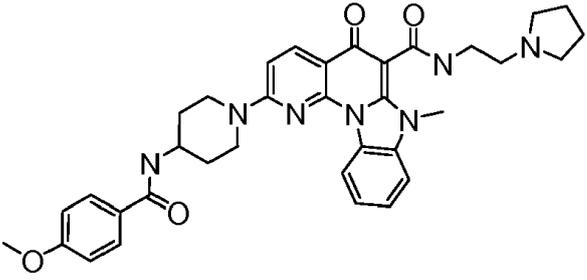
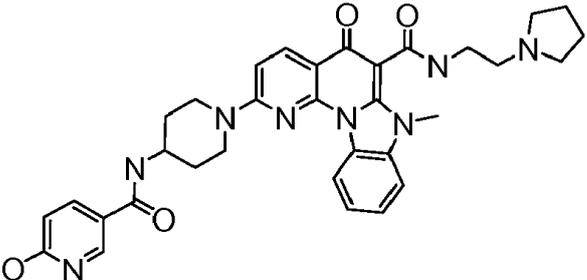
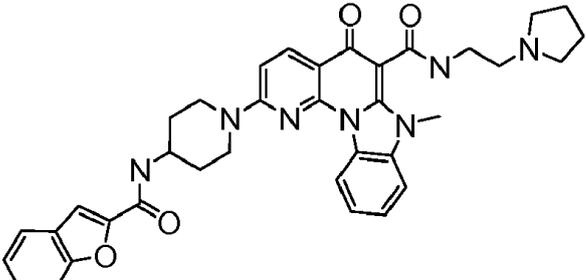
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	535.63	536
	549.62	550
	563.65	564

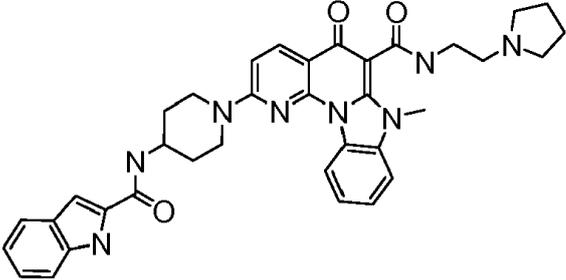
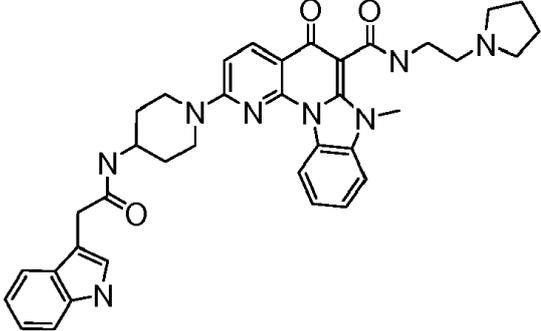
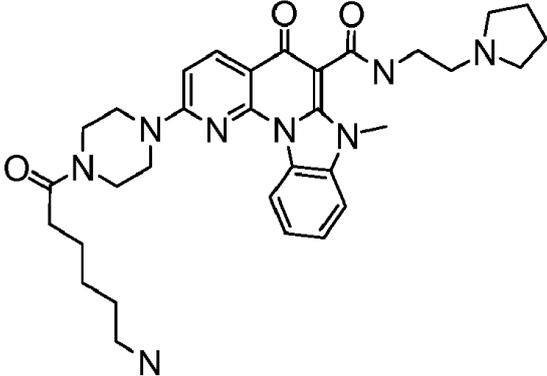
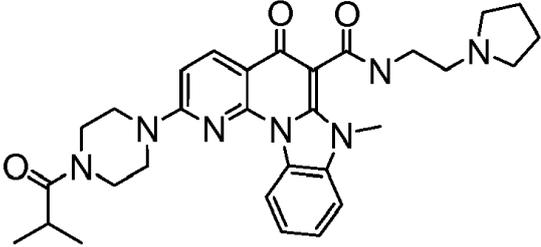
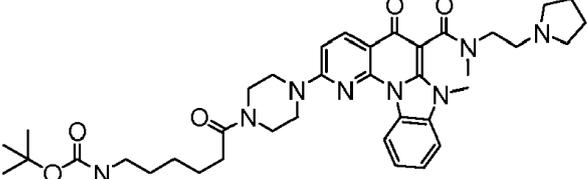
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	495.57	496
	565.66	566
	609.71	610
	527.59	528
	529.63	530

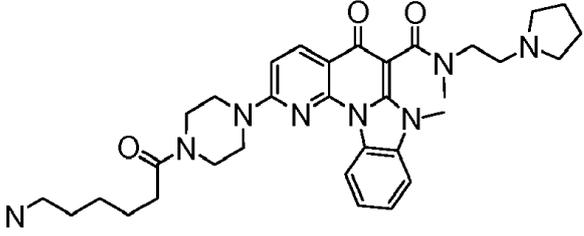
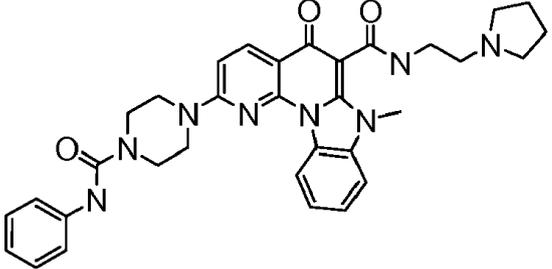
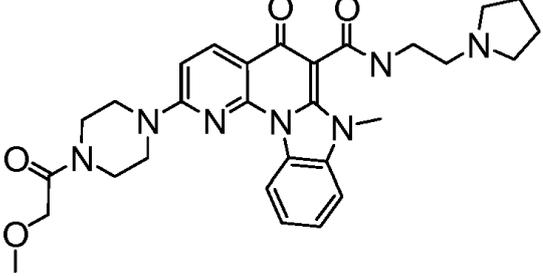
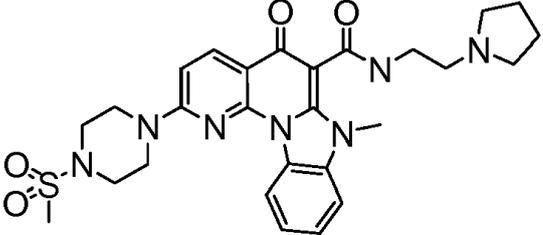
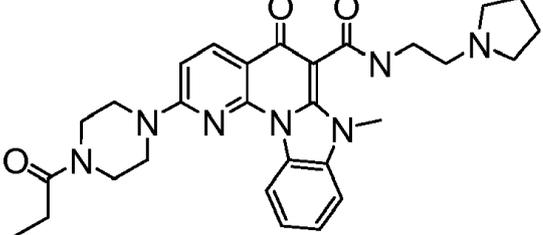
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	487.60	488
	543.66	544
	557.69	558
	591.70	592

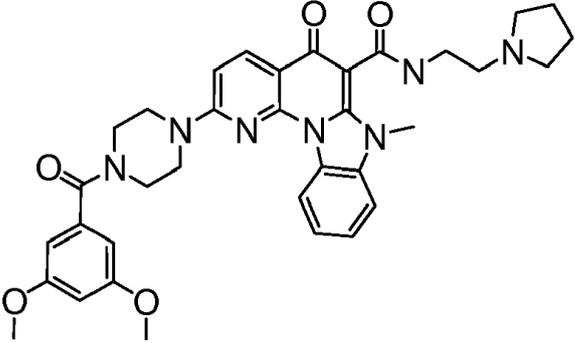
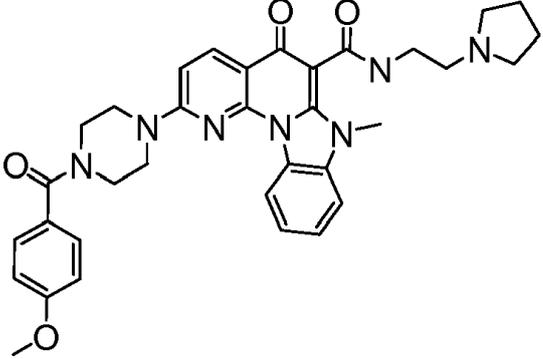
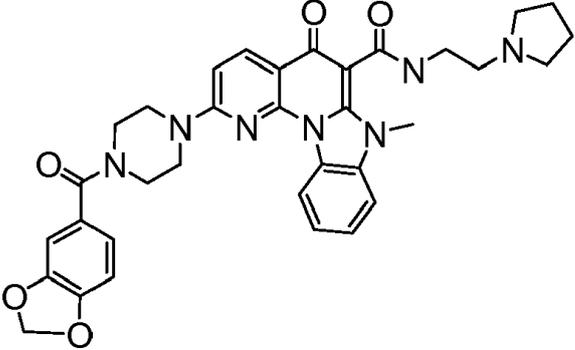
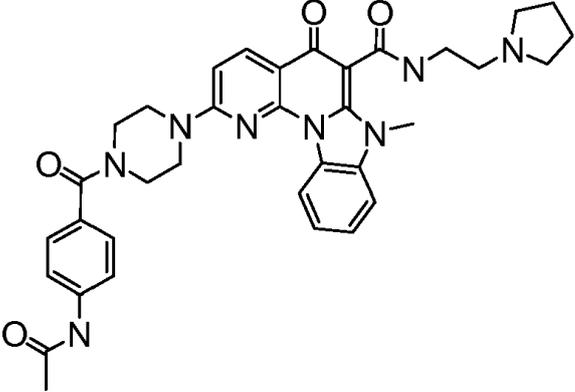
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	565.69	566
	641.78	642
	641.78	642
	487.60	488

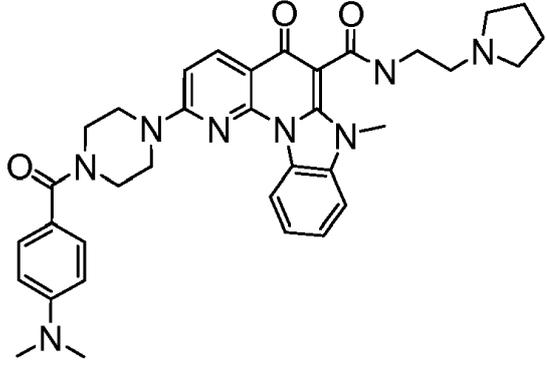
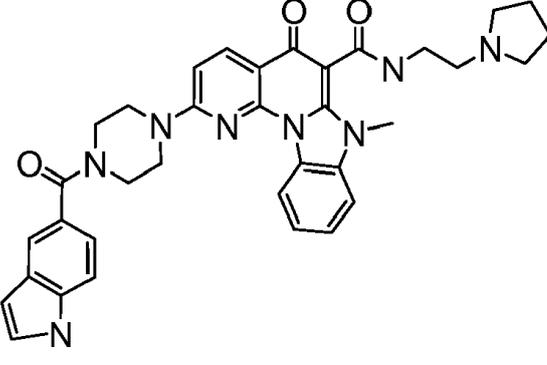
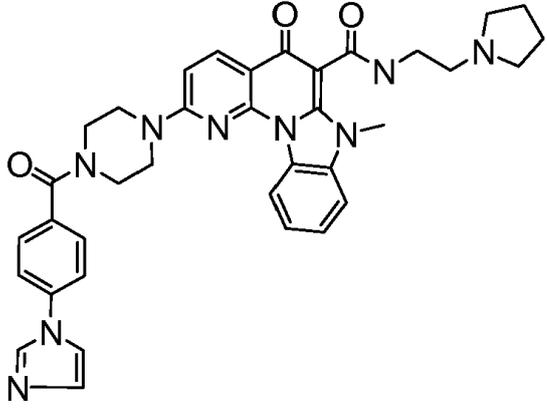
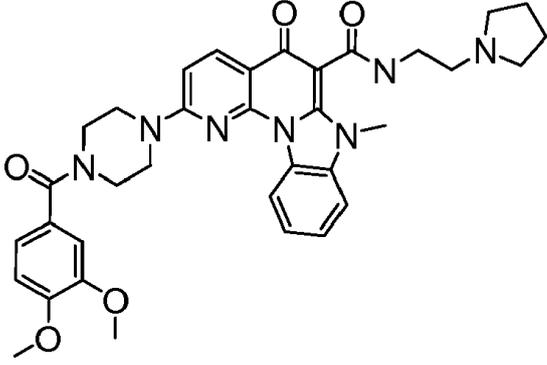
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	641.78	642
	543.66	544
	557.69	558
	591.70	592
	565.69	566
	593.68	594

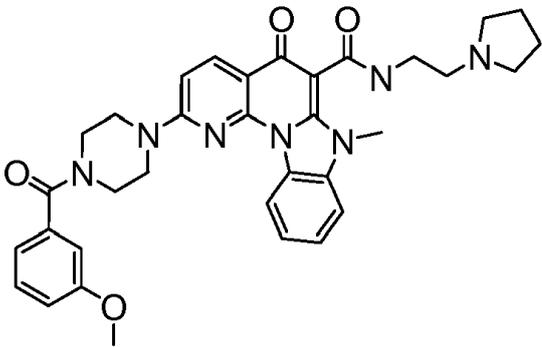
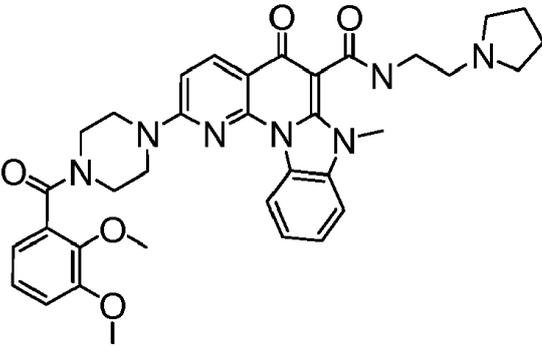
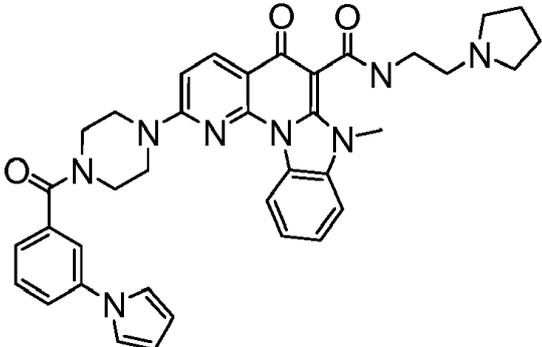
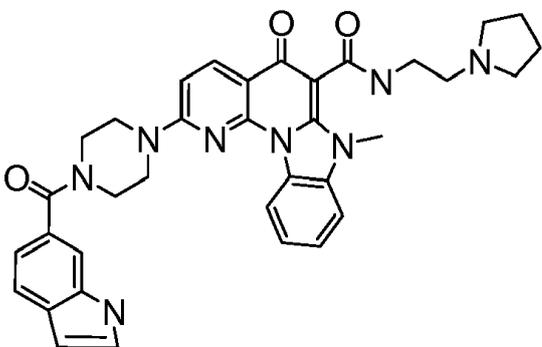
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	634.77	635
	619.76	620
	621.73	622
	608.69	609
	631.72	632

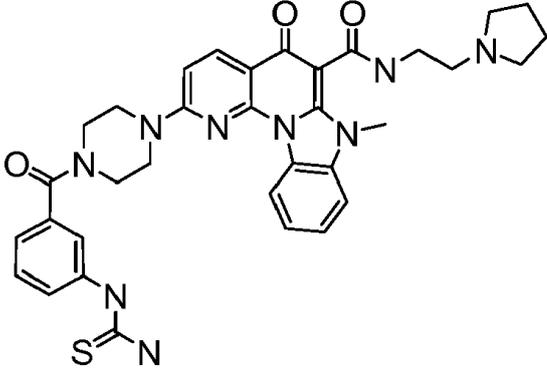
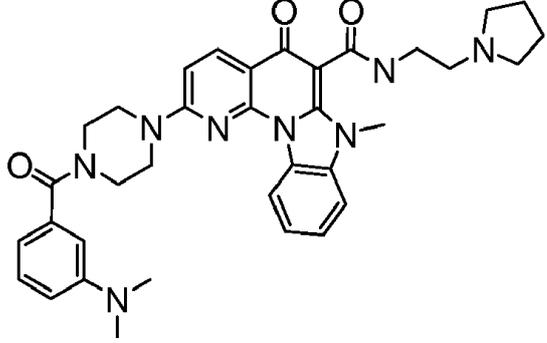
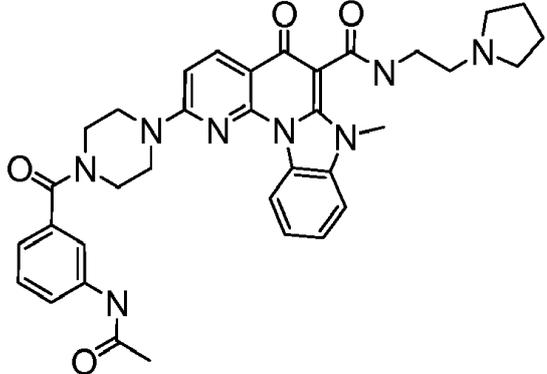
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	630.74	631
	644.77	645
	586.73	587
	543.66	544
	700.87	701

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	600.75	601
	592.69	593
	545.63	546
	551.66	552
	529.63	530

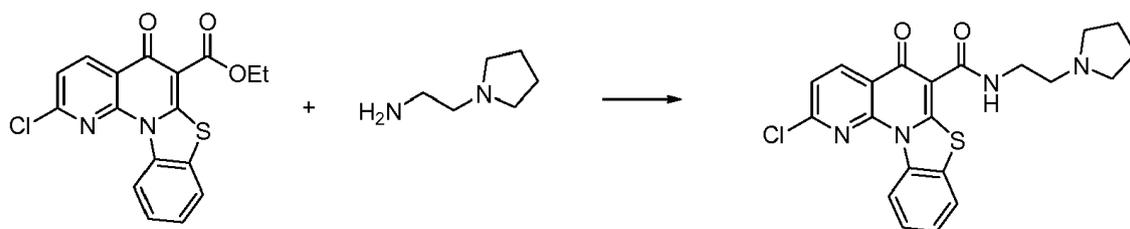
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	637.73	638
	607.70	608
	621.69	622
	634.73	635

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	620.74	621
	616.71	617
	643.74	644
	637.73	638

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	607.70	608
	637.73	638
	642.75	643
	616.71	617

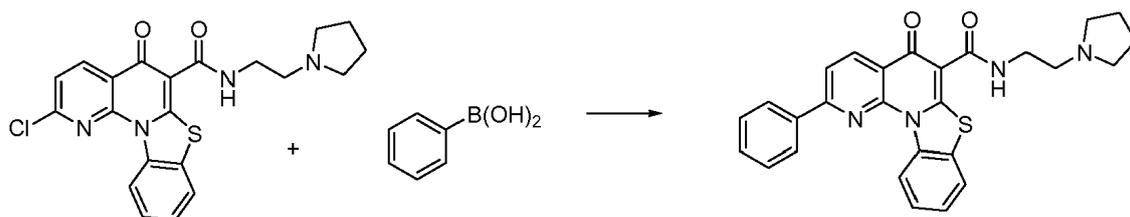
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	651.78	652
	620.74	621
	634.73	635

Ejemplo 35



5 La cloroamida deseada se sintetizó con un rendimiento del 72% usando el procedimiento usando condiciones de cloruro de aluminio usando cloroéster y amina. LCMS (ES): 95% puro, m/z 427 [M+1]⁺.

Ejemplo 36

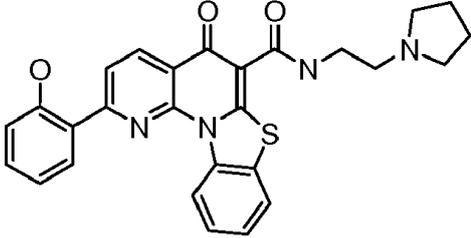
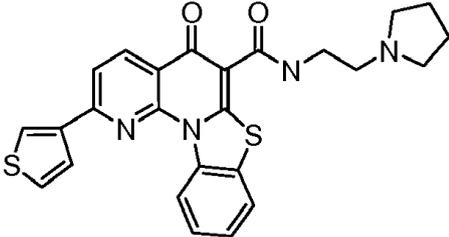
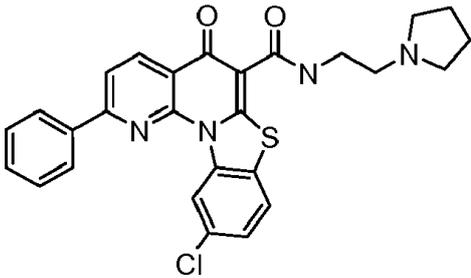
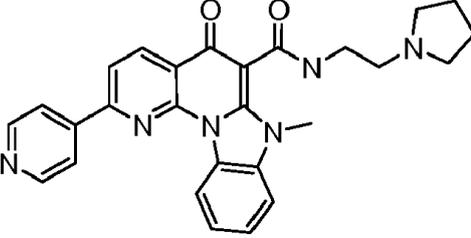
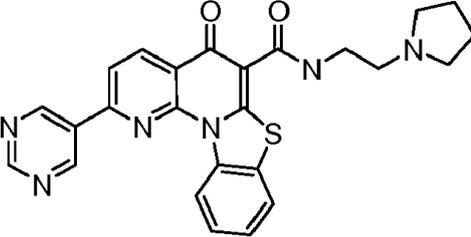


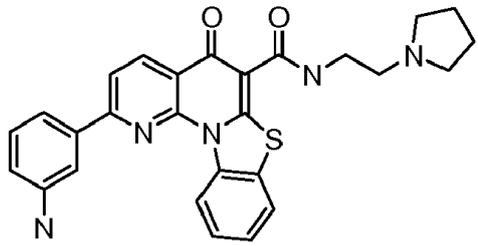
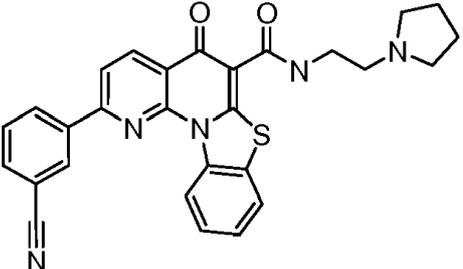
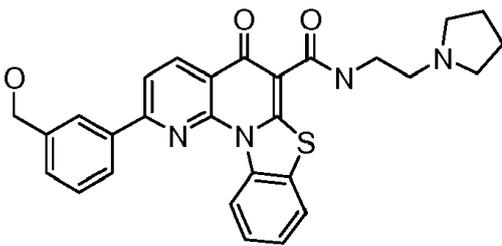
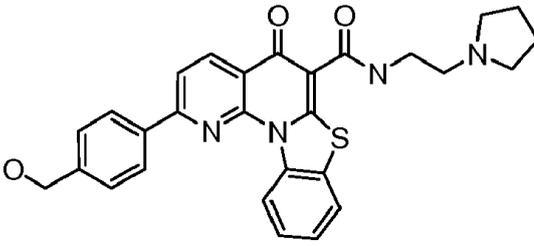
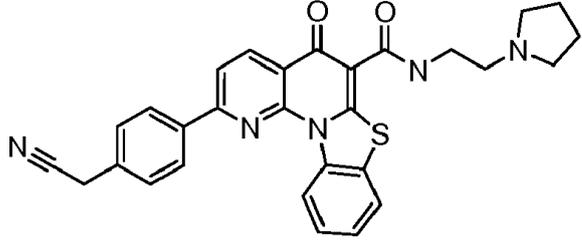
5 La cloroamida (1.0 eq, 100 mg, 0.23 mmol) y el ácido bencenoborónico (2.0 eq, 57 mg, 0.47 mmol) se mezclaron con acetato de sodio (3.0 eq, 58 mg, 0.70 mmol) en DMF (1 ml). Después de agregar PdCl₂(dppf) (0.1 eq, 19 mg, 0.02 mmol), la mezcla se calentó en microondas a 100°C durante 5 min. La solución se filtró a través de CELITE™ y el material se precipitó mediante la adición de acetato de etilo y hexanos. Después de la purificación por HPLC preparativa, el producto deseado se aisló como un sólido marrón (51 mg, 47% de rendimiento). LCMS (ES): 95% puro, m/z 469 [M+1]⁺.

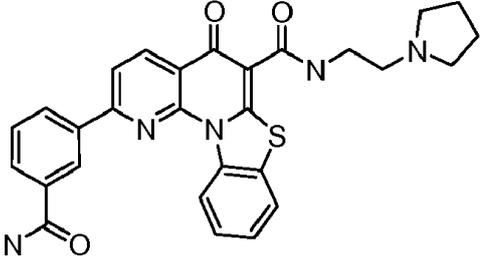
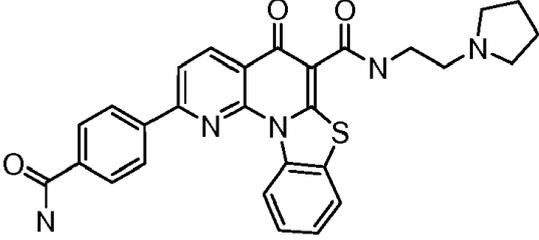
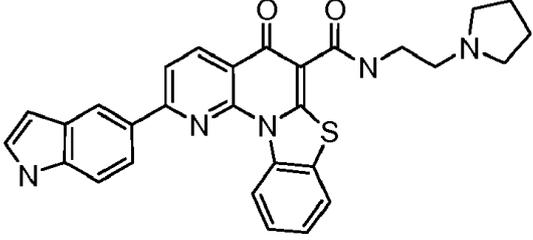
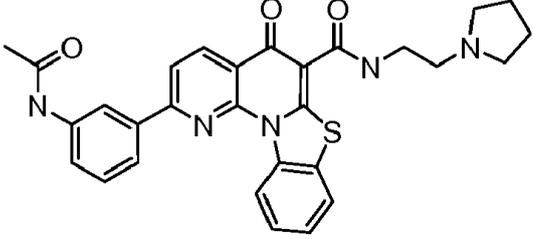
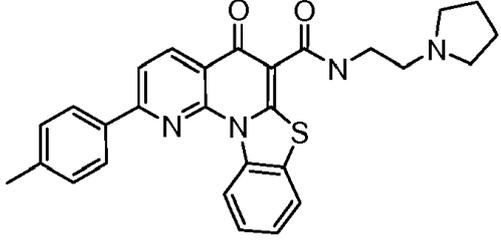
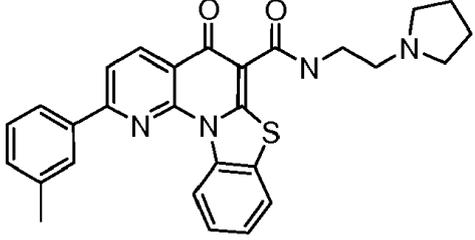
Los siguientes análogos en la Tabla 4 se prepararon por el mismo método, usando la cloroamida y ácido borónico apropiados.

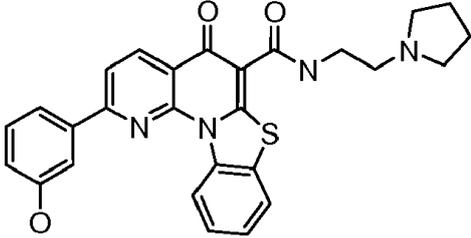
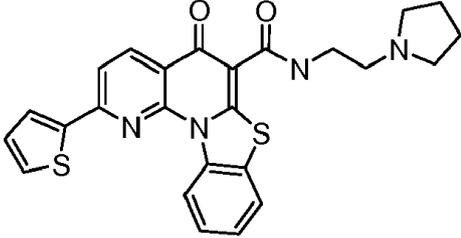
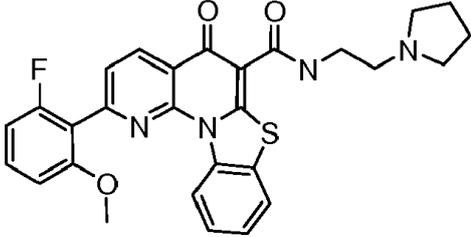
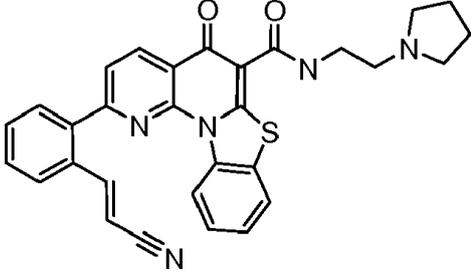
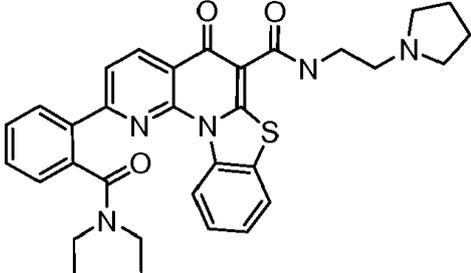
Tabla 4

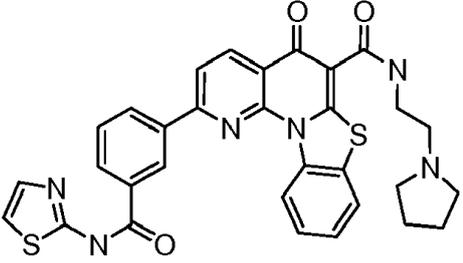
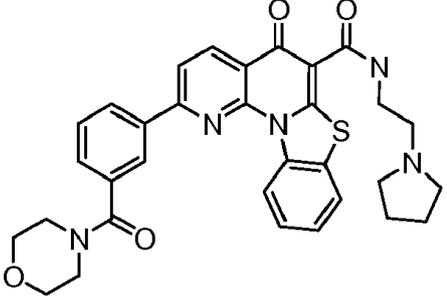
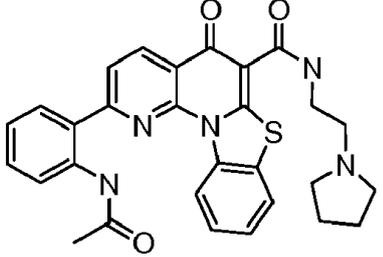
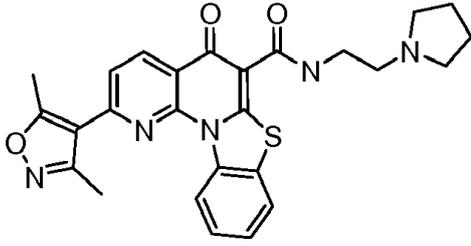
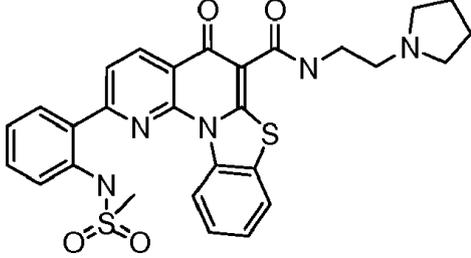
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	469.56	470
	468.57	469
	482.60	483
	484.57	485

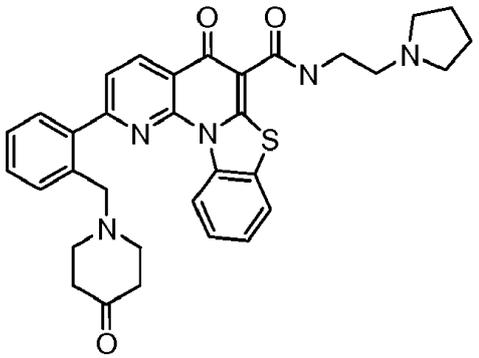
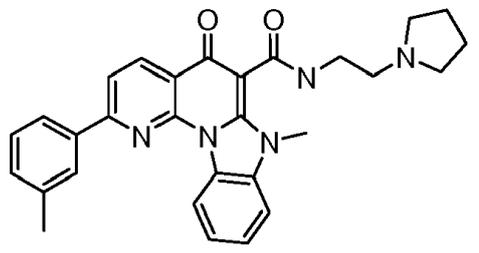
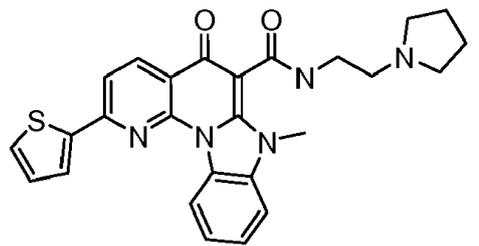
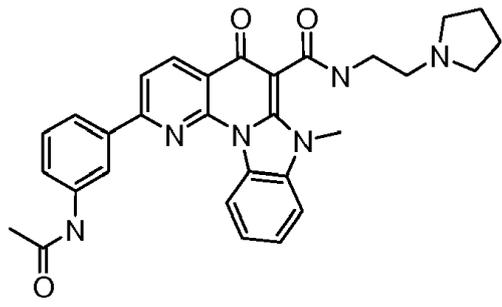
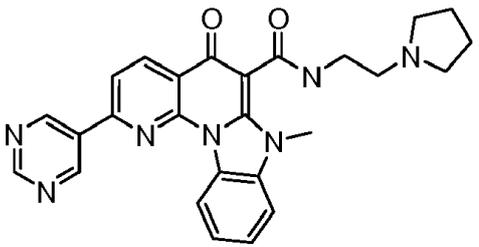
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	484.57	485
	474.60	475
	503.02	503
	466.53	467
	470.55	471

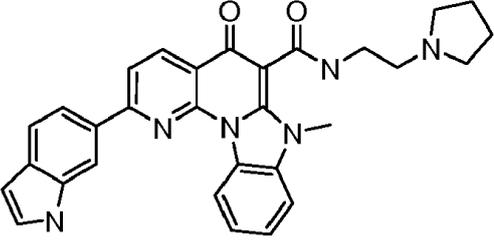
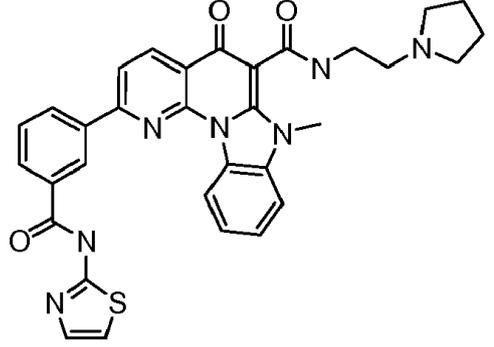
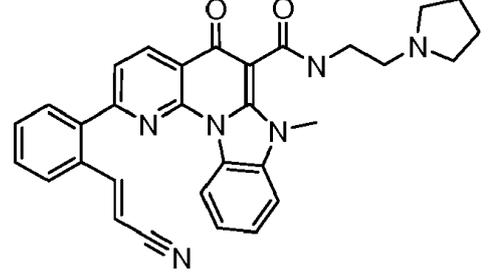
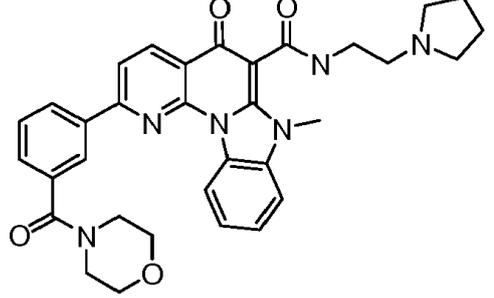
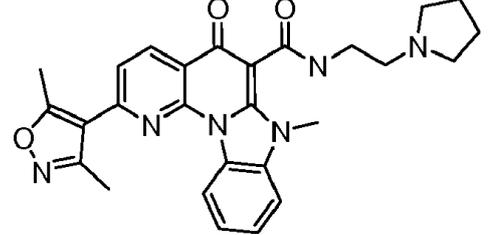
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	483.58	484
	493.58	494
	498.60	499
	498.60	499
	507.61	508

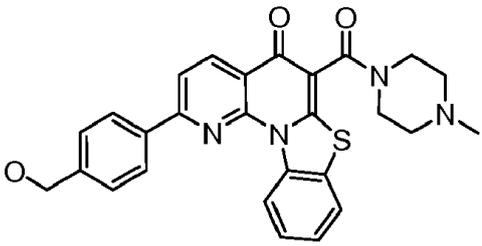
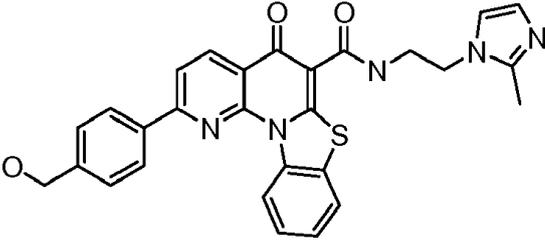
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	511.59	512
	511.59	512
	507.61	508
	525.62	526
	482.60	483
	482.60	483

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	484.57	485
	474.60	475
	516.59	517
	519.62	520
	567.70	568

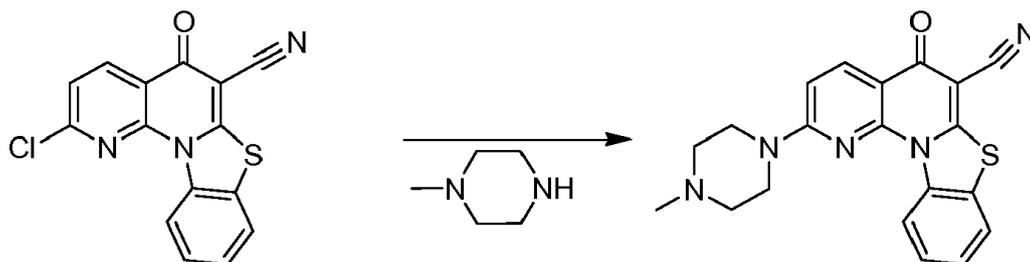
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	594.71	595
	581.68	582
	525.62	526
	487.57	488
	561.68	562

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	579.71	580
	479.57	480
	471.57	472
	522.60	523
	467.52	468

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	504.58	505
	591.68	592
	516.59	517
	578.66	579
	484.55	485

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	484.57	485
	509.58	510

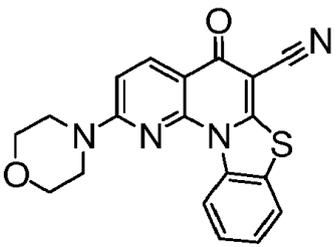
Ejemplo 37

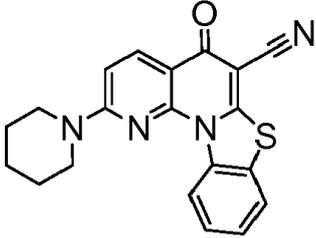
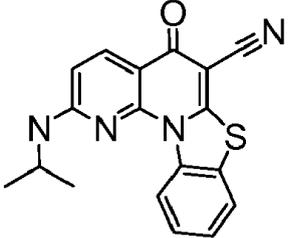
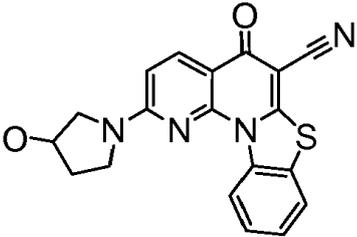
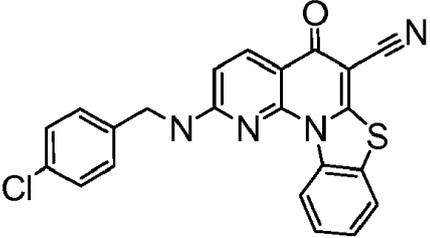
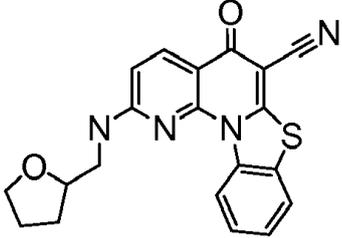
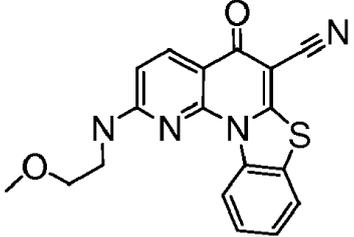


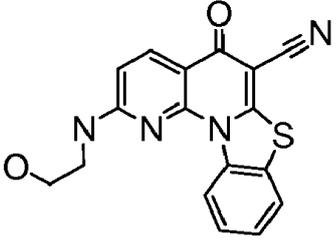
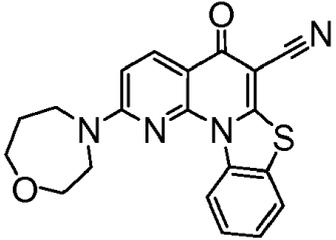
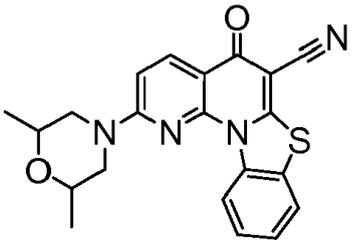
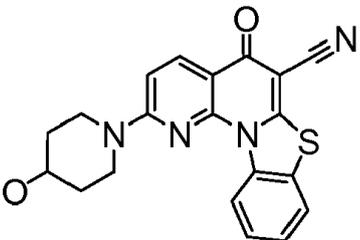
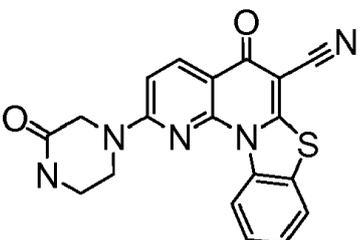
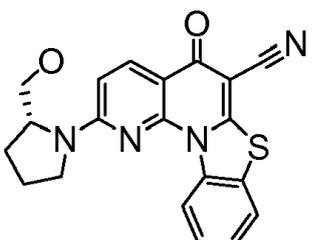
5 Una solución de cloruro (40 mg, 0.13 mmol) y 1-metilpiperazina (0.10 ml) en ACN (1.0 ml) se calentó a 120°C durante 10 minutos en microondas. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con ACN y luego EtOAc para producir el producto deseado como un sólido. LCMS (ES): m/z 376 [M+1]⁺.

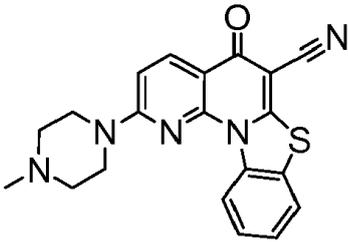
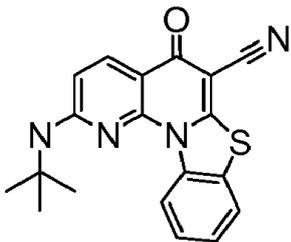
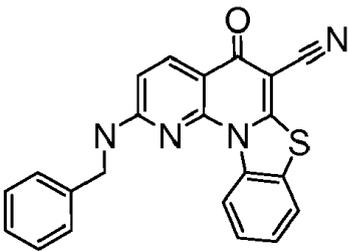
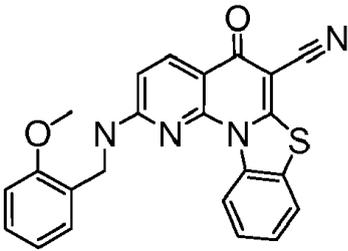
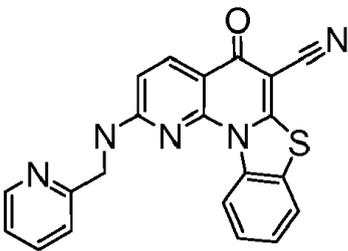
Los siguientes análogos en la Tabla 5 se prepararon por el mismo método, usando las cloroquinolonas y aminas apropiadas.

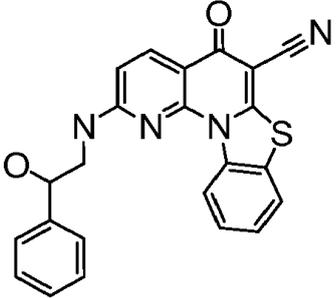
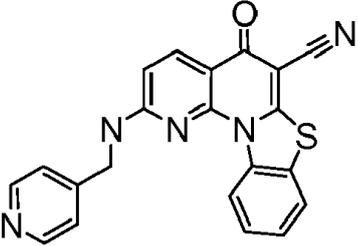
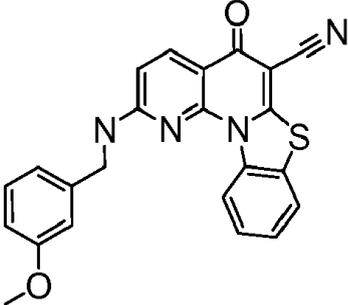
Tabla 5

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	362.41	363

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	360.43	361
	334.39	335
	362.41	363
	416.88	417
	376.43	377
	350.39	351

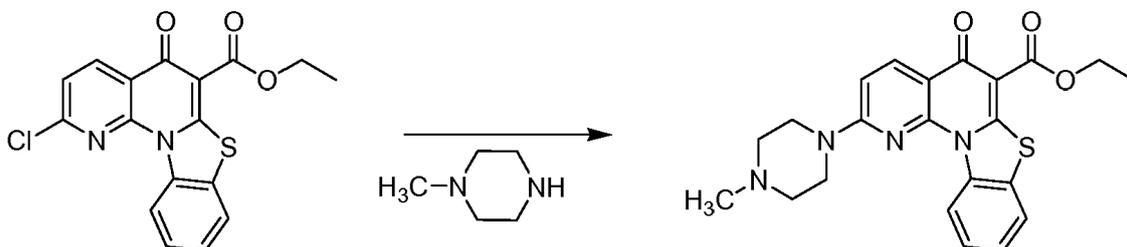
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	336.37	337
	376.43	377
	390.46	391
	376.43	377
	375.43	376
	376.43	377

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
 <chem>C1CCN(C1)c2cc3c(nc2C#N)sc3c4ccccc4</chem>	375.45	376
 <chem>CC(C)(C)Nc1cc2c(nc1C#N)sc2c3ccccc3</chem>	348.42	349
 <chem>c1ccc(cc1)Nc2cc3c(nc2C#N)sc3c4ccccc4</chem>	382.44	383
 <chem>COc1ccccc1CNc2cc3c(nc2C#N)sc3c4ccccc4</chem>	412.46	413
 <chem>c1ccc2c(nc1C#N)sc2c3ccncc3</chem>	383.43	384

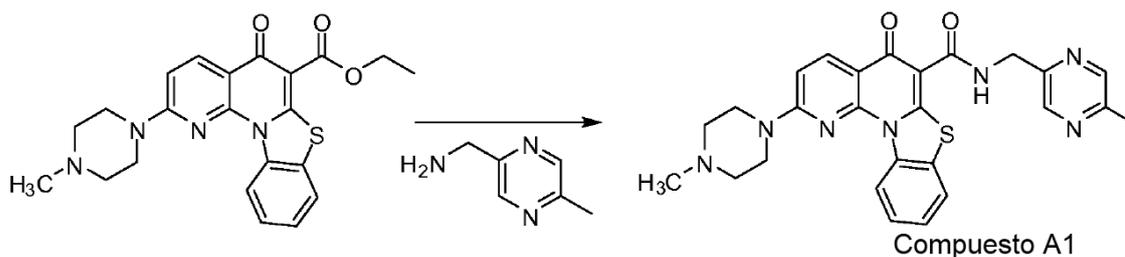
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	412.46	413
	383.43	384
	412.46	413

Ejemplo 38

Síntesis del Compuesto A1



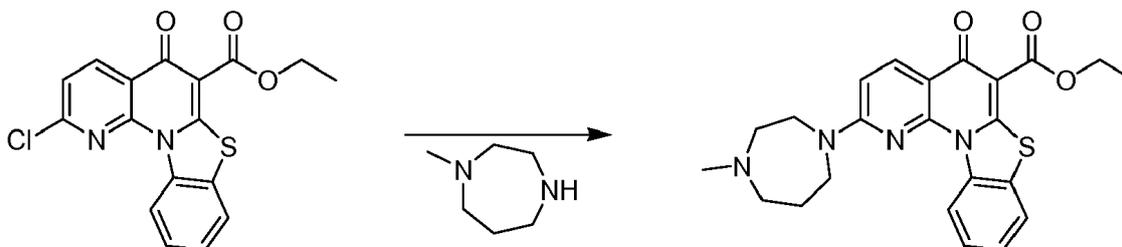
- 5 A una suspensión del cloroéster (5.00 g, 13.94 mmol) en CH_3CN (50 ml) se añadió N-metilpiperazina (3.10 ml, 27.95 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se recogió por filtración para producir el producto deseado como un sólido de color bronce (4.7 g, 80%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 9.47 (d, 1H), 8.62 (d, 1H), 7.74 (dd, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 6.89 (d, 1H), 4.50 (q, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.62 (t, 4H), 2.40 (s, 3H), 1.49 (t, 3H). LCMS (ES): m/z 423 [M+1]⁺.



5 A una solución de éster (72 mg, 0.17 mmol), (5-metilpirazin-2-il)metanamina (0.10 ml, 0.81 mmol) y DBU (0.20 ml, 1.34 mmol) en DCM (10 ml) se añadió AlCl_3 (80 mg, 0.60 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y $\text{NaOH}_{3\text{N}}$ (25 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x50 ml), salmuera (50 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (60 mg, 71%). LCMS (ES): m/z 500 $[\text{M}+1]^+$.

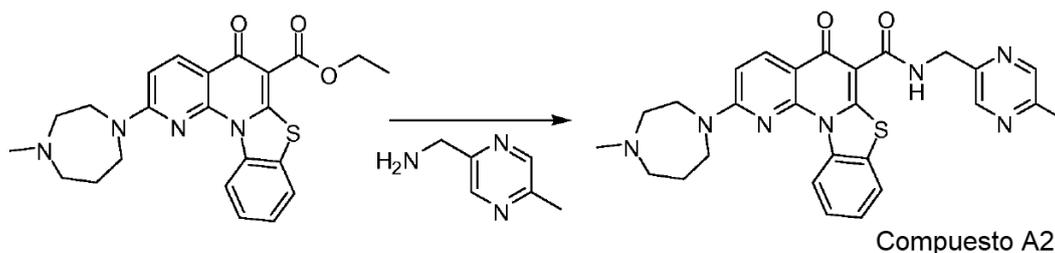
Ejemplo 39

Síntesis del Compuesto A2



10

Se añadió N-metilhomopiperazina (1.34 ml, 10 mmol) y trietilamina (1.49 ml, 10 mmol) a una suspensión del cloroéster (3.51 g, 9.7 mmol) en CH_3CN (50 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se recogió por filtración para producir el producto deseado como un sólido de color bronce (2.85 g). LCMS (ES): m/z 437 $[\text{M}+1]^+$.

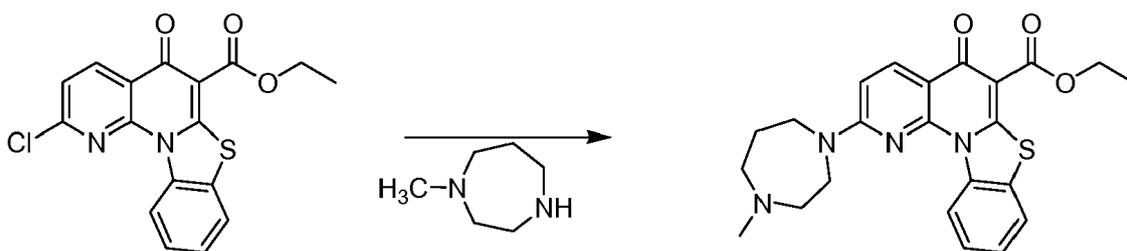


15

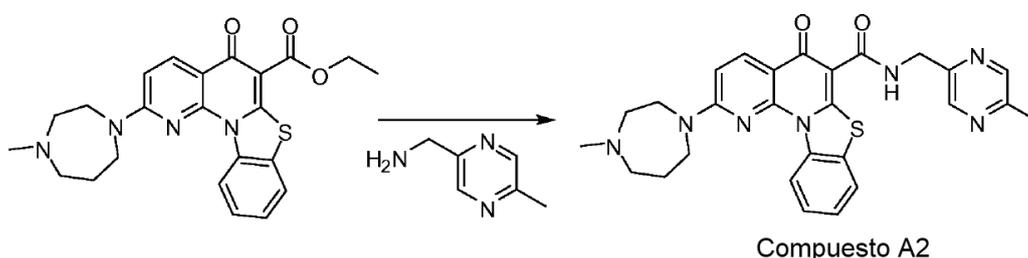
20 A una solución del éster (2.85 mg, 6.53 mmol), (5-metilpirazin-2-il)metanamina (2.45 ml) y DBU (2.93 ml) en DCM (100 ml) se añadió AlCl_3 (2.67 g). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y NaOH 4N (100 ml) y se agitó durante 15 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x100 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituró en ACN para dar el producto deseado como un sólido blanco (1.98 g). LCMS (ES): m/z 514 $[\text{M}+1]^+$.

Ejemplo 40

Síntesis a gran escala del Compuesto A2



5 A una suspensión del cloroéster (20.0 g, 55.90 mmol) en ACN (300 ml) se añadió N-metilhomopiperazina (13.9 ml, 111.70 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se recogió por filtración. El sólido resultante se disolvió en CHCl_3 (500 ml) y se filtró a través de CELITE™. El disolvente se eliminó a presión reducida para producir el producto deseado como un sólido (16.07 g, 66%). LCMS (ES): m/z 437 $[\text{M}+1]^+$.

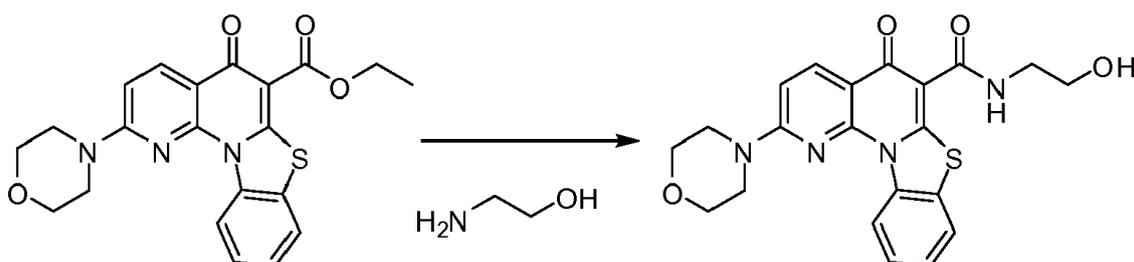


10 A una solución del éster (2.24 g, 5.15 mmol), se añadió AlCl_3 2-(aminometil)-5-metilpirazina (1.27 g, 10.32 mmol) y DBU (2.3 ml, 15.38 mmol) en DCM (50 ml) (2.05 g, 15.39 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se diluyó con DCM (200 ml) y NaOH 3N (50 ml) y se agitó durante 10 minutos. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H_2O (2x100 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido resultante se trituroó en ACN para dar el producto deseado (1.80 g) como un sólido amarillo pálido. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 11.28 (t, 1H), 9.52 (d, 1H), 8.57 (m, 2H), 8.45 (d, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.78 (d, 1H), 4.86 (d, 2H), 3.90 (br, 4H), 2.86 (m, 2H), 2.65 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.15 (m, 2H). LCMS (ES): m/z 485 $[\text{M}+1]^+$. LCMS (ES): m/z 514 $[\text{M}+1]^+$.

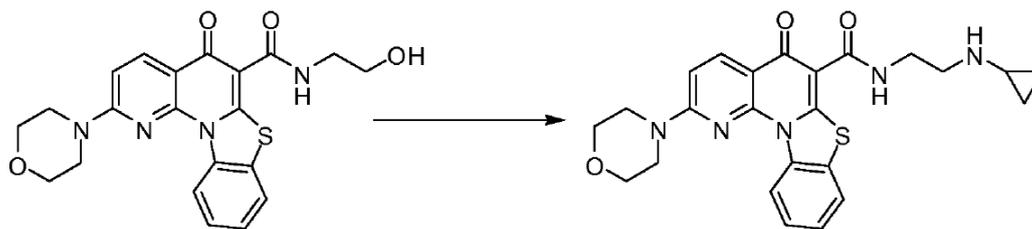
15

Ejemplo 41

Síntesis del Compuesto A3



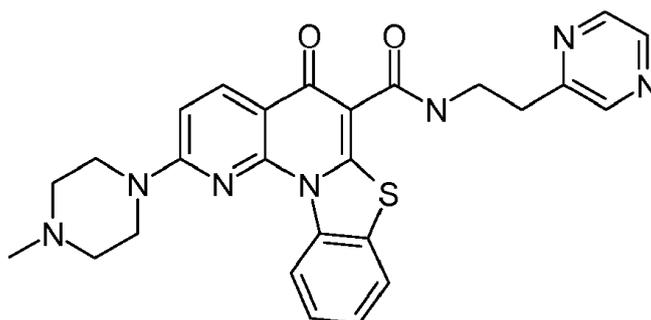
20 Una solución de éster (6.53 g, 15.97 mmol) en etanolamina (30 ml) se agitó a 150°C durante la noche. La reacción se diluyó con H_2O (100 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración. El sólido se lavó con H_2O (2x) y ACN (2x) para producir el producto deseado como un sólido blanco (5.75 g, 85%). ^1H RMN (DMSO-d_6) δ : 10.57 (t, 1H), 9.32 (d, 1H), 8.36 (d, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.18 (d, 1H), 4.85 (t, 1H), 3.82 (t, 4H), 3.75 (t, 4H), 3.56 (q, 2H), 3.43 (q, 2H). LCMS (ES): m/z 425 $[\text{M}+1]^+$.



Compuesto A3

Se añadió MsCl (1.70 ml, 21.964 mmol) a una solución de alcohol (4.810 g, 11.343 mmol) y TEA (4.75 ml, 34.076 mmol) en DCM (125 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, se diluyó con DCM (200 ml) y solución saturada de NH₄Cl (50 ml). Las capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y la reacción en bruto se trituró en ACN para producir el mesilato. Una solución del mesilato anterior, ciclopropilamina (2.20 ml, 33.570 mmol), HCl (1N, 1.0 ml) y TEA (4.75 ml, 34.076 mmol) en ACN (100 ml) se calentó a reflujo durante la noche. El precipitado se recogió por filtración y se purificó en una columna de gel de sílice para producir la amina deseada como un sólido blanco (1.2 g). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 10.64 (t, 1H), 9.45 (d, 1H), 8.63 (d, 1H), 7.77 (dd, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 6.92 (d, 1H), 3.94 (t, 4H), 3.82 (t, 4H), 3.66 (q, 2H), 3.01 (t, 2H), 2.00 (m, 1H), 0.43 (m, 4H). LCMS (ES): m/z 464 [M+1]⁺

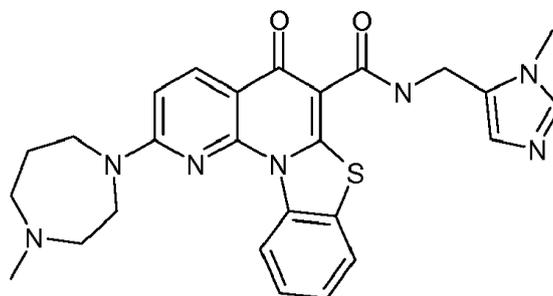
Ejemplo 42



El compuesto del Ejemplo 42 se preparó por el mismo método que el compuesto A1, usando el éster etílico de amina y quinolona apropiados.

15 MW 499.6; LCMS (ES): m/z 500 [M+1]⁺.

Ejemplo 43



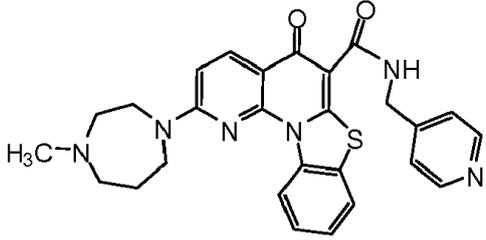
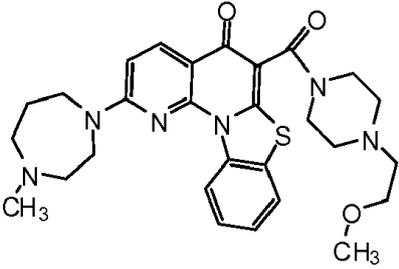
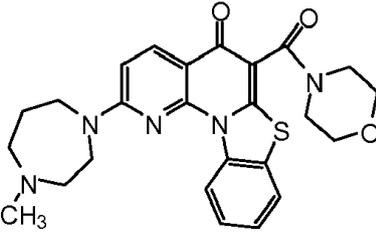
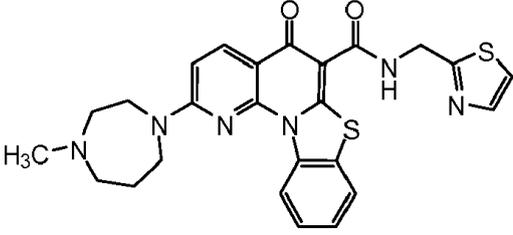
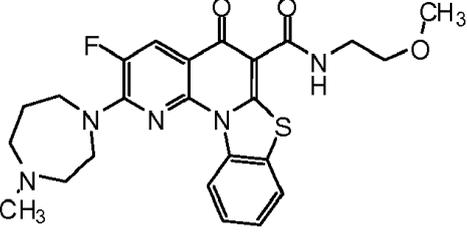
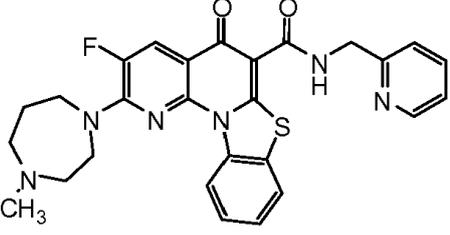
El compuesto del Ejemplo 43 se preparó por el mismo método que el compuesto A2, usando la amina y el éster etílico de quinolona apropiados.

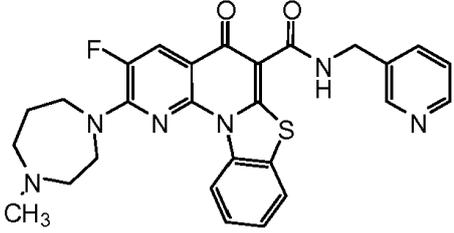
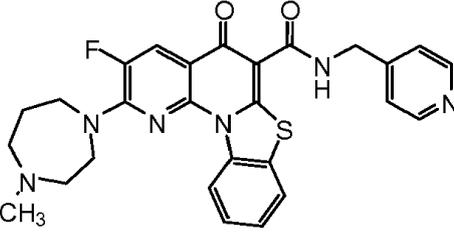
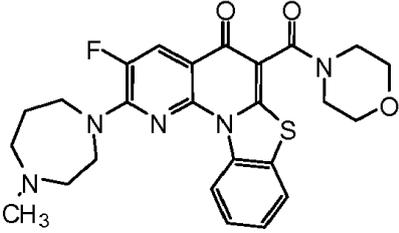
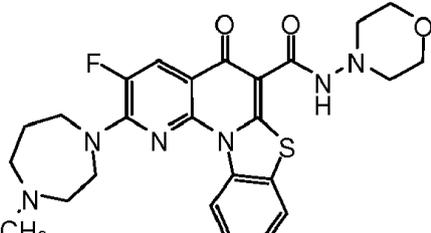
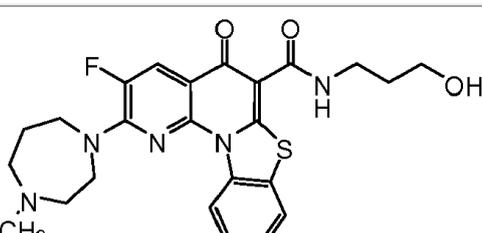
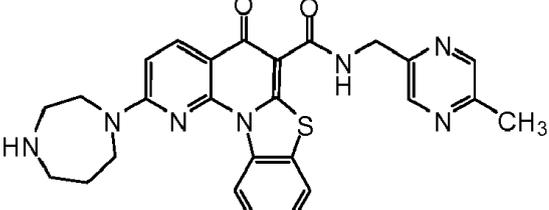
20 MW 501.61; LCMS (ES): m/z 502 [M+1]⁺.

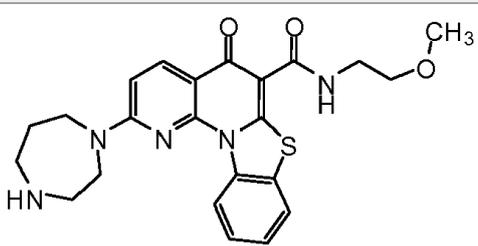
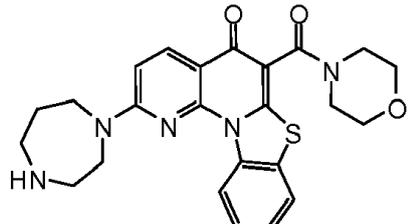
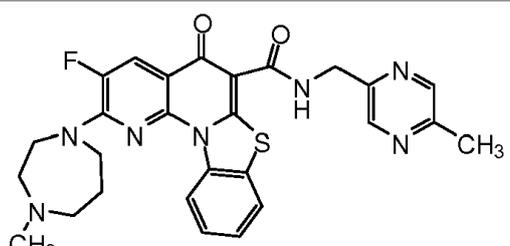
Los siguientes análogos en la Tabla 6 se prepararon por el mismo método, usando la amina y el éster etílico de quinolona apropiados.

Tabla 6

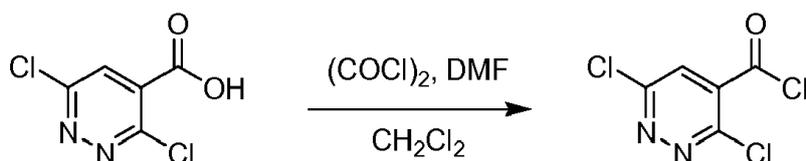
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	465.5	466.3
	573.6	574.2
	493.6	494.2
	541.6	542.2
	581.7	582.2
	527.6	528.2

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	498.6	499.1
	534.6	535.2
	477.5	478.1
	504.6	505.2
	483.6	484
	516.6	517

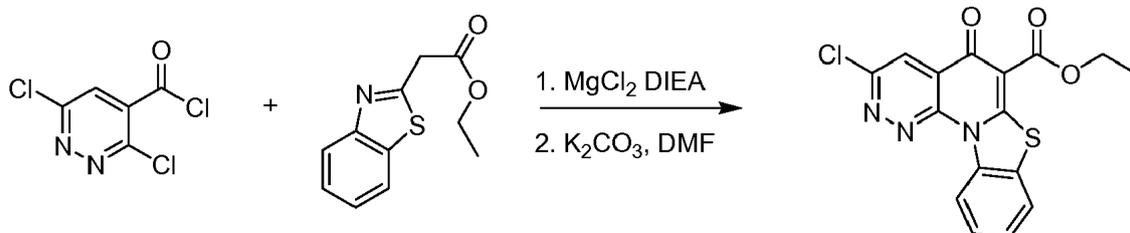
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	516.6	517
	516.6	517
	495.6	496
	510.6	511
	483.6	484
	499.6	500

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	451.5	452
	463.6	464
	531.6	532

Ejemplo 44

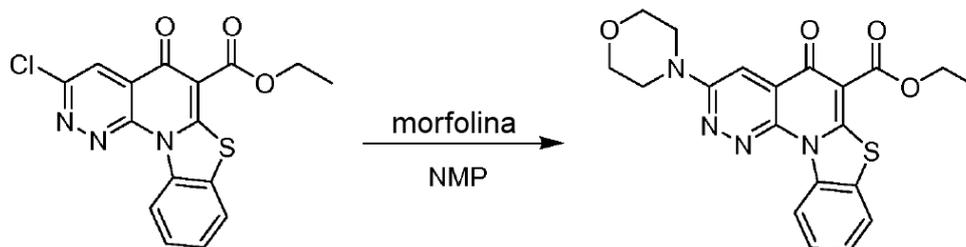


5 A una solución del ácido 3,6-dicloropiridazina-4-carboxílico (2.5 g, 12.9 mmol) en cloruro de metileno (25 ml) se añadió cloruro de oxalilo (14.2 mmol, 1.1 eq.) seguido de 2 gotas de DMF y la mezcla se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. Luego se eliminó el disolvente al vacío para proporcionar el cloruro de ácido bruto como un aceite que se usó sin purificación adicional (cuantitativa).

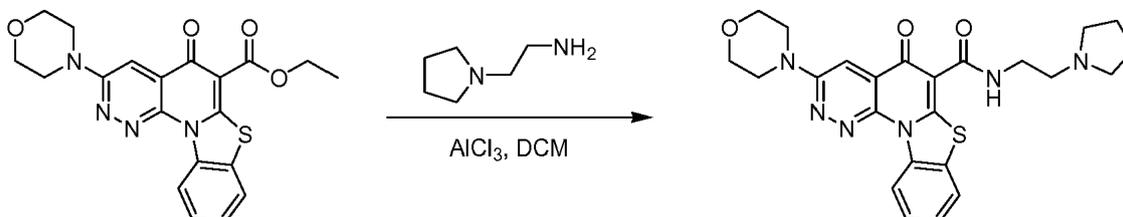


10 A una solución del éster de benzotiazol (2.53 g, 11.45 mmol) en acetonitrilo (25 ml) a 0°C se añadió cloruro de magnesio (1.63 g, 1.5 eq.) y la mezcla se agitó durante 5 minutos. A esta mezcla se añadió el cloruro de piridazina-4-carbonilo (2.36 g, 11.45 mmol), se disolvió en THF (5.0 ml) mediante un embudo de adición y la mezcla se agitó durante 5 minutos adicionales. Se añadió lentamente trietilamina (3.75 ml, 2.5 eq.) y se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó al vacío y se reemplazó con DMF (75 ml) y se añadió carbonato de potasio (3.16 g, 22.9 mmol) y la mezcla se calentó a 100°C durante 2 horas. Al enfriar, la mezcla se filtró y los sólidos resultantes se

agitaron en agua (20 ml), luego se filtraron, se lavaron con agua (20 ml), metanol (20 ml) y acetato de etilo (20 ml) y se secaron para proporcionar el éster de piridazinabenzotiazol como un sólido de color bronce (2.9 g, 8.08 mmol, 70%).



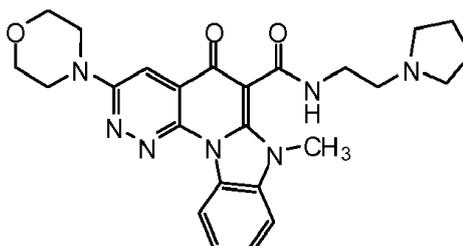
5 A una suspensión del éster de piridazinabenzotiazol (500 mg) en NMP seco (5 ml) se añadió morfolina (500 mg) y la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. La mezcla se enfrió luego a temperatura ambiente y se filtró, se lavó con acetonitrilo y se secó para proporcionar el compuesto de morfolino como un sólido de color bronce (505 mg).



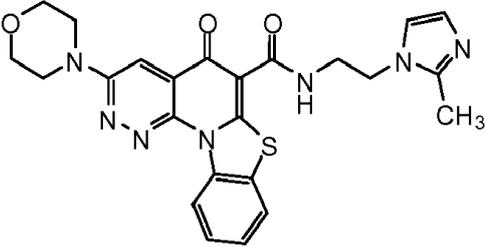
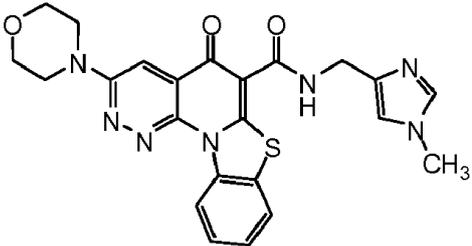
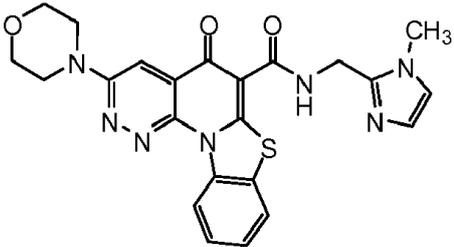
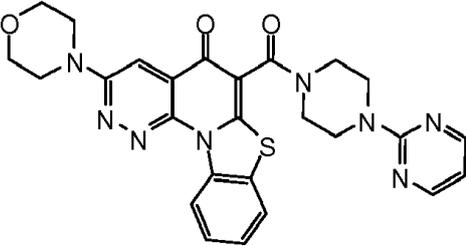
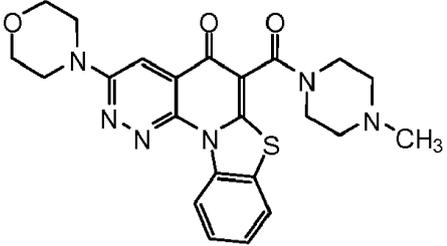
10 A una mezcla del éster de morfolinopiridazinabenzotiazol (100 mg) y 1-(2-aminoetil)pirrolidina (100 mg) en DCM (2 ml) se añadió cloruro de aluminio (100 mg) y la mezcla se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó al vacío y se añadió una solución saturada de ácido L-tartárico (5 ml) y se dejó en agitación durante 30 minutos. La solución se lavó con DCM (5 ml) y se basificó con NaOH 1N. El sólido se recogió por filtración y se disolvió en DCM (20 ml) y metanol (2 ml) y la solución se pasó sobre una almohadilla de alúmina. El disolvente se eliminó al vacío y el sólido resultante se trituró con metanol para proporcionar el compuesto final como un sólido amarillo.

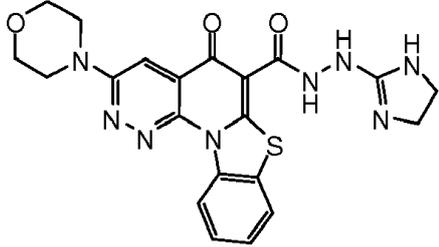
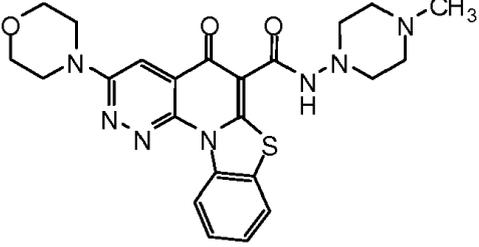
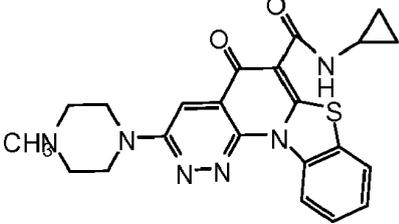
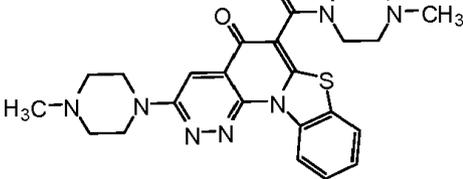
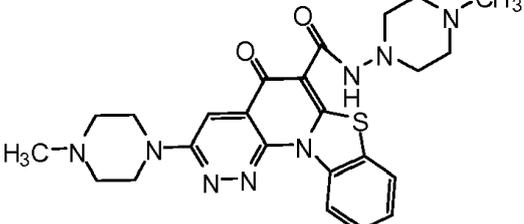
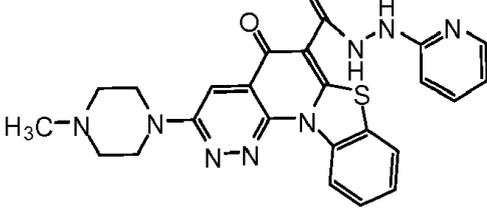
15 Los siguientes análogos en la Tabla 7 se prepararon por el mismo método, usando el éster apropiado de amina y piridazinabenzotiazol.

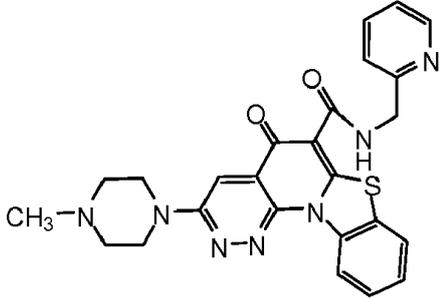
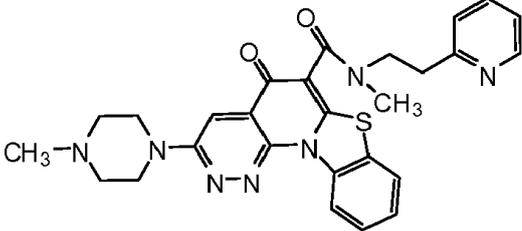
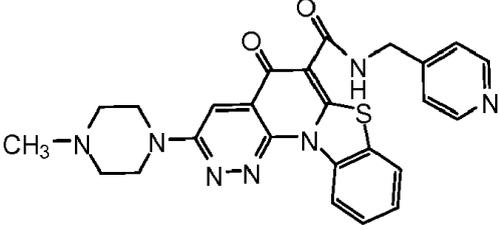
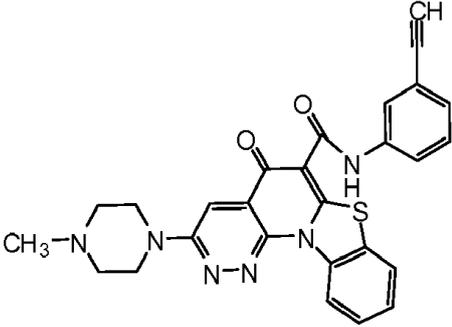
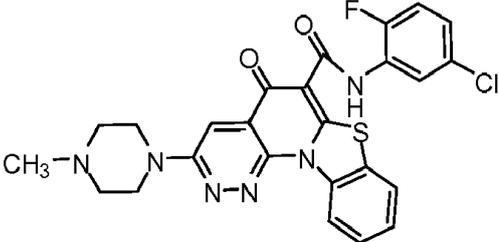
Tabla 7

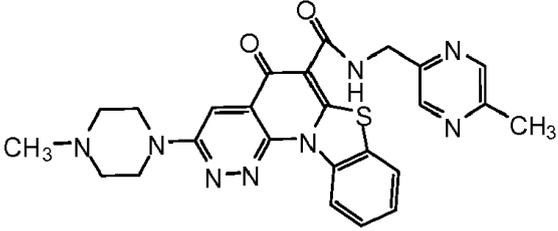
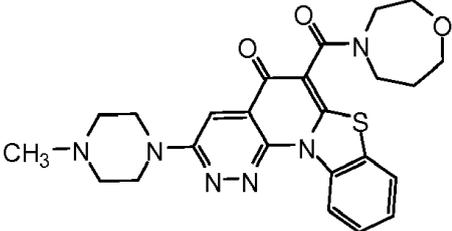
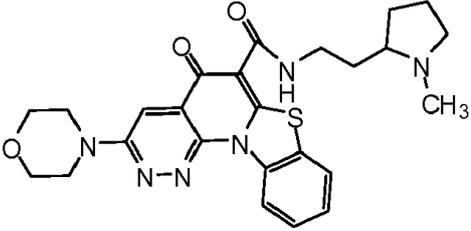
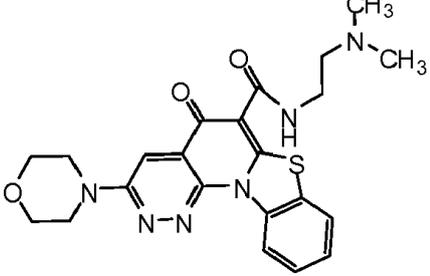
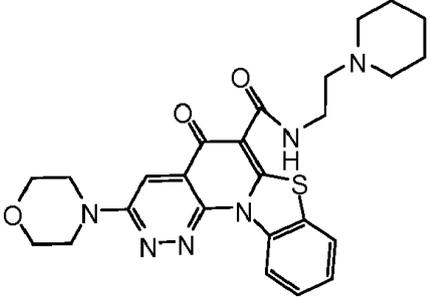
Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	478.6	479.6
	475.6	476.6

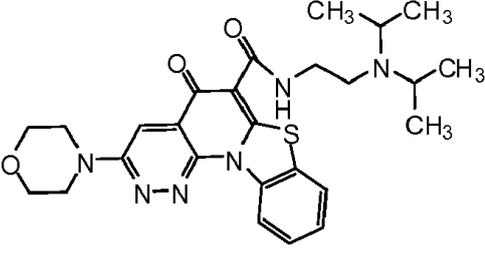
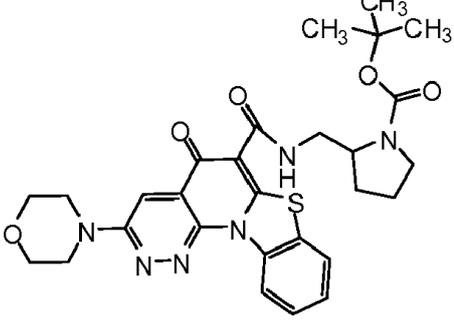
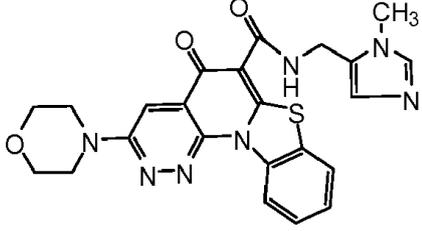
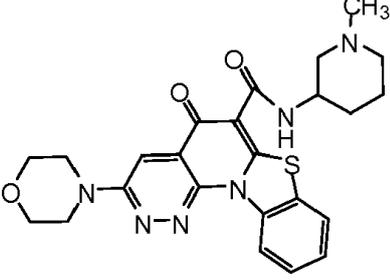
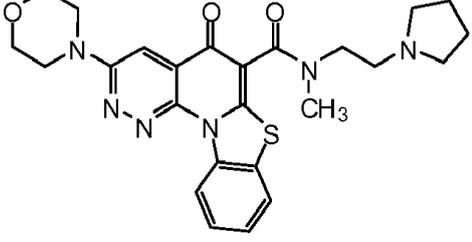
ES 2 791 305 T3

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	489.6	490.6
	475.5	476.5
	475.5	476.5
	528.6	529.6
	464.5	465.5

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	464.5	465.5
	479.6	480.6
	434.5	435.5
	477.6	478.6
	492.6	493.6
	486.6	487.6

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	485.6	486.6
	513.6	514.6
	485.6	486.6
	494.6	495.6
	523.0	524.0

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	500.6	501.6
	478.6	479.6
	492.6	493.6
	452.5	453.5
	492.6	493.6

Estructura	MW	LCMS (ES) m/z [M+1] ⁺
	508.6	509.6
	564.7	565.7
	475.5	476.5
	478.6	479.6
	492.6	493.6

Ejemplo 45

Actividad moduladora de la proliferación celular

ES 2 791 305 T3

En lo que sigue se describe un protocolo representativo de ensayo de proliferación celular que usa colorante Alamar Blue (almacenado a 4°C, usa 20 µl por pozo).

Configuración de placa de 96 pozos y tratamiento compuesto

- a. Dividir y tripsinizar células.
- 5 b. Contar las células con hemocitómetro.
- c. Colocar en placa 4.000-5.000 células por pozo en 100 µl de medio y sembrar en una placa de 96 pozos de acuerdo con el siguiente diseño de placa. Agregar medio de cultivo celular solo a los pozos B10 a B12. Los pozos B1 a B9 tienen células, pero no se añaden compuestos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	VACÍO												
B	SIN COMPUESTO AGREGADO						Solo medio						
C	10 nM		100 nM			1 µM			10 µM			Control	
D	10 nM		100 nM			1 µM			10 µM			Comp 1	
E	10 nM		100 nM			1 µM			10 µM			Comp 2	
F	10 nM		100 nM			1 µM			10 µM			Comp 3	
G	10 nM		100 nM			1 µM			10 µM			Comp 4	
H	VACÍO												

- 10 d. Agregar 100 µl de dilución de fármaco 2X a cada pozo en una concentración que se muestra en el diseño de la placa anterior. Al mismo tiempo, agregar 100 µl de medio en los pozos de control (pozos B10 a B12). El volumen total es de 200 µl/pozo.
- e. Incubar por cuatro (4) días a 37°C, 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.
- f. Agregar 20 µl de reactivo Alamar Blue a cada pozo.
- 15 g. Incubar durante cuatro (4) horas a 37°C, 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.
- h. Registrar la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm utilizando un lector de microplacas.

En los ensayos, las células se cultivan con un compuesto de prueba durante aproximadamente cuatro días, luego se agrega el colorante a las células y se detecta la fluorescencia del colorante no reducido después de aproximadamente cuatro horas. Se pueden utilizar diferentes tipos de células en los ensayos (por ejemplo, células de carcinoma colorrectal humano HCT-116, células de cáncer de próstata humano PC-3 y células de carcinoma pancreático humano MiaPaca). Los efectos antiproliferativos de compuestos representativos se proporcionan más adelante.

Ejemplo 46

Medición de valores de ARNm en ensayos celulares

- 25 El método de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) puede usarse para detectar los cambios de la diana c-myc y las copias del gen GAPDH de referencia endógeno en el mismo tubo. Generalmente, las células (15.000 células/pozo) se siembran en placas de fondo plano de 96 pozos (Corning, NY) y se incuban en condiciones normales de crecimiento durante la noche. Al día siguiente, el medio de cultivo se cambia por el que contiene medicamentos contra el cáncer a diversas concentraciones y se incuba durante 4 horas en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C. El ARN total

(ARNt) se extrae usando el kit RNeasy 96 (QIAGEN, CA). La concentración del ARNt se determina mediante el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen (Molecular Probes, OR).

5 Se puede llevar a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) utilizando 50 ng de ARNt de cada pozo en una reacción de 25 μ l que contiene 1x regulador RT TaqMan, hexámeros aleatorios 2.5 μ M, MgCl₂ 5.5 mM, 0.5 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTP), 30 U de transcriptasa reversa MultiScribe y 10 U de inhibidor de RNasa. Las reacciones de RT se incuban durante 10 minutos a 25°C, se someten a transcripción reversa durante 30 minutos a 48°C, se inactivan durante 5 minutos a 95°C y se colocan a 4°C. Todos los reactivos RT se pueden comprar en Applied Biosystems, CA.

10 La reacción QPCR en tiempo real se puede realizar en una reacción de 50 μ l que contiene los 5 μ l de ADNc, 1x de mezcla maestra universal de PCR, 1x juego de cebadores y sonda predesarrollados de c-myc y un juego de 0.8 x de cebadores y sonda predesarrollados GAPDH. Debido a la abundancia relativa del gen GAPDH en Hela, los cebadores GAPDH y la concentración de la sonda pueden ajustarse para obtener ciclos umbral (C_T) precisos para ambos genes en el mismo tubo. El ciclo de umbral (C_T) indica el número de ciclo fraccional en donde la cantidad de objetivo amplificado alcanza un umbral fijo. Al hacerlo, la amplificación de GAPDH se detiene antes de que pueda limitar los reactivos comunes disponibles para la amplificación de c-myc. El valor de Δ Rn representa la señal normalizada del indicador menos la línea base. Δ Rn aumenta durante la PCR a medida que aumenta el número de copias del amplicón hasta que la reacción se acerca a una meseta.

20 La sonda c-myc está marcada con colorante MGB 6FAM™ y la sonda GAPDH está marcada con colorante MGB VIC™. La preincubación se realiza durante 2 minutos a 50°C para activar la enzima AmpErase UNG y luego durante 10 minutos a 95°C para activar la AmpliTaq ADN polimerasa. El ADN se amplifica durante 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El ADNc humano c-myc y GAPDH se amplifica, detecta y cuantifica en tiempo real utilizando el sistema ABI Prism 7000 Sequence Detection (Applied Biosystems, CA), que está configurado para detectar colorantes informadores 6-FAM y VIC simultáneamente.

25 Los datos pueden analizarse usando el sistema ABI Prism Sequence Detection y Microsoft Excel. La cuantificación relativa se realiza utilizando la curva estándar y el método CT comparativo al mismo tiempo, y ambos métodos dieron resultados equivalentes. Se sabe que el ciclo en donde la gráfica de amplificación pasa el C_T refleja con precisión los valores relativos de ARNm. (Véase, Heid, et al., Genome Res. (1996) 6: 986-994; Gibson, et al., Genome Res. (1996) 6: 995-1001). Las reacciones de QPCR se establecen por triplicado en cada muestra de ADNc y se promedian los valores de C_T por triplicado. Todos los reactivos, incluidos los cebadores previamente desarrollados y el conjunto de sondas, se pueden adquirir en Applied Biosystems, CA.

Ejemplo 47

Caracterización in vitro

35 Se pueden usar diversos métodos para la caracterización in vitro de los compuestos de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a i) ensayos de detención; ii) ensayo de competencia cuádruplex/dúplex; iii) huellas cuadrométricas; y iv) ensayo directo en ausencia de una molécula competidora.

Ensayos de detención.

40 Los ensayos de detención son pantallas de primer paso de alto rendimiento para detectar fármacos que se unen y estabilizan el G-cuádruplex objetivo. Generalmente, se crea el oligonucleótido plantilla de ADN, que contiene la secuencia de nucleótidos del cuádruplex "objetivo" contra el cual se desea la detección del fármaco. Luego se fusiona un cebador de ADN marcado con fluorescencia en el extremo 3' del ADN plantilla. Luego se introduce un ADN polimerasa tal como la polimerasa Taq para sintetizar una cadena complementaria de ADN extendiéndose desde el cebador marcado con fluorescencia. Cuando el progreso de la polimerasa Taq no se ve obstaculizado, sintetiza una copia completa de la plantilla. La adición de un fármaco de prueba que simplemente se une al ADN dúplex pero no se une selectivamente a la región cuádruplex da como resultado una disminución en la síntesis del producto de longitud completa y un aumento concomitante en las copias de ADN de longitud variable. Sin embargo, si el fármaco de prueba se une y estabiliza selectivamente el cuádruplex, el progreso de las detenciones de polimerasa solo en el cuádruplex, y se sintetiza un "Stop Product" característico.

50 Los compuestos se seleccionan inicialmente en una concentración única, y los "aciertos" se vuelven a analizar en un intervalo de dosis para determinar un valor de IC₅₀ (es decir, la concentración de fármaco requerida para producir una relación de producto de detención/producto de longitud completa de 1:1). Estos productos se visualizan por electroforesis capilar.

Ensayo de competidor cuádruplex/dúplex.

La selectividad de los compuestos para la secuencia cuádruple diana con respecto al ADN dúplex puede medirse usando un ensayo de competición (es decir, "pantalla de selectividad"). Esta pantalla de selectividad utiliza el ensayo de detención como un sistema indicador para medir la capacidad relativa de una secuencia de ADN añadida externamente para competir con la estructura cuádruple objetivo formada en la plantilla de ADN para la unión del fármaco. Por ejemplo, los competidores son la secuencia cuádruple c-myc, que es idéntica a la secuencia cuádruple presente en la plantilla de ADN; o un ADN plasmídico que imita el ADN dúplex genómico complejo. El grado en que cada competidor "absorbe" el fármaco en solución se refleja en la disminución cuantitativa de la síntesis del producto de detención. De esta manera, se determinan las afinidades relativas de unión del fármaco tanto al ADN cuádruple objetivo como al ADN dúplex.

Huellas cuadrómáticas.

Los compuestos también pueden evaluarse por su capacidad para unirse a otras estructuras cuádruple nativas de relevancia biológica, incluyendo elementos de control cuádruple que regulan un rango de diferentes oncogenes. Los datos resultantes se utilizan para crear una huella cuadrómática.

Ensayo de interacción directa.

Los compuestos pueden evaluarse por su capacidad para interactuar directamente con ácidos nucleicos capaces de formar una estructura cuádruple, en donde el ácido nucleico no es un ácido nucleico telomérico. El ensayo se puede realizar en el mismo o en diferentes recipientes. Por ejemplo, un compuesto puede ponerse en contacto con cada ácido nucleico en el mismo recipiente. Alternativamente, un compuesto puede ponerse en contacto por separado con cada uno de los ácidos nucleicos probados en un recipiente diferente. Un ácido nucleico telomérico como se usa en el presente documento representa una región de ácido nucleico altamente repetitivo en el extremo de un cromosoma. Como se usa en el presente documento, se mide una interacción directa sin la presencia de un ácido nucleico competidor.

Una interacción entre el compuesto y el ácido nucleico puede determinarse, por ejemplo, midiendo los valores de IC_{50} , que son indicativos de la unión y/o la estabilización cuádruple. La selectividad de las interacciones puede determinarse, por ejemplo, comparando los valores medidos de IC_{50} . Por ejemplo, los valores IC_{50} más bajos pueden usarse para indicar una interacción fuerte entre el compuesto y el ácido nucleico, mientras que los valores IC_{50} más altos muestran una interacción pobre; mostrando así la selectividad de la interacción. Los productos de reacción pueden caracterizarse por electroforesis capilar.

Ejemplo 48

Propiedades farmacéuticas de los compuestos RBI

Se utilizó un procedimiento de dosificación en casete para determinar las propiedades farmacéuticas de los compuestos descritos aquí. En este procedimiento, los compuestos se seleccionan para cada casete (es decir, cóctel) sobre la base de que las señales espectrométricas de masas para cada compuesto no interferirán entre sí en el análisis espectrométrico de masas (por ejemplo, no se superpondrán). La concentración de cada compuesto en el casete de dosificación con frecuencia es de aproximadamente 20 mg/ml para alcanzar un nivel de dosis oral de 25 mg/kg en ratones ICR. Los aspectos del procedimiento de dosificación de casete se describen en lo que sigue.

Desarrollo de métodos MS/MS

Preparar 0.5 ml de solución de dosificación de 20 mg/ml (en PBS o vehículo de formulación) de 12 compuestos de prueba. Diluir una solución de dosificación 20 veces transfiriendo 10 μ L de la solución madre a 190 μ L de acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0.1% para lograr una concentración final de 1 mg/mL. Diluir aún más una solución de 1 mg/ml 1.000 veces transfiriendo 1 μ L de la solución madre a 999 μ L de acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0.1% para lograr una concentración final de 1 μ g/ml. Usar la solución de 1 μ g/ml para el desarrollo del método de espectrometría de masas basado en infusión directa. Determinar los espectros de masas padre/hija de cada compuesto usando el monitoreo de reacción múltiple (MRM). Comparar los espectros de masas progenitor/hijo de cada compuesto para asegurar que no haya interferencia de reacción cruzada durante las mediciones de LC-MS/MS. En función de los espectros de masas MRM, determinar la composición de todos los casetes.

Preparación del casete de dosificación

Mezclar 250 μ L de cuatro soluciones de dosificación preparadas y un estándar interno de PK oral (20 mg/ml cada uno) de acuerdo con el diseño del casete para lograr una concentración final de 4 mg/ml. Se someten los casetes a vórtice rigurosamente y a ultrasonido para obtener una solución transparente o una suspensión homogénea. Se utilizan las soluciones de casete para dosificar animales por vía oral de administración a 25 mg/kg.

Animales y dosificación

5 Todos los experimentos in vivo siguen protocolos aprobados por el Animal Use and Care Committee. Se obtienen ratones hembra ICR (IcrTac:ICR) de 8-10 semanas de edad de Taconic (Hudson, Nueva York). Los ratones se alojan en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h con acceso ad libitum al agua y a los alimentos. Después de un período mínimo de aclimatación de dos semanas, los ratones se aleatorizan en grupos con un tamaño de grupo mínimo de cuatro. Los animales utilizados para estudios farmacocinéticos tienen un rango de peso corporal de 25-35 g. Una dosis de 25 mg/kg (4 mg/ml) de un casete descrito en el Ejemplo 1 se administra por vía oral a ratones que han estado en ayunas durante la noche.

Preparación de muestras de sangre

10 Después de la administración del compuesto, se recogen muestras de sangre en serie mediante punción retroorbital con un tubo capilar en varios puntos de tiempo (15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6 y 8 horas). Las muestras se transfieren a un tubo de microcentrifuga heparinizado de 0.5 ml y se colocan en hielo. El plasma se separa por centrifugación y las muestras se almacenan a -80°C hasta el ensayo.

Preparación de soluciones estándar de trabajo

15 Se diluye cuatro veces una solución de dosificación en casete (4 mg/ml) transfiriendo 25 µl de la solución madre a 75 µl de acetonitrilo al 50% que contiene ácido fórmico al 0.1% para lograr la concentración de 1 mg/ml. Se diluye adicionalmente esta solución madre mediante diluciones en serie para obtener soluciones estándar de trabajo de 0.01, 0.1, 1 y 5 µg/ml.

Preparación de una solución de enfriamiento.

20 Preparar 500 ml de solución de 0.5 µg/ml de patrón interno bioanalítico utilizando acetonitrilo al 100% con ácido fórmico al 0.1%. Almacenar la solución de enfriamiento rápido en una botella herméticamente cerrada a 4°C.

Preparación estándar de calibración para análisis

Transferir 15 µL de plasma de ratón como blanco a una placa de 96 pozos y precipitar las proteínas plasmáticas pipeteando 120 µL de solución de detención a todas las alícuotas de plasma. Cubrir la placa con una cubierta de placa correspondiente y mezclar bien durante 30-60 segundos con un agitador vertical de tubos múltiples.

25 Agregar 15 µL de la solución estándar de trabajo del casete correspondiente al plasma en detención y agitar la placa en vórtice durante 30-60 segundos adicionales. Luego, centrifugar la placa a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Sin alterar el sedimento de proteínas plasmáticas, transferir 120 µL del sobrenadante a una nueva placa de 96 pozos y secar la muestra bajo nitrógeno usando un evaporador de placa TurboVap® (Caliper Life Sciences; Hopkinton, Massachusetts). Reconstituir los residuos secos con 120 µl de acetonitrilo al 20% que contiene ácido fórmico al 0.1%. Agitar en vórtex la placa durante 30-60 segundos y someter a análisis LC-MS/MS (descrito más adelante).

Estudio de preparación de muestras para análisis

Transferir 15 µL de plasma de ratón en blanco a una placa de 96 pozos y precipitar las proteínas plasmáticas pipeteando 120 µL de solución de detención a todas las alícuotas de plasma. Cubrir la placa con una cubierta de placa correspondiente y mezclar bien durante 30-60 segundos con un agitador vertical de tubos múltiples.

35 Agregar 15 µL de la solución estándar de trabajo del casete correspondiente al plasma inactivado y agitar en vórtex la placa durante 30-60 segundos adicionales. Agregar 15 µL de acetonitrilo al 50% que contenga ácido fórmico al 0.1% al plasma en detención para que coincida con la matriz y agitar la placa en vórtex durante 30-60 segundos adicionales. Luego, centrifugar la placa a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

40 Sin alterar la pella de proteínas plasmáticas, transferir 120 µl del sobrenadante a una nueva placa de 96 pozos y secar la muestra bajo nitrógeno usando el evaporador de placa TurboVap® (Caliper Life Sciences; Hopkinton, Massachusetts). Reconstituir los residuos secos con 120 µl de acetonitrilo al 20% que contiene ácido fórmico al 0.1%. Agitar en vórtex la placa durante 30-60 segundos y someter a análisis LC-MS/MS (descrito más adelante).

Análisis LC-MS/MS

45 Se analizan las mezclas de reacción en cuanto a la cantidad de cada entidad química en los casetes para la forma original de acuerdo con las siguientes condiciones de HPLC:

Columna: PHENOMENEX® Synergi™ Polar RP, 20.0 x 2.0 mm, 3 µM

Columna de protección: PHENOMENEX® C18, 4.0 x 2.0 mm

ES 2 791 305 T3

Rata de flujo: 0.25 ml/min

Temperatura de columna: 40°C

Temperatura de muestra: 10°C

Volumen de inyección: 10 µl

5 Tiempo de ejecución: 3.5 min.

Perfil de gradiente de disolvente:

Disolvente A: ácido fórmico al 0.1% en agua

Disolvente B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo

Perfil de gradiente de solvente:

Tiempo, min	% A	% B
0.0	95	5
1.0	95	5
1.5	5	95
2.0	5	95
2.5	95	5
3.5	95	5

10

Parámetros de espectrometría de masas:

Modo MS: ESI (+)

Capilar: 3.5 Kv

15 Cono: 40 V

Extractor: 3 V

Lente RF: 0.2 V

Fuente T: 120°C

Desolvatación T: 300°C

20 Desolvatación_Gas: 450 l/h

Cono_Gas: 72 l/h

Resolución LM: 15.0

Resolución HM: 15.0

Energía iónica: 0.5

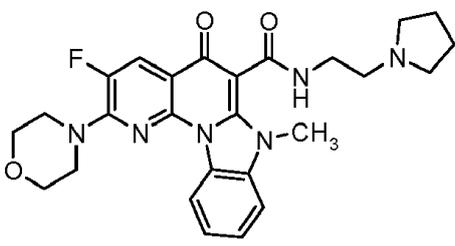
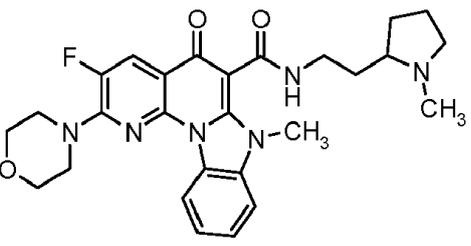
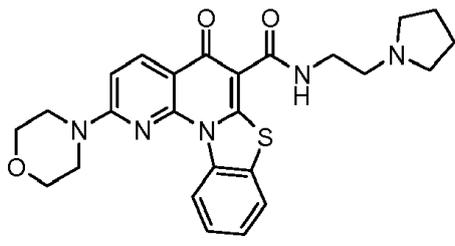
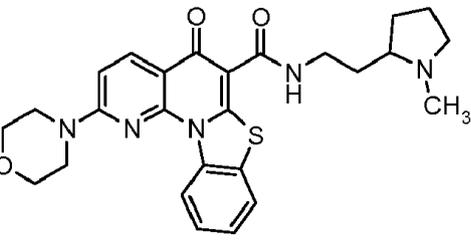
25 Multiplicador: 650

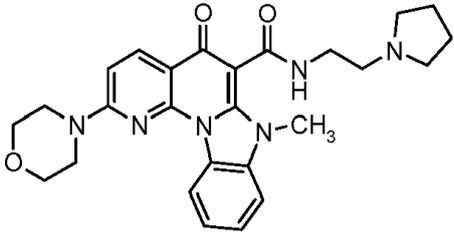
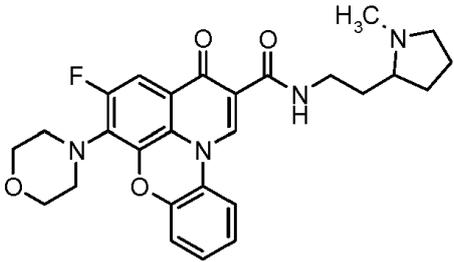
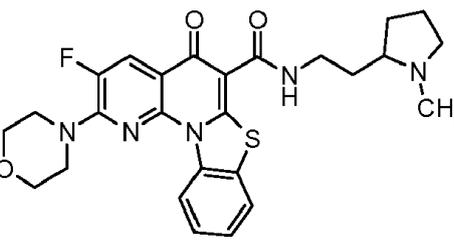
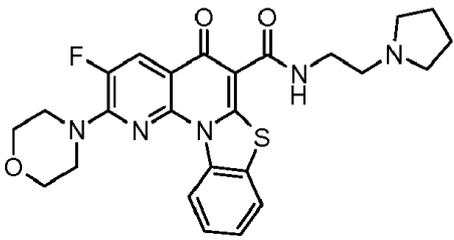
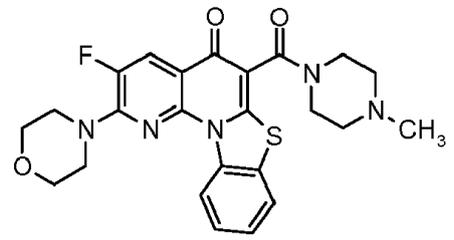
Análisis farmacocinético

Aplicar análisis farmacocinético no comparativo para administración oral. Registrar la C_{max} y T_{max} observadas. Usar la regla trapezoidal lineal para calcular el AUC (0-8) de acuerdo con Gibaldi, M. and Perrier, D. Pharmacokinetics, Segunda edición, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1982.

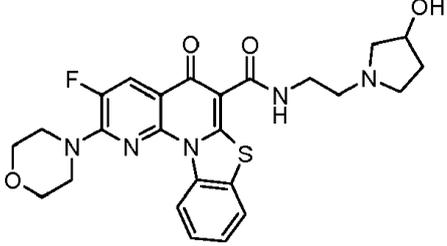
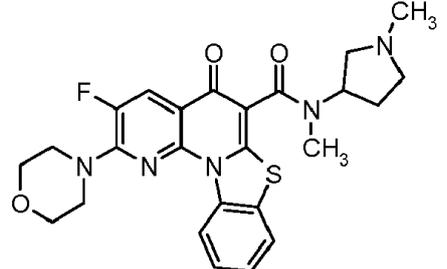
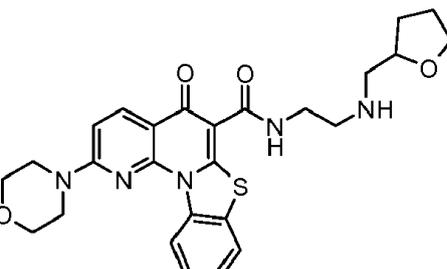
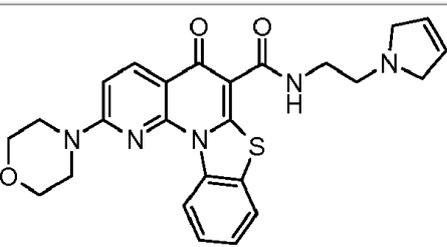
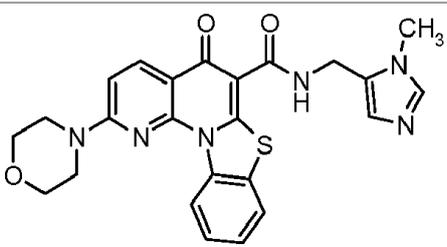
- 5 Los datos representativos de dosificación en casete y biodisponibilidad se dan en la Tabla 8, junto con la inhibición de la proliferación celular (del ensayo Alamar Blue (AB) (por ejemplo, Ejemplo 45 aquí) y la inhibición de ARNr (del ensayo de PCR cuantitativa (QPCR) (por ejemplo, Ejemplo 46 en este documento).

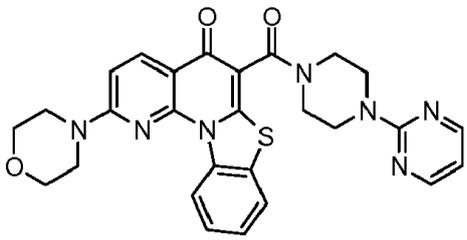
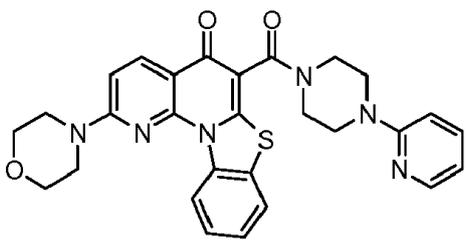
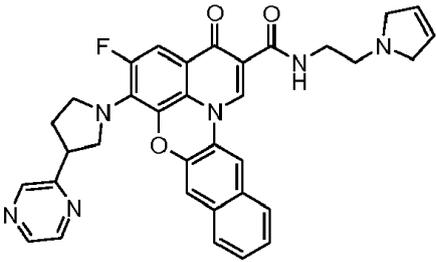
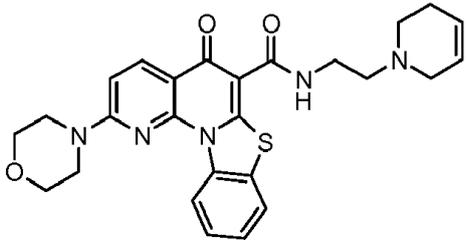
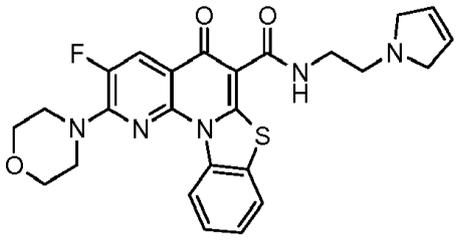
Tabla 8. Dosificación de casete, datos de biodisponibilidad y datos de actividad farmacéutica representativos

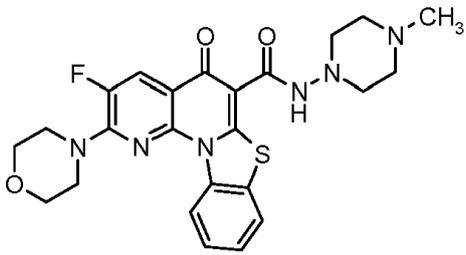
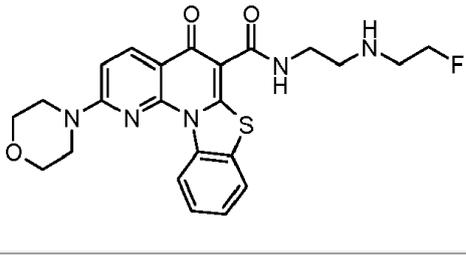
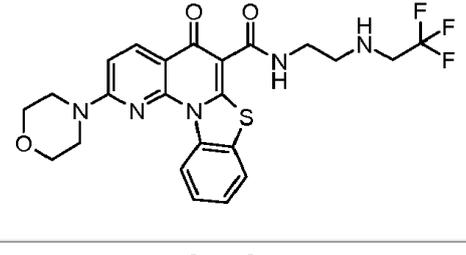
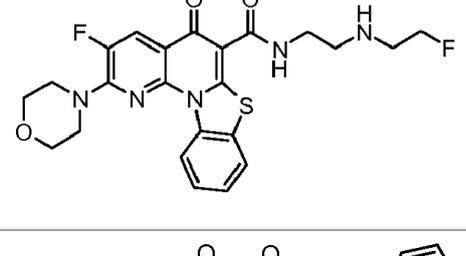
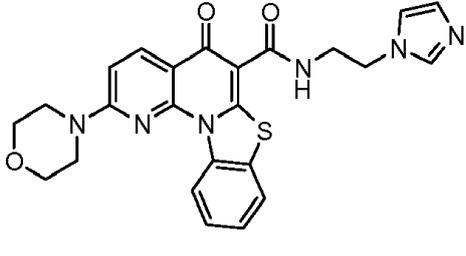
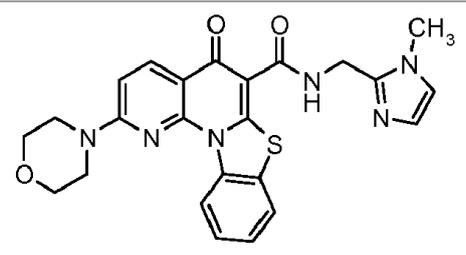
Estructura	AB: HCT-116 (μ M)	QPC R: ADNr (μ M)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.307	0.318	7	2002	
	0.21	0.521	8	1190	10.4
	0.059	0.052	162	2151	10.7
	0.055	0.249	42	2586	

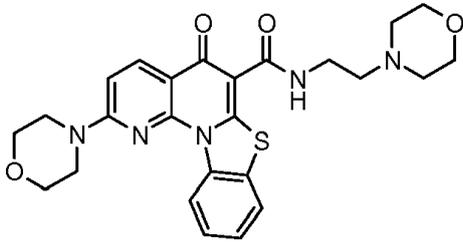
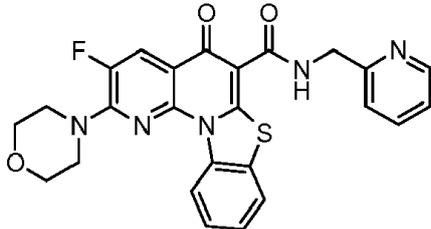
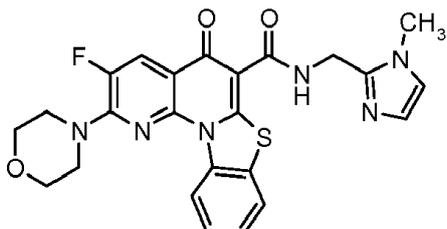
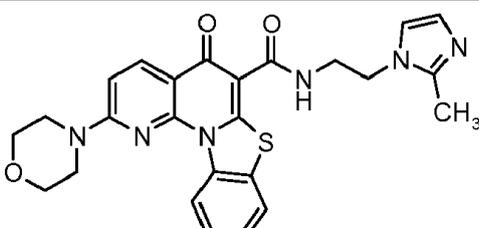
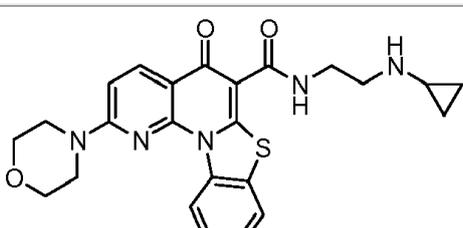
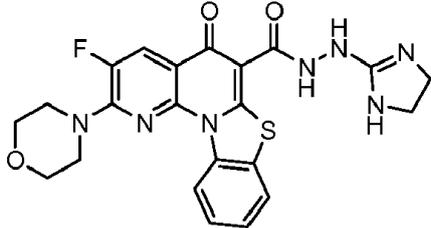
Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.075	0.261	3	1260	
	0.389	0.405	12	1426	
	0.337	0.892	10	3807	22.4
	0.081	0.127	70	2261	
	0.386	1.153	7	6163	30.3

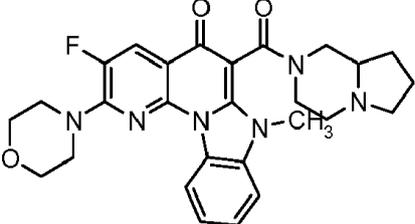
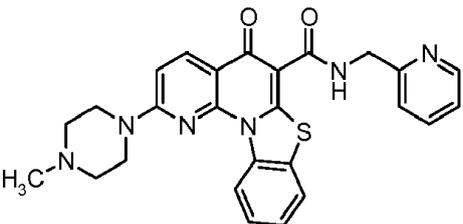
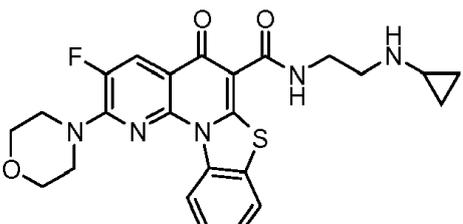
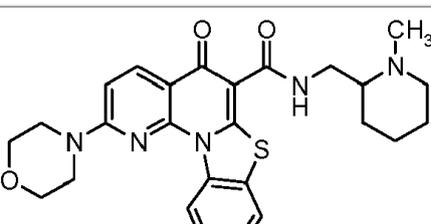
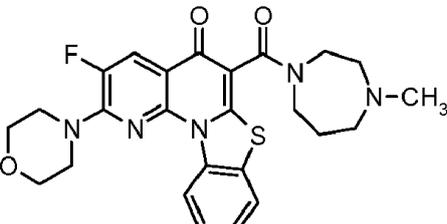
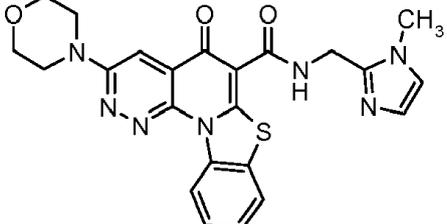
ES 2 791 305 T3

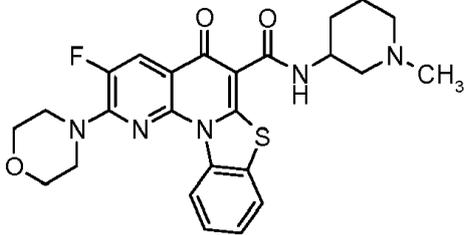
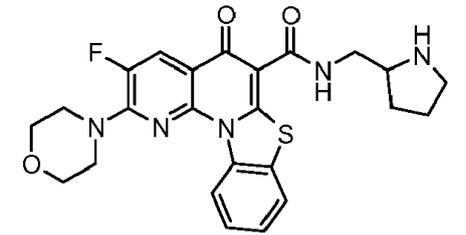
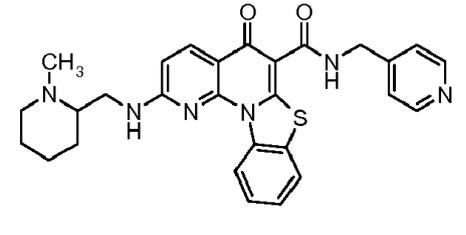
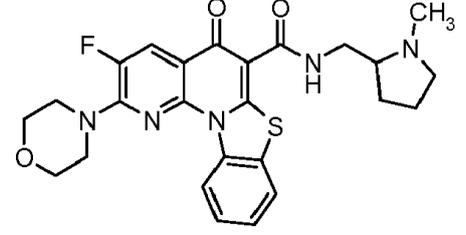
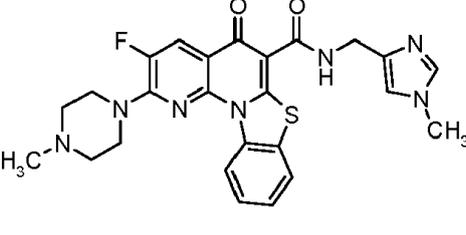
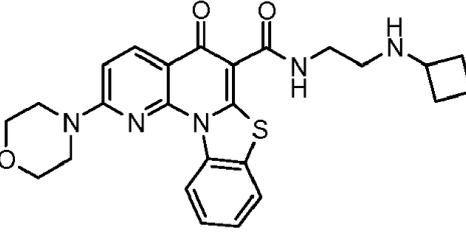
Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.055	0.01	10	1086	
	0.174	0.381	5	2133	
	0.116	0.04	119	1904	2
	0.13	0.064	22	7939	27.5
	0.174	0.262	60	2915	12.4

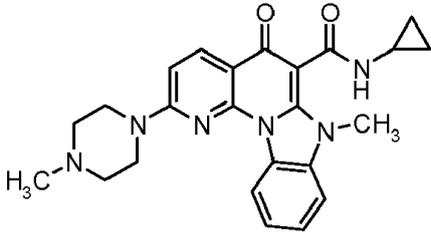
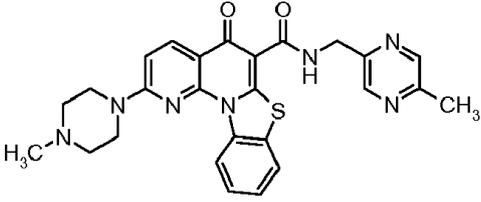
Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.461	0.578	13	15344	31.1
	0.21	0.723	17	1742	
	0.398	1.041	24	8042	
	0.098	0.032	64	632	
	0.392	0.042	3	1999	

Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.265	0.102	89	4362	
	0.135	0.059	48	5015	
	0.535	0.502	15	9447	
	0.484	0.147	70	2223	
	0.473	0.431	24	4028	
	0.145	0.173	9	5491	17.9

Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.454	0.496	16	2985	
		22.63 2	1	90599	
	0.199	0.134	11	20272	15.8
	0.166	0.084	21	4378	
	0.065	0.1	39	5372	43.3
	0.001	0.028	893	2429	0.1

Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.843	0.841	10	3206	
	0.147	0.112	111	51054	41.4
	0.132	0.248	53	5154	
	0.006	0.009	2778	1048	
	0.3	0.233	10	4226	
	0.174	0.334	53	3779	

Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)-Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.027	0.029	862	1026	
	0.009	0.016	25	1049	
	0.008	0.067	39	790	
	0.128	0.383	45	3957	
	0.303	0.139	69	45116	
	0.286	0.176	16	3176	

Estructura	AB: HCT-116 (μM)	QPC R: ADNr (μM)	Selectividad	AUC (8 horas)- Casete	Biodisponibilidad (%F)
	0.202	0.127	4	5195	
	0.391	0.069	13	165786	

Ejemplo 49

Evaluación de propiedades farmacocinéticas

5 Las propiedades farmacocinéticas de los fármacos se investigan en ratones ICR después de un bolo intravenoso (IV) y dosis orales (PO) de fármaco a 5 mg/kg y 25 mg/kg respectivamente. Se recogen muestras de sangre en momentos predeterminados y se separa el plasma. El plasma se separa de las muestras de sangre recogidas a los 5, 15 y 30 minutos y 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la dosis.

10 Los niveles de fármaco se cuantifican por el método LC/MS/MS descrito más adelante. El análisis farmacocinético no comparativo se aplica para administración intravenosa. Se usa una regla trapezoidal lineal para calcular AUC (0-24) o AUC (0-8). El terminal $t_{1/2}$ y C_o se calculan utilizando los últimos tres y los primeros tres puntos de datos, respectivamente.

15 El bioanálisis se realiza usando un instrumento Quattro Micro LC/MS/MS en el modo de detección MRM, con un estándar interno (IS). En resumen se preparan 15 μL de muestras de plasma para análisis usando precipitación de proteínas con 120 μL de acetonitrilo. Los sobrenadantes se transfieren a una placa de 96 pozos y se someten a análisis LC-MS/MS usando una columna PHENOMENEX® Polar-RP HPLC. Las fases móviles son NH_4HCO_3 10 mM en agua (Solución-A) y NH_4HCO_3 10 mM en metanol (Solución-B). La columna se equilibra inicialmente con 25% de Solución B y se sigue con 100% de Solución B durante 5 minutos. El método tiene un rango dinámico de 1 a 10.000 ng/mL. La cuantificación de los analitos se realiza en el modo por lotes con dos curvas de calibración entre corchetes de acuerdo con la lista de muestras bioanalíticas.

Ejemplo 50

20 Ensayo de inhibición del citocromo P450 (CYP450)

25 Los compuestos de la presente invención pueden evaluarse para determinar la actividad inhibitoria potencial contra isoenzimas del citocromo P450. Generalmente, se prepararán seis tubos de reacción con 100 μL de una solución que contiene fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, NADP+ 2.6 mM, glucosa 6-fosfato 6.6 mM, 0.8 U de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa/mL y diluciones en serie 1:6 del compuesto prueba junto con seis tubos de diluciones en serie 1:6 de un inhibidor de control positivo adecuado. Las reacciones se iniciarán agregando 100 μL de una solución de enzima/sustrato precalentada a los tubos de reacción. Se preparará una reacción de control de punto de tiempo cero agregando 50 μL de acetonitrilo a 100 μL de solución de cofactor para inactivar las enzimas, luego agregando 100 μL de solución de enzima/sustrato. También se puede preparar una reacción de control sin inhibidor. Después de una incubación adecuada a 37°C, las reacciones se detendrán mediante la adición de 50 μL de acetonitrilo. Las reacciones se analizarán en cuanto a las formas de metabolitos del sustrato de sonda usando LC/MS/MS.

30

Ejemplo 51

Evaluación de la eficacia del compuesto en la supresión tumoral

Un experimento representativo para evaluar la eficacia de los compuestos de la presente invención en modelos atómicos de ratón desnudo de carcinoma humano puede diseñarse como sigue. Se utilizarán animales machos o hembras (ratón, Sim) (NCR, nu/nu) de cinco a seis semanas y que pesen más de 20 gramos. Los animales serán criados a propósito y serán experimentalmente ingenuos al comienzo del estudio. Se propagarán tumores desde las células inyectadas o del paso de fragmentos tumorales. Las líneas celulares que se utilizarán incluyen, entre otras, Paca-2, HPAC, Hs700T, Panc10.05, Panc 02.13, PL45, SW 190, Hs 766T, CFPAC-1 y PANC-1.

Implantación celular. Se inocularán por vía subcutánea en el costado derecho de sesenta animales uno a diez millones de células suspendidas en medios de cultivo de 0.1 ml con o sin Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Inc, Bedford, MA). Solo habrá una inyección por animal. Durante de los 7 a 14 días posteriores a la inyección, los tumores se desarrollarán hasta un tamaño de uso de estudio de aproximadamente 1.0 cm³. Se considerará un pequeño subconjunto (<10/60) de animales. Los donantes y los tumores crecerán entre 10 y 28 días y tendrán un tamaño de 1.5 cm³ para ser utilizados para el trasplante en serie.

Trasplante de fragmentos. Los animales donantes serán sacrificados y los tumores serán extirpados quirúrgicamente y cortados en fragmentos de 2 mm³ de tamaño utilizando una técnica aséptica. Los animales que van a recibir el implante serán ligeramente anestesiados con isoflurano. El área que se va a implantar se limpiará con alcohol al 70% y betadina. Luego se implantará un solo fragmento por vía subcutánea utilizando un trócar.

Estudios de eficacia. Se dividirán al azar grupos de 50-60 animales portadores de tumores. Por ejemplo, en un estudio representativo, los animales pueden dividirse aleatoriamente en tres a ocho grupos que contienen 7 animales cada uno, como se describe en la Tabla 9.

Tabla 9

	Número de machos/hembras	Nivel de dosis	Dosis vol. (µL)	Dosis de solución conc. (mg/ml)	Números de sacrificados en: Día 28-42
1	N=7	Control Negativo*	250		Todos
2	N=7	Control Positivo**	10 - 400 IP	2 a 5 IP	Todos
			10 - 250 IV	2.5 a 5 IV	
			125 - 500 PO	≤10 PO	
Grupos 3 - 8	N = 7/grp	Compuesto de prueba	10 - 400 IP	2.5 a 5 IP	Todos
		1 a 25 IP	10 - 250 IV	2.5 a 5 IV	
	<56 total	1 a 50 IV	125 - 500 PO	10 PO	
		50 a 200 PO			

*Vehículo/Diluyente

**Se utilizarán como controles positivos compuestos anticancerígenos disponibles en el mercado que incluyen, entre otros, Taxol, CPT11 y Gemcitabina.

5 Procedimiento de dosificación. Los compuestos se administrarán QD, QOD, Q3D o una vez por semana a través de IP, IV (vena lateral de la cola) o PO. Los animales serán dosificados en un orden sistemático que distribuya el tiempo de dosificación de manera similar en todos los grupos. Para la administración de IP y PO en bolo, los animales se sujetarán manualmente. Para la administración intravenosa en bolo o infusión intravenosa a corto plazo (un minuto), los animales estarán sujetos mecánicamente pero no sedados. Se utilizarán jeringas estériles desechables para cada animal/dosis. También se analizará un compuesto de prueba en combinación con aproximadamente 10-100 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 40 mg/kg) de agente quimioterapéutico como la gemcitabina, normalmente mediante administración IP una vez por semana.

Ejemplo 52

10 Evaluación de dosis máximas toleradas

Un experimento representativo para evaluar la dosis máxima tolerada (MTD) de los compuestos de la presente invención puede diseñarse como sigue.

15 Estudios de toxicidad aguda. En un estudio representativo para determinar la MTD después de una dosis única, sesenta animales ingenuos, por ejemplo, se dividirán aleatoriamente en grupos que contienen 10 animales (5 machos y 5 hembras) y recibirán un compuesto a través de dos vías de administración o dos compuestos a través de una única vía de administración. Se ha demostrado que se tolera una sola dosis intravenosa de 50 mg/kg y se utiliza como niveles preliminares de dosis baja. La dosis baja para estudios orales se basa en la tolerabilidad proyectada y se ajustará a la baja si es necesario. En la Tabla 10 se describe un diseño representativo de niveles de dosis, volúmenes de dosis y concentración de la solución de dosis.

20

Tabla 10

Grupo No.	Número de machos/hembras	Nivel de dosis (mg/kg)	Dosis vol. (µL)	Dosis de solución Conc. (mg/ml)	Número de sacrificados en: Día 7
1	N = 5 M	Compuesto de prueba #1 50IV	250 IV	5 IV	Todos
	N = 5 H	100 PO	500 PO	5 PO	
2	N = 5 M	Compuesto de prueba #175IV	250 IV	8.25 IV	Todos
	N = 5 H	200 PO	500 PO	10 PO	
3	N = 5 M	Compuesto de prueba #1100 IV	250 IV	10 IV	Todos
	N = 5 H	300 PO	500 PO	15 PO	
4	N = 5 M	Compuesto de prueba #2 501V	250 IV	5 IV	Todos
	N = 5 H	100 PO	500 PO	5 PO	
5	N = 5 M	Compuesto de prueba #2	250 IV	8.25 IV	Todos
	N = 5 H	75IV 200 PO	500 PO	10 PO	
6	N = 5 M	Compuesto de prueba #2100 IV	250 IV	10 IV	Todos

Grupo No.	Número de machos/hembras	Nivel de dosis (mg/kg)	Dosis vol. (µL)	Dosis de solución Conc. (mg/ml)	Número de sacrificados en: Día 7
	N = 5 H	300 PO	500 PO	15 PO	

5 Estudios subcrónicos. En un estudio representativo para caracterizar las relaciones dosis-respuesta después de una dosificación repetida, veinticinco animales ingenuos, por ejemplo, se dividirán aleatoriamente en grupos que contienen 5 animales cada uno como se describe en la Tabla 11. Cada estudio de dos semanas probará solo un compuesto a través de una vía única de administración a una dosis óptima derivada de los datos recopilados en estudios previos de toxicidad aguda.

Tabla 11

Grupo No.	Número de machos y hembras	Nivel de dosis (mg/kg)	Dosis vol. (µL)	Dosis de solución Conc. (mg/ml)	Número de sacrificados en: Día 14
1	N = 5	Control negativo	250 IV	Depende de Nivel de dosis	Todos
			500 PO		
2 QD	N = 5	Compuesto de prueba según lo determinado en estudios de MTD	250 IV	Depende de Nivel de dosis	Todos
			500 PO		
3 QOD	N = 5	Compuesto de prueba según lo determinado en estudios de MTD	250 IV	Depende de Nivel de dosis	Todos
			500 PO		
4 Q3D	N = 5	Compuesto de prueba según lo determinado en estudios de MTD	250 IV	Depende de Nivel de dosis	Todos
			500 PO		
5 Q7D	N = 5	Compuesto de prueba según lo determinado en estudios de MTD	250 IV	Depende de Nivel de dosis	Todos
			500 PO		

10 Procedimiento de dosificación. Los compuestos se administrarán QD, QOD, Q3D o Q7D a través de IV (vena de la cola lateral) o PO. Los animales serán dosificados en un orden sistemático que distribuya el tiempo de dosificación de manera similar en todos los grupos. Para la dosificación de PO, los animales se sujetarán manualmente. Para la administración intravenosa en bolo o infusión intravenosa a corto plazo (un minuto), los animales estarán sujetos mecánicamente pero no sedados. Se utilizarán jeringas estériles desechables para cada animal/dosis.

Ejemplo 53

15 Actividad farmacéutica de los compuestos A1, A2 y A3

La actividad inhibidora sobre la proliferación celular de los Compuestos A1, A2 y A3 se determinó usando un ensayo de viabilidad celular con Alamar Blue (por ejemplo, el Ejemplo 39 en el presente documento) usando una variedad de tipos de células que son representativos de diferentes cánceres. Los valores de inhibición (IC₅₀) se presentan en concentraciones micromolares en la siguiente tabla (Tabla 12).

20

Tabla 12

Enfermedad	Línea celular	Tipo de Célula	IC ₅₀ (micromolar)		
			A1	A2	A3
Próstata	LNCAP	Fibroblastoide	0.077	0.029	0.045
	PC-3	Epitelial	0.600	0.089	0.563
Colorrectal	HCT-116	Epitelial	0.097	0.032	0.093
	HT-29	Epitelial	0.073	0.042	0.102
	COLO-205	Epitelial		0.096	
Pulmón	H1299	NSCL	0.112	0.069	0.102
	H460	Epitelial	0.142	0.090	0.123
	SK-MES-1	Carcinoma escamoso	0.105	0.021	0.134
Páncreas	Miapaca-2	Epitelial	0.103	0.036	0.122
	Miapaca-R5	Epitelial	0.149	0.034	0.133
	BXPC3	Epitelial	0.056	0.035	0.071
	PANC-1	Epitelial	0.148		0.103
Mama	MCF-7	Carcinoma mamario	0.348		0.267
	MDA-MB-231	Epitelial	0.105	0.052	0.139
Hematopoyético	K562	Linfoblastoma	0.140	0.042	0.120
	Jurkat	Linfoma	0.069	0.025	0.060
	HL60	Linfoma	0.264	0.083	0.160
	HL60/MX2	Linfoma	0.244	0.147	0.219
Piel	A375	Epitelial	0.090	0.023	0.070
Ovario	SK-OV-3	Epitelial	0.215	0.064	0.279
Hueso	U2OS	Epitelial	0.752	0.089	0.476
	Saos-2	Epitelial	0.264	0.124	0.249

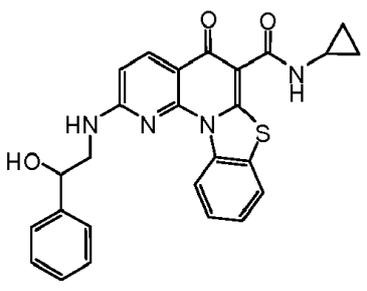
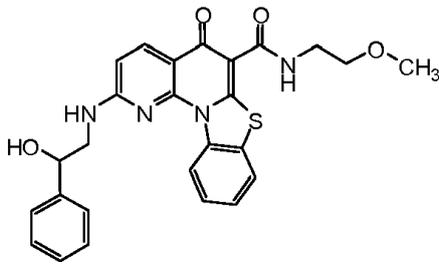
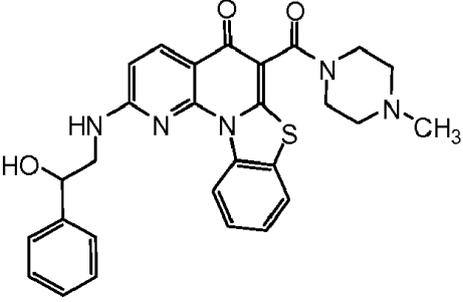
5 Los compuestos A1, A2 y A3 también se ensayaron para la inhibición tumoral en roedores con xenoinjerto. A los roedores que tenían tumores por xenoinjerto de células A375 se les administraron dosis de 100 mg/kg, 75 mg/kg y 100 mg/kg de Compuesto A1, A2 y A3, respectivamente, mediante administración oral dos veces al día. Cada uno de estos compuestos inhibió significativamente el crecimiento del tumor A375 durante un período de siete días en relación con un grupo de control no tratado. Además, a los roedores con tumores de xenoinjerto MiaPaCa se les administraron dosis de 100 mg/kg de Compuesto A1 y A3 mediante administración oral dos veces al día. Cada uno de estos compuestos inhibió significativamente el crecimiento del tumor MiaPaCa durante un período de veintidós días en relación con un grupo de control no tratado.

Ejemplo 54

10 Datos representativos de IC₅₀ basados en células

La actividad inhibidora sobre la proliferación celular de compuestos representativos de la divulgación se determinó usando un ensayo de viabilidad celular con Alamar Blue (por ejemplo, el Ejemplo 39 en el presente documento) usando una variedad de tipos de células que son representativos de diferentes cánceres. Los valores de inhibición (IC₅₀) se presentan en concentraciones micromolares en la Tabla 13 y la Tabla 14.

15 Tabla 13

Estructura	AB: MV-4-11 (IC ₅₀ , μM)	AB: PC3 (IC ₅₀ , μM)	AB: HCT-116 (IC ₅₀ , μM)	AB: K-562 (IC ₅₀ , μM)	M+1
	> 10	> 10	> 10	> 10	471
		3.736	0.133		489
	0.543	6.666	2.507	3.127	514

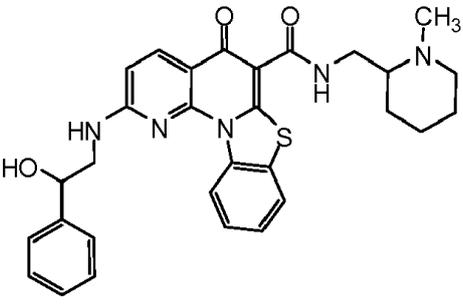
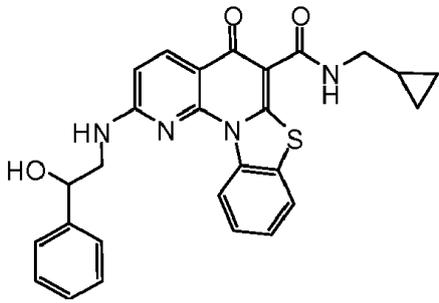
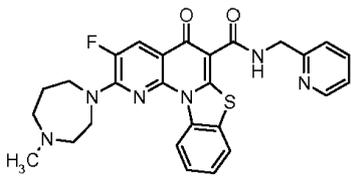
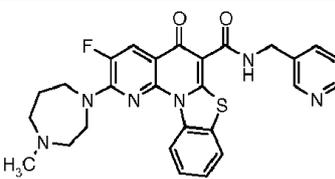
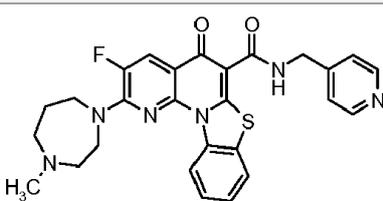
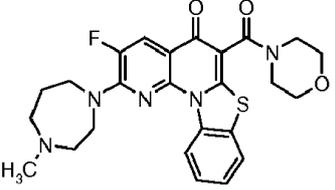
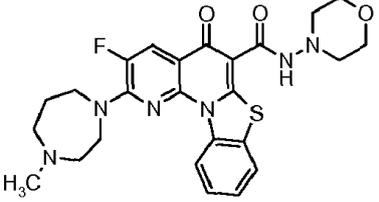
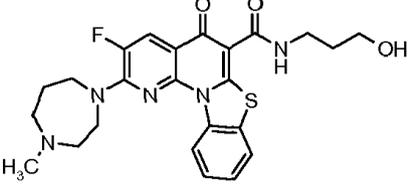
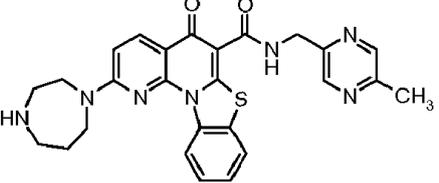
Estructura	AB: MV-4-11 (IC ₅₀ , μM)	AB: PC3 (IC ₅₀ , μM)	AB: HCT-116 (IC ₅₀ , μM)	AB: K-562 (IC ₅₀ , μM)	M+1
		0.633	0.267		542
	5.032	6.08	> 10	> 10	485

Tabla 14

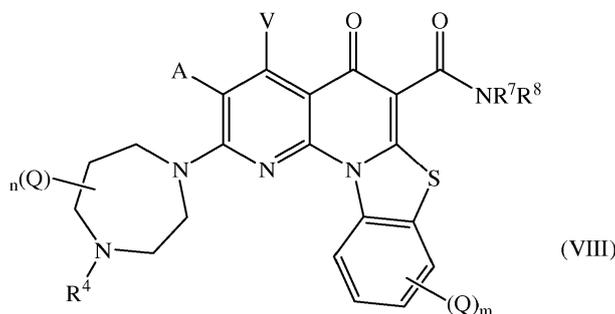
Estructura	AB: MV-4-11 (IC ₅₀ , μM)	AB: K-562 (IC ₅₀ , μM)	AB: THP-1 (IC ₅₀ , μM)	AB: PC3 (IC ₅₀ , μM)	AB: MiaPaCa (IC ₅₀ , μM)
	0.043	0.118	1.334	7.773	0.941
	< 3.e-002	0.032	0.356	2.485	0.133
	< 3.e-002	0.095	1.064	6.59	0.131

ES 2 791 305 T3

Estructura	AB: MV-4-11 (IC ₅₀ , μM)	AB: K-562 (IC ₅₀ , μM)	AB: THP-1 (IC ₅₀ , μM)	AB: PC3 (IC ₅₀ , μM)	AB: MiaPaCa (IC ₅₀ , μM)
	< 3.e-002	0.11	0.59	1.212	0.352
	0.124	0.267	1.317	1.804	0.359
	0.032	0.051	0.571	2.645	< 0.12
	0.084	0.101			0.637

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (VIII),



o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 en donde:

A y V son independientemente H, halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

cada Q es independientemente halo, azido, -CN, -CF₃, -CONR¹R², -NR¹R², -SR², -OR², -R³, -W, -L-W, -W⁰ o -L-N(R)-W⁰;

10 en cada -NR¹R², R¹ y R² junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como miembro del anillo;

R¹ es H o alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, o =O;

R² es H, o alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alqueno C2-C10 o heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-7 miembros opcionalmente sustituido;

15 R³ es un alquilo C1-C10, alqueno C2-C10, arilo C5-C10 o arilalquilo C6-C12 opcionalmente sustituido, o una heteroforma de uno de estos, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-6 miembros opcionalmente sustituido;

R⁴ es H, o alquilo C1-C6;

cada R es independientemente H o alquilo C1-C6;

20 R⁷ es H y R⁸ es alquilo C1-C10, heteroalquilo C1-C10, alqueno C2-C10 o heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, =O, o un anillo carbocíclico o heterocíclico de 3-7 miembros opcionalmente sustituido; o en -NR⁷R⁸, R⁷ y R⁸ junto con N pueden formar un anillo azacíclico opcionalmente sustituido, que opcionalmente contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como miembro del anillo;

m es 0;

25 n es 0;

L es un alqueno C1-C10, heteroalqueno C1-C10, alqueno C2-C10 o un conector heteroalqueno C2-C10, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, oxo (=O), o alquilo C1-C6;

30 W es un anillo azacíclico de 4-7 miembros opcionalmente sustituido, que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S como miembro del anillo; y

W⁰ es un anillo carbocíclico de 3-4 miembros opcionalmente sustituido, o un grupo alquilo C1-C6 sustituido con de 1 a 4 átomos de flúor.

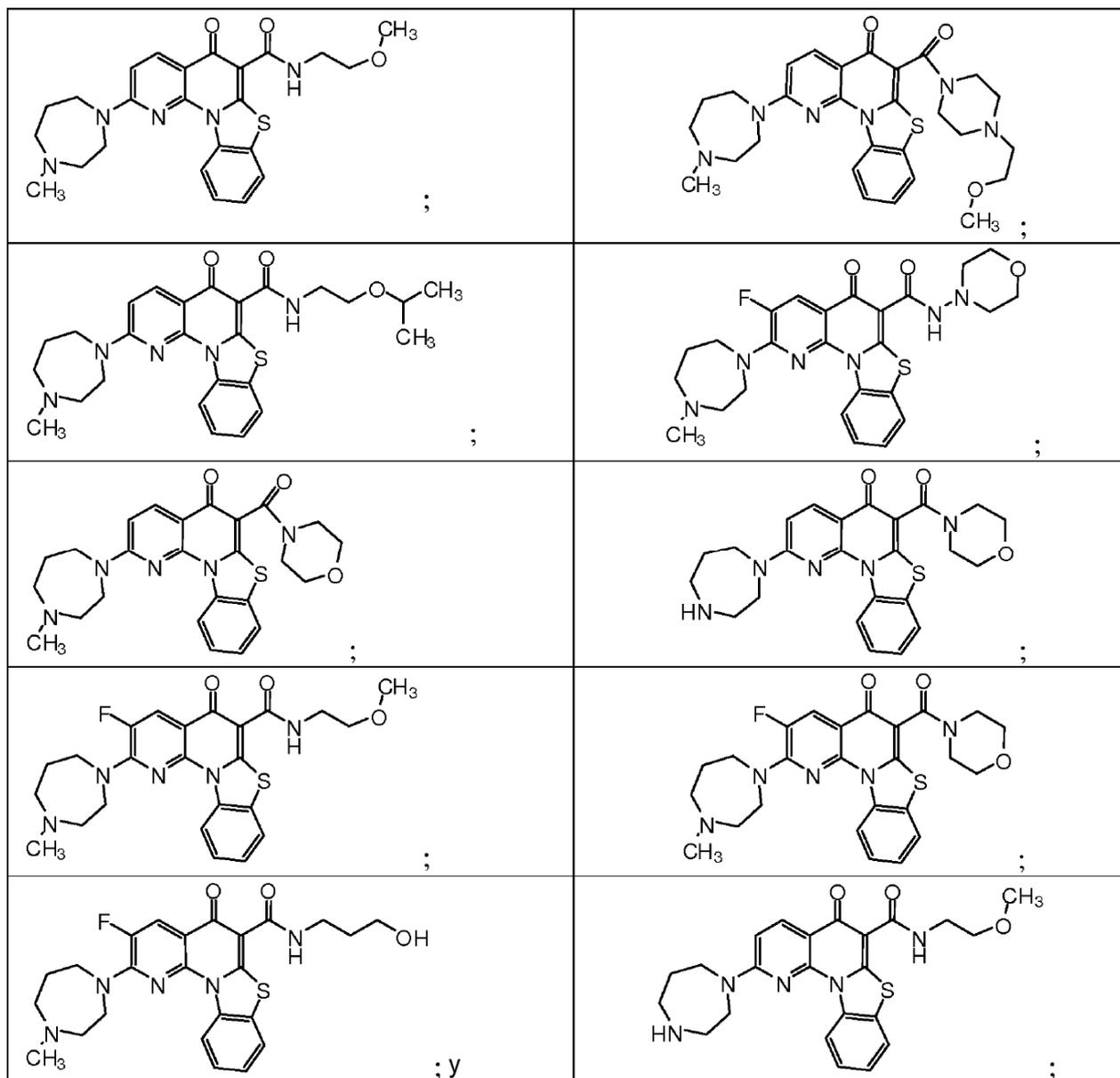
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R⁷ y R⁸ junto con N en -NR⁷R⁸ forman un anillo azacíclico opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en anillo de morfolina, tiomorfolina, piperidina o piperazina.

35 3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde el anillo azacíclico es un anillo de morfolina o piperazina opcionalmente sustituido.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R⁷ es H y R⁸ se selecciona de -CH₂CH₂OCH₃, -CH₂CH₂OCH(CH₃)₂, -CH₂-(piridina), -CH₂-(metil piridina), -CH₂-(pirimidina), -CH₂-(metil pirimidina), -CH₂-(pirazina), -CH₂-(metil pirazina), -CH₂-(imidazol), -CH₂-(N-metil imidazol); -CH₂-(pirrolidina), -CH₂-(N-metil pirrolidina); -CH₂-(tiazol); y CH₂-(N-metil tiazol).

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R⁴ es H o metilo.

5 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:



o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 8. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método para tratar un trastorno de proliferación celular.

9. Un compuesto para su uso según la reivindicación 8, en donde el trastorno de proliferación celular es un tumor o cáncer.

10. Un compuesto para su uso según la reivindicación 8, en donde el trastorno de proliferación celular es un trastorno neoplásico hematopoyético.

11. Un compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el trastorno de proliferación celular es un cáncer colorrectal, de mama, pulmón, hígado, páncreas, ganglio linfático, colon, próstata, cerebro, cabeza y cuello, piel, hígado, riñón y corazón.

Figura 1

Comparación de los valores de casete y AUC individuales para la administración oral de compuestos RBI

