

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 632**

51 Int. Cl.:
C07D 211/58 (2006.01)
C07D 401/04 (2006.01)
C07D 207/14 (2006.01)
C07D 403/04 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03711980 .7**
96 Fecha de presentación: **11.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1485353**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54 Título: **NUEVOS INHIBIDORES DE DESACETILASA DE HISTONA.**

30 Prioridad:
13.03.2002 US 363799 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.01.2012

73 Titular/es:
JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE

72 Inventor/es:
ANGIBAUD, Patrick René;
PILATTE, Isabelle Noelle C.;
VAN BRANDT, Sven Franciscus Anna;
ROUX, Bruno;
TEN HOLTE, Peter;
VERDONCK, Marc, Gustaaf, Celine;
MEERPOEL, Lieven y
DYATKIN, Alexey B.

74 Agente: **Pérez Barquín, Eliana**

ES 2 371 632 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

Nuevos inhibidores de desacetilasa de histona

5 La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad enzimática de inhibición de la desacetilasa de histona (HDAC). La misma se refiere además a procedimientos para su preparación, a composiciones que incluyen a los mismos, así como también a su uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, para inhibir la HDAC y como medicina, por ejemplo como medicina para inhibir afecciones proliferativas, tales como el cáncer y la psoriasis.

10 En todas las células eucarióticas, el ADN genómico presente en la cromatina se asocia con histonas para formar nucleosomas. Cada nucleosoma consiste en un octámero proteico formado por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El ADN se enrolla alrededor de este núcleo de proteína, con los aminoácidos básicos de las histonas interactuando con los grupos fosfato del ADN cargados negativamente. La modificación post-transaccional más común de estas histonas del núcleo es la acetilación reversible de los ϵ -amino de residuos de lisina conservados de terminal N, altamente básicos. El estado estable de acetilación de histona está establecido por el equilibrio dinámico entre la(s) acetiltransferasa(s) de histona y la(s) desacetilasa(s) de histona competentes, mencionadas en la presente memoria como "HDAC". La acetilación y desacetilación de histona ha estado enlazada durante mucho tiempo al control transcripcional. La reciente clonación de genes que codifican diferentes acetiltransferasas de histona y desacetilasas de histona, proporcionaron una posible explicación respecto a la relación entre la acetilación de histona y el control transcripcional. La acetilación reversible de histonas puede dar como resultado la remodelación de la cromatina, y como tal, actuar como mecanismo de control para la transcripción de genes. En general, la hiperacetilación de histonas facilita la expresión de gen, mientras que la desacetilación de histona está correlacionada con la represión transcripcional. Se ha demostrado que las acetiltransferasas de histona actúan como co-activadores transcripcionales, mientras que se ha encontrado que las desacetilasas de histona pertenecen a vías de represión transcripcional.

15 El equilibrio dinámico entre la acetilación y la desacetilación de histona es esencial para el crecimiento de la célula. La inhibición de la desacetilasa de histona da como resultado una detención del ciclo de la célula, una diferenciación celular, apoptosis e inversión del fenotipo transformado. Por lo tanto, los inhibidores de HDAC pueden tener un gran potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades o afecciones proliferativas de las células (Marks et al., Nature Reviews: Cáncer 1: 194-202, 2001).

20 El estudio de inhibidores de desacetilasas de histona (HDAC) indica que, en efecto, estas enzimas juegan un importante papel en la proliferación y diferenciación celular. El inhibidor Trichostatin A (TSA) provoca la detención del ciclo celular en ambas fases G1 y G2, revierte el fenotipo transformado de diferentes líneas de células, e induce la diferenciación de células de leucemia de Friend y otras. El TSA (y el ácido suberoilánilida hidroxámico SAHA) han sido descritos como inhibidores del crecimiento celular, inducen diferenciación terminal, e impiden la formación de tumores en ratones (Finnin et al., Nature, 401: 188-193, 1999).

25 El Trichostatin A ha sido descrito como útil en el tratamiento de fibrosis, por ejemplo fibrosis de hígado y cirrosis de hígado. (Geerts et al., solicitud de Patente Europea EP 0 827 742, publicada el 11 de Marzo de 1998).

30 La solicitud de Patente WO 01/38322 publicada el 31 de Mayo de 2001 divulga, entre otros inhibidores de desacetilasa de histona de fórmula general $Cy-L^1-Ar-Y^1-C(O)-NH-Z$, la provisión de composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades y afecciones proliferativas de la célula.

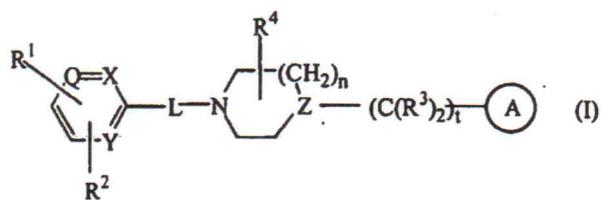
35 La solicitud de Patente WO 01/70675 publicada el 27 de Septiembre de 2001 divulga inhibidores de desacetilasa de histona de fórmula $Cy^2-Cy^1-X-Y^1-W$ y proporciona además composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades y afecciones proliferativas de la célula.

40 El problema que debe ser resuelto consiste en proporcionar inhibidores de desacetilasa de histona con una alta actividad enzimática y que muestren también propiedades ventajosas tales como actividad celular y biodisponibilidad incrementada, con preferencia biodisponibilidad oral, y que tengan efectos colaterales pequeños o nulos.

45 Los nuevos compuestos de la presente invención resuelven el problema descrito anteriormente. Los compuestos difieren de la técnica anterior en su estructura.

50 Los compuestos de la presente invención muestran una excelente actividad enzimática de inhibición de desacetilasa de histona *in vitro*. Los presentes compuestos tienen propiedades ventajosas con relación a la actividad celular y propiedades específicas con relación a la inhibición de la progresión del ciclo de la célula en ambos controles G1 y G2 (capacidad de inducción de p21). Los compuestos de la presente invención muestran buena estabilidad metabólica y una alta biodisponibilidad y, más en particular, muestran biodisponibilidad oral.

55 Esta invención se refiere a compuestos de fórmula general (I):



las formas *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de las mismas, en la que:

- 5 n es 0, 1, 2 ó 3, y cuando n es 0 entonces se busca un enlace directo;
t es 0, 1, 2, 3 ó 4, y cuando t es 0 entonces se busca un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o ;

cada X es nitrógeno o ;

cada Y es nitrógeno o ;

cada Z es nitrógeno o ;

R¹ es -C(O)NH(OH);

R² es hidrógeno, halo, hidroxy, amino, nitro, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi, trifluorometil, di(C₁₋₆ alquilamino) amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinil;

- 10 -L- es un enlace directo;

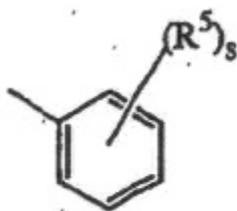
cada R³ representa independientemente un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno puede ser sustituido por un sustituyente elegido a partir de aril;

R⁴ es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxi C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi, aril C₁₋₆ alquil, aminocarbonil, amino C₁₋₆ alquil; aminocarbonil C₁₋₆ alquil, hidroxicarbonil C₁₋₆ alquil, hidroxiaminocarbonil, C₁₋₆ alquiloxicarbonil, C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil o di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;

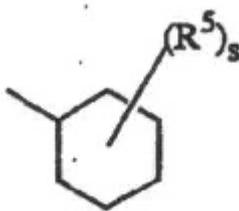
- 15



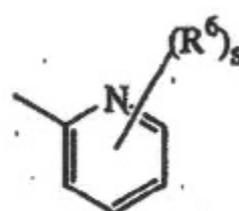
es un radical elegido a partir de:



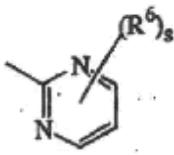
(a-1)



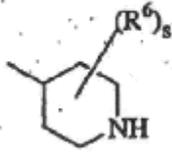
(a-2)



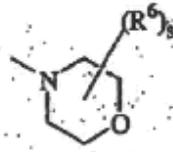
(a-3)



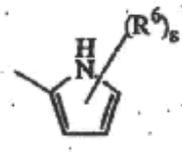
(a-5)



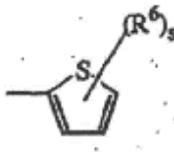
(a-6)



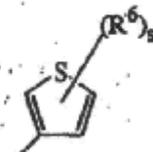
(a-7)



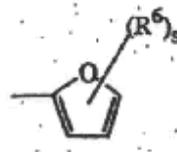
(a-8)



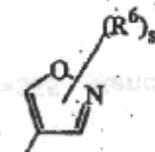
(a-9)



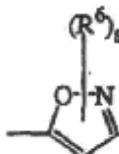
(a-10)



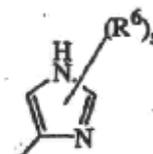
(a-11)



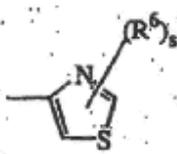
(a-12)



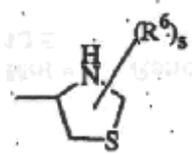
(a-13)



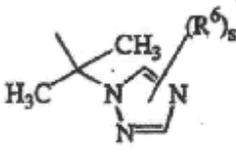
(a-14)



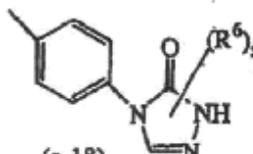
(a-15)



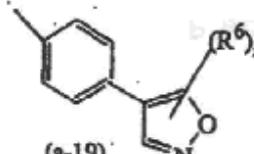
(a-16)



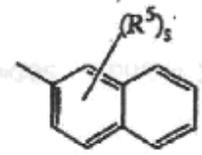
(a-17)



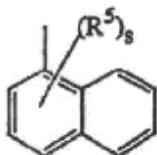
(a-18)



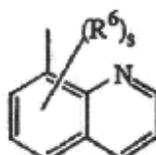
(a-19)



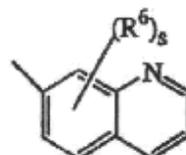
(a-20)



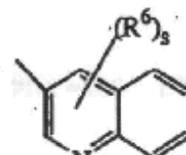
(a-21)



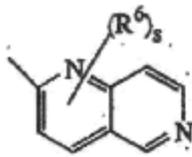
(a-22)



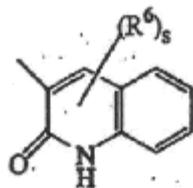
(a-23)



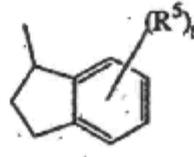
(a-24)



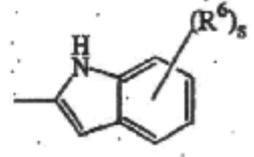
(a-25)



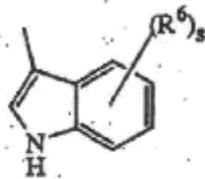
(a-26)



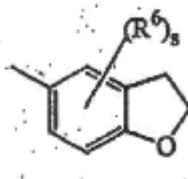
(a-27)



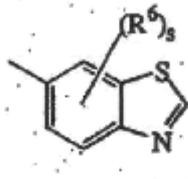
(a-28)



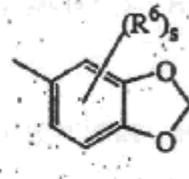
(a-29)



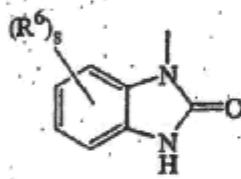
(a-30)



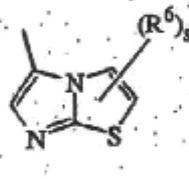
(a-31)



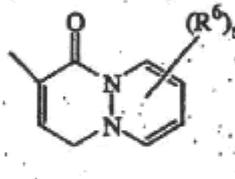
(a-32)



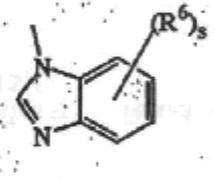
(a-33)



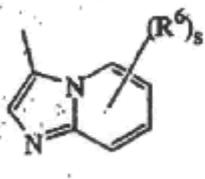
(a-34)



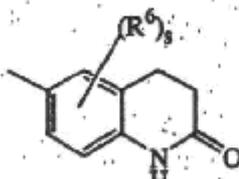
(a-35)



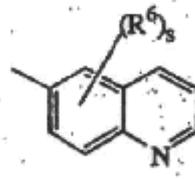
(a-36)



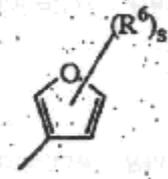
(a-37)



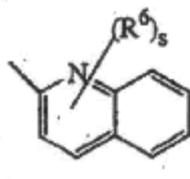
(a-38)



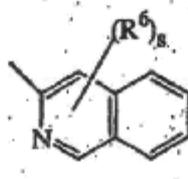
(a-39)



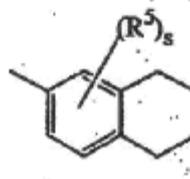
(a-40)



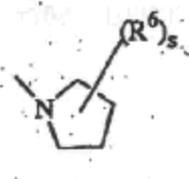
(a-41)



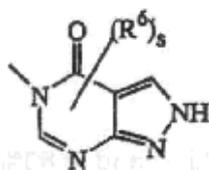
(a-42)



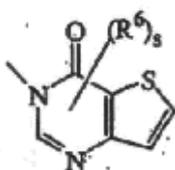
(a-43)



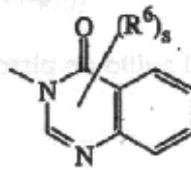
(a-44)



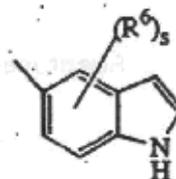
(a-45)



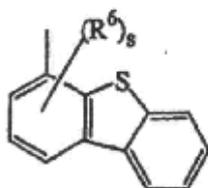
(a-46)



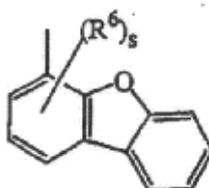
(a-47)



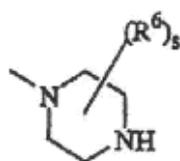
(a-48)



(a-49)



(a-50)



(a-51)

en la que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;
 cada R⁵ y R⁶ se eligen independientemente a partir de hidrógeno; halo; hidroxilo; amino; nitro;
 trihalo C₁₋₆ alquil; trihalo C₁₋₆ alcoxi; C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquil sustituido con aril y C₃₋₁₀ cianoalquil; C₁₋₆ alquiloxi;
 C₁₋₆ alquiloxi C₁₋₆ alquiloxi; C₁₋₆ alquilcarbonil;

- 5 C₁₋₆ alquiloxycarbonil; C₁₋₆ alquilsulfonil; ciano C₁₋₆ alquil; hidroxilo C₁₋₆ alquil;
 hidroxilo C₁₋₆ alquiloxi; hidroxilo C₁₋₆ alquilamino; amino C₁₋₆ alquiloxi;
 di(C₁₋₆ alquil) aminocarbonil; di(hidroxilo C₁₋₆ alquil) amino; (aril) (C₁₋₆ alquil) amino;
 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquiloxi; di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquilamino;
 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; arilsulfonil; arilsulfonilamino;
- 10 ariloxi; ariloxi C₁₋₆ alquil; aril C₂₋₆ alquenoalquil; di(C₁₋₆ alquil) amino;
 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; di(C₁₋₆ alquil) amino (C₁₋₆ alquil) amino;
 di(C₁₋₆ alquil) amino (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino;

- di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino;
 aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino;
 5 di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; ciano; tiofenil; tiofenil sustituido con di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil, di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil, hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil, hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil, di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxipiperidinil, C₁₋₆ alquiloxipiperidinil C₁₋₆ alquil, morfolinil C₁₋₆ alquil, hidroxil C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; o di(hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 10 furanil; furanil sustituido con hidroxil C₁₋₆ alquil; benzofuranil; imidazolil; oxazolil; oxazolil sustituido con aril y C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiltriazolil; tetrazolil; pirrolidinil; pirrolil; piperidinil C₁₋₆ alquiloxil; morfolinil; C₁₋₆ alquilmorfolinil; morfolinil C₁₋₆ alquiloxil;
 morfolinil C₁₋₆ alquil; morfolinil C₁₋₆ alquilamino;
 15 morfolinil C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; piperazinil; C₁₋₆ alquilpiperazinil; C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquiloxil; piperazinil C₁₋₆ alquil; naftalenilsulfonilpiperazinil; naftalenilsulfonilpiperidinil; naftalenilsulfonil; C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquilamino; C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquilpiperazinilsulfonil;
 20 aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquiloxil; aminosulfonilpiperazinil; aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquil; di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilpiperazinil; di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquil; hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil; hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiloxipiperidinil; C₁₋₆ alquiloxipiperidinil C₁₋₆ alquil; piperidinilamino C₁₋₆ alquilamino;
 25 piperidinilamino C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; (C₁₋₆ alquilpiperidinil) (hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquilamino; (C₁₋₆ alquilpiperidinil) (hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; hidroxil C₁₋₆ alquiloxil C₁₋₆ alquilpiperazinil; hidroxil C₁₋₆ alquiloxil C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil;
 30 (hidroxil C₁₋₆ alquil) (C₁₋₆ alquil) amino; (hidroxil C₁₋₆ alquil) (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; hidroxil C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; di(hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; pirrolidinil C₁₋₆ alquil; pirrolidinil C₁₋₆ alquiloxil; pirazolil; tiopirazolil; pirazolil sustituido con dos sustituyentes elegidos a partir de C₁₋₆ alquil o trihalo C₁₋₆ alquil; piridinil; piridinil sustituido con C₁₋₆ alquiloxil, ariloxil o aril; pirimidinil; tetrahidropirimidinilpiperazinil; tetrahidropirimidinilpiperazinil C₁₋₆ alquil;
 35 quinolinil; indol; fenil; fenil sustituido con uno, dos o más sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo, amino, nitro, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxil, hidroxil C₁₋₄ alquil, trifluorometil, trifluorometiloxil, hidroxil C₁₋₄ alquiloxil, C₁₋₄ alquilsulfonil, C₁₋₄ alquiloxil, C₁₋₄ alquiloxicarbonil, amino C₁₋₄ alquiloxil, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquiloxil, di(C₁₋₄ alquil) amino, di(C₁₋₄ alquil) aminocarbonil, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil (C₁₋₄ alquil) amino, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil, aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino, aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil, di(C₁₋₄ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino, di(C₁₋₄ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₆ alquil, ciano, piperidinil C₁₋₄ alquiloxil, pirrolidinil C₁₋₄ alquiloxil, aminosulfonilpiperazinil, aminosulfonilpiperazinil C₁₋₄ alquil, di(C₁₋₄ alquil) aminosulfonilpiperazinil, di(C₁₋₄ alquil) sulfonilpiperazinil C₁₋₄ alquil, hidroxil C₁₋₄ alquilpiperazinil, hidroxil C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquiloxipiperidinil, C₁₋₄ alquiloxipiperidinil C₁₋₄ alquil, hidroxil C₁₋₄ alquiloxil C₁₋₄ alquilpiperazinil, hidroxil C₁₋₄ alquiloxil C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquil, (hidroxil C₁₋₄ alquil) (C₁₋₄ alquil) amino, (hidroxil C₁₋₄ alquil) (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil, di(hidroxil C₁₋₄ alquil) amino, di(hidroxil C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil, furanil, furanil sustituido con -CH=CH-CH=CH-, pirrolidinil C₁₋₄ alquil, pirrolidinil C₁₋₄ alquiloxil, morfolinil, morfolinil C₁₋₄ alquiloxil, morfolinil C₁₋₄ alquil, morfolinil C₁₋₄ alquilamino, morfolinil C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil, piperazinil, C₁₋₄ alquilpiperazinil, C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquiloxil, piperazinil C₁₋₄ alquil, C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquil, C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquilamino, C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquilamino C₁₋₆ alquil, tetrahidropirimidinilpiperazinil, tetrahidropirimidinilpiperazinil C₁₋₄ alquil, piperidinilamino C₁₋₄ alquilamino, piperidinilamino C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil, (C₁₋₄ alquilpiperidinil) (Hidroxil C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino, (C₁₋₄ alquilpiperidinil) (hidroxil C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil, piridinil C₁₋₄ alquiloxil, hidroxil C₁₋₄ alquilamino, hidroxil C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino, aminotiadiazolil, aminosulfonilpiperazinil C₁₋₄ alquiloxil, o tiofenil C₁₋₄ alquilamino;
 pudiendo cada R⁵ y R⁶ ser colocado sobre el nitrógeno en sustitución del hidrógeno;
 el aril en lo que antecede es fenil, o fenil sustituido con uno o más sustituyentes, cada uno de ellos elegido de forma independiente, seleccionados a partir de halo, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxil, trifluorometil, ciano o hidroxicarbonil.
 60 El término "inhibidor de desacetilasa de histona" o "inhibidor de la desacetilasa de histona" se utiliza para identificar un compuesto que está capacitado para interactuar con una desacetilasa de histona e inhibir su actividad, más en particular su actividad enzimática. Inhibición de la actividad enzimática de la desacetilasa de histona significa reducir la capacidad de la desacetilasa de histona para separar un grupo acetil de una histona. Con preferencia, tal inhibición es específica, es decir, el inhibidor de desacetilasa de histona reduce la capacidad de una desacetilasa de histona para separar un grupo acetil de una histona a una concentración que es más baja que la concentración del
 65

inhibidor que se requiere para producir algún otro efecto biológico, no relacionado.

Según se utiliza en las definiciones que anteceden y en las que siguen a continuación, se refiere en general a flúor, cloro, bromo y yodo; C₁₋₄ alquil define radicales hidrocarburos saturados de cadena recta y ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono tal como, por ejemplo, metil, etil, propil butil, 1-metiletil, 2-metilpropil y similares; C₁₋₆ alquil incluye C₁₋₄ alquil y los homólogos más altos del mismo que tienen de 5 a 6 átomos de carbono, tal como, por ejemplo, pentil, 2-metil-butil, hexil, 2-metilpentil y similares; C₁₋₆ alcanodiil define radicales hidrocarburos saturados bivalentes de cadena recta o ramificada que tienen de 1 a 6 átomos de carbono tal como, por ejemplo, metileno, 1,2-etanodiil, 1,3-propanodiil, 1,4-butanodiil, 1,5-pentanodiil, 1,6-hexanodiil y los isómeros ramificados de los mismos tal como 2-metilpentanodiil, 3-metilpentanodiil, 2,2-dimetilbutanodiil, 2,3-dimetilbutanodiil y similares; trihalo C₁₋₆ alquil define C₁₋₆ alquil que contiene tres sustituyentes halo idénticos o diferentes como por ejemplo trifluorometil; C₂₋₆ alquenodiil define radicales hidrocarburos bivalentes de cadena recta o ramificada que contienen un doble enlace y que tienen de 2 a 6 átomos de carbono tal como, por ejemplo, etenodiil, 2-propenodiil, 3-butenodiil, 2-pentenodiil, 3-pentenodiil, 3-metil-2-butenodiil, y similares; aminoaril define aril sustituido con amino;

C₃₋₁₀ cicloalquil incluye grupos hidrocarburo cíclicos que tienen de 3 a 10 átomos de carbono, tal como ciclopropil, ciclobutil, ciclohexil, ciclohexenil, cicloheptil, ciclooctil y similares.

Las sales de adición farmacéuticamente aceptables abarcan las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, según se ha mencionado en lo que antecede, significa que comprenden las formas de sal de adición de ácido no tóxico terapéuticamente activas que los compuestos de fórmula (I) sean capaces de formar. Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades básicas pueden ser convertidos en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables tratando la citada forma de base con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como los ácidos hidrácidos, como por ejemplo el ácido clorhídrico o bromhídrico; sulfúrico, nítrico, fosfórico y ácidos similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, trifluoroacético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir, ácido butanodióico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, benzenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-amino salicílico, pamoico y ácidos similares.

Los compuestos de fórmula (I) que tienen propiedades ácidas pueden ser convertidos en sus sales de adición de base farmacéuticamente aceptables tratando la citada forma de ácido con una base orgánica o inorgánica adecuada. Las formas apropiadas de sal de base comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metal alcalino y alcalino térreo, como por ejemplo las sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, como por ejemplo las sales de benzatina, *N*-metil-D-glucamina, hidrabamina, y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares.

El término "sales de adición de ácido o base" comprende también las formas de adición hidrato y solvente, que los compuestos de fórmula (I) sean capaces de formar. Ejemplos de tales formas son, por ejemplo, los hidratos, alcoholatos y similares.

El término "formas estereoquímicamente isoméricas de compuestos de fórmula (I)", según se utiliza en la presente memoria, define todos los compuestos posibles formados por los mismos átomos enlazados por la misma secuencia de enlaces, pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables, que los compuestos de fórmula (I) puedan poseer. A menos que se mencione o se indique otra cosa, la designación química de un compuesto abarca todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles, que dicho compuesto pudiera poseer. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular base de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de fórmula (I), tanto en forma pura como en mezcla de unos con otros, está previsto que caigan dentro del alcance de la presente invención.

Las formas *N*-óxido de los compuestos de fórmula (I) se entiende que comprenden aquellos compuestos de fórmula (I) en los que uno o varios átomos de nitrógeno están oxidizados según lo que conoce como *N*-óxido, en particular aquellos *N*-óxidos en los que uno o más de los piperidina-, piperazina- o piridazinil-nitrógenos están *N*-oxidizados.

Algunos de los compuestos de fórmula (I) pueden existir también en sus formas tautoméricas. Tales formas, aunque no están explícitamente indicadas en la fórmula anterior, se entiende que están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

Siempre que se utilice en lo que sigue, el término "compuestos de fórmula (I)" significa que incluye también las sales de adición farmacéuticamente aceptables y todas las formas estereoisoméricas.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "desacetilasa de histona" y "HDAC" está previsto que se refieran a una cualquiera de una familia de enzimas que separan grupos acetil de los grupos ε-amino de residuos de lisina en el término N de una histona. A menos que se indique otra cosa por contexto, el término "histona" significa que se refiere a cualquier proteína de histona, incluyendo la H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5, de cualquiera de las especies. Las proteínas de HDAC humanas o productos de gen incluyen, aunque sin limitación, las HDAC-1, HDAC-

2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9 y HDAC-10. La desacetilasa de histona puede ser también derivada de una fuente de protozoos o de hongos.

5 Un primer grupo de compuestos interesantes consiste en aquellos compuestos de fórmula (I) en los que se aplica una o más de las siguientes restricciones:

- 10 a) n es 1 ó 2;
 b) t es 0, 1, 2 ó 4;
 c) cada Q es



- 15 d) R^1 es $-C(O)NH(OH)$;
 e) R^2 es hidrógeno o nitro;
 f) $-L-$ es un enlace directo;
 g) R^4 es hidrógeno;
 h)



20 es un radical elegido a partir de (a-1), (a-2), (a-3), (a-5), (a-6), (a-11), (a-18), (a-20), (a-21), (a-32), (a-33), (a-47) o (a-51);

- 25 i) cada s es independientemente 0, 1, 2 ó 4;
 j) cada R^5 y R^6 se eligen independientemente a partir de hidrógeno; halo; trihalo C_{1-6} alquil; C_{1-6} alquil sustituido con aril y C_{3-10} cicloalquil; C_{1-6} alquilcarbonil; benzofuranil; naftalenilsulfonil; piridinil sustituido con ariloxi; fenil; o fenil sustituido con un sustituyente elegido independientemente a partir de hidroxil C_{1-4} alquil o morfolinil C_{1-4} alquil.

30 Un segundo grupo de compuestos interesantes consiste en aquellos compuestos de fórmula (I) en los que se aplica una o más de las siguientes restricciones:

- 35 a) n es 1;
 b) t es 0, 1 ó 2;
 c) cada Q es



- 40 d) cada X es nitrógeno;
 e) cada Y es nitrógeno;
 f) R^1 es $-C(O)NH(OH)$;;
 g) R^2 es hidrógeno;
 h) $-L-$ es un enlace directo;
 i) Cada R^3 representa independientemente un átomo de hidrógeno;
 j) R^4 es hidrógeno;
 k)



45 es un radical elegido a partir de (a-6), (a-11), (a-20), (a-47) o (a-51);
 l) cada s es independientemente 0, 1 ó 4;
 m) cada R^5 y R^6 se eligen independientemente a partir de hidrógeno; C_{1-6} alquil; C_{1-6} alcoxi; naftalenilsulfonil, o fenil sustituido con hidroxil C_{1-4} alquil o morfolinil C_{1-4} alquil.

50 Un tercer grupo de compuestos interesantes consiste en aquellos compuestos de fórmula (I) en los que se aplica una o más de las siguientes restricciones:

- a) R^1 es $-C(O)NH(OH)$;

b) -L- es un enlace directo.

Un cuarto grupo de compuestos interesantes consiste en aquellos compuestos de fórmula (I) en los que se aplica una o más de las siguientes restricciones:

- 5
- a) t es 1, 2, 3 ó 4;
- b) R^1 es $-C(O)NH(OH)$;
- c) R^2 es hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, nitro, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi, trifluorometil o $di(C_{1-6}$ alquil) amino;
- d) -L- es un enlace directo;
- 10 e) R^4 es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilo C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi, aril C_{1-6} alquil, aminocarbonil, amino C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquilamino C_{1-6} alquil o $di(C_{1-6}$ alquil) amino C_{1-6} alquil;
- f)



- 15 es un radical elegido a partir de (a-1), (a-3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42), (a-44), (a-45), (a-46), (a-47), (a-48) y (a-51);
- g) cada s es independientemente 0, 1, 2, 3 ó 4;
- 20 h) R^5 es hidrógeno; halo; hidroxilo; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alquil; trihalo C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquil; C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquilcarbonil; C_{1-6} alquiloxicarbonil; C_{1-6} alquilsulfonil; hidroxilo C_{1-6} alquil; ariloxi; $di(C_{1-6}$ alquil) amino; ciano; tiofenil; furanil; furanil sustituido con hidroxilo C_{1-6} alquil; benzofuranil; imidazolil; oxazolil; oxazolil sustituido con aril y C_{1-6} alquil; C_{1-6} alquiltriazolil; tetrazolil; pirrolidinil; pirrolil; morfolinil; C_{1-6} alquilmorfolinil; piperazinil; C_{1-6} alquimpiperazinil; hidroxilo C_{1-6} alquimpiperazinil; C_{1-6} alquiloxipiperidinil; pirazolil; pirazolil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos a partir de C_{1-6} alquil o trihalo C_{1-6} alquil; piridinil sustituido con C_{1-6} alquiloxi, ariloxi o aril; pirimidinil; quinolinil; indol; fenil; o fenil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi o trifluorometil;
- 25 C_{1-6} alquilmorfolinil; piperazinil; C_{1-6} alquimpiperazinil; hidroxilo C_{1-6} alquimpiperazinil; C_{1-6} alquiloxipiperidinil; pirazolil; pirazolil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos a partir de C_{1-6} alquil o trihalo C_{1-6} alquil; piridinil sustituido con C_{1-6} alquiloxi, ariloxi o aril; pirimidinil; quinolinil; indol; fenil; o fenil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi o trifluorometil;
- 30 i) R^9 es hidrógeno; halo; hidroxilo; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alquil; trihalo C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquil; C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquilcarbonil; C_{1-6} alquiloxicarbonil; C_{1-6} alquilsulfonil; hidroxilo C_{1-6} alquil; ariloxi; $di(C_{1-6}$ alquil) amino; ciano; piridinil; fenil; o fenil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi o trifluorometil.
- 35

Un grupo de compuestos preferidos consiste en aquellos compuestos de fórmula (I) en los que t es 1, 2, 3 ó 4;

R^1 es $-C(O)NH(OH)$;

R^2 es hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, nitro, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi, trifluorometil o

40 $di(C_{1-6}$ alquil) amino;

-L- es un enlace directo;

R^4 es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilo C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi,

aril C_{1-6} alquil, aminocarbonil, amino C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquilamino C_{1-6} alquil o $di(C_{1-6}$ alquil) amino C_{1-6} alquil;



- 45 es un radical elegido a partir de (a-1), (a-3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42), (a-44), (a-45), (a-46), (a-47), (a-48) y (a-51);
- 50 cada s es independientemente 0, 1, 2, 3 ó 4;
- R^5 es hidrógeno; halo; hidroxilo; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alquil; trihalo C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquil; C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquilcarbonil; C_{1-6} alquiloxicarbonil; C_{1-6} alquilsulfonil; hidroxilo C_{1-6} alquil; ariloxi; $di(C_{1-6}$ alquil) amino; ciano; tiofenil; furanil; furanil sustituido con hidroxilo C_{1-6} alquil; benzofuranil; imidazolil; oxazolil; oxazolil sustituido con aril y C_{1-6} alquil; C_{1-6} alquiltriazolil; tetrazolil; pirrolidinil; pirrolil; morfolinil; C_{1-6} alquilmorfolinil; piperazinil; C_{1-6} alquimpiperazinil; hidroxilo C_{1-6} alquimpiperazinil; C_{1-6} alquiloxipiperidinil; pirazolil; pirazolil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos a partir de C_{1-6} alquil o trihalo C_{1-6} alquil; piridinil; piridinil sustituido con C_{1-6} alquiloxi, ariloxi o aril; pirimidinil; quinolinil; indol; fenil; o fenil
- 55

sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi o trifluorometil;

R⁶ es hidrógeno; halo; hidroxilo; amino; nitro; trihalo C₁₋₆ alquil; trihalo C₁₋₆ alquiloxi;

C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiloxi; C₁₋₆ alquilcarbonil; C₁₋₆ alquiloxicarbonil;

5 C₁₋₆ alquilsulfonyl; hidroxilo C₁₋₆ alquil; ariloxi; di(C₁₋₆ alquil) amino; ciano; piridinil; fenil; o fenil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi o trifluorometil.

Un grupo adicional de compuestos preferidos son aquellos compuestos de fórmula (I) en los que n es 1 ó 2; t es 0, 1, 2 ó 4; cada Q es

10



R¹ es -C(O)NH(OH); R² es hidrógeno o nitro; -L- es un enlace directo; R⁴ es hidrógeno;



15

es un radical elegido a partir de (a-1), (a-2), (a-3), (a-5), (a-6), (a-11), (a-18), (a-20), (a-21), (a-32), (a-33), (a-47) o (a-51);

cada s es independientemente 0, 1, 2 ó 4; cada R⁵ y R⁶ se eligen independientemente a partir de hidrógeno; halo;

20

trihalo C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquil sustituido con aril y C₃₋₁₀ cicloalquil; C₁₋₆ alquiloxi; C₁₋₆ alquilcarbonil; benzofuranil; naftalenilsulfonyl; piridinil sustituido con ariloxi; fenil; o fenil sustituido con un sustituyente elegido independientemente a partir de hidroxilo C₁₋₄ alquil o morfolinil C₁₋₄ alquil.

Un grupo de compuestos más preferidos son aquellos compuestos de fórmula (I) en la que n es 1; t es 0 ó 1; cada Q es

25



cada X es nitrógeno; cada Y es nitrógeno; R¹ es -C(O)NH(OH); R² es hidrógeno; -L- es un enlace directo; cada R³ representa independientemente un átomo de hidrógeno; R⁴ es hidrógeno;

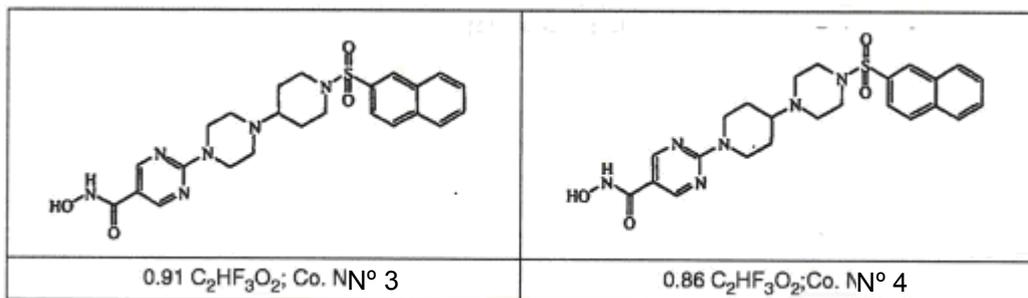
30



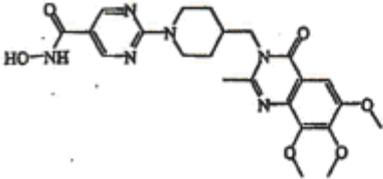
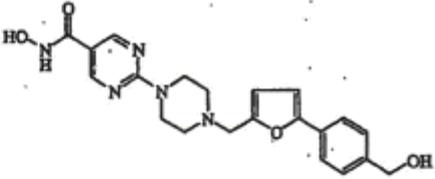
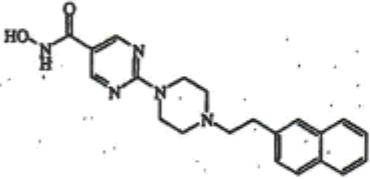
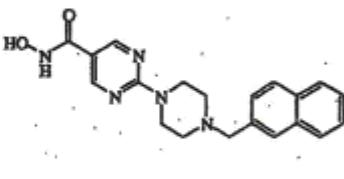
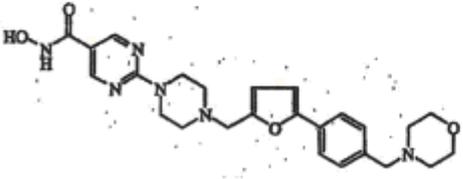
es un radical elegido a partir de (a-6) elegido a partir de (a-6), (a-11), (a-20), (a-47) o (a-51); cada s es independientemente 0, 1 ó 4; y cada R⁵ y R⁶ se eligen independientemente a partir de hidrógeno; C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiloxi; naftalenilsulfonyl; o aril sustituido con hidroxilo C₁₋₄ alquil o morfolinil C₁₋₄ alquil.

35

Los compuestos más preferidos son los compuestos núm. 3, núm. 4, núm. 8, núm. 5, núm. 7, núm. 6 y núm. 9.

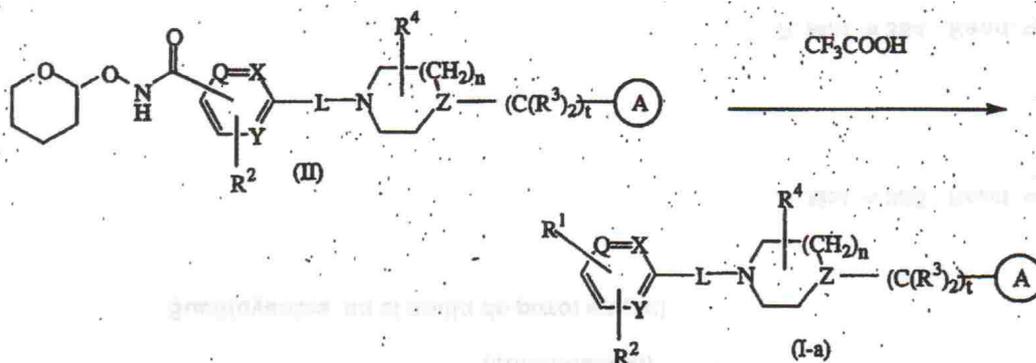


(continuación)

	
$C_2HF_3O_2$ (1:1); Co. NN° 8	0.83 $C_2HF_3O_2$; Co. NN° 5
	
0.79 $C_2HF_3O_2$; Co; NN° 7	0.83 $C_2HF_3O_2$; Co; NN° 6
	
0.47 H_2O 1.99 $C_2HF_3O_2$; Co. NN° 9	

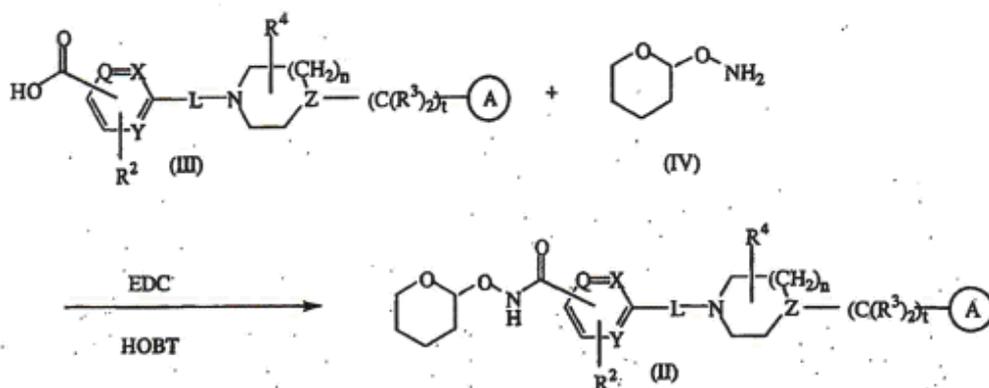
5 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales y N-óxidos farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, pueden ser preparadas de una manera convencional. Una vía de síntesis general abarca, como ejemplo:

10 a) Ácidos hidroxámicos de fórmula (1) en la que R^1 es $-C(O)NH(OH)$, siendo dichos compuestos mencionados como compuestos de fórmula (I-a), que pueden ser preparados haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (II) con un ácido apropiado, tal como por ejemplo, ácido trifluoro acético. Dicha reacción se realiza en un solvente apropiado, tal como, por ejemplo, metanol.

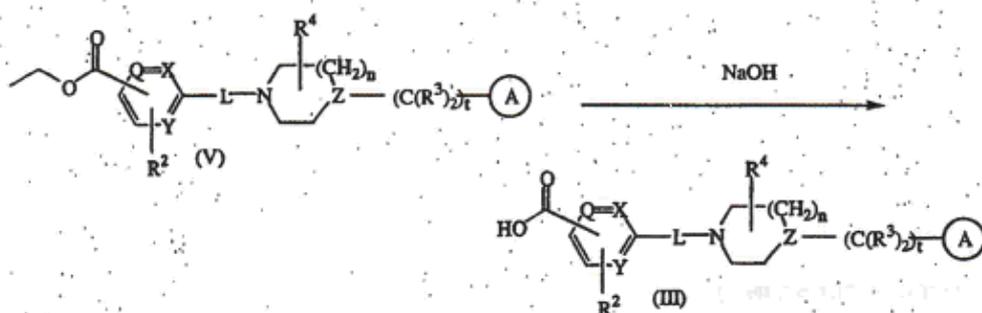


15 b) los productos intermedios de fórmula (II) pueden ser preparados haciendo reacción un producto intermedio de fórmula (III) con un producto intermedio de fórmula (IV) en presencia de un reactivo apropiado tal como N-(etilcarbonimidil)-N,N dimetil-1,3-propanodiamina, monohidrocloreto (EDC) y 1-hidroxil-1H-benzotrazol (HOBT). La reacción puede ser llevada a cabo en un solvente adecuado tal como una mezcla de DCM y de THF.

20



c) se pueden preparar productos intermedios de fórmula (III) haciendo reaccionar un producto intermedio de fórmula (V) con una base apropiada tal como NaOH en presencia de un solvente adecuado tal como etanol.



5 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser también preparados convenientemente utilizando técnicas de síntesis de fase sólida. En general, la síntesis de fase sólida incluye hacer reaccionar un producto intermedio en una síntesis con un soporte de polímero. Este producto intermedio soportado en polímero puede ser transportado entonces a través de un cierto número de etapas. Después de cada etapa, filtrando la resina y lavándola numerosas veces con varios solventes se eliminan las impurezas. En cada etapa la resina puede ser dividida para que reaccione con varios productos intermedios en la siguiente etapa permitiendo de ese modo la síntesis de un gran número de compuestos. Después de la última etapa del procedimiento, la resina se trata con un reactivo o un proceso para extraer la resina de la muestra. Una explicación más detallada de las técnicas usadas en química de fase sólida se describe, por ejemplo, en "El Índice Combinatorio" (B. Bunin, Academic Press) y en Novabloch² 1999 Catalogue & Peptide Synthesis Handbook (Novabloch² AG, Suiza), ambos documentos incorporados aquí como referencia.

15 Los compuestos de fórmula (I) y algunos de los productos intermedios pueden tener al menos un centro estereogénico en su estructura. Este centro estereogénico puede estar presente según una configuración R o S.

20 Los compuestos de fórmula (I) según se preparan en los procesos descritos en lo que antecede, pueden ser mezclas racémicas de enantiómeros, que pueden ser separados unos de otros siguiente procedimientos de resolución conocidos en el estado de la técnica. Los compuestos racémicos de fórmula (I) pueden ser convertidos en las correspondientes formas de sales diastereoméricas mediante reacción con un ácido quiral adecuado. Dichas formas de sales diastereoméricas son posteriormente separadas, por ejemplo mediante cristalización selectiva o fraccional y los enantiómeros son liberados de las mismas mediante álcali. Una manera alternativa de separar las formas enantioméricas de los compuestos de fórmula (I) incluye cromatografía de líquido con la utilización de una fase quiral estacionaria. Dichas formas isoméricas estereoquímicamente puras pueden ser derivadas también de las correspondientes formas isoméricas estereoquímicamente puras de materiales de partida apropiadas, siempre que la reacción ocurra estereoespecíficamente. Con preferencia, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto podría ser sintetizado mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos podrán emplear ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

30 Los compuestos de fórmula (1), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y las formas estereoisoméricas de las mismas, tienen propiedades farmacológicas válidas debido a que las mismas tienen un efecto inhibitorio de la desacetilasa de histona (HDAC).

35 Esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento anormal de las células, incluyendo las células

transformadas, mediante administración de una cantidad efectiva de un compuesto de la invención. El crecimiento anormal de células se refiere al crecimiento de la célula independiente de los mecanismos reguladores normales (por ejemplo, inhibición por pérdida de contacto). Esto incluye la inhibición del crecimiento de un tumor tanto directamente, provocando la detención del crecimiento, la diferenciación terminal y/o la apoptosis de células cancerígenas, como indirectamente, inhibiendo la neovascularización de tumores.

Esta invención proporciona también un método para inhibir el crecimiento de un tumor mediante administración de una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, a un sujeto, por ejemplo un mamífero (y más en particular un humano) que necesite tal tratamiento. En particular, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de tumores por administración de una cantidad efectiva de los compuestos de la presente invención. Ejemplos de tumores que pueden ser inhibidos, aunque sin limitación, son el cáncer de pulmón (por ejemplo, el adenocarcinoma e incluyendo el cáncer de pulmón de célula no pequeña), cánceres pancreáticos (por ejemplo, el carcinoma pancreático tal como, por ejemplo, el carcinoma pancreático exocrino), cáncer de colon (por ejemplo, carcinomas tales como, por ejemplo, adenocarcinoma y adenoma de colon), cáncer de próstata incluyendo la enfermedad en estado avanzado, los tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico (por ejemplo, la leucemia linfocítica aguda, el linfoma de células B, el linfoma de de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, la leucemia mielógena aguda (AML)), el cáncer folicular de tiroides, el síndrome mielodisplásico (MDS), los tumores de origen mesenquimal (por ejemplo, los fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), los melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de piel (por ejemplo, los queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de pecho avanzado), carcinoma de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidémico.

El compuesto conforme a la invención puede ser usado para otros propósitos terapéuticos, por ejemplo:

- a) sensibilización de tumores a la radioterapia por administración del compuesto conforme a la invención antes, durante o después de la irradiación del tumor, para tratar el cáncer;
- b) tratamiento de artropatías y afecciones osteopatológicas tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, gota, poliartritis, artritis psoriásica; espondilitis anquilosante y lupus eritematoso sistémico;
- c) inhibición de proliferación celular de músculo suave, incluyendo los desórdenes proliferativos vasculares, la aterosclerosis y la restenosis;
- d) tratamiento de afecciones inflamatorias y afecciones dérmicas tales como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la rinitis alérgica, injerto frente a enfermedad del anfitrión, conjuntivitis, asma, ARDS, enfermedad de Behcets, rechazo de trasplante, urticaria, dermatitis alérgica, alopecia areata, escleroderma, exantema; eccema, dermatomiositis, acné, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfisema, fibrosis quística y bronquitis crónica;
- e) tratamiento de endometriosis, fibroides uterina, sangrado uterino disfuncional e hiperplasia endometrial;
- f) tratamiento de vascularización ocular incluyendo la vasculopatía que afecta a los vasos retinales y coroidales;
- g) tratamiento de una disfunción cardíaca;
- h) inhibición de afecciones inmunosupresivas tales como el tratamiento de infección de VIH;
- i) tratamiento de disfunción renal;
- j) supresión de desórdenes endocrinos;
- k) inhibición de disfunción de gluconeogénesis;
- l) tratamiento de una neuropatología, por ejemplo la enfermedad de Parkinson o de una neuropatología que dé como resultado un desorden cognitivo, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer o poliglutamina relacionada con enfermedades neuronales;
- m) inhibición de una patología neuromuscular, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica;
- n) tratamiento de la atrofia muscular espinal;
- o) tratamiento de otras afecciones patológicas propicias para su tratamiento mediante potenciación de expresión de un gen;
- p) aumento de terapia de gen.

Para ello, la presente invención divulga los compuestos de fórmula (I) para el uso como medicina, así como también el uso de estos compuestos de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una o más de las afecciones mencionadas en lo que antecede.

En los compuestos de fórmula (I), las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y las formas estereoisoméricas de las mismas pueden tener propiedades diagnósticas válidas debido a que las mismas pueden ser usadas para detectar o identificar una HDAC en una muestra biológica que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto etiquetado y una HDAC.

Los métodos de detección o identificación pueden usar compuestos que estén etiquetados con agentes de etiquetamiento tales como radioisótopos, sustancias fluorescentes enzimáticas, sustancias luminosas, etc. Los ejemplos de radioisótopos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^3H y ^{14}C . Las enzimas se han normalmente detectables por conjugación de un sustrato apropiado que, a su vez, cataliza una reacción detectable. Ejemplos del mismo incluyen, por ejemplo, la beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa, con

preferencia peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aecuorina y luciferasa.

Las muestras biológicas pueden ser definidas como tejido corporal o como fluidos corporales. Ejemplos de fluidos corporales son el fluido cerebroespinal, sangre, plasma, suero, orina, esputo, saliva y similares.

5 En vista de sus propiedades farmacológicas habituales, los compuestos objeto pueden ser formulados según varias formas farmacéuticas a efectos de administración.

10 Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, una cantidad efectiva de un compuesto particular, en forma de sal de adición de base o de ácido, se combina como ingrediente activo en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, cuyo portador puede tener una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para su administración. Estas composiciones farmacéuticas se proporcionan deseablemente en forma de dosis unitarias adecuadas, preferentemente, para su administración oral, rectal, percutánea, o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosis oral se puede emplear cualquier medio farmacéutico habitual, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcohóles y similares en el caso de preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o portadores sólidos tales como almidón, azúcares, caolín, lubricantes, ligantes, agentes de desintegración y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y tabletas.

20 Debido a su facilidad de administración, las tabletas y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el portador comprenderá normalmente agua estéril, al menos en gran parte, por medio de otros ingredientes, que se pueden incluir para ayudar por ejemplo a la solubilidad. Se pueden preparar soluciones inyectables, por ejemplo, en las que el portador comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y glucosa. Se pueden preparar también suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente incrementador de la penetración y/o un agente de mojado adecuado, combinados opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, cuyos aditivos no causen un efecto deletéreo significativo en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser ayuda para preparar las composiciones deseadas. Esas composiciones pueden ser administradas de diversas formas, por ejemplo como parche transdérmico, pegatina o unguento.

35 Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas en lo que antecede en forma de dosis unitaria para facilidad y uniformidad de administración de la dosis. La forma de dosis unitaria, según se utiliza en la descripción y reivindicaciones de la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, junto con el portador farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas de dosis unitarias son las tabletas (incluyendo las compuestas o recubiertas), cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples derivados de las mismas.

45 Los expertos en la materia podrán determinar fácilmente la cantidad efectiva a partir de los resultados de los ensayos que se presentan en lo que sigue. En general, se contempla que una cantidad terapéuticamente efectiva podría ser desde 0,005 mg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal, y en particular desde 0,005 mg/kg hasta 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida en forma de dos, tres, cuatro o más sub-dosis a intervalos apropiados a través del día. Dichas sub-dosis pueden estar formuladas en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, que contenga de 0,5 a 500 mg, y en particular de 10 mg a 500 mg de ingrediente efectivo por cada forma de dosificación unitaria.

50 Según otro aspecto de la presente invención, se prevé una combinación de un inhibidor de HDAC con otro agente anti-cáncer, especialmente para el uso en medicina, más específicamente en el tratamiento del cáncer o de enfermedades relacionadas.

55 Para el tratamiento de las afecciones que anteceden, los compuestos de la invención pueden ser empleados ventajosamente en combinación con uno o más de otros agentes medicinales, más en particular con otros agentes anti-cáncer. Ejemplos de agentes anti-cáncer son:

- 60 - compuestos de coordinación de platino, por ejemplo cisplatino, carboplatino u oxaliplatino;
- compuestos de taxano, por ejemplo paclitaxel o docetaxel;
- inhibidores de topoisomerasa I, tal como compuestos de camptotecina, por ejemplo irinotecan o topotecan;
- inhibidores de topoisomerasa II, tal como derivados de prodofilotoxina anti-tumor, por ejemplo etoposida o teniposida;
- 65 - alcaloides vinca anti-tumor, por ejemplo vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- derivados de nucleótido anti-tumor, por ejemplo 5-fluorouracil, gemcitabina o capecitabina;
- agentes alquilantes, tal como mostaza de nitrógeno o nitrosourea, por ejemplo ciclofosfamida, clorambucil,

- carmustina o lomustina;
- derivados de antraciclina anti-tumor, por ejemplo daunorubicina, doxorubicina, idarubicina o mitoxantrona;
- anticuerpos HER2, por ejemplo trastuzumab;
- 5 - antagonistas de receptor de estrógeno o moduladores selectivos de receptor de estrógeno, por ejemplo tamoxifen, toremifeno, droloxifeno, faslodex o raloxifeno;
- inhibidores de aromatasa, tal como exemestano, anastrozol, letrozol y vorozol;
- agentes de diferenciación, tal como retinoides, agentes bloqueantes del metabolismo de la vitamina D y del ácido retinoico (RAMBA), por ejemplo acutano;
- 10 - inhibidores de metiltransferasa de ADN, por ejemplo azacitidina;
- inhibidores de quinasa, por ejemplo flavopeidol, imatinib mesilato o gefitinib;
- inhibidores de farnesiltransferasa, o
- otros inhibidores de HDAC.

15 El término “compuesto de coordinación de platino” se utiliza en la presente memoria para indicar un compuesto de coordinación de platino inhibidor del crecimiento de cualquier célula tumoral, que proporciona platino en forma de ion.

20 El término “compuestos de taxano” indica una clase de compuestos que tienen el sistema de anillo de taxano y que están relacionados con, o derivan de, extractos de ciertas especies de tejos (*Taxus*).

25 El término “inhibidores de topoisomerasa” se utiliza para indicar enzimas que son capaces de alterar la topología del ADN en células eucarióticas. Éstas son críticas para funciones celulares importantes y para proliferación celular. Existen dos clases de topoisomerasas en células eucarióticas, en particular de tipo I y de tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monomérica de un peso molecular de aproximadamente 100.000. La enzima enlaza con el ADN e introduce una rotura transitoria de cadena simple, desenrolla la doble hélice (o permite que la misma se desenrolle), y a continuación sella de nuevo la rotura antes de su disociación desde la cadena de ADN. La topoisomerasa II tiene un mecanismo de acción similar que incluye la inducción de roturas de cadena de ADN o la formación de radicales libres.

30 El término “compuestos de camptotecina” se utiliza para indicar compuestos que están relacionados con, o que derivan de, un compuesto de camptotecina madre, que es un alcaloide insoluble en agua derivado del árbol chino *Camptothecin acuminata*, y del árbol indio *Nothapodytes foetida*.

35 El término “compuestos de podofilotoxina” se utiliza para indicar compuestos que están relacionados con, o que derivan de, una podofilotoxina madre; la cual se extrae de la planta de mandrágora.

El término “alcaloide vinca anti-tumor” se utiliza para indicar compuestos que están relacionados con, o que derivan de, extractos de la planta *Vincapervinca* (*Vinca rosea*).

40 El término “agentes alquilantes” abarca un grupo diverso de sustancias químicas que tienen la característica común de que tienen la capacidad de contribuir, bajo condiciones fisiológicas, con grupos alquil en macromoléculas biológicamente vitales tales como el ADN. Con la mayor parte de los agentes más importantes, tal como las mostazas de nitrógeno y las nitrosureas, las porciones alquilantes activas son generadas *in vivo* tras reacciones degradantes complejas, algunas de las cuales son enzimáticas. Las acciones farmacológicas más importantes de los agentes alquilantes son aquellas que perturban los mecanismos fundamentales afectados por proliferación celular, en particular síntesis de ADN y división celular. La capacidad de los agentes alquilantes para interferir con la función del ADN y la integridad en tejidos rápidamente proliferantes, proporciona la base para sus aplicaciones terapéuticas y para muchas de sus propiedades tóxicas.

50 El término “derivados de antraciclina anti-tumor” comprende antibióticos obtenidos a partir del hongo *Strep. peiticus var. caesius* y sus derivados, caracterizados por tener una estructura de anillo de tetraciclina con un azúcar inusual, daunosamina, vinculado al enlace glicosídico.

55 Se ha demostrado que la amplificación de la proteína del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER 2) en carcinomas de mama primarios, está relacionada con un pronóstico clínico pobre para determinados pacientes. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado derivado de ADN recombinantes altamente purificado, que enlaza con alta afinidad y especificada en el dominio extracelular del receptor de HER2.

60 Muchos cánceres de mama tienen receptores de estrógeno y el crecimiento de estos tumores puede ser estimulado por el estrógeno. Los términos “antagonistas de receptor de estrógeno” y “moduladores selectivos de receptor de estrógeno” son utilizados para indicar inhibidores del enlace de estradiol en el receptor de estrógeno (ER). Los moduladores selectivos de receptor de estrógeno, cuando enlazan con el ER, inducen un cambio en la configuración tridimensional del receptor, inhibiendo su vinculación al elemento de respuesta de estrógeno (ERE) en el ADN.

65 En las mujeres postmenopáusicas, la fuente principal de estrógeno circulante consiste en la conversión de andrógenos suprarrenales y ováricos (androstenediona y testosterona) en estrógenos (estrone y estradiol) mediante

la enzima aromatasas en tejidos periféricos. La privación de estrógeno mediante la inhibición o inactivación de aromatasas es un tratamiento efectivo y selectivo para algunas pacientes postmenopáusicas con cáncer de pecho dependiente de hormona.

5 El término “agente anti-estrógeno” se utiliza en la presente memoria de modo que incluye no solo antagonistas de receptor de estrógeno y moduladores selectivos de receptor de estrógeno, sino también inhibidores de aromatasas según se ha expuesto en lo que antecede.

10 El término “agentes de diferenciación” abarca compuestos que pueden inhibir, de diversas formas, la proliferación celular e inducir diferenciación. Se sabe que la vitamina D y los retinoides juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y diferenciación de una amplia variedad de tipos de células normales y malignas. Los agentes de bloqueo del metabolismo del ácido retinoico (RAMBA's) incrementan los niveles de ácidos retinoicos andrógenos inhibiendo el metabolismo citocromo mediado por P450 de los ácidos retinoicos.

15 Los cambios de metilación de ADN se encuentran entre las anomalías más comunes en la neoplasia humana. La hipermetilación en el interior de los promotores de genes seleccionados está asociada habitualmente a la inactivación de los genes involucrados. El término “inhibidores de metil transferasa de ADN” se utiliza para indicar compuestos que actúan mediante inhibición farmacológica de metil transferasa de ADN y reactivación de expresión de gen supresor del tumor.

20 El término “inhibidores de quinasa” comprende potentes inhibidores de quinasa que están involucrados en la progresión del ciclo de la célula y en la muerte celular programada (apoptosis).

25 El término “inhibidores de farnesiltransferasa” se utiliza para indicar compuestos que fueron diseñados para impedir la farnesilación de Ras y de otras proteínas intracelulares. Se ha demostrado que tienen efecto sobre la proliferación y supervivencia de la célula maligna.

El término “otros inhibidores de HDAC” comprende, aunque sin limitación:

- 30 - ácidos grasos de cadena corta, por ejemplo butirato, 4-fenilbutirato o ácido valproico;
- ácidos hidroxámicos, por ejemplo el ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), el biaril hidroxamato A-161906, las aril-N- hidroxicarboxamidas bicíclicas, la piroxamida, el CG-1521, el PXD 101, el ácido sulfonamida hidroxámico, el LAQ-824, la tricostatina A (TSA), la oxamflatina, la scriptaida, el ácido m-carboxi cinámico o análogo del ácido trapoxin-hidroxámico;
- 35 - tetrapéptidos cíclicos, por ejemplo trapoxina, apidicina o depsipeptina;
- benzamidas, por ejemplo MS-275 o CI-994, o
- depudecina.

40 Para el tratamiento del cáncer, los compuestos conforme a la presente invención pueden ser administrados a un paciente según se ha descrito en lo que antecede, junto con irradiación. La irradiación significa radiación ionizante y en particular radiación gamma, especialmente la emitida por aceleradores lineales o por radionucleidos que son utilizados en la actualidad de manera habitual. La irradiación del tumor mediante radionucleidos puede ser externa o interna.

45 La presente invención se refiere también a una combinación conforma a la invención de un agente anti-cáncer y un inhibidor de HDAC de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere también a una combinación de acuerdo con la invención para el uso en terapia médica, por ejemplo para inhibir el crecimiento de células tumorales.

50 La presente invención también se refiere a una combinación de acuerdo con la invención para inhibir el crecimiento de células tumorales.

55 La presente invención se refiere también a un procedimiento de inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto humano, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una combinación conforme a la invención.

60 La invención proporciona además un procedimiento para inhibir el crecimiento anormal de células, incluyendo células transformadas, mediante administración de una cantidad efectiva de una combinación de acuerdo con la invención.

65 El otro agente medicinal e inhibidor de HDAC puede ser administrado simultáneamente (por ejemplo, en composiciones separadas o unitarias), o secuencialmente en cualquier orden. En el último caso, los dos compuestos serán administrados dentro de un período y en una cantidad y una manera que sean suficientes para asegurar que se consigue un efecto ventajoso o sinérgico. Se apreciará que el procedimiento y el orden de administración preferidos y las cantidades y regímenes de dosificación respectivos para cada componente de la combinación dependerán del otro agente medicinal particular y del inhibidor de HDAC que se esté administrando, de su vía de

administración, del tumor particular que está siendo tratado y del anfitrión particular que está siendo tratado. El procedimiento y el orden de administración óptimos y las cantidades y régimen de administración pueden ser fácilmente determinados por los expertos en la materia utilizando métodos convencionales en vista de la información que se proporciona en la presente memoria.

5 El compuesto de coordinación de platino se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, por ejemplo de 50 a 400 mg/m^2 , en particular para el cisplatino a una dosificación de alrededor de 75 mg/m^2 y para el carboplatino de alrededor de 300 mg/m^2 en el transcurso del tratamiento.

10 El compuesto de taxano se administra ventajosamente en una dosis de 50 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, por ejemplo de 75 a 250 mg/m^2 , en particular para el paclitaxel en una dosis de alrededor de 175 a 250 mg/m^2 y para el docetaxel de alrededor de 75 a 150 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

15 El compuesto de camptotecina se administra ventajosamente en una dosis de 0,1 a 400 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, por ejemplo de 1 a 300 mg/m^2 , en particular para el irinotecan en una dosis de alrededor de 100 a 350 mg/m^2 y para el topotecan en alrededor de 1 a 2 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

20 El derivado de podofilotoxina anti-tumor se administra ventajosamente en una dosis de 30 a 300 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, por ejemplo de 50 a 250 mg/m^2 , en particular para la etoposida en una dosis de alrededor de 35 a 100 mg/m^2 y para la teniposida en alrededor de 50 a 250 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

25 El alcaloide vinca anti-tumor se administra ventajosamente en una dosis de 2 a 30 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, en particular para la vinblastina en una dosis de alrededor de 3 a 12 mg/m^2 , para la vincristina en una dosis de alrededor de 1 a 2 mg/m^2 , y para la vinorelbina en una dosis de alrededor de 10 a 30 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

30 El derivado de nucleótido anti-tumor se administra ventajosamente en una dosis de 200 a 2500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, por ejemplo de 700 a 1500 mg/m^2 , en particular para el 5-FU en una dosis de 200 a 500 mg/m^2 , para la gemcitabina en una dosis de alrededor de 800 a 1200 mg/m^2 y para la capecitabina en alrededor de 1000 a 2500 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

35 Los agentes alquilantes tales como mostaza de nitrógeno o nitrosourea se administran ventajosamente en una dosis de 100 a 500 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, por ejemplo de 120 a 200 mg/m^2 , en particular para la ciclofosfamida en una dosis de alrededor de 100 a 500 mg/m^2 , para el clorambucil en una dosis de alrededor de 0,1 a 0,2 mg/m^2 , para la carmustina en una dosis de alrededor de 150 a 200 mg/m^2 , y para la lomustina en una dosificación de alrededor de 100 a 150 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

40 El derivado de antraciclina anti-tumor se administra ventajosamente en una dosificación de 10 a 75 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, por ejemplo de 15 a 60 mg/m^2 , en particular para la doxorubicina en una dosis de alrededor de 40 a 75 mg/m^2 , para la daunorubicina en una dosis de alrededor de 25 a 45 mg/m^2 , y para la idarubicina en una dosis de alrededor de 10 a 15 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

45 El trastuzumab se administra ventajosamente en una dosis de 1 a 5 mg por metro cuadrado (mg/m^2) de área superficial corporal, en particular de 2 a 4 mg/m^2 durante el transcurso del tratamiento.

50 Al agente anti-estrógeno se administra ventajosamente en una dosis de alrededor de 1 a 100 mg diariamente, dependiendo del agente particular y de la afección que se esté tratando. El tamoxifen se administra ventajosamente de forma oral, en una dosis de 5 a 50 mg, con preferencia de 10 a 20 mg dos veces al día, continuando la terapia durante un tiempo suficiente para conseguir y mantener un efecto terapéutico. El toremifeno se administra ventajosamente de forma oral, en una dosis de alrededor de 60 mg una vez al día, continuando la terapia durante un tiempo suficiente para conseguir y mantener un efecto terapéutico. El anastrozol se administra ventajosamente de forma oral en una dosificación de alrededor de 1 mg una vez al día. El droloxifeno se administra ventajosamente de forma oral en una dosis de alrededor de 20-100 mg una vez al día. El raloxifeno se administra ventajosamente de forma oral en una dosis de alrededor de 60 mg una vez al día. El exemestano se administra ventajosamente de forma oral en una dosis de alrededor de 25 mg una vez al día.

60 Las dosis pueden ser administradas, por ejemplo, en una vez, dos veces o más durante el transcurso del tratamiento, el cual puede ser repetido, por ejemplo, cada 7, 14, 21 ó 28 días.

65 En vista de sus propiedades farmacológicas útiles, los componentes de las combinaciones conforme a la invención, es decir, el otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC, pueden ser formulados según varias formas farmacéuticas a efectos de administración. Los componentes pueden ser formulados por separado en composiciones farmacéuticas individuales o en una composición farmacéutica unitaria que contenga ambos componentes.

La presente invención se refiere también, por lo tanto, a una composición farmacéutica que comprende el otro agente medicinal y el inhibidor de HDAC junto con uno o más portadores farmacéuticos.

- 5 La presente invención se refiere también a una combinación de acuerdo con la invención en forma de composición farmacéutica que comprende un agente anti-cáncer y un inhibidor de HDAC de acuerdo con la invención, junto con uno o más portadores farmacéuticos.

10 La presente invención se refiere además al uso de una combinación conforme a la invención, en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de células tumorales.

15 La presente invención se refiere además a un producto que contiene como primer ingrediente un inhibidor de HDAC de acuerdo con la invención, y como segundo ingrediente activo un agente anti-cáncer, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de pacientes que sufren cáncer.

Parte experimental

Los ejemplos que siguen se proporcionan a efectos de ilustración.

20 En lo que sigue, "EDC" significa *N*-(etilcarbonimidiloil)-*N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina, monohidrocloreto "DCM" significa diclorometano, "DIEA" significa diisopropilietilamina, "DIPE" significa Diisopropil éter, "DMF" significa dimetilformamida, "EtOAc" significa etil acetato, "iPrOH" significa isopropil, "MeOH" significa metanol, "EtOH" significa etanol, "PyBrOP" significa bromo-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato, "TEA" significa trietilamina, "TFA" significa ácido trifluoroacético, y "THF" significa tetrahidrofurano.

25 **A. Preparación de sustancias intermedias**

Ejemplo A1

30 a) Una solución de hexahidro 1*H*-1,4-diazepina (0,20 moles) y 1-fluoro-4-nitro-benzeno (0,10 moles) en DCM (300 ml), fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Precipitaron cristales amarillos. El precipitado fue recogido sobre un filtro, lavado con éter y secado. El residuo (21,1 g, 87%) fue extraído en agua y tratado con una solución de NaOH 3N. Esta mezcla fue extraída DCM (3 x 500 ml), secada (Na₂SO₄), filtrada, y el solvente fue separado bajo presión reducida y secado bajo vacío a temperatura ambiente durante 16 horas, produciendo 18,3 g de hexahidro-1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,4-diazepina (producto intermedio 1), punto de fusión 115-116 °C.

35 b) Se añadió ácido bis-(1,1-dimetiletil)-dicarbónico, éster (0,090 moles) en DCM (100 ml), a una solución enfriada (baño de hielo) de el producto intermedio 1 (0,090 moles) en DCM (200 ml), con agitación. Se observó la evolución del gas. Después de que se detuvo la evolución de CO₂, se retiró el baño de hielo y continuó la agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue lavada con una solución de HCl 1N, y secada a continuación. El solvente fue evaporado, produciendo 20,5 g (70%) de ácido hexahidro-4-(4-nitrofenil)-1*H*-1,4-diazepina-1-carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (sustancia intermedia 2), punto de fusión 128-130 °C.

40 c) El producto intermedio 2 (0,047 moles) fue añadida en porciones (durante un período de 20 minutos) a una mezcla a reflujo de monohidrato de hidracina (15 ml) en metanol (700 ml) y Raney Nickel (16,1 g). La mezcla de reacción fue agitada y sometida a reflujo hasta que se descargó el color amarillo. La mezcla continuó sometida a reflujo durante media hora adicional. El catalizador fue extraído mediante filtrado. El solvente fue evaporado, produciendo 13,0 g de ácido 4-(4-aminofenil) hexahidro-1*H*-1,4-diazepina-1 carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (producto intermedio 3).

45 d) Una mezcla de el producto intermedio 3 (0,045 moles) y ácido (1-etoxietilideno)-hidrazina carboxílico, etil éster (0,090 moles), fue calentada en un baño de aceite a 130 °C durante 1 hora, con agitación. Después de dos horas más, la mezcla de reacción fue enfriada y se añadió 2-propanol (alrededor de 100 ml) con trituración. El sólido fue filtrado y secado para proporcionar 14 g de sólido. Este sólido fue triturado con éter, extraído mediante filtrado y secado, produciendo 13,0 g (77%) de ácido 1*H*-1,4-diazepina-1-carboxílico, ácido 4-[4-(1,5-dihidro-3-metil-5-oxo-4*H*-1,2,4-triazol-4-il) fenil] hexahidro-1*H*-1,4-diazepina-1 carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (producto intermedio 4), punto de fusión 238-240 °C.

50 e) Reacción bajo atmósfera de Ar. Se añadió (por medio de una jeringa) 1,1,1-trimetil-*N*-(trimetilsilil)-silanamina, sal de sodio (0,01 moles; 10 ml, 1 M/THF) al producto intermedio 4 (0,01 moles) en DMF (200 ml), a temperatura ambiente. Empezó a formarse sal de sodio sólida. Ésta fue agitada vigorosamente y se añadió DMF (200 ml) adicional. Una solución de 2-bromo-butano (0,02 moles) en DMF (100 ml) fue añadida lentamente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 18 horas. El solvente de DMF fue retirado (bomba de vacío). Se añadió agua al residuo y el producto aceitoso resultante fue extraído con éter (500 ml). La solución de éter fue concentrada para proporcionar 2,70 g (material aceitoso que solidificó con reposo;

producción del 62%), la cual fue adicionalmente purificada mediante cromatografía de columna flash sobre gel de sílice (eluyente: 1% (10% de NH₄OH/CH₃OH)/CH₂Cl₂) produciendo 0,55 g de ácido 4-[4-(1,5-dihidro-3-metil-1-(1-metilpropil)-5-oxo-4H-1,2,4-triazol-4-il] fenil] hexahidro-1H-1,4-diazepina-1 carboxílico, 1,1-dimetiletil éster (producto intermedio 5), punto de fusión: 119-120 °C.

f) Se añadió producto intermedio 5 (0,0014 moles) a una solución enfriada de TFA (5 ml; baño de hielo) durante 30 minutos. El solvente fue extraído bajo presión reducida. Se añadió agua y la mezcla fue saturada con carbonato de potasio. Esta mezcla fue extraída con etilacetato (2 x 50 ml), secada sobre sulfato de sodio, filtrada, y el solvente fue separado, produciendo 0,35 g (65%) de 4-[4-(hexahidro-1H-1,4-diazepina-1-il] fenil]-2,4-dihidro-5-metil-2-(1-metilpropil)-3H-1,2,4-triazol-3-ona (producto intermedio 6).

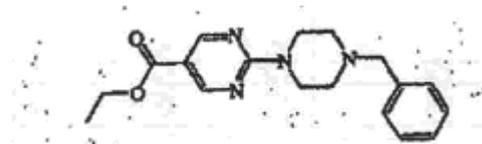
g) Una mezcla de el producto intermedio 6 (0,00076 moles), ácido 4-bromo benzoico, metil éster (0,0304 moles), (1R)-[1,1'-binaftaleno]-2,2'-diilbis[difenil]-fosfina (0,016 g), Pd₂(dba)₃ (0,008 g) y Cs₂CO₃ (0,40 g) en tolueno (10 ml), fue colocada en un tubo a presión (que contenía una pequeña barra agitadora magnética) en una caja de guantes bajo argón. El tubo a presión fue tapado herméticamente y calentado en un baño de aceite a 120 °C durante 12 horas con agitación. Se añadió más (1R)-[1,1'-binaftaleno]-2,2'-diilbis[difenil]-fosfina (0,016 g), Pd₂(dba)₃ (0,008 g) y Cs₂CO₃ (0,40 g). La mezcla fue calentada a 120 °C en el baño de aceite durante 24 horas. La mezcla de reacción fue filtrada para extraer el material sólido orgánico y fue lavada con aproximadamente 20 ml de CHCl₃. El filtrado fue concentrado bajo presión reducida para su secado. El residuo fue purificado mediante cromatografía flash sobre gel de sílice (eluyente: NH₄OH/CH₃OH/CH₂Cl₂, 0,1/0,9/99). Las fracciones deseadas fueron combinadas y el solvente fue evaporado, y secadas a temperatura ambiente bajo vacío durante 16 horas, produciendo 0,21 g (60%) de ácido 4-[4-[4-(1,5-dihidro-metil-1-(1-metilpropil)-5-oxo-4H-1,2,4-triazol-4-il] fenil] hexahidro-1H-1,4-diazepin-1-il] benzoico, metil éster (sustancia intermedia 7), punto de fusión 152 °C – 153 °C.

Ejemplo A2

Una mezcla de ácido 4-[4-(fenilmetil)-1-piperazinil] benzoico (0,0145 moles), O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,029 moles), N,N'-metanotetrail-bisciclohexanamina (0,0145 moles) y 1-hidroxi-1H-benzotriazol (0,021 moles) en DCM p.a. (200 ml), fue agitada a temperatura ambiente durante un fin de semana. La mezcla de reacción fue lavada con agua, secada (MgSO₄), filtrada, y el solvente fue evaporado. El residuo fue cristalizado a partir de EtOAc, extraído mediante filtrado, produciendo 3,5 g y otro cultivo: 2,0 g, producción total de 5,5 g (95%) de 4-[4-(fenilmetil)-1-piperazinil]-N-[(tetrahidro-2H-piran-2-il) oxi] benzamida (producto intermedio 8).

Ejemplo A3

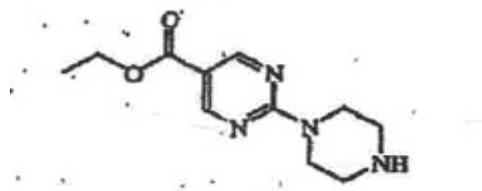
a) Preparación de



producto intermedio 9

Una solución de 1-(fenilmetil)-,piperazina (0,068 moles) en acetonitrilo p.a. (135 ml) fue añadida gradualmente a una solución de carbonato de potasio (0,18 moles) y ácido 2-(metilsulfonil)-5-pirimidino carboxílico, etil éster (0,082 moles) en acetonitrilo p.a. (135 ml), y la mezcla de reacción fue agitada durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se dejó reposar durante la noche. Se añadió DCM (400 ml). Se añadió agua (300 ml) y se separó la capa orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró y el solvente fue evaporado. El residuo (28 g) fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH 95/5). Las fracciones puras fueron recogidas y el solvente fue evaporado. El residuo fue cristalizado a partir de acetonitrilo, extraído mediante filtrado y secado en vacío, produciendo 15,1 g de producto intermedio 9.

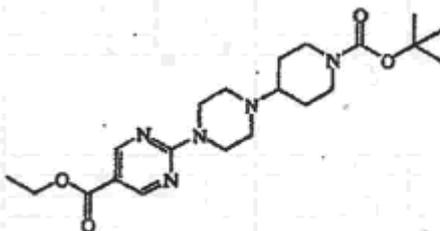
b) Preparación de



producto intermedio 10

Una mezcla de producto intermedio 9 (0,003 moles) en EtOH (250 ml) fue hidrogenada a 50 °C con Pd/C 10% (2 g) como catalizador. Tras un consumo de H₂ (1 equiv.), el catalizador fue extraído por filtrado y el filtrado fue evaporado. El residuo fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: DCM/(MeOH/NH₃) 90/10). Las fracciones de producto fueron recogidas y el solvente fue evaporado, produciendo 6,8 g (>96%) de producto intermedio 10.

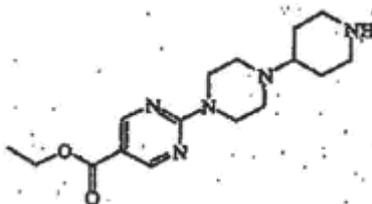
c) Preparación de



10 producto intermedio 11

Se añadió titanio tetracis (etóxido) (0,0029) a una mezcla de producto intermedio 10 (0,0022 moles) y ácido 4-oxo-1-piperidinocarboxílico, 1,1-dimetiletil éster (0,0027 moles) en 1,2-dicloro etano (6 ml). La mezcla fue agitada a 50 °C durante 18 horas, a continuación enfriada a temperatura ambiente. Se añadió NaBH(OAc)₃ en fracciones. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua. La mezcla fue extraída con DCM y filtrada sobre celita. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO₄), filtrada, y el solvente fue evaporado hasta la sequedad. El residuo (1,1 g) fue cristalizado a partir de dietil éter/DIPER. El precipitado fue extraído por filtrado y secado, produciendo 0,49 g (51%) de sustancia intermedia 11.

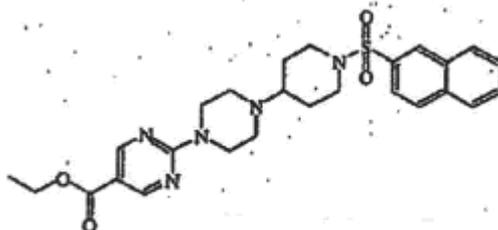
20 d) Preparación de



.HCl
producto intermedio 12

25 Una mezcla de producto intermedio 11 (0,0011 moles) en HCl/iPrOH (5 ml) fue agitada a 50 °C durante 1 hora, y después enfriada a temperatura ambiente. El precipitado fue filtrado, lavado con EtOH, a continuación con dietil éter y secado, produciendo 0,38 g (94%) del producto intermedio 12 (sal de HCl).

30 e) Preparación de



producto intermedio 13

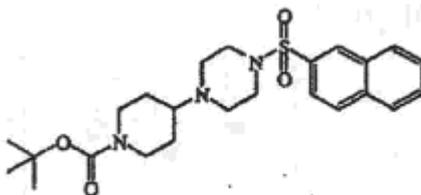
35 Una solución de cloruro de 2-naftalenosulfonil (0,0011 moles) en DCM (1 ml), fue añadida a 5 °C a una mezcla de producto intermedio 12 (0,001 mol) y TEA (0,0032 moles) en DCM (4 ml) bajo flujo de N₂. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadió carbonato de potasio 10%. La mezcla fue extraída con DCM. Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO₄), se filtró, y el solvente fue evaporado hasta la sequedad. El

residuo (0,53 g) fue extraído en dietil éter/DIPE. El precipitado fue extraído por filtrado con secado, produciendo 0,42 g (77%) de producto intermedio 13.

Ejemplo A4

5

a) Preparación de



producto intermedio 14

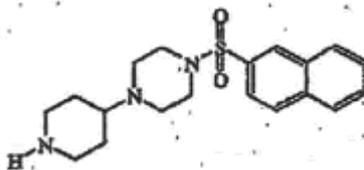
10

Se añadió tetrakis (2-propanolato) titanio (0,0023 moles) a una mezcla de 1-(2-naftalenilsulfonil)-piperazina (0,0018 moles) y ácido 4-oxo-1-piperidinocarboxílico, 1,1-dimetiletil éster (0,0021 moles) en 1,2-dicloro etano (6 ml) bajo flujo de N_2 . La mezcla fue agitada a 50 °C durante 18 horas, y a continuación enfriada a temperatura ambiente.

15 Se añadió $NaBH(OAc)_3$ (0,0023 moles) en fracciones. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió agua. Esta mezcla fue filtrada sobre celita. La mezcla fue extraída con DCM. El filtrado fue decantado. La capa orgánica fue separada, secada ($MgSO_4$), filtrada, y el solvente fue evaporado hasta la sequedad. El residuo (1,3 g) fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (70-200 μm) (eluyente: DCM 100 a DCM/MeOH 99/1). Las fracciones puras fueron recogidas y el solvente fue evaporado, produciendo 0,72 g (86%) de producto intermedio 14.

20

b) Preparación de



.HCl
producto intermedio 15

25

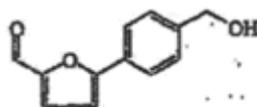
Una mezcla de producto intermedio 14 (0,0014 moles) en HCl/iPrOH 5N (10 ml) fue agitada a 50 °C durante 18 horas, y a continuación enfriada a temperatura ambiente, filtrada, lavada con dietil éter y secada, produciendo 0,53 g (95%) de producto intermedio 15 (sal de HCl), punto de fusión 260 °C.

30

Ejemplo A5

Preparación de

35



producto intermedio 16

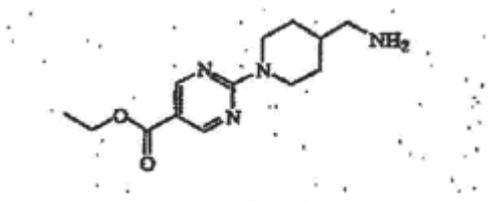
40 Una solución de 5-bromo-2-furancarboxaldeoído (0,0171 moles) en 1,2-dimetoxietano (15 ml) fue añadida gota a gota, a temperatura ambiente, a una solución de tetrakis (trifenilfosfina)-paladio (0,0045 moles) en 1,2-dimetoxietano (50 ml) bajo flujo de N_2 . La mezcla fue agitada durante 20 minutos. Se añadió una suspensión de ácido [4-(hidroximetil) fenil] bórico (0,0257 moles) en EtOH (18 ml). La mezcla fue agitada durante 20 minutos. Se añadió carbonado de sodio (0,15 moles). La mezcla fue agitada y sometida a reflujo durante 4 horas, y a continuación llevada a temperatura ambiente. La capa orgánica fue evaporada. El residuo fue extraído en DCM y lavado con

40

agua. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO_4), filtrada, y el solvente fue evaporado. El residuo (4,1 g) fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH 99/1). Las fracciones puras fueron recogidas y el solvente fue evaporado, produciendo 2,8 g (82%) de producto intermedio 16.

5 Ejemplo A6

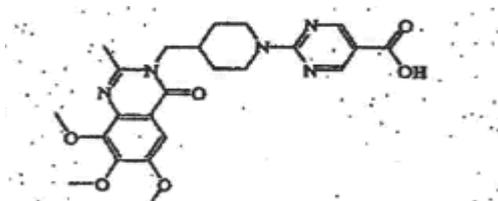
a) Preparación de



10 producto intermedio 17

Una solución de ácido 2-(metilsulfonil)-5-pirimidino carboxílico, etil éster (0,0434 moles) en acetonitrilo (100 ml), fue añadida gota a gota, a 10 °C, a una solución de 4-piperidinometanamina (0,0868 moles) y carbonato de potasio (0,0434 moles) en acetonitrilo (200 ml) bajo flujo de N_2 . La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, vertida en agua de hielo y extraído con DCM. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO_4), filtrada, y el solvente fue evaporado. El residuo (14,18 g) fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (20-45 μm) (eluyente: DCM/MeOH/ NH_4OH 90/10/1 a 80/20/2). Las fracciones puras fueron recogidas y el solvente fue evaporado, produciendo 3,7 g (32%) de producto intermedio 17.

20 b) Preparación de

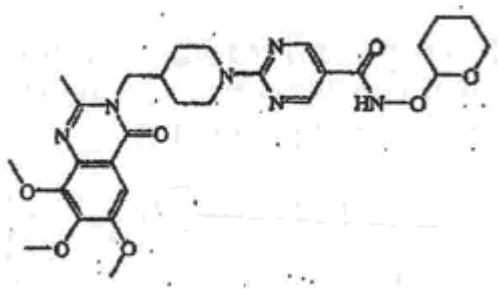


producto intermedio 18

25 A *N*-ciclohexilcarbodiimida, *N*'-metil poliestireno (153 mg) (NovaBiochem Cat. Núm. 01-64-0211) se añadió ácido *N*-acetil-3,4,5-trimetoxiantranílico (0,2 mmol), disuelto en THF (0,5 ml), seguido de 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol, disuelto en THF (0,5 ml). Esta mezcla fue agitada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el producto intermedio 17 (0,1 mmol), disuelta en DCM (1 ml) fue añadida a la suspensión, después de los cual fueron evaporados los solventes por medio de un flujo de nitrógeno a 50 °C y posteriormente, la mezcla de reacción limpia se dejó durante toda la noche a 90 °C bajo flujo de nitrógeno. El producto fue disuelto en diclorometano (2 ml) y filtrado a través de un filtro de vidrio. El residuo fue enjuagado con DCM (2 x 2 ml) y el filtrado fue concentrado. El producto fue tratado a continuación con una mezcla de THF (1 ml) e hidróxido de sodio acuoso (1 ml, 1*N*) durante 48 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla fue neutralizada mediante la adición de HCl acuoso (1 ml, 1*N*), y secada a 70 °C bajo flujo de nitrógeno, produciendo el producto intermedio 18.

35

c) Preparación de

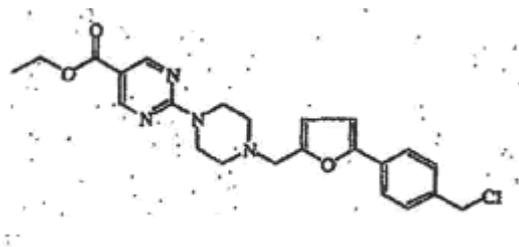


producto intermedio 19

Al producto intermedio 18 (0,1 mmol) se añadió una solución de 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (0,1 mmol) EDC (0,1 mmol) y TEA (0,12 mmol) en una mezcla de DCM/THF (3/4, 7 ml). La mezcla de reacción fue agitada durante 5 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se añadió O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-hidroxilamina (0,1 mmol). Se permitió que la solución resultante se agitase durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue concentrada a continuación bajo un flujo de nitrógeno a 50 °C hasta un volumen de 5 ml, y después se añadió metil isocianato soportado en polímero (1,25 mmol/g, 0,25 mmol, Argonaut, Cat. Núm. 800261) y bicarbonato de (poliestirilmetil) trimetilamonio (0,6 mmol) (NovaBiochem Cat núm. 01-64-0419), y esta mezcla fue agitada durante 2 horas más. La mezcla de reacción fue filtrada, y el filtrado fue concentrado. La purificación de HPLC preparativa del producto, produjo 29 mg de producto intermedio 19.

Ejemplo A7

Preparación de

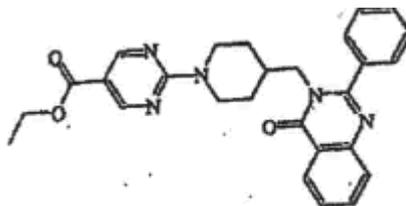


producto intermedio 20

Se añadió cloruro de metanosulfonyl (0,006 mol), a 0 °C, a una solución de producto intermedio 27 (0,001 ml) y TEA (0,008 moles) en DCM 10 ml) bajo flujo de N₂. La mezcla fue agitada a 0 °C durante 3 horas, vertida en agua de hielo y extraída con DCM. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO₄), filtrada, y el solvente fue evaporado, produciendo 0,44 g de producto intermedio 20. Este producto fue utilizado directamente en la siguiente etapa de reacción.

Ejemplo A8

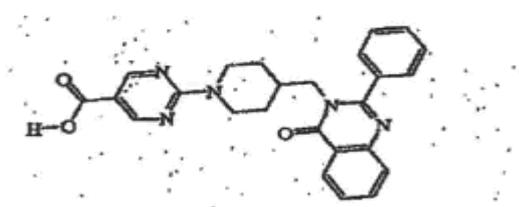
a) Preparación de



producto intermedio 21

Una muestra de producto intermedio (0,1 mmol) y 2-fenil-4*H*-3,1-benzoxazin-4-ona (0,1 mmol), fue pesada en un vaso y se añadió tolueno (2 ml). El vaso fue sellado y la mezcla calentada durante 10 horas a 90 °C. A continuación, el solvente fue evaporado y el residuo extraído en DCM (4 ml), seguido de la adición de dicloruro de etanodiol (1 mmol) y DMF (1 mmol). La mezcla resultante fue agitada durante toda la noche a 90 °C. La mezcla de reacción fue lavada a continuación con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 10% (2 x 1 ml), las fases fueron separadas, y la capa orgánica fue concentrada, produciendo el producto intermedio 21.

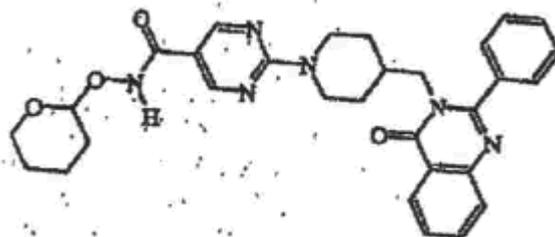
b) Preparación de



producto intermedio 22

El producto intermedio 21 (crudo) fue tratado con una mezcla de THF/NaOH ac. 1N/MeOH (1/1/0,2, 2,2 ml) mientras se agitaba vigorosamente durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación se añadió HCl acuoso (1N, 1 ml) para neutralizar la solución. Los solventes fueron evaporados en vacío, produciendo el producto intermedio 22.

5 c) Preparación de



producto intermedio 23

10 Al producto intermedio 22 se añadió a continuación 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (0,13 mmol) disuelto en THF (seco, 1 ml), EDC (0,13 mmoles), disuelto en DCM (seco, 1 ml), y TEA (0,15 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió O-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-hidroxilamina (0,13 mmol), disuelto en THF (seco, 1 ml), y la mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante toda la noche. Los solventes fueron evaporados y el producto fue purificado utilizando HPLC de fase reversa, produciendo el producto intermedio 23, punto de fusión (219 °C).

15 B.. Preparación de compuestos finales

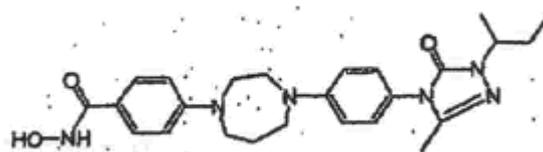
20 **Ejemplo B1**

Resina de N-Fmoc-hidroxilamina 2-cloronitrilo (Novabiochem, 01-64-0165) fue desprotegida mediante 50% de piperidina en DMF (RT, 24 horas). La resina fue lavada varias veces en DCM y DMF e hinchada en DMF. Dos equivalentes de ácido¹, PyBrOP y 4 equivalentes de DIEA, fueron añadidos como una sola porción. La mezcla fue agitada durante 24 horas, el líquido fue drenado y la resina fue lavada varias veces mediante DCM y DMF. La resina se hinchó en DMF que contenía 2 equivalentes de amina, fue agitada 24 horas en RT, el líquido fue drenado y la resina fue lavada mediante DCM y DMF. El producto final partido mediante 5% de TFA en DCM, analizado mediante HPLC y MS, y evaporado en los tubos de ensayo previamente pesados.

30 ¹. En base a la carga de resina

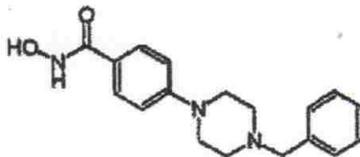
Ejemplo B2

Preparación de



35 .H₂O
compuesto 1

40 Una mezcla de producto intermedio 7 (0,00075 moles), NH₂OH/H₂O 50% (5 ml), KCN (0,001 mol), MeOH (10 ml) y THF (10 ml), fue agitada a temperatura ambiente durante 48 horas. El solvente fue evaporado. El residuo fue extraído con DCM y fue lavado con agua. El solvente fue retirado y el residuo aceitoso (0,225 g) fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (eluyente: NH₄OH/CH₃OH/CH₂Cl₂, 0,005/0,95/99; después con NH₄OH/CH₃OH/CH₂Cl₂, 0,1/0,9/99). Se recogieron las fracciones puras y el solvente fue evaporado, produciendo 0,114 g de compuesto 1 .H₂O, punto de fusión 182-184 °C, y 0,040 g de ácido 4-[4-[4-[1,5-dihidro-3-metil-1(1-metilpropil)-5-oxo-4*H*-1,2,4-triazol-4-il] fenil] hexahidro-1*H*-1,4-diazepin-1-il] benzoico, punto de fusión 244-245 °C.

Ejemplo B3Preparación de

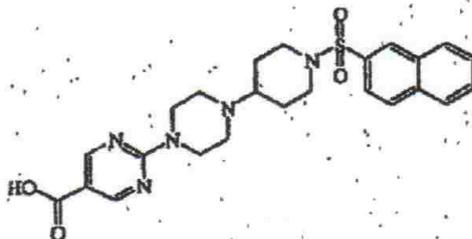
5

compuesto 2

10 Producto intermedio 8 (0,000088 moles) fue agitado en 5% TFA/MeOH (5 ml) durante 24 horas a 25 °C. A continuación, la mezcla de reacción fue vertida en agua (5 ml) + 1 equivalente de NaHCO₃. Esta mezcla fue extraída con DCM (5 ml, 2 x). La capa orgánica separada fue secada (MgSO₄), filtrada, y el solvente evaporado (soplado en seco bajo flujo de N₂ a 50 °C). El residuo fue secado (vacío, 50 °C), produciendo 0,018 g (65%) de compuesto 2, punto de fusión 196 °C.

Ejemplo B4

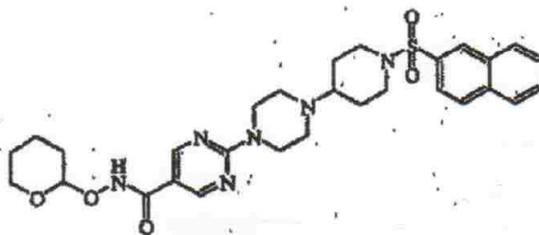
15

Preparación de

20

.Na
producto intermedio 24

25 Una mezcla de producto intermedio 13 (0,0008 moles) e hidróxido de sodio (0,0016 moles) en EtOH (10 ml) fue agitada y sometida a reflujo durante 2 horas, y enfriada a continuación a temperatura ambiente. El precipitado fue filtrado, lavado con EtOH, a continuación con dietil éter y secado, produciendo 0,425 g (>100%) de producto intermedio 24 (sal de sodio).

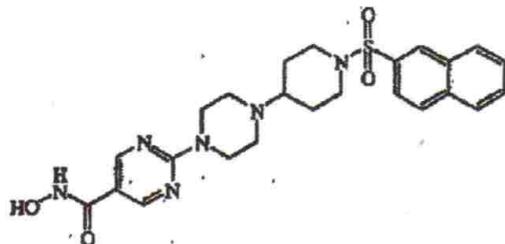
b) Preparación de

30

producto intermedio 25

35 Se añadió EDC (0,001 mol) a una mezcla de producto intermedio 24 (0,0008 moles), O-(tegrahidro-2H-piran-2-il) hidroxilamina (0,001 mol) y 1-hidroxi-1H-benzotriazol (0,001 mol) en DCM/THF (10 ml) bajo flujo de N₂. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 18 horas. El precipitado fue filtrado, lavado con THF, y a continuación con dietil éter y secado, produciendo 0,4 g (83%) de producto intermedio 25, punto de fusión 260 °C.

c) Preparación de



5

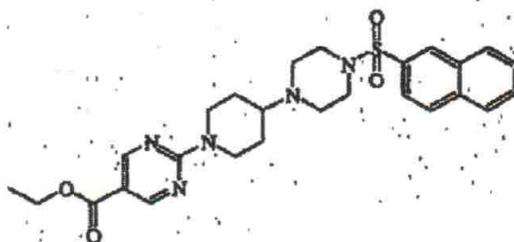
.91 CF₃COOH
compuesto 3

10

Se añadió TFA (0,5 ml) a una mezcla de producto intermedio 25 (0,0006 moles) en MeOH (10 ml). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 5 días. El precipitado fue filtrado, lavado con dietil éter y secado. El residuo fue extraído en agua, agitado durante 30 minutos, extraído por filtrado y secado, produciendo 0,143 g (38%) de compuesto 3 (.091 CF₃COOH), punto de fusión 210 °C.

Ejemplo B5

15

Preparación de

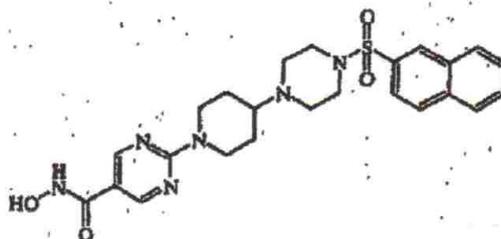
producto intermedio 26

20

Una mezcla de producto intermedio 15 (0,0013 moles), ácido 2-(metilsulfoni)-5-pirimidinocarboxílico, etil éster (0,0017 moles) y carbonato de potasio (0,0039 moles) en acetonitrilo (10 ml) fue agitada a 80 °C durante 18 horas. Se añadió agua. La mezcla fue extraída con DCM. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO₄), filtrada y el solvente fue evaporado hasta la sequedad. El residuo (0,5 g) fue cristalizado a partir de CH₃CN/DIPE. El precipitado fue extraído por filtrado y secado, produciendo 0,25 g (37%) de producto intermedio 26.

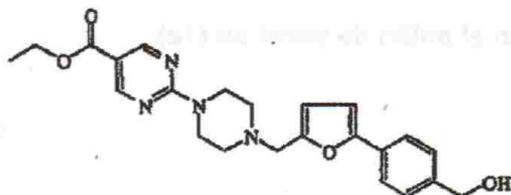
25

El producto intermedio 26 fue manipulado de manera análoga a la que se ha descrito en el ejemplo [B4] para proporcionar 0,126 g (74%) de compuesto 4 (.086 CF₃COOH), punto de fusión 230 °C.



30

.086 CF₃COOH
compuesto 4

Ejemplo B6Preparación de

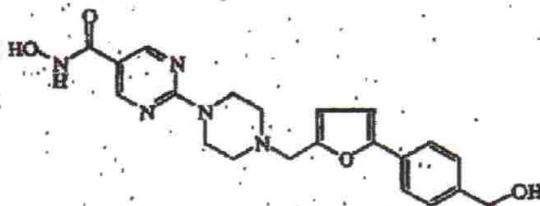
5

producto intermedio 27

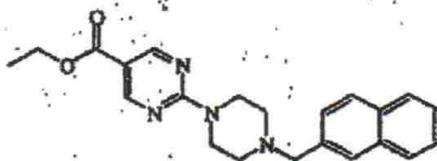
Una mezcla de producto intermedio 10 (0,0015 moles) y producto intermedio 16 (0,0015 moles) en MeOH (6 ml), fue agitada a 60 °C durante 20 horas, y a continuación enfriada a 0 °C. Se añadió hidrobórato de sodio (0,0022 moles). La mezcla fue llevada a la temperatura ambiente, y a continuación agitada durante 4 horas, vertida en agua de hielo y extraída con DCM. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO₄), filtrada, y el solvente fue evaporado. El residuo (0,8 g) fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (15-40 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 97/3/0,1 a 95/5/0,1). Las fracciones puras fueron recogidas y el solvente fue evaporado, produciendo 0,28 g (45%) de producto intermedio 27.

15

El producto intermedio 27 fue manipulado de forma análoga a la que se ha descrito en el ejemplo [B4] para proporcionar 0,143 g (89%) de compuesto 5 (.0.83 CF₃COOH), punto de fusión 219 °C.



20

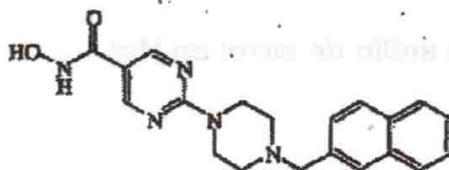
.0.83 CF₃COOH
compuesto 5**Ejemplo B7**Preparación de

compuesto intermedio 28

Una mezcla de producto intermedio 10 (0,0042 moles) y 2-naftaleno carboxialdehído (0,005 moles) en 1,2-dicloroetano (10 ml) fue agitada a 50 °C durante 3 horas, y a continuación enfriada a temperatura ambiente. Se añadió NaBH(OAc)₃ (0,0055 moles) por fracciones. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua. La mezcla fue extraída con DCM. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO₄), filtrada, y el solvente fue evaporado hasta la sequedad. El residuo (2 g) fue extraído en CH₃CN/DIPE. El precipitado fue extraído por filtrado y secado, produciendo 1,2 g (75%) de producto intermedio 28, punto de fusión 147 °C.

35

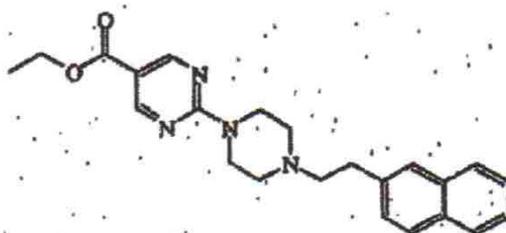
El producto intermedio 28 fue manipulado de una manera análoga a la que se ha descrito en el ejemplo [B4], para proporcionar 0,724 g (88%) de compuesto 6 (.0.83 CF₃COOH), punto de fusión >260 °C.



.083 CF₃COOH
compuesto 6

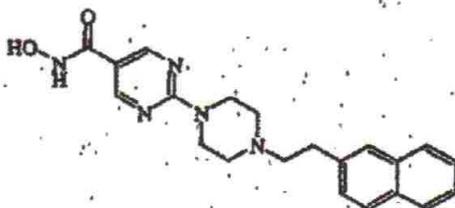
5 Ejemplo B8

Preparación de



10 producto intermedio 29

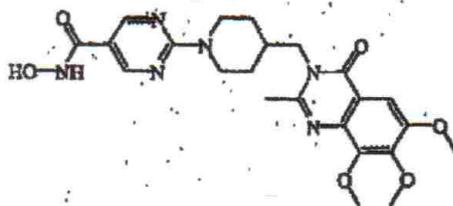
15 Una solución de 2-naftalenoetanol, meanosulfonato (0,0029 moles) en acetonitrilo (3 ml), fue añadida a 5 °C a una mezcla de producto intermedio 10 (0,0024 moles) y carbonato de potasio (0,0048 moles) en acetonitrilo (6 ml). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 18 horas, a continuación agitada y sometida a reflujo durante toda la noche y enfriada a temperatura ambiente. Se añadió agua. La mezcla fue filtrada, lavada con agua, y después con dietil éter y secada, produciendo 0,45 g (48%) de producto intermedio 29, punto de fusión 128 °C. El producto intermedio 29 fue manipulado de manera análoga a la que se ha descrito en el ejemplo [B4] para proporcionar 0,254 g (85%) de compuesto 7 (.079 CF₃COOH), punto de fusión 209 °C.



20 .079 CF₃COOH
compuesto 7

25 Ejemplo B9

Preparación de



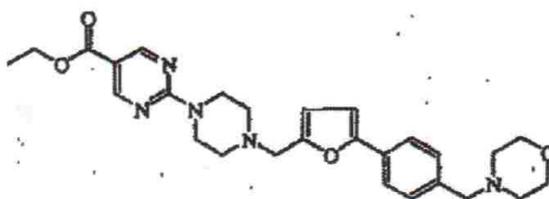
.CF₃COOH
compuesto 8

Se trató producto intermedio 19 (0,05 mmoles) con TFA (2 ml, en DCM/MeOH 1/1) durante 10 días a temperatura ambiente. A continuación, los solventes fueron evaporados a temperatura ambiente bajo un flujo de nitrógeno, seguido de la adición de 1,4-dioxano y repitiendo el procedimiento de evaporación. A continuación la muestra fue secada bajo un flujo de nitrógeno durante toda la noche a 40 °C, produciendo el compuesto 8 (.CF₃COOH).

5

Ejemplo B10

Preparación de



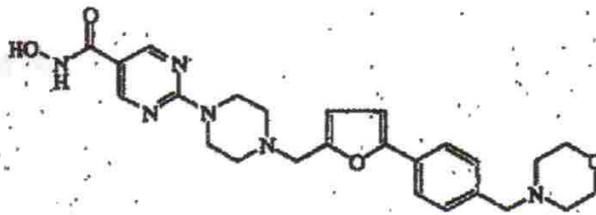
10

producto intermedio 30

Una mezcla de producto intermedio 20 (0,001 mol), morfolina (0,0013 moles) y carbonato de potasio (0,002 moles) en acetonitrilo (6 ml) fue agitada y sometida a reflujo durante toda la noche, a continuación enfriada, vertida en agua de hielo y extraída con EtOAc. La capa orgánica fue separada, secada (MgSO₄), filtrada, y el solvente fue evaporado. El residuo (0,79 g) fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice (10 μm) (eluyente: DCM/MeOH/NH₄OH 96/4/0,1). Se recogieron las fracciones puras y el solvente fue evaporado. El residuo (0,183 g) fue cristalizado a partir de DIPE. El precipitado fue extraído por filtrado y secado, produciendo 0,086 g (47%) de producto intermedio 30, punto de fusión 120 °C. El producto intermedio 30 fue manipulado de una manera análoga a la que se ha descrito en el ejemplo [B4] para proporcionar 0,432 g (87%) de compuesto 9 (.0.47 H₂O .1.99 CF₃COOH), punto de fusión 140 °C.

15

20

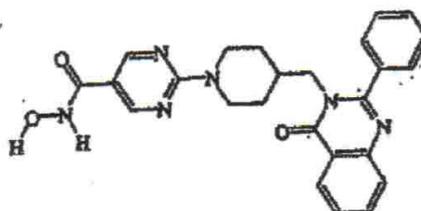


compuesto 9
.0.47 H₂O
.1.99 CF₃COOH

25

Ejemplo B11

Preparación de



compuesto 10
.CF₃COOH

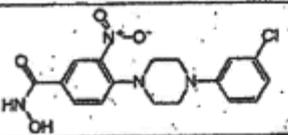
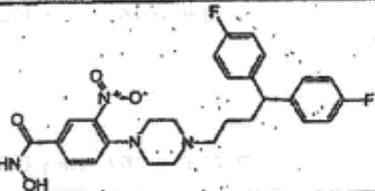
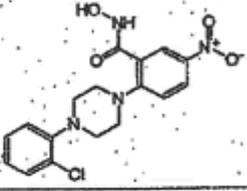
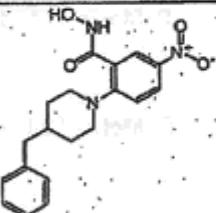
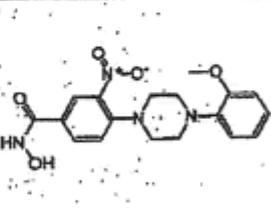
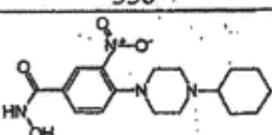
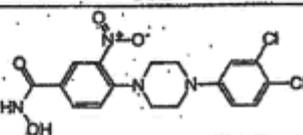
35

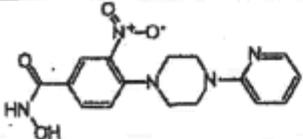
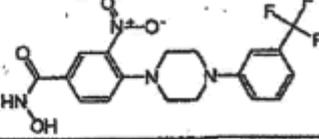
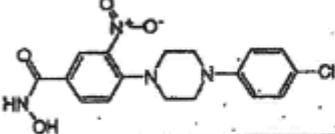
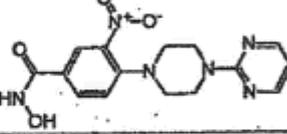
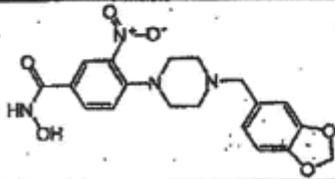
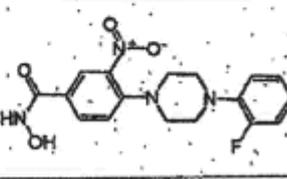
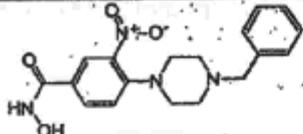
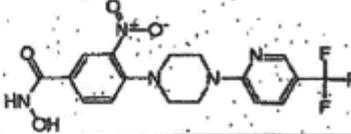
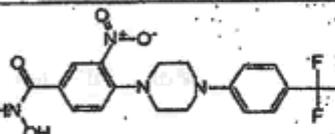
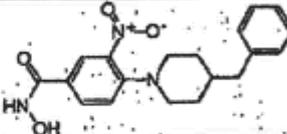
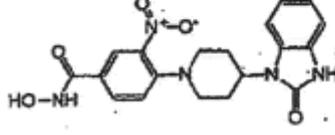
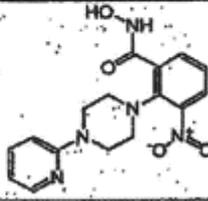
Una solución de TFA (5% en DCM/MeOH 1/1, 2 ml) fue añadida al producto intermedio 23 y la mezcla de reacción fue agitada durante 5 días a temperatura ambiente. A continuación, los solventes fueron evaporados a temperatura ambiente, bajo un flujo de nitrógeno, seguido de la adición de 1,4-dioxano y se repitió el procedimiento de concentración. A continuación, la mezcla fue secada bajo flujo de nitrógeno durante toda la noche a 40 °C, produciendo el compuesto 10 (.CF₃COOH).

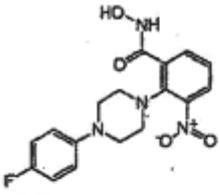
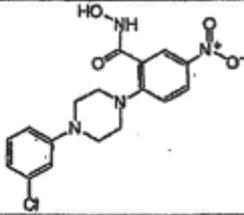
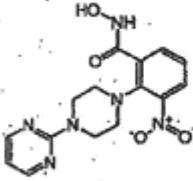
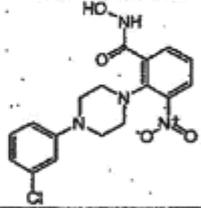
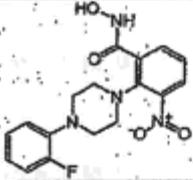
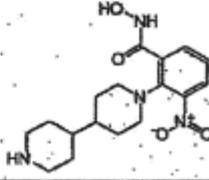
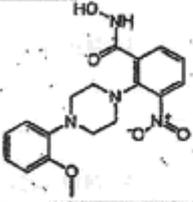
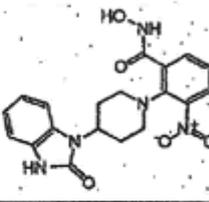
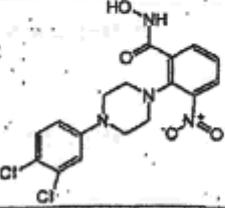
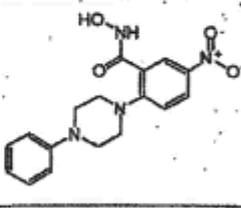
La Tabla F-1 relaciona los compuestos que fueron preparados de acuerdo con uno de los Ejemplos anteriores. Se utilizaron en las tablas las siguientes abreviaturas: .CF₂HF₃O₂ son las siglas de la sal de trifluoroacetato.

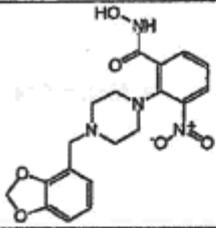
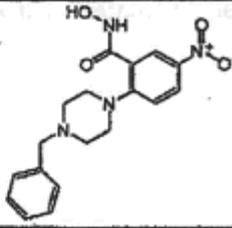
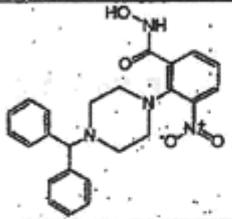
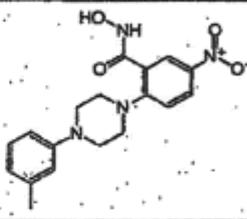
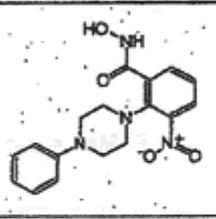
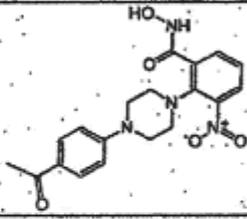
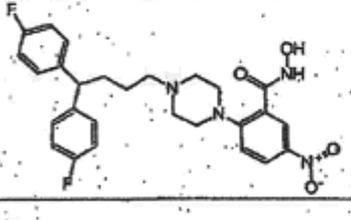
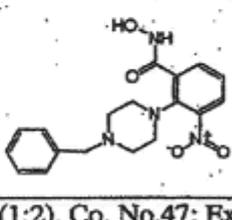
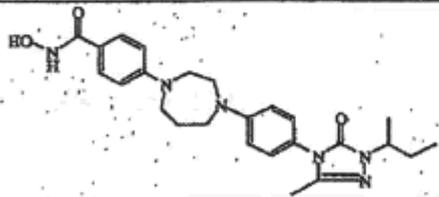
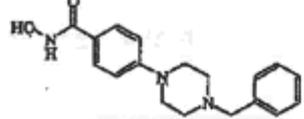
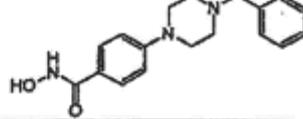
10

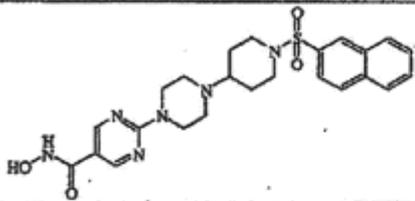
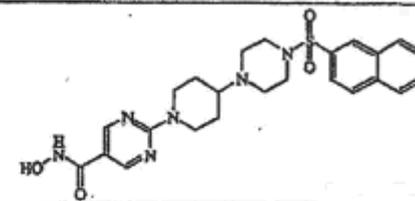
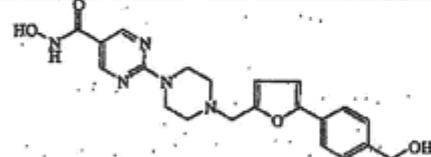
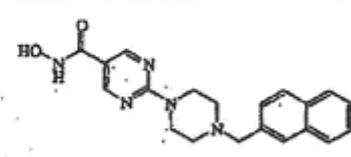
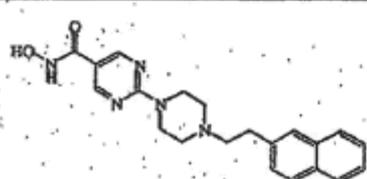
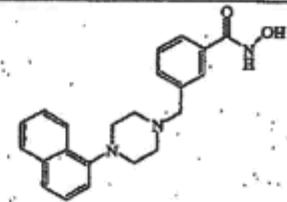
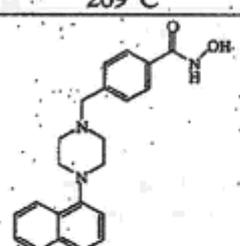
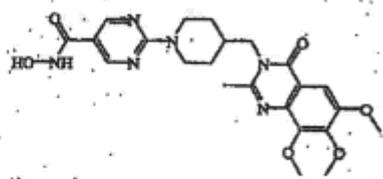
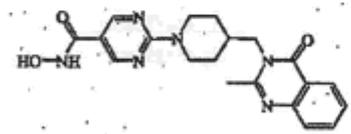
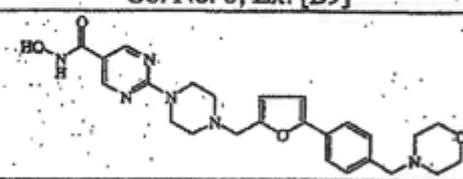
Tabla F-1

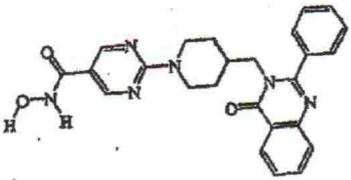
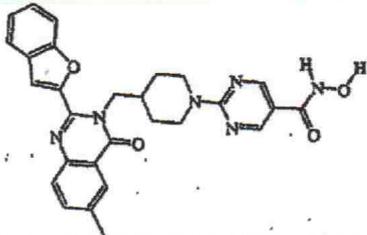
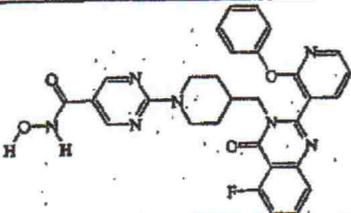
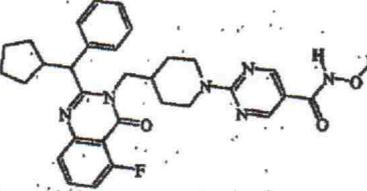
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.11; Ex. [B1]; ms. 378</p>	
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.12; Ex. [B1]; ms. 512</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.13; Ex. [B1]; ms. 377</p>
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:1), Co. No.14; Ex. [B1]; ms. 356</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.15; Ex. [B1]; ms. 373</p>
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.16; Ex. [B1]; ms.349</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.17; Ex. [B1]; ms. 412</p>

 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.18; Ex. [B1]; ms. 344 °C</p>	 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.19; Ex. [B1]; ms. 411</p>
 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.20; Ex. [B1]; ms. 378</p>	 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.21; Ex. [B1]; ms. 345</p>
 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No. 22; Ex. [B1]; ms. 401</p>	 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No. 23; Ex. [B1]; ms. 361</p>
 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.24; Ex. [B1]; ms. 357</p>	 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.25; Ex. [B1]; ms. 412</p>
 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.26; Ex. [B1]; ms. 411</p>	 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.27; Ex. [B1]; ms. 356</p>
 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.28; Ex. [B1]; ms. 397</p>	 <p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.29; Ex. [B1]; ms. 344</p>

	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.30; Ex. [B1]; ms. 361</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.31; Ex. [B1]</p>
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.32; Ex. [B1]; ms. 345</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.33; Ex. [B1]; ms. 377</p>
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.34; Ex. [B1]; ms. 361</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.35; Ex. [B1]; ms. 349</p>
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.36; Ex. [B1]; ms. 373</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:1), Co. No.37; Ex. [B1]; ms. 398</p>
	
<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.38; Ex. [B1]; ms. 411</p>	<p>.C₂HF₃O₂ (1:2), Co. No.39; Ex. [B1]</p>

	
<p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.40; Ex. [B1]; ms. 401</p>	<p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.41; Ex. [B1]</p>
	
<p>$.C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.42; Ex. [B1]; ms. 433</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.43; Ex. [B1]</p>
	
<p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.44; Ex. [B1]; ms. 343</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.45; Ex. [B1]; ms. 385</p>
	
<p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.46; Ex. [B1]</p>	<p>$C_2HF_3O_2$ (1:2), Co. No.47; Ex. [B1]; ms. 357</p>
	
<p>$.H_2O$ Co. No. 1; Ex. [B2]; mp. 182-184°C</p>	
	
<p>Co. No. 2; Ex. [B3]; mp. 196°C</p>	<p>$.C_2HF_3O_2$ (1:1), Co. No.48; Ex. [B3]</p>

	
0.91 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. No. 3; Ex. [B4]; mp. 210°C	0.86 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. No. 4; Ex. [B5]; mp. 230°C
	
0.83 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. No. 5; Ex. [B6]; mp. 219°C	0.83 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. No. 6; Ex. [B7]; mp. >260°C
	
0.79 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. No. 7; Ex. [B8]; mp. 209°C	C ₂ HF ₃ O ₂ (1:1); Co. No.49; Ex. [B3]
	
C ₂ HF ₃ O ₂ (1:1); Co. No.50; Ex. [B3]	Co. No. 8; Ex. [B9]
	
C ₂ HF ₃ O ₂ (1:1); Co. No.51; Ex. [B9]	0.47 H ₂ O .1.99 C ₂ HF ₃ O ₂ ; Co. No. 9; Ex. [B10]

	
$C_2HF_3O_2$ (1:1); Co. No. 10; Ex. [B11]	$C_2HF_3O_2$ (1:1); Co. No.52; Ex. [B11]
	
$C_2HF_3O_2$ (1:1); Co. No.53; Ex. [B11]	$C_2HF_3O_2$ (1:1); Co. No.54; Ex. [B11]

C.. Muestra farmacológica

5 El ensayo *in vitro* en cuanto a inhibición de la desacetilasa de histona (véase por ejemplo C.1) mide la inhibición de la actividad enzimática de HDAC obtenida con los compuestos de fórmula (I).

10 La actividad celular de los compuestos de fórmula (I) fue determinada sobre células de tumor A2870 utilizando un ensayo colorimétrico para toxicidad o supervivencia de la célula (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983) (véase por ejemplo C.2).

15 La solubilidad cinética en medio acuoso mide la capacidad de un compuesto para permanecer en solución acuosa tras la disolución (véase por ejemplo C.3).

Las soluciones madre de DMSO se diluyen con un único solvente tampón acuoso en 3 etapas consecutivas. Para cada dilución se mide la turbidez con un nefelómetro.

20 La permeabilidad de un medicamento expresa su capacidad para moverse desde un medio por, o a través de, otro. Específicamente, su capacidad para moverse a través de la membrana intestinal hacia la corriente sanguínea y/o desde la corriente sanguínea hacia el objetivo. La permeabilidad (véase por ejemplo C.4) puede ser medida mediante la formación de una bicapa fosfolípida de membrana artificial inmovilizada por filtro. En el ensayo de membrana artificial inmovilizada por filtro, se forma un "sándwich" con una placa de microtitulación de 96 pocillos y una placa de filtro de 96 pocillos, de tal modo que cada pocillo de compuesto está dividido en dos cámaras con una solución de donante en el fondo y una solución de aceptador en la parte superior, separadas por un disco de microfiltro de 125 μm (poros de 0,45 μm), recubierto con un 2% (p/v) de solución de dodecano de dioleoilfosfatidilcolina, bajo condiciones que forman bicapas multi-laminares en el interior de los canales de filtro cuando el sistema

25 se mide en cm/s. El propósito es el de buscar la permeación de los medicamentos a través de una membrana artificial paralela a 2 pHs diferentes: 4,0 y 7,4. La detección del compuesto se hacía con espectrometría de UV a longitudes de onda óptimas de entre 250 y 500 nm.

30 El metabolismo de medicamentos significa que un compuesto xenobiótico o endobiótico soluble en un lípido es transformado enzimáticamente en (a) metabolito(s) polar(es), soluble(s) en agua, y excretable(s). El órgano más importante para el metabolismo del medicamento es el hígado. Los productos metabólicos son con frecuencia menos activos que el medicamento madre, o son inactivos. Sin embargo, algunos metabolitos pueden tener una actividad aumentada o efectos tóxicos. Así, el metabolismo puede incluir procesos tanto de "desintoxicación" como de "intoxicación". Uno de los sistemas enzimáticos más importantes que determinan la capacidad del organismo para tratar con medicamentos y productos químicos, está representado por las citocromo P450 monooxigenasas, las cuales son enzimas dependientes de NADPH. La estabilidad metabólica de los compuestos puede ser determinada *in vitro* con el uso de tejido sub-celular humano (véase por ejemplo C.5). Aquí, la estabilidad metabólica de los

35 compuestos se expresa como % del medicamento metabolizado después de 15 minutos de incubación de estos compuestos con microsomas. La cuantificación de los compuestos fue determinada mediante análisis de LC-MS.

40 El supresor de tumor p53 activa transcripcionalmente un número de genes incluyendo el gen WAF1/CIP1 en

respuesta a ADN dañado. El producto 21 kDa del gen WAF1 se encuentra en un complejo que incluye ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDKs), y antígeno nuclear proliferante celular (PCNA) en células normales pero no en células transformadas, y parecer ser un inhibidor universal de la actividad CDK. Una consecuencia de que el p21WAF1 enlace con CDKs inhibidores consiste en impedir la fosforilación dependiente de CDK y la posterior inactivación de la proteína Rb, lo cual es esencial para la progresión del ciclo de la célula. La inducción de p21WAF1 en respuesta al contacto celular con un inhibidor de HDAC es por lo tanto un indicador potente y específico de inhibición de la progresión del ciclo de la célula en ambos puntos de control G1 y G2.

La capacidad de los compuestos para inducir p21WAF1 fue medida con el ensayo de inmunoabsorbente enlazado a enzima de p21WAF1 (WAF1 ELISA de Oncogén). El ensayo de p21WAF1 en un inmunoensayo de enzima "sándwich" que emplea tanto anticuerpos monoclonales de ratón como policlonales de conejo. Un anticuerpo policlonal de conejo, específico para la proteína WAF1 humana, ha sido inmovilizado sobre la superficie de los pocillos de plástico proporcionados en el kit. Cualquier p21WAF1 presente en la muestra que va a ser sometida a ensayo enlazará con el anticuerpo de captura. El anticuerpo monoclonal detector biotinilado reconoce también la proteína P21WAF1 humana, y enlazará con cualquier p21WAF1, que haya sido retenida por el anticuerpo de captura. El anticuerpo detector, a su vez, está enlazado mediante estreptavidina conjugada por peroxidasa de rábano picante. La peroxidasa de rábano picante cataliza la conversión de la tetra-metilbenzidina de substrato cromogénico desde una solución incolora a una solución azul (o amarilla tras la adición de reactivo de parada), cuya intensidad es proporcional a la cantidad de proteína p21WAF1 enlazada a la placa. El producto de reacción coloreado se cuantifica utilizando un espectrofotómetro. La cuantificación se consigue mediante la construcción de una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de p21WAF1 (proporcionada ya liofilizada) (véase el ejemplo C.6).

Ejemplo C.1: Ensayo *in vitro* para inhibición de desacetilasa de histona:

Extractos nucleares de HeLa (proveedor: Biomol) fueron incubados a 60 µg/ml con 2×10^{-8} M de substrato de péptido radioetiquetado. Como substrato para la medición de la actividad de HDAC se utilizó un péptido sintético, es decir, los aminoácidos 14-21 de histona H4. El substrato está biotinilado en la parte de terminal NH₂ con un separador de ácido 6-aminohexanóico, y está protegido en la parte de terminal COOH mediante un grupo amida y específicamente [³H] acetilado en lisina 16. El substrato, biotin-(6-aminohexanoico) Gly-Ala-([³H]-acetil.Lys.Arg-His-Arg-Lys-Val-NH₂), fue añadido en una solución tampón que contenía 25 mM de Hepes, 1M de sacarosa, 0,1 mg/ml de BSA y 0,01% de Triton X a un pH de 7,4. Después de 30 minutos, la reacción de desacetilación fue terminada mediante la adición de HCl y ácido acético (concentración final de 0,035 mM y 3,8 mM, respectivamente). Tras la parada de la reacción, el ³H-acetato fue extraído con etilacetato. Tras la mezcla y centrifugación, la radiactividad según una proporción alícuota de la fase superior (orgánica), fue medida en un contador β. Para cada experimento, se desarrollaron en paralelo controles (que contenían extracto nuclear de HeLa y DMSO sin compuesto), una incubación en blanco (que contenía DMSO pero no extracto nuclear de HeLa ni compuesto) y muestras (que contenían compuesto disuelto en DMSO y extracto nuclear de HeLa). En primer lugar, los compuestos fueron probados a una concentración de 10⁻⁵ M. Cuando los compuestos mostraron actividad a 10⁻⁵ M, se realizó una curva de respuesta de concentración en la que los compuestos fueron probados a concentraciones de entre 10⁻⁵ M y 10⁻¹² M. En cada prueba, el valor de la prueba en blanco fue restado de ambos valores de control y de muestra. La muestra de control representaba el 100% de la desacetilación de substrato. Para cada muestra, la radiactividad fue expresada como un porcentaje del valor medio de los controles. Cuando se computaron valores de IC₅₀ apropiados (concentración del medicamento necesaria para reducir la cantidad de metabolitos hasta el 50% del control), utilizando análisis probit para datos clasificados. En la presente memoria, los efectos de los compuestos de prueba se expresan como pIC₅₀ (el valor logarítmico negativo del valor de IC₅₀). Todos los compuestos probados mostraron actividad enzimática e una concentración de prueba de 10⁻⁵ M y 28 compuestos tuvieron un pIC₅₀ ≥ 5 (véase la tabla F-2).

Ejemplo C.2: Determinación de la actividad proliferativa sobre células A2780

Todos los compuestos probados estaban disueltos en DMSO y se realizaron diluciones adicionales en medio de cultivo. Las concentraciones finales de DMSO nunca excedieron del 0,1% (v/v) en ensayos de proliferación celular. Los controles contenían células A2780 y DMSO sin compuesto las pruebas en blanco contenían DMSO pero no células. El MTT fue disuelto a razón de 5 mg/ml en PBS. Se preparó una solución tampón de glicina que comprendía glicina 0,1 M y NaCl 0,1 M, tamponada a pH 10,5 con NaOH (1N) (todos los reactivos eran de Merck).

Las células de carcinoma ovárico A2780 humanas (una especie de regalo del Dr. T.C. Hamilton [Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, USA]) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal bovino. Las células fueron mantenidas de forma rutinaria como cultivos monocapa a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% humidificada. Las células se hicieron pasar una vez por semana utilizando una solución de tripsina/EDTA en una relación a una relación de separación de 1:40. Todos los medios y suplementos fueron obtenidos en Life Technologies. Las células estaban libres de contaminación por micoplasma según se determinó utilizando el kit Gen-Probe Mycoplasma Tissue Culture (proveedor: BioMérieux).

Las células fueron cultivadas en placas de cultivo NUNC® de 96 pocillos (proveedor: Life Technologies) y se les

permitió adherirse al plástico durante la noche. Las densidades utilizadas para las placas fueron de 1500 células por pocillo en un volumen total de 200 μl del medio. Tras la adhesión celular a las placas, se cambió el medio y los medicamentos y/o solventes fueron añadidos hasta un volumen final de 200 μl . En los siguientes cuatro días de incubación, el medio fue sustituido por 200 μl de medio de refresco y se averiguó la densidad y la viabilidad celular utilizando un ensayo basado en MTT. A cada pocillo, se añadieron 25 μl de solución de MTT y las células fueron incubadas adicionalmente durante 2 horas a 37 °C. El medio fue a continuación aspirado cuidadosamente y el producto de MTT-formazan azul fue solubilizado por adición de 25 μl de tampón de glicina seguido de 100 μl de DMSO. Las placas de micro-ensayo fueron agitadas durante 10 minutos en un agitador de micro-placa y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro de 96 pocillos Emax (proveedor: Sopachem). Dentro de un experimento, los resultados de cada condición experimental son el valor medio de 3 pocillos replicados. Para fines de selección inicial, los compuestos fueron probados a una única concentración fija de 10^{-6} M. Para compuestos activos, se repitieron los experimentos para establecer curvas de respuesta de concentración completa. Para cada experimento, los controles (que no contenían ningún medicamento) y una incubación en blanco (que no contenía células ni medicamentos) se realizaron en paralelo. El valor de la prueba en blanco fue restado de todos los valores de control y de muestra. Para cada muestra, el valor medio para el crecimiento celular (en unidades de absorbancia) fue expresado como un porcentaje del valor medio para el crecimiento de la célula del control. Cuando resultó apropiado, se calcularon los valores de IC_{50} (concentración del medicamento, necesaria para reducir el crecimiento de la célula al 50% del control) utilizando análisis probit para datos clasificados (Finney, D.J. Probit Analyses, 2ª Edic., Capítulo 10, Respuestas Calibradas, Cambridge University Press, Cambridge 1962). En la presente memoria, los efectos de los compuestos de prueba están expresados como pIC_{50} (el valor logarítmico negativo del valor de IC_{50}). La mayor parte de los compuestos de prueba mostraron actividad celular a una concentración de prueba de 10^{-6} M y 9 compuestos tuvieron un $\text{pIC}_{50} \geq 5$ (véase la tabla F-2).

Ejemplo C.3: Solubilidad cinética en medio acuoso

En la primera etapa de dilución, 10 μl de una solución madre del compuesto activo, solubilizada en DMSO (5 mM), fue añadida a 100 μl de solución tampón de fosfato citrato de pH 7,4 y se mezclaron. En la segunda etapa de dilución, una porción alícuota (20 μl) de la primera etapa de dilución fue dispensada además en 100 μl de solución tampón de fosfato citrato de pH 7,4 y se mezclaron. Finalmente, en la tercera etapa de dilución, una muestra (20 μl) de la segunda etapa de dilución fue diluida adicionalmente en 100 μl de solución tampón de fosfato citrato de pH 7,4 y se mezclaron. Todas las diluciones fueron realizadas en placas de 96 pocillos. Inmediatamente después de la última etapa de dilución se midió la turbidez de las tres etapas de dilución consecutivas con un nefelómetro. La dilución se hizo por triplicado para cada compuesto para eliminar errores ocasionales. En base a las mediciones de turbidez se realizó un ranking en 3 clases. Los compuestos con alta solubilidad obtuvieron una puntuación de 3, y para estos compuestos la primera dilución es clara. Los compuestos con solubilidad media obtuvieron una puntuación de 2. Para estos compuestos, la primera dilución no es clara y la segunda dilución es clara. Los compuestos con baja solubilidad obtuvieron una puntuación de 1, y para estos compuestos tanto la primera como la segunda dilución son poco claras. Se midió la solubilidad de 6 compuestos. De estos compuestos, 3 mostraron una puntuación de 3, otros 2 obtuvieron una puntuación de 2 y 1 demostró una puntuación de 1 (véase la tabla F-2).

Ejemplo C.4: Análisis de permeabilidad de membrana artificial paralela

Las muestras madre (porciones alícuotas de 10 μl de una solución madre de 5 mM en 100% de DMSO), fueron diluidas en una placa de pre-mezcla o de pocillo profundo que contenía 2 ml de un sistema tampón acuoso de pH 4 o de pH 7,4 (Concentrado de Solución de Sistema PSR4 (pION)).

Antes de que las muestras fueran añadidas a la placa de referencia, se añadieron 150 μl de solución tampón a los pocillos y se realizó una medición por UV de la prueba en blanco. A continuación, la solución tampón fue descartada y la placa fue usada como placa de referencia. Todas las mediciones fueron realizadas en placas resistentes a la UV (proveedor: Costar o Greiner).

Tras la medición en blanco de la placa de referencia, se añadieron 150 μl de las muestras diluidas a la placa de referencia a la placa de donante 1. Una placa de filtro aceptador 1 (proveedor: Millipore, tipo: MAIP N45) fue recubierta con 4 μl de la solución de formación de membrana artificial (1,2-dioleoil-sn-Glycer-3-Fosfolina en dodecano que contiene un 0,1% de 2,6-di-ter-butil-4-metilfenol, y se colocó sobre la parte superior de placa de donante 1 para formar un "sándwich". Se dispuso solución tampón (200 μl) en los pocillos de aceptador por la parte superior. El sándwich fue cubierto con una tapa y almacenado durante 18 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

Se realizó una medición en blanco de la placa de aceptador 2 con la adición de 150 μl de solución tampón a los pocillos, seguido de una medición de UV. Tras la medición en blanco de la placa de aceptador 2 la solución tampón fue desechada y se transfirieron 150 μl de solución de aceptador desde la placa de filtro de aceptador 1 hasta la placa de aceptador 2. A continuación la placa de filtro de aceptador 1 fue retirada del sándwich. Tras la medición en blanco de la placa de donante 2 (véase lo que antecede), se transfirieron 150 μl de la solución de donante desde la placa de donante 1 hasta la placa de donante 2. Los espectros de UV de la placa de donante 2, la placa de

aceptador 2 y los pocillos de la placa de referencia fueron explorados (con un SpectraMAX 190). Todos los espectros fueron procesados para calcular la permeabilidad con el software FSR4p Command. Todos los compuestos fueron medidos por triplicado. La carbamazepina, griseofulvina, acilguanina, atenolol, furosemida y clorotiazida fueron utilizados como estándares en cada experimento. Los compuestos fueron clasificados en 3 categorías como que tenían una permeabilidad baja (efecto medio $< 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; puntuación 1), una permeabilidad media (1×10^{-6} cm/s $>$ efecto medio $\geq 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; puntuación 2) o una permeabilidad alta ($\geq 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s; puntuación 3). Se comprobaron dos compuestos y mostraron al menos una puntuación de 2 a uno de los pHs medidos.

10 Ejemplo C.5: estabilidad metabólica

Se realizaron preparaciones de tejido sub-celular de acuerdo con Gorrod et al. (Xenobiótica 5: 453-462, 1975) mediante separación centrífuga tras la homogeneización mecánica de tejido. Tejido de hígado fue enjuagado en solución tampón de This-HCl (pH 7,4) 0,1 M en hielo frío para lavar el exceso de sangre. El tejido fue secado a continuación con material absorbente, pesado y picado en trozos gruesos utilizando tijeras quirúrgicas. Las piezas de tejido fueron homogeneizadas en 3 volúmenes de solución tampón de fosfato 0,1 M en hielo frío (pH 7,4) utilizando ya sea un homogeneizador Potter-S (Braun, Italia) equipado con un mortero de Teflón o ya sea un homogeneizador Sorvall Omni-Mix, durante 7×10 segundos. En ambos casos, el vaso fue mantenido en/sobre hielo durante el proceso de homogeneización.

Los homogeneizados de tejido fueron centrifugados a $9000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C utilizando una centrifugadora Sorvall o una ultracentrifugadora Bechman. El sobrenadante resultante fue almacenado a -80°C y se ha designado como "S9".

La fracción S9 puede ser centrifugada adicionalmente a $100.000 \times g$ durante 60 minutos (4°C) utilizando una ultracentrifugadora Beckman. El sobrenadante resultante fue aspirado cuidadosamente, dividido en porciones alícuotas y designado como "cytosol". El granulado fue re-suspendido en solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,4) en un volumen final de 1 ml por 0,5 g de peso de tejido original y designado como "microsomos".

Todas las fracciones sub-celulares fueron divididas en porciones alícuotas, congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso.

Para las muestras que van a ser probadas, la mezcla de incubación contenía PBS (0,1 M) compuesto ($5 \mu\text{M}$), microsomas (1 mg/ml) y un sistema generador de NADPH (0,8 mM de glucosa-6-fosfato, 0,8 mM de cloruro de magnesio y 0,8 Unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Las muestras de control contenían el mismo material pero los microsomas fueron sustituidos por microsomas inactivados por calor (10 minutos a 95 grados Celsius). La recuperación de los compuestos en las muestras de control fue siempre del 100%.

Las mezclas fueron pre-incubadas durante 5 minutos a 37 grados Celsius. La reacción fue iniciada en el instante cero ($t = 0$) por adición de 0,8 mM de NADP, y las muestras fueron incubadas durante 15 minutos ($t = 15$). La reacción fue terminada con la adición de 2 volúmenes de DMSO. A continuación las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a $900 \times g$ y los sobrenadantes fueron almacenados a temperatura ambiente durante no más de 24 horas con anterioridad al análisis. Todas las incubaciones fueron realizadas por duplicado. El análisis de los sobrenadantes se llevó a cabo con análisis LC-MS. La elución de las muestras se llevó a cabo sobre una Xterra MS C18 (50 x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$, Waters, US). Se utilizó un sistema de HPLC Alliance 2790 (Proveedor: Waters, US). La elución se realizó con solución tampón A (25 mM de amonio acetato (pH 5,2) en H_2O acetonitrilo (95/5)), siendo el solvente B acetonitrilo y el solvente C metanol, a un caudal de 2,4 ml/min. El gradiente empleado fue incrementando la concentración de fase orgánica desde 0% hasta por encima de un 50% de B y un 50% de C en 5 minutos hasta un 100% de B en 1 minuto de una forma lineal, y la concentración de la fase orgánica se mantuvo estacionaria durante 1,5 minutos adicionales. El volumen de inyección total de las muestras fue de $25 \mu\text{l}$.

Un espectrómetro de masas Quattro de triple cuádrupolo (proveedor: Micromass, Manchester, Reino Unido), equipado con una fuente ESI, fue utilizado como detector. Las temperaturas de la fuente y la de desolvatación fueron establecidas en 120 y 350°C respectivamente, y se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de secado. Los datos fueron adquiridos en modo de exploración positiva (reacción de ion simple). La tensión de cono se estableció en 10 V y el tiempo de estancia fue establecido en 1 segundo.

La estabilidad metabólica fue expresada como % de metabolismo del compuesto después de 15 minutos de incubación en presencia de microsomas activos (E(act))

$$(\% \text{ metabolismo} = (100\% - \frac{\text{Corriente Iónica Total (TIC) de E(act) a } t = 15}{\text{TIC de E(act) a } t = 0}) \times 100)$$

Los compuestos que tenían un porcentaje de metabolismo menor del 20% fueron definidos como estables altamente metabólicos. Los compuestos que tenían un metabolismo entre un 20 y un 70% fueron definidos como de estabilidad

intermedia, y los compuestos que mostraron un porcentaje de metabolismo por encima del 70% fueron definidos como de estabilidad metabólica baja. Estos compuestos de referencia fueron siempre incluidos cuando se realizó una detección de estabilidad metabólica. El verapamilo fue incluido como compuesto con baja estabilidad metabólica (% metabolismo = 73%). La cisaprida fue incluida como un compuesto de estabilidad metabólica media (% de metabolismo del 45%), y el propanol fue incluido como un compuesto con estabilidad metabólica entre intermedia y alta (25% de metabolismo). Estos compuestos de referencia fueron utilizados para validar el ensayo de estabilidad metabólica.

Se ensayaron tres compuestos, uno tuvo un porcentaje de metabolismo menor que el 20% y dos tuvieron un metabolismo entre 20% y 70%.

Ejemplo C 6: Capacidad de inducción de p21

Se ha aplicado el protocolo que sigue para determinar el nivel de expresión de proteína p21 en células de carcinoma ovárico A2780 humano. Las células A2780 (20000 células/180 µl) fueron plantadas en placas de 96 micropocillos en un medio RPMI 1640 suplementado con 2mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y un 10% de suero fetal bobino. 24 horas de la lisis de las células, se añadieron compuestos a concentraciones finales de 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M. Todos los compuestos probados estaban disueltos en DMSO y se realizaron diluciones adicionales en el medio de cultivo. 24 horas después de la adición del compuesto, los sobrenadantes fueron retirados de las células. Las células fueron lavadas con 200 µl de PBS a frío de hielo. Los pocillos fueron aspirados y se añadieron 30 µl de tampón de lisis (50 mM de Tris.HCl (pH 7,6), 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet p40 y 10% de glicerol). Las placas fueron incubadas durante la noche a -70 °C.

Un número apropiado de pocillos de microtitulación fueron retirados de la bolsa de papel y colocados en un porta-pocillos vacío. Se preparó una solución de trabajo (1x) del Tampón de Lavado (concentrado de lavado de placa 20x: 100 ml de solución concentrada 20 veces de PBS y surfactante. Contiene un 2% de cloroacetamida). El estándar p21WAF1 liofilizado fue reconstituido con H₂O destilada y diluido adicionalmente con diluyente de muestra (proporcionado en el kit).

Las muestras fueron preparadas por dilución de las mismas 1:4 en diluyente de muestra. Las muestras (100 µl) y los estándares p21WAF1 (100 µl) fueron colocados con pipetas en los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos fueron lavados 3 veces con 1x de solución tampón de lavado y a continuación se dispuso con pipeta en cada pocillo 100 µl de reactivo anticuerpo detector (una solución de anticuerpo p21WAF1 monoclonal biotinilado). Los pocillos fueron incubados a temperatura durante 1 hora y a continuación lavados tres veces con 1x de solución tampón de lavado. El conjugado 400x (conjugado de estreptavidina de peroxidasa: solución concentrada 400 veces) fue diluido y se añadió a los pocillos 100 µl de la solución 1x. Los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos y después lavados 3 veces con 1x de solución tampón de lavado y 1 vez con H₂O destilada. La solución de sustrato (sustrato cromogénico) (100 µl) fue añadida a los pocillos y los pocillos fueron incubados durante 300 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se añadió solución de parada a cada pocillo en el mismo orden que la solución de sustrato añadida. Se midió la absorbancia en cada pocillo utilizando un lector espectrofotométrico de placa a una longitud de onda dual de 450/595 nm.

Para cada experimento, controles (sin contener ningún medicamento) y una incubación en blanco (que no contenía células ni medicamentos) fueron realizados en paralelo. El valor de la prueba en blanco fue restado de los valores del control y la muestra. Para cada muestra, el valor para inducción de p21WAF1 (en unidades de absorbancia) fue expresado como porcentaje del valor para la p21WAF1 presente en el control. El porcentaje de inducción más alto que un 130% fue definido con inducción significativa. Se probaron dos compuestos en este ensayo, los cuales mostraron una inducción significativa.

Tabla F-2: La Tabla F-2 relaciona los resultados de los compuestos que fueron probados de acuerdo con los ejemplos C.1, C.2 y C.3.

Co. Núm.	Actividad de enzima pIC50	Actividad celular pIC50	Graduación de solubilidad
1	5,121	4,825	3
2	6,377	5,04	3
3	7,28	6,016	1
4	7,306	6,182	3
5	8,035	6,814	3
6	8,148	7,227	3
7	7,952	6,353	3
8	7,365	6,429	
9	7,889	7,009	3

10	7,427	6,182	
11	<5		
12	>5		
13	<5		
Co. Núm.	Actividad de enzima pIC50	Actividad celular pIC50	Graduación de solubilidad
14	<5		
15	>5		
16	5,698		
17	>5		
18	>5		
19	>5		
20	<5		
21	5		
22	>5		
23	>5		
24	<5		
25	5		
26	>5		
27	<5		
28	>5		
48	6,343	5,367	3
49	<5		2
50	5,206		2
51	7,561	5,929	
52	7,235	5,93	
53	7,295		
54	6,176		

D. Ejemplo de composición: tabletas recubiertas de película

5 Preparación del núcleo de la tableta

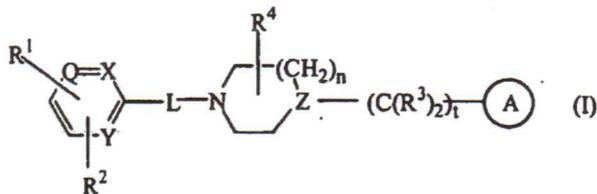
Una mezcla de 100 g de un compuesto de fórmula (I), 570 g de lactosa y 200 g de almidón, fueron bien mezclados y a continuación humedecidos con una solución de 5 g de sodio de sulfato de dodecil sodio y 10 g de polivinil pirrolidona en aproximadamente 200 ml de agua. La mezcla de polvo mojado se tamiza, se seca y se vuelve a tamizar. A continuación se añaden 100 g de celulosa microcristalina y 15 g de aceite vegetal hidrogenado. El conjunto se mezcla bien y se comprime en tabletas, proporcionando 10.000 tabletas, de las que cada una comprende 10 mg de un compuesto de fórmula (I).

15 Recubrimiento

A una solución de 10 de metil celulosa en 75 ml de etanol desnaturalizado, se añade una solución de 5 g de etil celulosa en 1,50 ml de diclorometano. A continuación se añaden 75 ml de diclorometano y 2,5 ml de 1,2,3-propanotriol, 10 g de polietileno se funden y se disuelven en 75 ml de diclorometano. La última solución se añade a la anterior y a continuación se añaden 2,5 g de octadecanoato de magnesio, 5 g de polivinil pirrolidona y 30 ml de suspensión de color concentrada y el conjunto es homogeneizado. Los núcleos de las tabletas son recubiertos con la mezcla así obtenida en un aparato de recubrimiento.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I),



5 las formas de *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo, en el que :

n es 0, 1, 2 ó 3, y cuando n es 0, entonces se busca un enlace directo;

10 t es 0, 1, 2, 3 ó 4, y cuando t es 0, entonces se busca un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o ;

cada X es nitrógeno o ;

cada Y es nitrógeno o ;

cada Z es nitrógeno o ;

R^1 es $-C(O)NH(OH)$;

15 R^2 es hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, nitro, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi, trifluorometil, di(C_{1-6} alquil) amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinil;

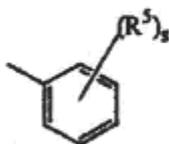
-L- es un enlace directo;

20 cada R^3 representa independientemente un átomo de hidrógeno, y un átomo de hidrógeno puede ser sustituido por un sustituyente elegido a partir de aril;

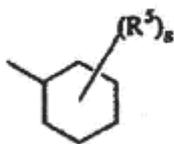
R^4 es hidrógeno, hidroxilo, amino, hidroxilo C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquil, C_{1-6} alquiloxi, aril C_{1-6} alquil, aminocarbonil, hidroxycarbonil, amino C_{1-6} alquil, aminocarbonil C_{1-6} alquil, hidroxycarbonil C_{1-6} alquil, hidroxiaminocarbonil, C_{1-6} alquiloxicarbonil, C_{1-6} alquilamino C_{1-6} alquil o di(C_{1-6} alquil) amino C_{1-6} alquil;

25

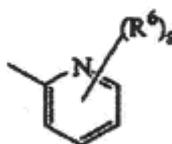
es un radical elegido a partir de



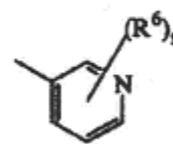
(a-1)



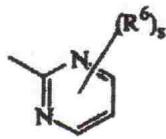
(a-2)



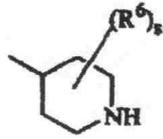
(a-3)



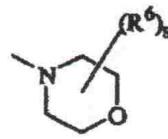
(a-4)



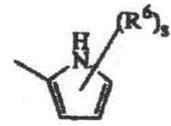
(a-5)



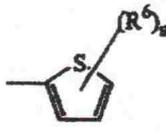
(a-6)



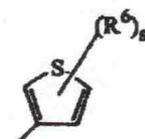
(a-7)



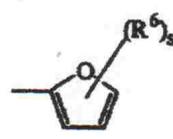
(a-8)



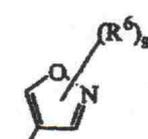
(a-9)



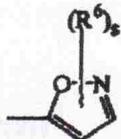
(a-10)



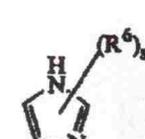
(a-11)



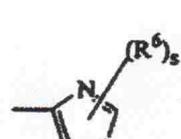
(a-12)



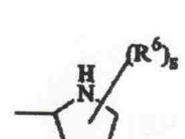
(a-13)



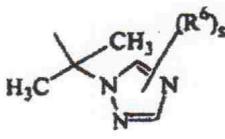
(a-14)



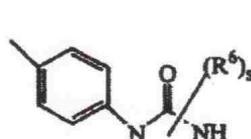
(a-15)



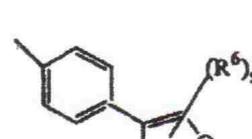
(a-16)



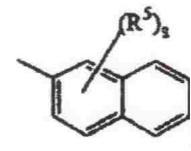
(a-17)



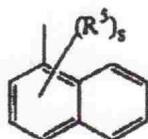
(a-18)



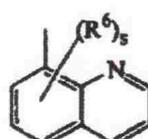
(a-19)



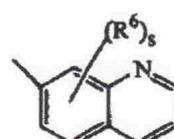
(a-20)



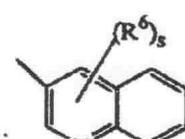
(a-21)



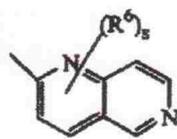
(a-22)



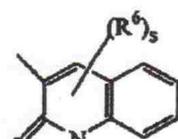
(a-23)



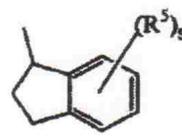
(a-24)



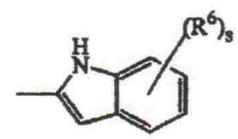
(a-25)



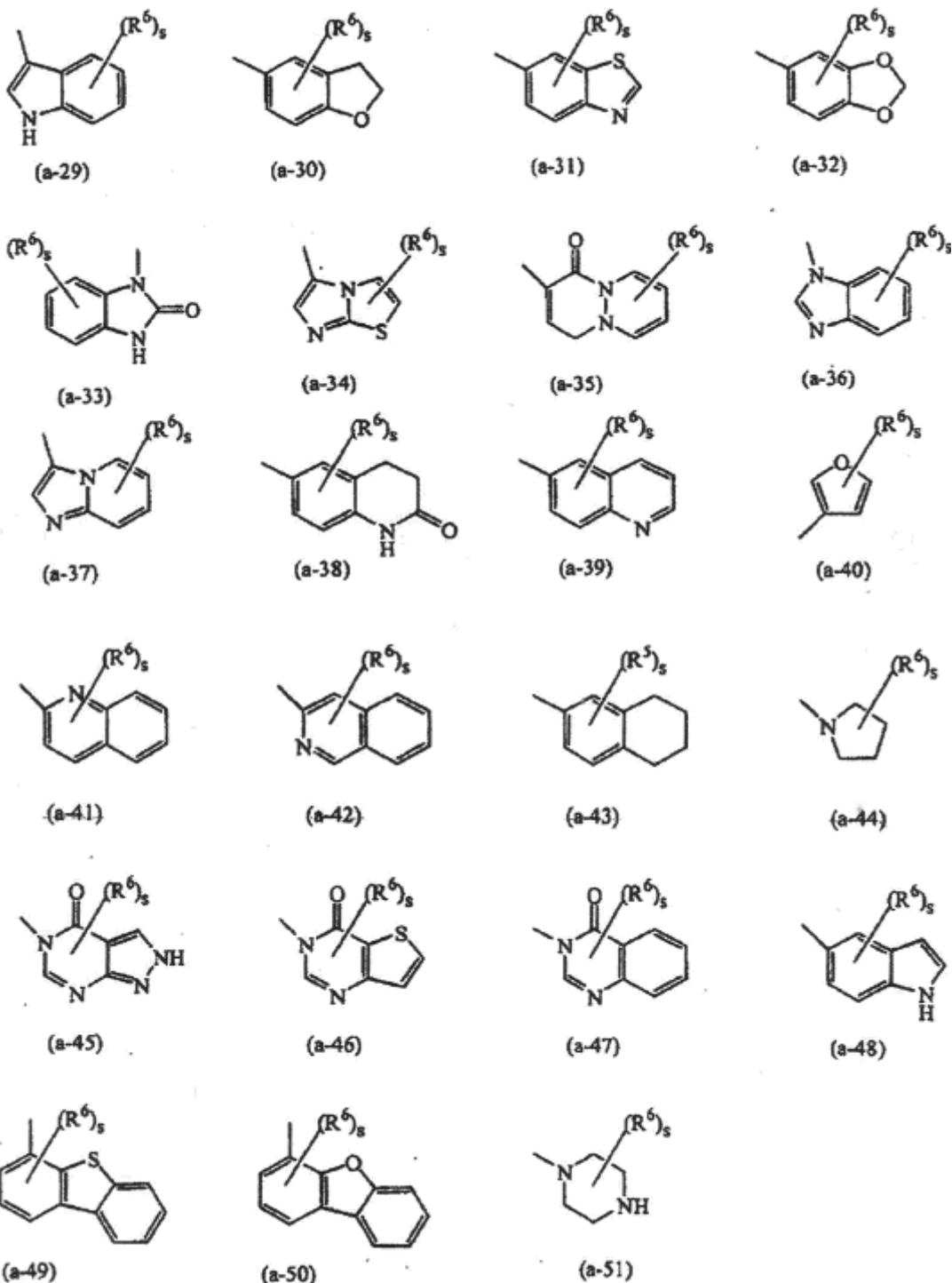
(a-26)



(a-27)



(a-28)



en la que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

cada R^5 y R^6 se eligen independientemente a partir de hidrógeno; halo; hidroxilo; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alquil; trihalo C_{1-6} alcoxi; C_{1-6} alquil; C_{1-6} alquil sustituido con aril y C_{3-10} cicloalquil; C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquiloxi C_{1-6} alquiloxi; C_{1-6} alquilcarbonil; C_{1-6} alquiloxicarbonil; C_{1-6} alquilsulfonil; ciano C_{1-6} alquil; hidroxilo C_{1-6} alquil; hidroxilo C_{1-6} alquiloxi; hidroxilo C_{1-6} alquilamino; amino C_{1-6} alquiloxi; di(C_{1-6} alquil) aminocarbonil; di(hidroxilo C_{1-6} alquil) amino; (aril) (C_{1-6} alquil) amino; di(C_{1-6} alquil) amino C_{1-6} alquiloxi; di(C_{1-6} alquil) amino C_{1-6} alquilamino;

5

- di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; arilsulfonil; arilsulfonilamino;
 ariloxi; ariloxi C₁₋₆ alquil; aril C₂₋₆ alquenodil; di(C₁₋₆ alquil) amino;
 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; di(C₁₋₆ alquil) amino (C₁₋₆ alquil) amino;
 di(C₁₋₆ alquil) amino (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 5 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino;
 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino;
 aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino;
 10 di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; ciano; tiofenil;
 tiofenil sustituido con di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil,
 di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil,
 hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil,
 hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil,
 15 di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquil,
 C₁₋₆ alquiloxipiperidinil, C₁₋₆ alquiloxipiperidinil C₁₋₆ alquil, morfolinil C₁₋₆ alquil,
 hidroxil C₁₋₆ alquil (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil; o di(hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 furanil; furanil sustituido con hidroxil C₁₋₆ alquil; benzofuranil; imidazolil;
 oxazolil; oxazolil sustituido con aril y C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiltriazolil; tetrazolil;
 20 pirrolidinil; pirrolil; piperidinil C₁₋₆ alquiloxi; morfolinil; C₁₋₆ alquilmorfinil;
 morfolinil C₁₋₆ alquiloxi;
 morfolinil C₁₋₆ alquil; morfolinil C₁₋₆ alquilamino;
 morfolinil C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; piperazinil; C₁₋₆ alquilpiperazinil;
 C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquiloxi; piperazinil C₁₋₆ alquil;
 25 naftalenilsulfonilpiperazinil; naftalenilsulfonilpiperidinil; naftalenilsulfonil;
 C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquilamino;
 C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquilpiperazinilsulfonil;
 aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquiloxi; aminosulfonilpiperazinil;
 aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquil; di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilpiperazinil;
 30 di(C₁₋₆ alquil) aminosulfonilpiperazinil C₁₋₆ alquil; hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil;
 hidroxil C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiloxipiperidinil;
 C₁₋₆ alquiloxipiperidinil C₁₋₆ alquil; piperidinilamino C₁₋₆ alquilamino;
 piperidinilamino C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil;
 (C₁₋₆ alquilpiperidinil) (hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquilamino;
 35 (C₁₋₆ alquilpiperidinil) (hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil;
 hidroxil C₁₋₆ alquiloxi C₁₋₆ alquilpiperazinil;
 hidroxil C₁₋₆ alquiloxi C₁₋₆ alquilpiperazinil C₁₋₆ alquil;
 (hidroxil C₁₋₆ alquil) (C₁₋₆ alquil) amino; (hidroxil C₁₋₆ alquil) (C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 hidroxil C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil; di(hidroxil C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;
 40 pirrolidinil C₁₋₆ alquil; pirrolidinil C₁₋₆ alquiloxi; pirazolil; tiopirazolil; pirazolil sustituido con dos sustituyentes elegidos a
 partir de C₁₋₆ alquil o trihalo C₁₋₆ alquil;
 piridinil; piridinil sustituido con C₁₋₆ alquiloxi, ariloxi o aril; pirimidinil;
 tetrahidropirimidinilpiperazinil; tetrahidropirimidinilpiperazinil C₁₋₆ alquil;
 quinolinil; indol; fenil; fenil sustituido con uno, dos o tres sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo,
 45 amino, nitro, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi,
 hidroxil C₁₋₄ alquil, trifluorometil, trifluorometiloxi, hidroxil C₁₋₄ alquiloxi,
 C₁₋₄ alquilsulfonil, C₁₋₄ alquiloxi, C₁₋₄ alquiloxicarbonil,
 amino C₁₋₄ alquiloxi, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquiloxi, di(C₁₋₄ alquil) amino,
 di(C₁₋₄ alquil) aminocarbonil, di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil,
 50 di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil,
 di(C₁₋₄ alquil) amino (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil,
 di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil amino C₁₋₄ alquil,
 di(C₁₋₄ alquil) amino (C₁₋₄ alquil) amino, di(C₁₋₄ alquil) amino (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil,
 di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil (C₁₋₄ alquil) amino,
 55 di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil,
 aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino,
 aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil,
 di(C₁₋₄ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino,
 di(C₁₋₄ alquil) aminosulfonilamino (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₆ alquil, ciano,
 60 piperidinil C₁₋₄ alquiloxi, pirrolidinil C₁₋₄ alquiloxi, aminosulfonilpiperazinil,
 aminosulfonilpiperazinil C₁₋₄ alquil, di(C₁₋₄ alquil) aminosulfonilpiperazinil,
 di(C₁₋₄ alquil) sulfonilpiperazinil C₁₋₄ alquil, hidroxil C₁₋₄ alquilpiperazinil,
 hidroxil C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquiloxipiperidinil,
 C₁₋₄ alquiloxipiperidinil C₁₋₄ alquil, hidroxil C₁₋₄ alquiloxi C₁₋₄ alquilpiperazinil,
 65 hidroxil C₁₋₄ alquiloxi C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquil,
 (hidroxil C₁₋₄ alquil) (C₁₋₄ alquil) amino, (hidroxil C₁₋₄ alquil) (C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil,

5 di(hidroxi C₁₋₄ alquil) amino, di(hidroxi C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquil, furanil, furanil sustituido con -CH=CH-CH=CH-,
 pirrolidinil C₁₋₄ alquil, pirrolidinil C₁₋₄ alquiloxi, morfolinil, morfolinil C₁₋₄ alquiloxi, morfolinil C₁₋₄ alquil,
 morfolinil C₁₋₄ alquilamino, morfolinil C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil, piperazinil,
 C₁₋₄ alquilpiperazinil, C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquiloxi, piperazinil C₁₋₄ alquil,
 C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquil, C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquilamino,
 C₁₋₄ alquilpiperazinil C₁₋₄ alquilamino C₁₋₆ alquil, tetrahidropirimidinilpiperazinil,
 tetrahidropirimidinilpiperazinil C₁₋₄ alquil, piperidinilamino C₁₋₄ alquilamino,
 piperidinilamino C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil,
 (C₁₋₄ alquilpiperidinil) (hidroxi C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino,
 10 (C₁₋₄ alquilpiperidinil) (hidroxi C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil,
 piridinil C₁₋₄ alquiloxi,
 hidroxi C₁₋₄ alquilamino, hidroxi C₁₋₄ alquilamino C₁₋₄ alquil,
 di(C₁₋₄ alquil) amino C₁₋₄ alquilamino, aminotiadiazolil,
 15 aminosulfonilpiperazinil C₁₋₄ alquiloxi, o tiofenil C₁₋₄ alquilamino;
 pudiendo ser cada R⁵ y R⁶ colocado sobre el nitrógeno en sustitución del hidrógeno;

20 aril es, en lo que antecede, fenil o fenil sustituido con uno o más sustituyentes elegidos independientemente cada uno de ellos a partir de halo, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi, trifluorometil, ciano o hidroxicarbonil.

2.- Un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1, en el que n es 1 ó 2; t es 0, 1, 2 ó 4; cada Q es



R¹ es -C(O)NH(OH); R² es hidrógeno o nitro; -L- es un enlace directo; R⁴ es hidrógeno;



25 es un radical elegido a partir de (a-1), (a-2), (a-3), (a-5), (a-6), (a-11), (a-18), (a-20), (a-21), (a-32), (a-33), (a-47) o (a-51); cada s es independientemente 0, 1, 2 ó 4; cada R⁵ y R⁶ se eligen independientemente a partir de hidrógeno, halo; trihalo C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquil sustituido con aril y C₃₋₁₀ cicloalquil; C₁₋₆ alquiloxi; C₁₋₆ alquilcarbonil; benzofuranil; naftalenilsulfonil; piridinil sustituido con ariloxi; fenil, o fenil sustituido con un sustituyente elegido independientemente a partir de hidroxi C₁₋₄ alquil, o morfolinil C₁₋₄ alquil.

30 3.- Un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1, en el que t es 1, 2, 3 ó 4;

R¹ es -C(O)NH(OH);

35 R² es hidrógeno, halo, hidroxi, amino, nitro, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi, trifluorometil o di(C₁₋₆ alquil) amino;

-L- es un enlace directo;

R⁴ es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxi C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi, aril C₁₋₆ alquil, aminocarbonil, amino C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquilamino C₁₋₆ alquil, o di(C₁₋₆ alquil) amino C₁₋₆ alquil;



40 es un radical elegido a partir de (a-1), (a-3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42), (a-44), (a-45), (a-46), (a-47), (a-48) y (a-51);

45 cada s es independientemente 0, 1, 2, 3 ó 4;

R⁵ es hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihalo C₁₋₆ alquil; trihalo C₁₋₆ alquiloxi; C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiloxi; C₁₋₆ alquilcarbonil; C₁₋₆ alquiloxicarbonil; C₁₋₆ alquilsulfonil; hidroxi C₁₋₆ alquil; ariloxi; di(C₁₋₆ alquil) amino; ciano;

50 Tiofenil; furanil; furanil sustituido con hidroxi C₁₋₆ alquil; benzofuranil;

Imidazolil; oxazolil; oxazolil sustituido con aril y C₁₋₆ alquil;

C₁₋₆ alquiltriazolil; tetrazolil; pirrolidinil; pirrolil; morfolinil;

C₁₋₆ alquilmorfilinil; piperazinil;

C₁₋₆ alquilpiperazinil; hidroxi C₁₋₆ alquilpiperazinil;

55 C₁₋₆ alquiloxipiperidinil; pirazolil; pirazolil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos a partir de C₁₋₆ alquil o trihalo C₁₋₆ alquil; piridinil; piridinil sustituido con C₁₋₆ alquiloxi, ariloxi o aril; pirimidinil; quinolinil; indol;

fenil o fenil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo; C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi o trifluorometil;

R⁶ es hidrógeno; halo; hidroxil; amino; nitro; trihalo C₁₋₆ alquil; trihalo C₁₋₆ alquiloxi;

5 C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiloxi; C₁₋₆ alquilcarbonil; C₁₋₆ alquiloxicarbonil;

C₁₋₆ alquilsulfonyl; hidroxil C₁₋₆ alquil; ariloxi; di(C₁₋₆ alquil) amino; ciano;

Piridinil; fenil o fenil sustituido con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente a partir de halo; C₁₋₆ alquil, C₁₋₆ alquiloxi o trifluorometil.

10 4.- Un compuesto según se reivindica en las reivindicaciones 1 y 2, en el que n es 1; t es 0 ó 1; cada Q es



cada X es nitrógeno; cada Y es nitrógeno; R¹ representa independientemente -C(O)NH(OH); R² es nitrógeno; cada Y es nitrógeno; R¹ es -C(O)NH(OH); R² es hidrógeno; -L- es un enlace directo; cada R³



representa independientemente un átomo de hidrógeno; R⁴ es hidrógeno;

15 un radical elegido a partir de (a-6), (a-11), (a-20), (a-47) o (a-51); cada s es independientemente 0, 1 ó 4; y cada R⁵ y R⁶ se eligen independientemente a partir de hidrógeno; C₁₋₆ alquil; C₁₋₆ alquiloxi; naftalenilsulfonyl; o fenil sustituido con hidroxil C₁₋₄ alquil, o morfolinil C₁₋₄ alquil.

5.- Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 y 4 elegido a partir de los compuestos núm. 3, núm. 4, núm. 8, núm. 5, núm. 7, núm. 6 y núm. 9.

20

0.91 C ₂ HF ₃ O ₂ ; N° 3 d. 3	0.86 C ₂ HF ₃ O ₂ ; N° 4 d. 4
C ₂ HF ₃ O ₂ (1:1); N° 8 o.8	0.83 C ₂ HF ₃ O ₂ ; N° 5 d.5
0.79 C ₂ HF ₃ O ₂ ; N° 7 d.7	0.83 C ₂ HF ₃ O ₂ ; N° 6 d.6
0.47 H ₂ O .1.99 C ₂ HF ₃ O ₂ ; N° 9 o.9	

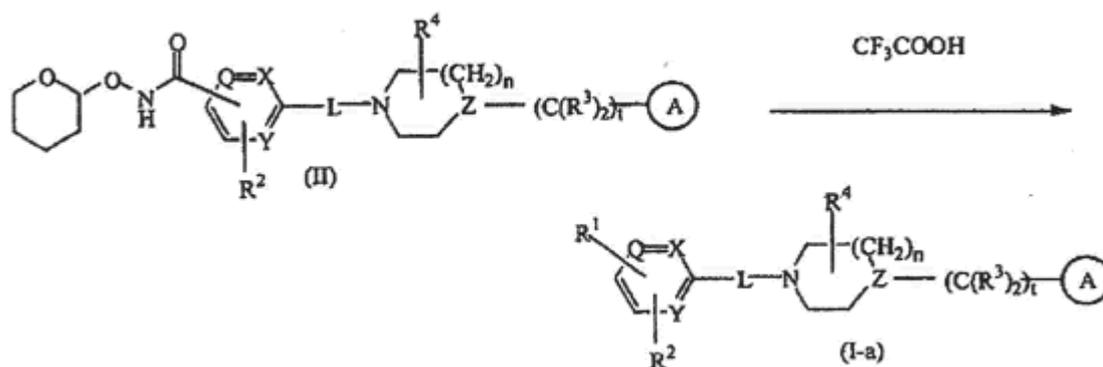
6.- Una composición farmacéutica que comprende portadores farmacéuticamente aceptables y como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como el reivindicado en las reivindicaciones 1 a 5.

7.- Un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica según se reivindica en la reivindicación 6, en el que se mezclan íntimamente los portadores farmacéuticamente aceptables y un compuesto como el reivindicado en las reivindicaciones 1 a 5.

5 8.- Un compuesto según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso como medicina.

9.- Uso de un compuesto como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

10 10.- Un procedimiento para la preparación de un compuesto como el reivindicado en la reivindicación 1, que se caracteriza por hacer reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (II) con un ácido apropiado, tal como por ejemplo, ácido trifluoroacético, produciendo un ácido hidroxámico de fórmula (I-a), en el que R^1 es $-C(O)NH(OH)$



15 11.- Un método de detección o de identificación de una HDAC en una muestra biológica, que comprende detectar o medir la formación de un complejo entre un compuesto etiquetado como el definido en la reivindicación (I) y una HDAC.

20 12.- Una combinación de un agente anti-cáncer y un inhibidor de HDAC como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.