O.F.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 06-83386

54. TITULO "DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS Y LA SÍNTESIS DE DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07D 403/06 ; A61K31/496

71. SOLICITANTE NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO SAN DIEGO, ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

72. BOGOTA, D.C. 23 AGO 2006

(FORMA P 10)

S.S.

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-083386- -00000-0000
Fec: 2006-09-23 17:15:31 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIVII
Eve: 376 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 407

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 04/09/06

① SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: **NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.** Dirección: 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: San Diego, Estado de California, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estado de California, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre: PALLADINO Michael A.; LLOYD George Kenneth; HAYASHI Yoshio y NICHOLSON Benjamin. Dirección: 3357 Fortuna Ranch Road, Olivenhain, CA 92024; 13932 Dodder Court, Poway, CA 92064; 3-9-18-301 Heso, Ritto, Shiga 520-3031 y 3936 Goldfinch Street, San Diego, CA 92103. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Japón	

⑤ PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2005/003636 Fecha: 04/02/05
Publicación Internacional No. WO 2005/077940 A1 Fecha: 25/08/05

⑥ Título (54) **"DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS Y LA SÍNTESIS DE DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS"**

⑦ Clasificación Internacional (51) C07D 403/06; A61K 31/496; A61P 35/00

⑧ Prioridad SI ☒ NO ☐

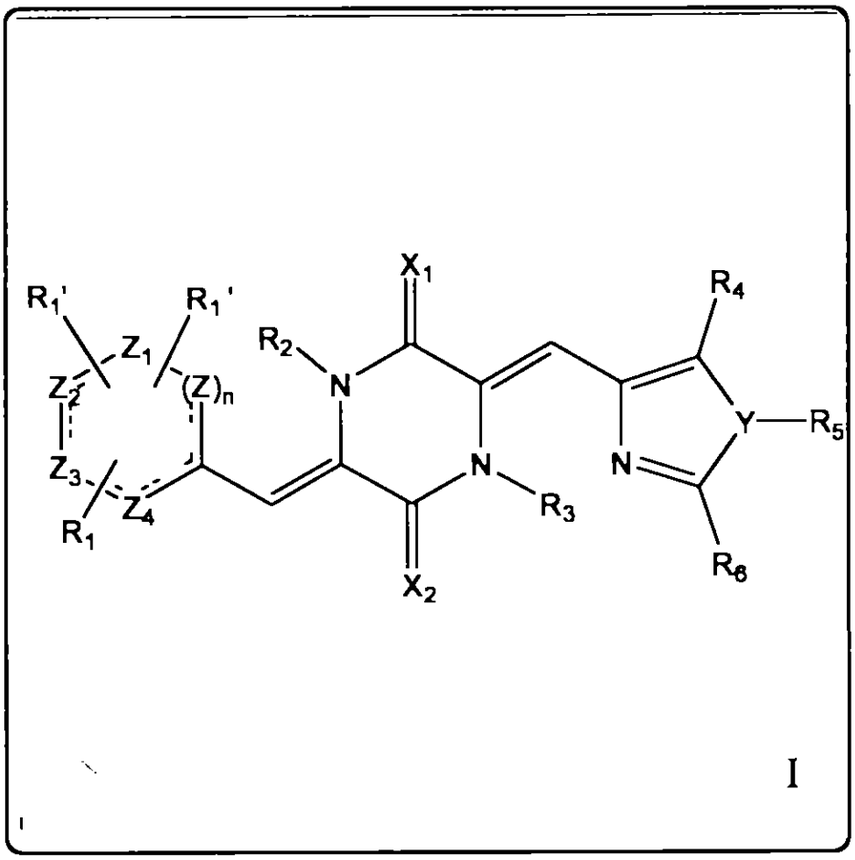
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	04/02/04	60/542,073
US	01/11/04	60/624,262

⑨ Comprobante de Pago No. 06 - 63.160 **Fecha:** 17/08/06

(10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [x] Documento de Representación Legal
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicaciones dibujos)
- [ ] Copia del reporte preliminar Internacional sobre patentabilidad
- [ ] Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad
- [ ] De ser el caso copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [x] Arte Final 12X12
- [ ] De ser el caso Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [x] Otros Reporte de búsqueda internacional con su traducción publicación con su traducción capítulo reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción y anexo explicativo de modificaciones a las reivindicaciones

(11) FIGURA CARACTERISTICA.



I

(12) Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39 690 713 Usaquén T.P. 53.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-083386- -00000-0000
Fec: 2006-08-23 17:15:31 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEYM
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 407

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 63,160
FECHA : AGOSTO 17 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	45313185	17/08/2006	8,215,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	53005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2

3

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

3

4

TRADUCCIÓN OFICIAL Nº 06/13/133

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLE

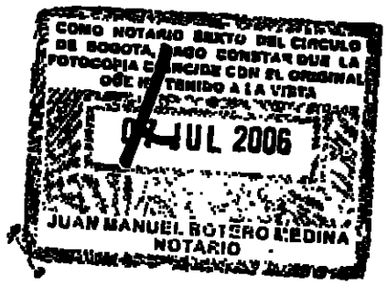
(Convención de la Haya de Octubre 5, 1961)

1. País: *Estados Unidos de América*
2. Este Documento Público ha sido firmado por Linda D. Rodríguez
3. En ejercicio de su investidura de Notario Público, Estado de California
4. Lleva el sello/timbre de Linda D. Rodríguez, Notario Público, Estado de California

CERTIFICADO

5. Certificado en Sacramento, California
6. Fecha: Mayo 31, 2005
7. Por el Subsecretario de Estado, Estado de California
8. Nº 241115
9. Sello/ timbre
10. Firma (Ilegible)

    Secretario de Estado



N. del T. hay un sello dorado en relieve: "The Great Seal of the State of California".

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE
CIONES EXTERIORES

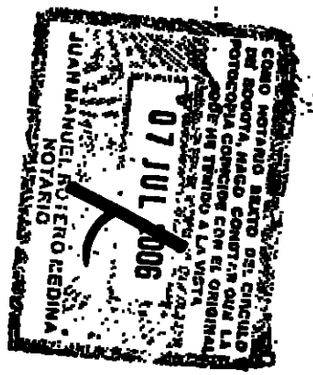
Jtbar Espinal

LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

06 JUN 1 A 10

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



5

Estado de California)

Condado de San Diego) ss.

El día 23 de Mayo, año 2005, ante mi, Linda D. Rodríguez, Notario Público, compareció personalmente Kobi M. Sethna, de **Nereus Phamaceuticals, Inc.**, a quien conozco personalmente cómo la persona cuyo nombre suscribe el presente instrumento y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello de tinta: Linda D. Rodríguez. Comisión Nº 1523682, Notario Público, California, Condado de San Diego. La comisión expira: Oct. 31, 2008.

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en Inglés y Español.

DE: NEREUS PHARMACEUTICALS, INC., con domicilio en 10480 Waterloo Circle, San Diego, CA 92121, U.S.A.

PARA: Alicia Lloreda y/o Gustavo Tamayo y/o Ignacio Santamaría y/o Enrique Alvarez de Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el día 23 de Mayo, año 2005.

(firma ilegible)

Kobi M. Sethna, Presidente y Gerente General (CEO)

CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
07 JUL 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

3

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

CERTIFICADO DEL REPRESENTANTE CORPORATIVO

Por el presente declaro que **Nereus Pharmaceuticals** Inc., es una corporación debidamente organizada y existente bajo las leyes de California, U.S.A., con su sede comercial principal en 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 U.S.A. y que yo Kobi M. Sethna soy el Presidente y Gerente General de dicha corporación y estoy debidamente autorizado cómo representante legal para formalizar ciertos documentos relacionados con patentes, modelos de utilidad, diseños y marcas registradas, en nombre y beneficio de la corporación.

Por el presente testifico que Nereus Pharmaceuticals Inc., está constituida legalmente por un periodo de duración aún no vencido, la cual ejerce su objeto social de conformidad con las leyes de California, U.S.A. Yo he visto el Acta Constitutiva de dicha corporación, formalizada en San Diego, California, en la fecha de Mayo 23, 2005, y por el presente doy fe que los hechos contenidos en el presente son ciertos.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE LA
DE ESTE ORIGINAL
A LA VISTA
07 JUL 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

Fecha: Mayo 23, 2005

En nombre de **Nereus Pharmaceuticals, Inc**

Por: (firma ilegible)

Kobi M. Sethna, Presidente & Gerente General

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

7

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLE

(Convención de la Haya de Octubre 5, 1961)

1. País: *Estados Unidos de América*
2. Este Documento Público ha sido firmado por Linda D. Rodríguez
3. En ejercicio de su investidura de Notario Público, Estado de California
4. Lleva el sello/timbre de Linda D. Rodríguez, Notario Público, Estado de California

CERTIFICADO

5. Certificado en Sacramento, California
6. Fecha: Mayo 31, 2005
7. Por el Subsecretario de Estado, Estado de California
8. Nº 241116
9. Sello/ timbre
10. Firma (Ilegible)

    Secretario de Estado

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
01 JUN 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

N. del T. hay un sello dorado en relieve: "The Great Seal of the State of California".

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Estado de California)

Condado de San Diego) ss.

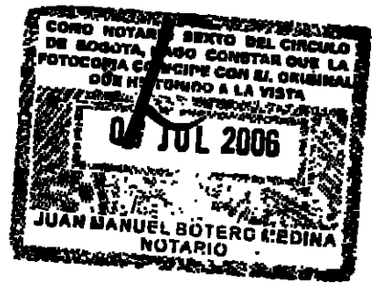
El día 23 de Mayo, año 2005, ante mi, Linda D. Rodríguez, Notario Público, compareció personalmente Kobi M. Sethna, de **Nereus Pharmaceuticals, Inc.**, a quien conozco personalmente cómo la persona cuyo nombre suscribe el presente instrumento y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello de tinta: Linda D. Rodríguez. Comisión Nº 1523682, Notario Público, California, Condado de San Diego. La comisión expira: Oct. 31, 2008.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



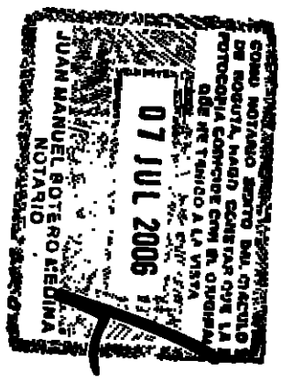
MINISTERIO DE
ACIONES EXTER...

...Ibar Espinel
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 JUN 10 A 11:11

MOS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

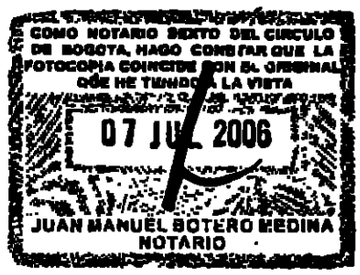
1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by Linda D. Rodriguez*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Linda D. Rodriguez, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 31st day of May 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 241115*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature



Secretary of State

NP-24 A (REV. 4-05)

BY

OSP 05 88970

10

STATE OF California)
) ss.
COUNTY OF San Diego)

On 05/23/05, before me, Linda D. Rodriguez, Notary Public personally appeared Kabi M. Sethna, of Nereus Pharmaceuticals, Inc., personally known to me (~~or proved to me on the basis of satisfactory evidence~~) to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument, and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her/their~~ signature(s) on the instrument the person(~~s~~), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

[SEAL]

LINDA D. RODRIGUEZ
Comm. # 1523682
NOTARY PUBLIC-CALIFORNIA
San Diego County
My Comm. Expires Oct. 31, 2006

Linda D. Rodriguez
Signature

1710742
051205

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCUITO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
07 JUL 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

10

//

Los abajo firmados,

NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.
Una sociedad organizada y existente bajo las leyes de California, Estados Unidos de America.
con domicilio en
10480 Wateridge Circle
San Diego, CA 92121
Estados Unidos de America

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y vecindario en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dada y firmada 23 de Mayo de 2005.

The undersigned,

NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.
A corporation organized and existing under the laws of the California, United States of America.
domiciled at
10480 Wateridge Circle
San Diego, CA 92121
United States of America

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, 5bth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this May 23, 2005

Kobi M. Sethna, President & CEO

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, NASO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
07 JUL 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

12

CORPORATION NATIONALITY REPRESENTATIVE CERTIFICATE

I hereby declare that **Nereus Pharmaceuticals, Inc.**, of USA, is a corporation duly organized and existing under the laws of California, USA, and having its principle place of business at 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 USA, and that I, Kobi M. Sethna, am President and Chief Executive Officer of said corporation and am duly authorized as a lawful representative to execute certain documents relating to patents, utility models, designs and trademarks on behalf of the corporation.

I hereby attest that Nereus Pharmaceuticals, Inc. is legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purpose in accordance with the laws of California, USA. I have seen the Articles of Incorporation of said corporation executed at San Diego, California, under date of May 23, 2005, and hereby attest that the facts therein contained are true.

Dated this 23rd day of May 2005

On behalf of **Nereus Pharmaceuticals, Inc.**

By: Kobi Sethna

Printed Name and Title: Kobi M. Sethna, President & CEO

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME TENIDO A LA VISTA
07 JUL 2006
JUAN MANUEL ROTERO MEDINA
NOTARIO

2

13

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

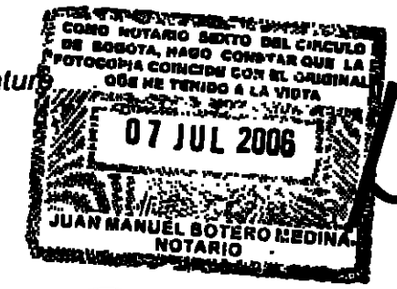
1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by Linda D. Rodriguez*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Linda D. Rodriguez, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 31st day of May 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 241116*
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature*



Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 80870

13

14

STATE OF California)
) ss.
COUNTY OF San Diego)

On 5/23/05, before me, Linda D. Rodriguez, Notary Public personally appeared Kobi M. Sethna, of **Nereus Pharmaceuticals, Inc.**, personally known to me (or ~~proved to me on the basis of satisfactory evidence~~) to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument, and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(ies), and that by his/~~her/their~~ signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

[SEAL]

LINDA D. RODRIGUEZ
Comm. # 1523682
NOTARY PUBLIC-CALIFORNIA
San Diego County
My Comm. Expires Oct. 31, 2006

Linda D. Rodriguez
Signature

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
07 JUL 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

74

15

FORMATO DE DIGITALIZACIO
RELACION DE ANEXOS

Royal Technologies S.A.

Item		Expediente No	06083386	No de Folio
			No de unidades	√
1	CD			
2	DVD			
3	REVISTA			
4	LIBRO			
5	PERIODICO			
6	DISQUETES			
7	SOBRE DE MANILA X		1	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA			
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO			
10	OTROS:			

Observaciones:

un sobre qi contiene arte final.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

16

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el Item 5 a continuación.	
NEREUS-062QP		
Solicitud internacional No. PCT/US2005/003636	Fecha de registro internacional *(día/mes/año)* 04/02/2005	Fecha de Prioridad (Primera) *(día/mes/año)* 04/02/2004
Solicitante		
NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 6 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☐ Respecto a una secuencia de ácido nucleótido y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Recuadro No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Recuadro II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Recuadro III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. 6

☒ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☐ Ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/003636 17

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 C07D403/06 C07D403/14 C07D405/14 C07D407/14 C07D487/04
A61K31/496 A61P31/00 A61P35/00

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07D A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, Dato WPI, PAJ, BEILSTEIN, Dato CHEM ABS, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
P, X	WO 2004/054498 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC) 1 de Julio de 2004 (2004-07-01) Fórmula I; página 60, compuesto KPU-2 página 10, líneas 1-13; reivindicaciones 15, 25, 39, 40; tablas 2-11 página 106, líneas 30-33 — -/--	1, 4-7, 12-15, 17-19, 23-25, 31-33, 35, 36, 38,39

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional	Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional
30 de Junio de 2005	19/07/2005

Nombre y dirección del correo de ISA	Funcionario autorizado
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax No. (+31-70) 340-3016	Rudolf, M

20

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/003636 18

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	EP 1 264 831 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.) NIPPON STEEL CHEMICAL CO., LTD; KANZAKI,) 11 de Diciembre de 2002 (2002-12-11) Fórmula (I) - (V) página 4, líneas 1-40; paragrafos 6, 28, 29; reivindicaciones 5, 14 página 5, líneas 9-46	1, 4-9, 12-19, 23, 24, 31, 32, 38-41
X Y	HIROSHI KANZAKI, SATOHIRO YANAGISAWA, KANEO KANOH, TERUHIKO NITODA: "Un nuevo y potente inhibidor del ciclo celular sintesis enzimatica y actividad inhibitoria de dehidrofenila histina con embriones de erizo de mar" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 55, No. 12, 2002, páginas 1042 -1047, XP009049905 página 1045 – página 1046 páginas 1042, 1046	1, 4, 5, 8, 9, 12-15, 17, 18, 23, 31, 32, 38, 39 1, 4-9, 12-15, 17, 18, 23-31, 32, 38, 39
Y	US 2002/143021 A1 (FUKUMOTO KENJU ET AL) 3 de Octubre de 2002 (2002-10-03) Fórmula (I), paragrafos '0015!, '0023!; reivindicaciones 1, 6-8; ejemplo 4-16	1, 4-9, 12-15, 17, 18, 23-31, 32, 38, 39
A	WO 95/21832 A (XENOVA LIMITED; BROCCHINI, STEPHEN, JAMES; BRYANS, JUSTIN, STEPHEN; FO) 17 de Agosto de 1995 (1995-08-17) Fórmula (A) página 2, líneas 1-18; ejemplos 13, 14, 16	1-41

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210

Continuación de la Casilla II. 1
Aunque las reivindicaciones 15-30, 33-36 están dirigidas a un método para el tratamiento del cuerpo humano/animal, se ha llevado a cabo la búsqueda y con base en los efectos supuestos del compuesto/composición.

Continuación de la Casilla II. 2

Reivindicaciones Nos.: 2, 3, 10, 11, 37

Las reivindicaciones 2, 3, 10, 11 todas dependientes de la reivindicación 1 hacen referencia a "...dicho primer aldehído..." y "...dicho segundo aldehído...". Sin embargo, la reivindicación 1 es completamente silenciosa acerca de un primer o un segundo aldehído. Por lo tanto, sigue siendo oscuro cuáles compuestos en las reivindicaciones 2, 3, 10, 11, en combinación con la reivindicación 1, son en verdad reivindicados.

La reivindicación 37 no define los agentes comprendidos por las características técnicas pero simplemente menciona un resultado que debe obtenerse; por lo tanto, no se ha llevado a cabo ninguna búsqueda significativa para esta reivindicación.

Se atrae la atención del solicitante al hecho de que las reivindicaciones relacionadas con invenciones respecto de las cuales no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional no tienen que ser el objeto de un examen preliminar internacional (Regla 66.1(e) PCT). Se le notifica al solicitante que la política de la EPO al actuar como una Autoridad de Examen Preliminar Internacional normalmente es no llevar a cabo un examen preliminar en asuntos que no se han buscado. Este es el caso prescindiendo de si las reivindicaciones han sido enmendadas o no siguiendo el recibo del reporte de búsqueda o durante un procedimiento del Capitulo II. Si el solicitante procede a la fase regional ante la EPO, se le recuerda al solicitante que puede llevarse a cabo una búsqueda durante el examen ante la EPO (ver Lineamiento de la EPO C-VI, 8.5), si se solucionan los problemas que llevaron a la declaración del Artículo 17(2).

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/003636 20

Casilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el Artículo 17.2)a), algunas reivindicaciones no fueron objeto de una búsqueda por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.: 2, 3, 10, 11, 37
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque las reivindicaciones 15-30, 33-36 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/ la composición.

2. ☒ Reivindicaciones Nos.: 2, 3, 10, 11, 37
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

VER INFORMACION ADICIONAL hoja PCT/ISA/210

3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

23

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/003636 . 21

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004054498 A	01-07-2004	AU 2003302721 A1	09-07-2004
		CA 2494049 A1	01-07-2004
		EP 1529044 A2	11-05-2005
		WO 2004054498 A2	01-07-2004
		US 2005090667 A1	28-04-2005
EP 1264831 A	11-12-2002	AU 7451100 A	31-07-2001
		BR 0017067 A	22-10-2002
		CA 2403790 A1	26-07-2001
		EP 1264831 A1	11-12-2002
		MX PA02006826 A	05-04-2004
		NZ 519989 A	28-05-2004
		WO 0153290 A1	26-07-2001
		ZA 200206576 A	12-05-2003
US 2002143021 A1	03-10-2002	US 6358957 B1	19-03-2002
		US 2004102454 A1	27-05-2004
WO 9521832 A	17-08-1995	AU 693159 B2	25-06-1998
		AU 1667795 A	29-08-1995
		CA 2182877 A1	17-08-1995
		EP 0745070 A1	04-12-1996
		WO 9521832 A1	17-08-1995
		GB 2286395 A ,B	16-08-1995
		JP 9509157 T	16-09-1997
		ZA 9501180 A	14-08-1996

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
NEREUS.062QP		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2005/003636	04/02/2005	04/02/2004
Applicant		
NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
      [ ] The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. [ ] Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant.
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant.
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 6
      [X] as suggested by the applicant.
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract.

RECEIVED
NEWPORT, INT
JUL 20 2005
KNOBBE, MARTENS
OLSON & BEAR, LLP

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/003636 23

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D403/06 C07D403/14 C07D405/14 C07D407/14 C07D487/04
A61K31/496 A61P31/00 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2004/054498 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC) 1 July 2004 (2004-07-01) Formula I; page 60, compound KPU-2 page 10, lines 1-13; claims 15,25,39,40; tables 2-11 page 106, lines 30-33 -/—	1,4-7, 12-15, 17-19, 23-25, 31-33, 35,36, 38,39

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 June 2005	19/07/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Rudolf, M

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 264 831 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC; NIPPON STEEL CHEMICAL CO., LTD; KANZAKI,) 11 December 2002 (2002-12-11) Formulae (I) - (V) page 4, lines 1-40, paragraphs 6,28,29; claims 5,14 page 5, lines 9-46	1,4-9, 12-19, 23,24, 31,32, 38-41
X	HIROSHI KANZAKI, SATOHIRO YANAGISAWA, KANEO KANOH, TERUHIKO NITODA: "A Novel Potent Cell Cycle Inhibitor Dehydrophenylahistin - Enzymatic Synthesis and Inhibitory Activity toward Sea Urchin Embryo" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 55, no. 12, 2002, pages 1042-1047, XP009049905 page 1045 - page 1046	1,4,5,8, 9,12-15, 17,18, 23,31, 32,38,39
Y	Pages 1042, 1046	1,4-9, 12-15, 17,18, 23,31, 32,38,39
Y	US 2002/143021 A1 (FUKUMOTO KENJI ET AL) 3 October 2002 (2002-10-03) Formula (I), paragraphs '0015!, '0023!; claims 1,6-8; examples 4-16	1,4-9, 12-15, 17,18, 23,31, 32,38,39
A	WO 95/21832 A (XENOVA LIMITED; BROCCHINI, STEPHEN, JAMES; BRYANS, JUSTIN, STEPHEN; FO) 17 August 1995 (1995-08-17) Formula (A) page 2, lines 1-18; examples 13,14,16	1-41

2

International Application No. PCT/US2005 /003636

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 15-30,33-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2,3,10,11, 37

Claims 2,3,10,11 all depending on claim 1 make reference to "...said first aldehyde..." and "...said second aldehyde...". However, claim 1 is completely silent about a first or a second aldehyde. It remains therefore obscure which compounds in claims 2,3,10,11, in combination with claim 1, are actually claimed.

Claim 37 does not define the agents involved by technical features but merely recites a result to be achieved, hence no meaningul search for this claim can be carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/003636

26

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 2,3,10,11,37
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 15-30,33-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.: 2,3,10,11, 37
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2005/003636

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004054498 A	01-07-2004	AU 2003302721 A1	09-07-2004
		CA 2494049 A1	01-07-2004
		EP 1529044 A2	11-05-2005
		WO 2004054498 A2	01-07-2004
		US 2005090667 A1	28-04-2005
EP 1264831 A	11-12-2002	AU 7451100 A	31-07-2001
		BR 0017067 A	22-10-2002
		CA 2403790 A1	26-07-2001
		EP 1264831 A1	11-12-2002
		MX PA02006826 A	05-04-2004
		NZ 519989 A	28-05-2004
		WO 0153290 A1	26-07-2001
		ZA 200206576 A	12-05-2003
US 2002143021 A1	03-10-2002	US 6358957 B1	19-03-2002
		US 2004102454 A1	27-05-2004
WO 9521832 A	17-08-1995	AU 693159 B2	25-06-1998
		AU 1667795 A	29-08-1995
		CA 2182877 A1	17-08-1995
		EP 0745070 A1	04-12-1996
		WO 9521832 A1	17-08-1995
		GB 2286395 A ,B	16-08-1995
		JP 9509157 T	16-09-1997
		ZA 9501180 A	14-08-1996

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

28

(43) Fecha de Publicación
25 de Agosto de 2005 (25.08.2005)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT WO 2005/077940 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: C07D 403/06, 403/14, 405/14, 407/14, 487/04, A61K 31/496, A61P 31/00, 35/00

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2005/003636

(22) Fecha de Registro Internacional: 4 de Febrero de 2005 (04.02.2005)

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:
60/542,073 4 de Febrero de 2004 (04.02.2004) US
60/624,262 1 de Noviembre de 2004 (01.11.2004) US

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto Estados Unidos de América): NEREUS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventores: e
(75) Inventores/solicitantes: (para los Estados Unidos de América únicamente): PALLADINO, Michael, A. [US/US]; 3357 Fortuna Ranch Road, Olivenhain, CA 92024 (US). LLOYD, George, Kenneth [CA/US]; 13932 Dodder Court, Poway, CA 92064 (US). HAYASHI, Yoshio [JP/JP]; 3-9-18-301 Hcso, Ritto, Shiga 520-3031 (JP). NICHOLSON, Benjamin [GB/US]; 3936 Goldfinch Street, San Diego, CA 92103 (US).

(74) Agente: DELANEY, Karoline, A.; KNOBBE MARTENS, OLSON AND BEAR, LLP, 2040 Main Street, Fourteenth Floor, Irvine, CA 92614 (US).

(81) Estados Designados (*salvo que de otro modo indicado para cada clase de protección nacional disponible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

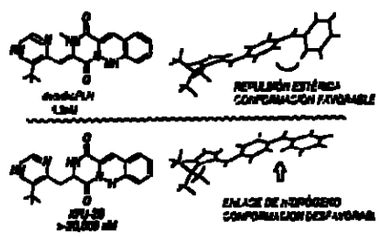
(84) Estados Designados (*salvo que de otro modo indicado para cada clase de la protección regional disponible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

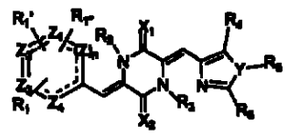
Declaración bajo la Regla 4.17:
__ de la calidad del inventor (Regla 4.17(iv)) para EU únicamente

Publicado:
__ con *reporte de búsqueda internacional*
__ *antes de que expire el tiempo límite para enmendar las reivindicaciones y para volverse a publicar en caso de recibir las enmiendas*

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS Y LA SÍNTESIS DE DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS"





(I)

(57) Resumen: Se describen compuestos representados por la siguiente estructura (I): al igual que métodos para la producción de dichos compuestos, caracterizado porque los métodos comprenden reaccionar una diacildicetopiperazina con un primer aldehído para producir un compuesto intermedio; y reaccionar el compuesto intermedio con un segundo aldehído para producir la clase de compuestos con la estructura genérica, en donde el primer aldehído y el el segundo aldehídos se eligen del grupo que consiste de un oxazolcarboxaldehído, imidazolcarboxaldehído, un benzaldehído, derivados imidazolcarboxaldehído, y derivados benzaldehído, formando de esta manera el compuesto anterior en donde R_1, R_1', R_1'', R_2, R_3, R_4, R_5, y R_6, X_1 y X_2, Y, Z, Z_1, Z_2, Z_3, y Z_4 cada uno puede ser definido por separado en una forma consistente con la descripción acompañante. También se describen composiciones y métodos para el tratamiento de proliferación vascular.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 August 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/077940 A1

(51) International Patent Classification[7]: C07D 403/06, 403/14, 405/14, 407/14, 487/04, A61K 31/496, A61P 31/00, 35/00

(21) International Application Number: PCT/US2005/003636

(22) International Filing Date: 4 February 2005 (04.02.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/542,073 4 February 2004 (04.02.2004) US
60/624,262 1 November 2004 (01.11.2004) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): NEREUS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): PALLADINO, Michael, A. [US/US]; 3357 Fortuna Ranch Road, Olivenhain, CA 92024 (US). LLOYD, George, Kenneth [CA/US]; 13932 Dodder Court, Poway, CA 92064 (US). HAYASHI, Yoshio [JP/JP]; 3-9-18-301 Heso, Ritto, Shiga 520-3031 (JP). NICHOLSON, Benjamin [GB/US]; 3936 Goldfinch Street, San Diego, CA 92103 (US).

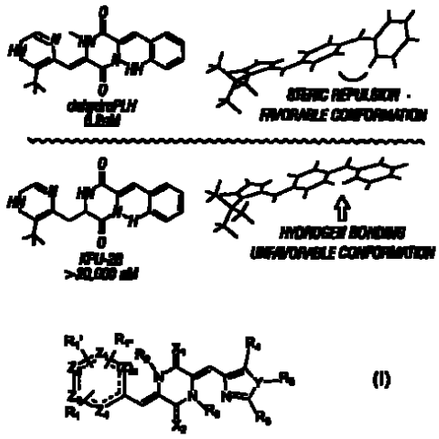
(74) Agent: DELANEY, Karoline, A.; KNOBBE, MARTENS, OLSON AND BEAR, LLP, 2040 Main Street, Fourteenth Floor, Irvine, CA 92614 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: DEHYDROPHENYLAHISTINS AND ANALOGS THEREOF AND THE SYNTHESIS OF DEHYDROPHENYLAHISTINS AND ANALOGS THEREOF



(I)

(57) Abstract: Compounds represented by the following structure (I) are disclosed: as are methods for making such compounds, wherein said methods comprise reacting a diacyldiketopiperazine with a first aldehyde to produce an intermediate compound; and reacting the intermediate compound with a second aldehyde to produce the class of compounds with the generic structure, where the first aldehyde and the second aldehydes are selected from the group consisting of an oxazolecarboxaldeyhyde, imidazolecarboxaldehyde, a benzaldehyde, imidazolecarboxaldehyde derivatives, and benzaldehyde derivatives, thereby forming the above compound wherein R_1, R_1', R_1'', R_2, R_3, R_4, R_5, and R_6, X_1 and X_2, Y, Z, Z_1, Z_2, Z_3, and Z_4 may each be separately defined in a manner consistent with the accompanying description. Compositions and methods for treating vascular proliferation are also disclosed.

WO 2005/077940 A1

FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

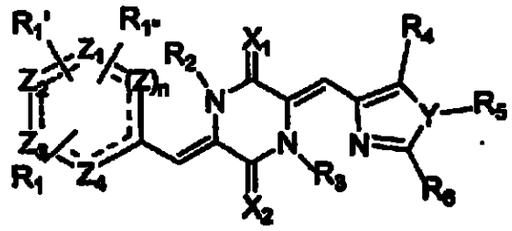
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION

31

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura de la fórmula (I)



(I)

en donde:

R_1, R_4, y R_6, cada uno se elige por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado que incluye alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino,

34

32

amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

R_1' y R_1'' se elige cada uno independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

R, R_1' y R_1'' están ligados ya sea covalentemente entre sí o no covalentemente;

35

33

R_2, R_3, y R_5 cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo saturado, C_1-C_{12} alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y nitro sustituido, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno ya sea sin sustituir o sustituido con un grupo R_5 como se definió anteriormente;

Y se elige del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con R_5, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

n es un entero igual a cero, uno o dos;

Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada uno se eligen por separado de un átomo de carbono, átomo de azufre, átomo de nitrógeno o átomo de oxígeno; y

30

34

los enlaces punteados pueden ser enlaces sencillos o dobles;

y en donde dicho compuesto reduce la proliferación vascular o densidad vascular.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno de R_2, R_3, R_5 y R_6 es un átomo de hidrógeno.

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno de X_1 y X_2 es un átomo de oxígeno.

4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R_4 es un C_1-C_{12} alquilo saturado.

5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el C_1-C_{12} alquilo saturado es un grupo butilo terciario.

6. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R_1 comprende un fenilo sustituido.

7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el grupo fenilo sustituido es metoxibenceno.

32

35

8. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque n es igual a cero o uno.

9. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque n es igual a uno.

10. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque n es igual a uno y Z, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son cada uno un átomo de carbono.

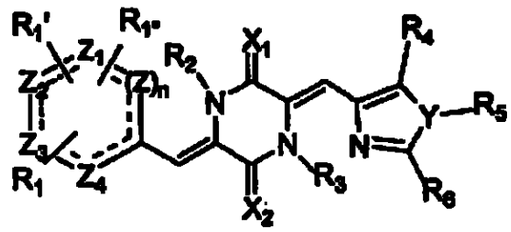
11. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R^4 se elige del grupo que consiste de un átomo de halógeno, ter-butilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ammino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

38

36

12. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es KPU-02.

13. Un compuesto que tiene la estructura de la Formula (I):



(I)

en donde:

R_1, R_4, y R_6, cada uno se elige por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado que incluye alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y C_1-C_{24} alquilo

39

37

saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

R_1' y R_1'' se elige cada uno independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

38

R, R_1' y R_1" están ligados ya sea covalentemente entre sí o no covalentemente;

R_2, R_3, y R_5 cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo saturado, C_1-C_{12} alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y nitro sustituido, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno ya sea sin sustituir o sustituido con un grupo R_5 como se definió anteriormente;

Y se elige del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con R_5, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

n es un entero igual a cero, uno o dos;

44

39

Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada uno se eligen por separado de un átomo de carbono, átomo de azufre, átomo de nitrógeno o átomo de oxígeno; y

los enlaces punteados pueden ser enlaces sencillos o dobles;

y en donde dicho compuesto apunta preferncialmente a la vasculatura de tumor contra vasculatura de tejido sin tumor.

14. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque cada uno de R_2, R_3, R_5 y R_6 es un átomo de hidrógeno.

15. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque cada uno de X_1 y X_2 es un átomo de oxígeno.

16. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R_4 es un C_1-C_{12} alquilo saturado.

17. El compuesto de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el C_1-C_{12} alquilo saturado es un grupo butilo terciario.

40

18. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R_1 comprende un fenilo sustituido.

19. El compuesto de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el grupo fenilo sustituido es metoxibenceno.

20. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque n es igual a cero o uno.

21. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque n es igual a uno.

22. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque n es igual a uno y Z, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son cada uno un átomo de carbono.

23. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R^4 se elige del grupo que consiste de un átomo de halógeno, ter-butilo, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ammino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y

41

C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

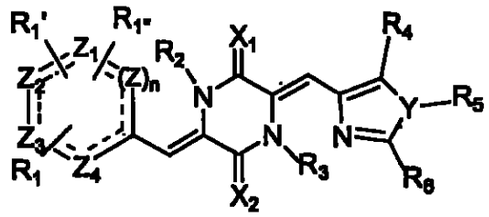
24. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el compuesto es KPU-02.

25. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el compuesto de la reivindicación 1.

26. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el compuesto de la reivindicación 13.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound having the structure of Formula (I):



wherein

R_1, R_4, and R_6, are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -CO-O-R_7, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl -CCO-R_7, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R_1' and R_1" are each independently selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -CO-O-R_7, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl -CCO-R_7, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted

aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R, R_1' and R_1" are either covalently bound to one another or are not covalently bound to one another;

R_2, R_3, and R_5 are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{12} alkyl, unsaturated C_1-C_{12} alkenyl, acyl, cycloalkyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, and substituted nitro groups, sulfonyl and substituted sulfonyl groups;

X_1 and X_2 are separately selected from the group consisting of an oxygen atom, a nitrogen atom, and a sulfur atom, each either unsubstituted or substituted with a R_5 group, as defined above;

Y is selected from the group consisting of a nitrogen atom, a nitrogen atom substituted with R_5, an oxygen atom, a sulfur atom, a oxidized sulfur atom, a methylene group and a substituted methylene group;

n is an integer equal to zero, one or two;

Z, for each separate n, if non-zero, and Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are each separately selected from a carbon atom, a sulfur atom, a nitrogen atom or an oxygen atom; and

the dashed bonds may be either single or double bonds;

and wherein said compound induces vasculature collapse.

2. The compound according to claim 1, wherein said first aldehyde is an imidazolecarboxaldehyde.

3. The compound according to claim 1, wherein said second aldehyde is a benzaldehyde.

4. The compound according to claim 1, wherein each of R_2, R_3, R_5 and R_6 is a hydrogen atom.

5. The compound according to claim 1, wherein each of X_1 and X_2 is an oxygen atom.

6. The compound according to claim 1, wherein R_4 is a saturated C_1-C_{12} alkyl.

7. The compound according to claim 6, wherein said saturated C_1-C_{12} alkyl is a tertiary butyl group.

8. The compound according to claim 1, wherein R_1 comprises a substituted phenyl.

9. The compound according to claim 8, wherein said substituted phenyl group is methoxybenzene.

10. The compound according to claim 1, wherein said first aldehyde is a benzaldehyde.

11. The compound according to claim 1, wherein said second aldehyde is an imidazolecarboxaldehyde.

12. The compound according to claim 1, wherein n is equal to zero or one.

13. The compound according to claim 1, wherein n is equal to one.

14. The compound according to claim 1, wherein n is equal to one and Z, Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are each a carbon atom.

15. A method for treating a condition in an animal, comprising administering to the animal the compound of Claim 1 in an amount that is effective to reduce vascular proliferation or in an amount that is effective to reduce vascular density.

16. The method of Claim 15, wherein the condition is selected from the group consisting of immune and non-immune inflammation, rheumatoid arthritis, chronic articular rheumatism, psoriasis, diabetic retinopathy, neovascular glaucoma, retinopathy of prematurity, macular degeneration, corneal graft rejection, retrolental fibroplasia, rubeosis, capillary proliferation in atherosclerotic plaques, and osteoporosis.

17. The method of Claim 15, wherein said condition is a neoplastic condition.

18. The method of Claim 17, wherein said neoplastic condition is cancer.

19. The method of Claim 15, wherein the condition is not cancer.

20. The method of Claim 15 or 16, wherein said condition is a retinopathy.

21. The method of Claim 20, wherein said retinopathy is diabetic retinopathy.

22. The method of Claim 20, wherein said retinopathy an age-related macular degeneration.

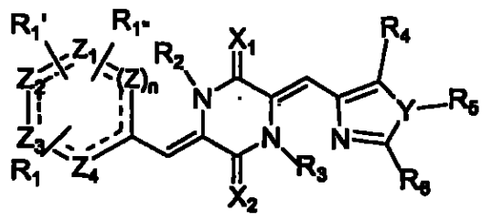
23. The method of Claim 15, wherein said animal is a human.

45

24. The method of Claim 15, wherein the compound is KPU-02.

25. The method of Claim 15, wherein the condition is a condition associated with hypervascularization.

26. A method of inducing vascular collapse in an animal, comprising treating said animal with a therapeutically effective amount of a compound of the Formula (I), wherein said therapeutically effective amount of said compound causes tubulin depolymerization in said vasculature, and wherein said compound having the following structure:



wherein

R_1, R_4, and R_6, are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -CO-O-R_7, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl -CCO-R_7, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, hetteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R_1' and R_1" are each independently selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -

$CO\text{-}O\text{-}R_7$, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl $-CCO\text{-}R_7$, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R, R_1' and R_1'' are either covalently bound to one another or are not covalently bound to one another;

R_2, R_3, and R_5 are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{12} alkyl, unsaturated C_1-C_{12} alkenyl, acyl, cycloalkyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, and substituted nitro groups, sulfonyl and substituted sulfonyl groups;

X_1 and X_2 are separately selected from the group consisting of an oxygen atom, a nitrogen atom, and a sulfur atom, each either unsubstituted or substituted with a R_5 group, as defined above;

Y is selected from the group consisting of a nitrogen atom, a nitrogen atom substituted with R_5, an oxygen atom, a sulfur atom, a oxidized sulfur atom, a methylene group and a substituted methylene group;

n is an integer equal to zero, one or two;

Z, for each separate n, if non-zero, and Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are each separately selected from a carbon atom, a sulfur atom, a nitrogen atom or an oxygen atom; and

the dashed bonds may be either single or double bonds.

27. The method of Claim 26, wherein said animal is a human.

28. The method of Claim 26, wherein said human has a disease selected from the group consisting of a tumor, a diabetic retinopathy, and an age-related macular degeneration.

29. The method of Claim 26, wherein the disease is not cancer.

30. The method of Claim 26, wherein the compound is KPU-02.

31. A pharmaceutical composition for treating or preventing vascular proliferation comprising a pharmaceutically effective amount of a compound of claim 1 together with a pharmaceutically acceptable carrier therefor.

32. The composition of Claim 31, wherein said vascular proliferation is a symptom of a disease selected from cancer, age-related macular degeneration and diabetic retinopathy.

33. A method of preferentially targeting tumor vasculature over non-tumor tissue vasculature, comprising:

administering to an animal a compound having the structure of Formula (I), wherein

R_1, R_4, and R_6, are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl; heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -CO-O-R_7, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl -CCO-R_7, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R_1' and R_1'' are each independently selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -CO-O-R_7, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl -CCO-R_7, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted

aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R, R_1' and R_1" are either covalently bound to one another or are not covalently bound to one another;

R_2, R_3, and R_5 are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{12} alkyl, unsaturated C_1-C_{12} alkenyl, acyl, cycloalkyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, and substituted nitro groups, sulfonyl and substituted sulfonyl groups;

X_1 and X_2 are separately selected from the group consisting of an oxygen atom, a nitrogen atom, and a sulfur atom, each either unsubstituted or substituted with a R_5 group, as defined above;

Y is selected from the group consisting of a nitrogen atom, a nitrogen atom substituted with R_5, an oxygen atom, a sulfur atom, a oxidized sulfur atom, a methylene group and a substituted methylene group;

n is an integer equal to zero, one or two;

Z, for each separate n, if non-zero, and Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are each separately selected from a carbon atom, a sulfur atom, a nitrogen atom or an oxygen atom; and

the dashed bonds may be either single or double bonds.

34. The method of Claim 33, wherein the non-tumor tissue is selected from the group consisting of skin, muscle, brain, kidney, heart, spleen, and gut.

35. The method of Claim 33, wherein the tumor vasculature is preferentially targeted over non-tumor tissue vasculature by about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% and 90%.

36. The method of Claim 33, wherein the animal is a human.

37. A method of preferentially targeting tumor vasculature over non-tumor tissue vasculature, comprising administering to an animal an agent that preferentially targets tumor vasculature over non-tumor tissue vasculature.

38. Use of a compound having the structure of Formula (I) in the preparation of a medicament for the treatment of a condition associated with increased vasculature or which relies upon vasculature,

wherein

R_1, R_4, and R_6, are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -CO-O-R_7, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl -CCO-R_7, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R_1' and R_1'' are each independently selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups, hydroxy, carboxy, -CO-O-R_7, cyano, alkylthio, halogenated alkyl including polyhalogenated alkyl, halogenated carbonyl, and carbonyl -CCO-R_7, wherein R_7 is selected from a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{24} alkyl, unsaturated C_1-C_{24} alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, azido, substituted nitro, phenyl, and substituted phenyl groups;

R, R_1' and R_1'' are either covalently bound to one another or are not covalently bound to one another;

R_2, R_3, and R_5 are each separately selected from the group consisting of a hydrogen atom, a halogen atom, and saturated C_1-C_{12} alkyl, unsaturated

60

C_1-C_{12} alkenyl, acyl, cycloalkyl, alkoxy, cycloalkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, amino, substituted amino, nitro, and substituted nitro groups, sulfonyl and substituted sulfonyl groups;

X_1 and X_2 are separately selected from the group consisting of an oxygen atom, a nitrogen atom, and a sulfur atom, each either unsubstituted or substituted with a R_5 group, as defined above;

Y is selected from the group consisting of a nitrogen atom, a nitrogen atom substituted with R_5, an oxygen atom, a sulfur atom, a oxidized sulfur atom, a methylene group and a substituted methylene group;

n is an integer equal to zero, one or two;

Z, for each separate n, if non-zero, and Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are each separately selected from a carbon atom, a sulfur atom, a nitrogen atom or an oxygen atom; and

the dashed bonds may be either single or double bonds.

39. The use of Claim 38, wherein the condition is cancer.

40. The use of Claim 38, wherein the condition is not cancer.

41. The use of Claim 38, wherein the condition is selected from the group consisting of immune and non-immune inflammation, rheumatoid arthritis, chronic articular rheumatism, psoriasis, diabetic retinopathy, neovascular glaucoma, retinopathy of prematurity, macular degeneration, corneal graft rejection, retrolental fibroplasia, rubeosis, capillary proliferation in atherosclerotic plaques, and osteoporosis.

53

51

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Articulo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capitulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

54

DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS Y LA SÍNTESIS DE DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

Se describen compuestos representados por la siguiente estructura (I): al igual que métodos para la producción de dichos compuestos, caracterizado porque los métodos comprenden reaccionar una diacildicetopiperazina con un primer aldehído para producir un compuesto intermedio; y reaccionar el compuesto intermedio con un segundo aldehído para producir la clase de compuestos con la estructura genérica, en donde el primer aldehído y el el segundo aldehídos se eligen del grupo que consiste de un oxazolcarboxaldehído, imidazolcarboxaldehído, un benzaldehído, derivados imidazolcarboxaldehído, y derivados benzaldehído, formando de esta manera el compuesto anterior en donde R_1, R_1', R_1'', R_2, R_3, R_4, R_5, y R_6, X_1 y X_2, Y, Z, Z_1, Z_2, Z_3, y Z_4 cada uno puede ser defindo por separado en una forma consistente con la descripción acompañante. También se describen composiciones y métodos para el tratamiento de proliferación vascular.

53

DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS Y LA SÍNTESIS DE DESHIDROFENILAHISTINAS Y SUS ANÁLOGOS

Solicitudes Relacionadas

[0001] Esta solicitud corresponde a una continuación-en-parte de la solicitud de patente de los E.U.A. Número de Serie 10/632,531 presentada en agosto 1, 2003, y que reclama prioridad de la solicitud de la patente de los E.U.A. Número de Serie 60/542,073 presentada en febrero 4, 2004 y la solicitud provisional de patente de los E.U.A. Número de Serie 60/624,262 presentada en noviembre 1, 2004, todas las cuales tienen como título DEHYDROPHENYLAHISTINS AND ANALOGS THEREOF AND THE SYNTHESIS OF DEHYDROPHENYLAHISTINS AND ANALOGS THEREOF; y cada una de las cuales aquí se incorpora por referencia totalmente.

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

[0002] La presente invención se refiere a compuestos y a métodos de preparación sintética en los campos de química y medicina. Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos y procedimientos para producir compuestos útiles en el tratamiento de cáncer y en el tratamiento de infecciones fungales.

96

54

Breve Descripción de la Técnica Relacionada

[0003] Se considera que un solo mecanismo celular universal controla la regulación del proceso del ciclo de células eucarióticas. Ver por ejemplo Hartwell, L. H. *et al.*, Science (1989), 246: 629-34. También se conoce que cuando surge una anormalidad en el mecanismo de control del ciclo celular, puede ocurrir cáncer o un desorden inmune. De acuerdo con esto, como también se conoce, los agentes antitumor y supresores inmunes pueden estar entre las sustancias que regulan el ciclo celular. De esta manera, se requieren nuevos métodos para producir inhibidores del ciclo celular eucariótico como compuestos antitumor y de mejora inmune, y deberán ser útiles en el tratamiento de cáncer humano como agentes antitumor quimioterapéuticos. Ver, Roberge, M. *et al.*, Cancer Res. (1994), 54, 6115-21.

[0004] Los hongos, en especial hongos patogénicos e infecciones relacionadas, representan un reto clínico creciente. Los agentes antifungales existentes son de limitada eficacia y toxicidad, y el desarrollo y/o descubrimiento de cepas de hongos patogénicos que son resistentes a drogas actualmente disponibles o bajo desarrollo. A manera de ejemplo, los hongos que son patogénicos en humanos incluyen entre otros Candida spp. incluyendo *C. albicans, C. tropicalis, C. kefyr, C. krusei y C.galbrata; Aspergillus spp.*

37

55

incluyendo *A. fumigatus* y *A. flavus; Cryptococcus neoformans; Blastomyces spp.* incluyendo *Blastomyces dermatitidis; Pneumocistis carinii; Coccidioides immitis; Basidiobolus ranaruni; Coitidiobolus* spp.; *Histoplasma capsulatum; Rhizopus* spp. incluyendo *R. oryzae y R. microsporus; Cunninghamella* spp.; *Rhizomucor* spp.; Paracoccidioides brasiliensis; *Pseudallescheria boydii; Rhinosporidium seeberi;* y *Sporotrix schenckii* (Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. 1992 Medical Mycology, Lea y Febiger, Malvern, PA).

[0005] Recientemente, se ha reportado que las triptoestatinas A y B (que son dicetopiperazinas consisten de residuos prolina y triptofano isoprenilados), y cinco otras dicetopiperazinas estructuralmente relacionadas, inhiben el avance del ciclo celular en la fase M, ver Cui, C. *et al.*, 1996 *J Antibiotics* **49**:527-33; Cui, C. *et al.* 1996 *J Antibiotics* **49**:534-40, y que estos compuestos también afectan la estructura de microtúbulos, ver Usui, T. *et al.* 1998 *Biochem J* **333**:543-48; Kondon, M. *et al.* 1998 *J Antibiotics* **51**:801-04. Además, compuestos naturales y sintéticos se ha reportado que inhiben la mitosis, y de esta manera inhiben el ciclo celular eucariótico, al ligar al sitio de enlace colchicina o colquicina (sitio CLC) en tubulina, que es una macromolécula que consiste

de dos subunidades de 50 kDa (alfa- y beta-tubulina) y es el constituyente principal de microtúbulos. Ver, e.g., Iwasaki, S., 1993 *Med Res Rev* 13:183-198; Hamel, E. 1996 *Med Res Rev* 16:207-31; Weisenberg, R. C. et al., 1969 *Biochemistry* 7:4466-79. Se considera que los microtúbulos están involucrados en varias funciones celulares esenciales tales como transporte axonal, movilidad celular y determinación de morfología celular. Por lo tanto, inhibidores de la función de microtúbulos pueden tener amplia actividad biológica, y ser aplicables para propósitos medicinales y agroquímicos. También es posible que ligandos de sitio cochicina (CLC) tales como CLC, esteganacina, ver Kupchan, S. M. *et al.* 1973 *J Am Chem Soc* 95:1335-36, podofilotoxina, *ver* Sackett, D. L., 1993 *Farmacol Elr* 59:163-228, y combrestatinas, *ver* Pettit, G. R. *et al.*, 1995 *J Med Chem* 38:166-67, pueden demostrar ser valiosos como inhibidores del ciclo celular eucariótico y de esta manera pueden ser útiles como agentes quimioterapéuticos.

[0006] Aunque los metabolitos del tipo dicetopiperazina se han aislado a partir de diversos hongos como micotoxina, ver Horak R. M. *et al.*, 1981 *JCS Chem Comm* 1265-67; Ali M. *et al.*, 1898 Toxicology Letters 48:235-41, o como metabolitos secundarios, ver Smedsgaard J. *et al.*, 1996 *J Microbiol Met* 25:5-17, se conoce poco

57

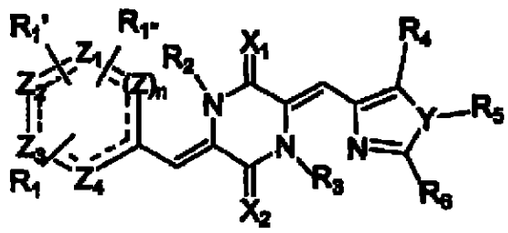
respecto a la estructura específica de los metabolitos tipo dicetopiperazina o sus derivados y su actividad antitumor, particularmente *in vivo*. No sólo esos compuestos se han aislado como micotoxinas, la síntesis química de un tipo de metabolito de tipo dicetopiperazina, fenilahistina, se ha descrito por Hayashi *et al.* in *J. Org. Chem.* (2000) 65, página 8402. En la técnica, este derivado metabolito tipo dicetopiperazina, deshidrofenilahistina, se ha preparado por hidrogenación enzimática de su fenilahistina padre. Con las incidencias de cáncer en crecimiento, existe una necesidad particular por producir químicamente una clase de derivados de metabolitos tipo dicetopiperazina sustancialmente purificados que tienen actividad inhibitoria de proliferación específica de células de animales y alta actividad antitumor y selectividad. Por lo tanto hay necesidad particular por un método eficiente para producir sintéticamente derivados metabolito tipo dicetopiperazina, sustancialmente purificados y caracterizados estructural y biológicamente.

[0007] También, la publicación de PCT WO/0153290 (julio 26,2001) describe un método no sintético para producir deshidrofenilahistina al exponer fenilahistina o un análogo de fenilahistina particular a una deshidrogenasa obtenida de *Streptomyces albulus*.

58

Compendio de la Invención

[0008] Compuestos y métodos para la fabricación sintética de compuestos se describen para una clase de compuestos que tienen la estructura de la Fórmula (I):



(I)

[0009] Los compuestos descritos tienen la estructura de la fórmula (I) en donde:

[0010] R_1, R_4, y R_6, cada uno se elige por separado el grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, ciclo alquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, grupos hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado que incluye alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, grupos C_1-C_{24}

61

59

alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

[0011] R_1' y R_1'' se elige independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

[0012] R_2, R_3, y R_5 cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12}

62

60

alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y nitro sustituido, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

[0013] X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno ya sea sin sustituir o sustituido con un grupo R_5 como se definió anteriormente;

[0014] Y se elige del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo R_5 de la parte superior, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

[0015] n es un entero igual a cero, uno o dos;

[0016] Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada uno se eligen por separado de un átomo de carbono, átomo de azufre, átomo de nitrógeno o átomo de oxígeno; y

[0017] los enlaces punteados ya pueden ser enlaces sencillos o dobles;

[0018] con la condición de que, en un compuesto particular, si R_1, R_1', R_2, R_3, R_4 y R_5 cada uno son un átomo de hidrógeno, entonces no es cierto que X_1 y X_2 cada

63

61

uno son un átomo de oxígeno y R_6 ya es 3,3-dimetilbutil-1-eno o un átomo de hidrógeno.

[0019] Los métodos comprenden las etapas de:

[0020] reaccionar una diacildicetopiperazina con un primer aldehído, para producir un compuesto intermediario; y

[0021] reaccionar el compuesto intermediario con un segundo aldehído para producir la clase de compuestos con la estructura genérica, en donde

[0022] el primer aldehído y el segundo aldehído se eligen del grupo que consiste de oxazolcarboxaldehído, imidazolcarboxaldehído, un benzaldehído, derivados de imidazolcarboxaldehído, y derivados de benzaldehído, de esta manera formando un compuesto en donde

[0023] Los compuestos descritos tienen estructura de la fórmula (I) en donde:

[0024] R_1, R_4, y R_6, cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano,

64

62

alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

[0025] R_1' y R_1" se eligen independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino

65

63

sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

[0026] R_2, R_3, y R_5 cada uno por separado se elige del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo saturado, C_1-C_{12} alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y nitro sustituido, grupo sulfonilo y sulfonilo sustituido;

[0027] X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno ya sustituido o sin sustituir con un grupo R_5 como se definió anteriormente;

[0028] Y se elige del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo R_5 de los anteriores, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

[0029] n es un entero igual a cero, uno o dos;

[0030] Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada una se elige por separado de un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

66

64

[0031] los enlaces punteados ya pueden ser enlaces sencillos o dobles.

[0032] En modalidades preferidas del compuesto y método, el imidazolcarboxaldehído es 5-(1,1-dimetil-2-etil)imidazol-4-carboxaldehído y el benzaldehído comprende un solo grupo metoxi. Modalidades preferidas adicionales de los compuestos aquí descritos incluyen compuestos que tienen un grupo t-butilo, un grupo dimetoxi, un grupo cloro, y un grupo metiltiofeno, y métodos para producir estos compuestos así como compuestos descritos en las Tablas 2, 3 y 4 así como métodos para producir estos compuestos.

[0033] También se describen métodos y materiales para tratar tejido neoplástico y evitar cánceres o infección por hongos patogénicos. Estos métodos y materiales son particularmente bien adecuados para tratamiento de sujetos mamíferos, más particularmente humanos involucran administrar al sujeto una deshidrofenilahistina o su análogo. El método comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad efectiva antitumor o antifungal de una deshidrofenilahistina o su análogo.

[0034] Adicionales modalidades se refieren a métodos para tratar una condición en un animal, estos métodos pueden incluir administrar al animal un compuesto

67

65

como se describe aquí, en una cantidad que es efectiva para reducir proliferación vascular o en una cantidad que es efectiva para reducir densidad vascular. Condiciones ejemplares incluyen neoplasma, tales como cánceres, así como otras condiciones asociadas con o que se basan en vascularización, incluyendo por ejemplo inflamación inmune y no inmune, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico, soriasis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, retinopatía prematura, degeneración macular, rechazo de injerto córneo, fibroplasia retrolental, rubeosis, proliferación capilar en placas ateroescleróticas, osteoporosis, y semejantes. En algunas modalidades, la enfermedad no es cáncer.

[0035] Otras modalidades se refieren a métodos para inducir colapso vascular en un animal. Los métodos pueden incluir tratar al animal con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I) como se describe aquí, por ejemplo. La cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto puede provocar despolimerización de tubulina en la vasculatura.

[0036] De preferencia el animal puede ser un humano. De preferencia la enfermedad puede ser un tumor, una retinopatía diabética, una degeneración mascular relacionada con la edad y semejantes. En algunos aspectos la enfermedad no es cáncer o cáncer puede ser

68

66

excluido específicamente de los métodos y usos. De preferencia, el compuesto es KPU-02.

[0037] Todavía modalidades adicionales se refieren a composiciones farmacéuticas para tratar o evitar proliferación vascular, que comprenden una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto aquí descrito junto con un portador farmacéuticamente aceptable del mismo. La proliferación vascular puede ser un síntoma de una enfermedad, por ejemplo cáncer, degeneración macular relacionada a la edad y retinopatía diabética.

[0038] Algunas modalidades se refieren a métodos para hacer blanco preferencial en vasculatura de tumor sobre vasculatura de tejido que no es de tumor. Los métodos pueden incluir la etapa de administrar a un animal, de preferencia un humano, un compuesto que tiene de estructura la Fórmula (I) como aquí se describe. El tejido que no es de tumor puede ser por ejemplo piel, músculo, cerebro, riñón, corazón, bazo, intestino y semejantes. La vasculatura de tumor puede hacerse preferencialmente diana sobre la musculatura que no es tejido de tumor, por ejemplo en aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90%.

[0039] Otras modalidades se refieren a métodos para hacer diana preferencial a vasculatura de tumor

69

67

frente a vasculatura de tejido que no es de tumor, estos métodos pueden incluir administrar a un animal un agente que de preferencia hace blanco o diana con vasculatura de tumor sobre la vasculatura que no es tejido de tumor.

[0040] Adicionales modalidades se refieren a usos de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (I) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición asociada con vasculatura incrementada o que se basa en vasculatura. En algunos aspectos, la condición puede ser cáncer, mientras que en otros tipos particulares de cáncer o todos los cánceres se excluyen específicamente. La condición puede ser cualquier otra asociada con hipervascularización, asociada con vasculatura o que se basa en vasculatura. Ejemplos incluyen inflamación inmune y no inmune, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico, soriasis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, retinopatía prematura, degeneración macular, rechazo de injerto córneo, fibroplasía retrolental, rubeosis, proliferación capilar en placas ateroescleróticas, osteoporosis, y semejantes.

Breve Descripción de los Dibujos

[0041] Los dibujos acompañantes que se incorporan en y forman parte de la especificación, simplemente ilustran ciertas modalidades preferidas de la

68

presente invención. Junto con el resto de la especificación, se pretende que sirvan para explicar modos preferidos para producir ciertos compuestos de la invención a aquellos con destreza en la especialidad. En los dibujos:

[0042] La Figura 1 ilustra un esquema de reacción para producir deshidrofenilahistina al reaccionar una diacildicetopiperazina 1 con un imidazolcarboxaldehído 2 para producir un compuesto intermedio 3 que se reacciona con un benzaldehído 4 para producir una deshidrofenilahistina.

[0043] La Figura 2 ilustra el perfil HPLC de la deshidrofenilahistina cruda sintética.

[0044] La Figura 3 ilustra un esquema de reacción para producir deshidrofenilahistina al reaccionar una diacildicetopiperazina 1 con un benzaldehído 4 para dar por resultado un compuesto intermedio 17 que se reacciona con un imidazolcarboxaldehído 15 para producir una deshidrofenilahistina.

[0045] La Figura 4 ilustra el perfil HPLC de la tBu-deshidrofenilahistina sintética cruda producida por la Ruta A y la Ruta B.

74

69

[0046] La Figura 5 ilustra dos estrategias de modificación para deshidroPLH para actividad citotóxica potente.

[0047] La Figura 6 ilustra la conformación putativa activa de deshidroPLH en la porción fenilo.

[0048] La Figura 7 ilustra metabolismo de Citocromo P450 de fenilahistina.

[0049] La Figura 8 ilustra la migración *Z-E* de tBu-deshidroPLH.

[0050] La Figura 9 ilustra la síntesis e imagen de pro-droga de acil-E-tBu-deshidroPLH.

[0051] La Figura 10 ilustra el gradiente de temperatura de 3-Z-benziliden-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1*H*-imidazol-4"-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona.

[0052] La Figura 11 ilustra el gradiente de temperatura de 3-Z-benziliden-6-(5"-ter-butil-1*H*-imidazol-4"-Z-ilmetilen)-piperazin-2, 5-diona.

[0053] La Figura 12 ilustra el efecto de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina, en comparación con colchicina y taxol en permeabilidad de monocapa HuVEC a FITC-Dextran.

[0054] La Figura 13 ilustra el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 en crecimiento de tumor estimado en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

70

[0055] La Figura 14 ilustra el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 en el peso de tumores cortados en la autopsia en ratones individuales en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

[0056] La Figura 15 ilustra el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 en crecimiento de tumor estimado en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

[0057] La Figura 16 ilustra el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 en el peso de tumores cortados en la autopsia en ratones individuales en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

[0058] La Figura 17 ilustra los efectos de: A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilahistina solo y en combinación con CPT-11 en crecimiento de tumor estimado en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

[0059] La Figura 18 ilustra los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilahistina solo y en combinación con CPT-11 en el peso de tumores cortados en la autopsia en ratones individuales en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

[0060] La Figura 19 ilustra los efectos de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 en crecimiento de

73

71

tumor y en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29: comparación de tres estudios.

[0061] La Figura 20 ilustra los efectos de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 en pesos de tumor final en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29: comparación de tres estudios.

[0062] La Figura 21 ilustra los efectos de KPU-2 solo o en combinación con Taxotere en crecimiento de tumor estimado en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humana DU-145.

[0063] La Figura 22 ilustra los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilahistina solos y en combinación con Taxotere en el crecimiento de tumor estimado con base en observaciones realizadas durante la porción en vida del modelo de Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humana DU-145.

[0064] La Figura 23 ilustra los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Taxotere en pesos de tumor cortados individuales en la autopsia en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humana DU-145.

[0065] La Figura 24 ilustra los efectos de KPU-35 solo y en combinación con Taxotere en pesos de tumor cortados individuales en la autopsia en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humana DU-145.

74

72

[0066] La Figura 25 ilustra los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilahistina solo y en combinación con Taxotere en modelo de Xenoinjerto de Tumor de Pecho Humano MCF-7.

[0067] La Figura 26 ilustra los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Taxotere en crecimiento de tumor estimado en el modelo de Xenoinjerto de Tumor Pulmonar Humano A549.

[0068] La Figura 27 ilustra los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Taxotere en los pesos de tumor cortado en la autopsia en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Pulmón Humano A549.

[0069] La Figura 28 ilustra los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Paclitaxel en el peso de tumor estimado en la almohadilla o panículo graso mamario murino implantado del modelo de Tumor de Pecho Humano MDA-231.

[0070] La Figura 29 ilustra los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilahistina solos y en combinación con Paclitaxel modelo de Tumor Metastásico B16 F10 de Melanoma Murino.

[0071] La Figura 30 ilustra efectos de KPU-35 y KPU-02 en vasculatura de tumor en la cámara del pliegue dérmico dorsal de la Figura 30.

96

73

[0072] La Figura 31 ilustra el efecto de KPU-02 en combinación con CPT-11 en el peso de tumor estimado en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

[0073] La Figura 32 ilustra efecto de KPU-02 en combinación con CPT-11 en el peso de tumor cortado en el modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29.

[0074] La Figura 33 ilustra rápida despolimerización de tubulina en células HuVEC inducida por KPU-02 y KPU-35.

[0075] La Figura 34 ilustra efecto de KPU-02 en permeabilidad de monocapa en células en HuVEC.

[0076] La Figura 35 ilustra el efecto de KPU-02 en flujo de sangre de tumor en el modelo de sarcoma de rata P22 utilizando la técnica 125I-IAP.

[0077] La Figura 36 ilustra el efecto de KPU-02 15 mg/kg IP (expresado como % de control de vehículo) en flujo de sangre en diferentes tejidos 1 y 24 horas posteriores a la dosis.

[0078] La Figura 37 ilustra la necrosis de tumor inducida por KPU-02 7.5 y 15.0 mg/kg IP en el modelo de sarcoma de rata P22.

[0079] La Figura 38 cita la actividad de diversos derivados tBu-deshidro-PLH en células HT-29.

[0080] La Figura 39 ilustra análisis 3D QSAR(CoMFA) de derivados tBu-deshidro-PLH.

74

[0081] La Figura 40 ilustra análisis cromatográfico de rayos X de derivados tBu-deshidro-PLH.

[0082] La Figura 41 ilustra la actividad biológica de diversos derivados de fenilahistina comparados con colchicina.

[0083] La Figura 42 ilustra el efecto en avance de ciclo celular de células HeLa por tBu-deshidro-PLH (KPU-2) y KPU-35.

[0084] La Figura 43 ilustra el efecto de deshidro-PLH y tBu-deshidro-PLH (KPU-2) en líneas de células de tumor sensibles a droga y resistentes a droga en comparación con paclitaxel.

[0085] La Figura 44A ilustra espectros de turbidez de polimerización de proteína de microtúbulos en la presencia de vehículo de droga DMSO (◊), 1. 25 μM (□), 2.5 μM (–), y 5 μM (o) KPU-02.

[0086] La Figura 44B ilustra espectros de turbidez de polimerización de proteína de microtúbulos en la presencia de vehículo de droga DMSO (◊), 1.25 μM (□), 2.5 μM(–), y 5 μM (O) CA4.

[0087] La Figura 44C ilustra espectros de turbidez de polimerización de proteína de microtúbulos en la presencia de vehículo de droga DMSO (◊), 1.25 μM (□), 2.5 μM (–), y 5 μM (O) CLC.

79

[0088] La Figura 45 ilustra inhibición de MT en la ausencia o presencia de un intervalo de concentraciones de KPU-02 (○), CA4 (□), y colchicina (◊).

[0089] La Figura 46A ilustra histogramas de frecuencia de longitudes promedio de microtúbulos *in vitro* en estado estable en la presencia de KPU-02.

[0090] La Figura 46B ilustra histogramas de frecuencia de longitudes promedio de microtúbulos *in vitro* en estado estable en la presencia de CA4.

[0091] La Figura 46C ilustra histogramas de frecuencia de longitudes promedio de microtúbulos *in vitro* en estado estable en la presencia de CLC.

[0092] La Figura 47A ilustra microfotografías de electrones de microtúbulos ricos en MAP formados *in vitro* en estado estable en la presencia de KPU-02.

[0093] La Figura 47B ilustra microfotografías de electrones de microtúbulos ricos en MAP formados *in vitro* en estado estable en la presencia de CA4.

[0094] La Figura 47C ilustra microfotografías de electrones de microtúbulos ricos en MAP formados *in vitro* en estado estable en la presencia de CLC.

[0095] La Figura 48 ilustra un resumen gráfico de disminución de longitud de MT en estado estable en la presencia de KPU-02, CA4, y colchicina.

96

[0096] La Figura 49A ilustra espectros de emisión de fluorescencia de tubulina en la presencia de KPU-02 creciente.

[0097] La Figura 49B ilustra un ajuste máximo de emisión de florescencia a 487 nm para obtener K_d de tubulina para KPU-02. El inserto ilustra residuos.

[0098] La Figura 49C ilustra transformación doble recíproca de los datos de enlace.

[0099] La Figura 50 ilustra los resultados gráficos de un ensayo de inhibición competitivo de enlace colchicina a tubulina con diversas concentraciones de [^{3}H]CLC en la ausencia (◊), o presencia de KPU-02 10 μM (○) o CA4 10 μM (□).

[0100] La Figura 51 ilustra curvas de respuesta log [compuesto] para inhibición de avance mitótico por KPU-02, CA4, y CLC en células MCF7 cultivadas en la presencia de KPU-02 (○), CA4 (□), y colchicina (◊).

[0101] La Figura 52 ilustra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células MCF7. a-d: Tubulina en control- (a) Tubulina en control, Células tratadas con (b) KPU-02, (c) CA4, y (d) CLC; e-h : ADN en control- (e) ADN en control, células tratadas con(f) KPU-02, (g) CA4, y (h) CLC.

77

[0102] La Figura 53A ilustra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células MCF7 tratadas con KPU-02.

[0103] La Figura 53B ilustra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células MCF7 tratadas con CA4.

[0104] La Figura 53C ilustra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células MCF7 tratadas con CLC.

[0105] La Figura 54A ilustra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células MCF7 tratadas con KPU-02.

[0106] La Figura 54B ilustra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células MCF7 tratadas con CA4.

[0107] La Figura 54C ilustra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células MCF7 tratadas con CLC.

[0108] En ciertas Figuras, se identifican compuestos utilizando una designación alterna. Un diagrama completo para convertir estas designaciones alternas es como sigue:

Designación alterna	Designación aquí empleada
NPI-2350	(-)-fenilahistina

78

Designación alterna	Designación aquí empleada
NPI-2352	KPU-01
NPI-2353	KPU-03
NPI-2354	KPU-04
NPI-2355	KPU-05
NPI-2356	KPU-06
NPI-2357	KPU-07
NPI-2358	KPU-02
NPI-2359	KPU-08
NPI-2360	KPU-09
NPI-2361	KPU-10
NPI-2362	KPU-11
NPI-2363	KPU-12
NPI-2364	KPU-13
NPI-2365	KPU-14
NPI-2366	KPU-15
NPI-2367	KPU-16
NPI-2368	KPU-17
NPI-2369	KPU-18
NPI-2370	KPU-19
NPI-2371	KPU-21
NPI-2372	KPU-22
NPI-2373	KPU-23
NPI-2374	KPU-24
NPI-2375	KPU-25

79

Designación alterna	Designación aquí empleada
NPI-2376	KPU-28
NPI-2377	KPU-26
NPI-2378	KPU-27
NPI-2379	KPU-29
NPI-2380	KPU-20
NPI-2381	KPU-30
NPI-2382	KPU-31
NPI-2383	KPU-32
NPI-2384	KPU-33
NPI-2385	KPU-34
NPI-2386	KPU-35
NPI-2387	KPU-36
NPI-2388	KPU-37
NPI-2389	KPU-38
NPI-2390	KPU-39
NPI-2391	KPU-40
NPI-2392	KPU-41
NPI-2393	KPU-42
NPI-2394	KPU-43
NPI-2395	KPU-44
NPI-2396	KPU-45
NPI-2397	KPU-46
NPI-2398	KPU-47
NPI-2399	KPU-48

80

Designación alterna	Designación aquí empleada
NPI-2400	KPU-49
NPI-2401	KPU-50
NPI-2402	KPU-51
NPI-2403	KPU-52
NPI-2404	KPU-53
NPI-2405	KPU-54
NPI-2406	KPU-55
NPI-2407	KPU-56
NPI-2408	KPU-57
NPI-2409	KPU-58
NPI-2410	KPU-59
NPI-2411	KPU-60
NPI-2412	KPU-61
NPI-2413	KPU-62
NPI-2414	KPU-63
NPI-2415	KPU-64
NPI-2416	KPU-65
NPI-2417	KPU-66
NPI-2418	KPU-67
NPI-2419	KPU-68
NPI-2420	KPU-69
NPI-2421	KPU-70
NPI-2422	KPU-71
NPI-2423	KPU-72

81

Designación alterna	Designación aquí empleada
NPI-2424	KPU-73
NPI-2425	KPU-74
NPI-2426	KPU-75
NPI-2427	KPU-76
NPI-2428	KPU-77
NPI-2429	KPU-79
NPI-2430	KPU-80
NPI-2431	KPU-81
NPI-2432	KPU-82
NPI-2433	KPU-83
NPI-2434	KPU-84
NPI-2435	KPU-86
NPI-2436	KPU-87
NPI-2437	KPU-88
NPI-2438	KPU-89
NPI-2439	KPU-90
NPI-2440	KPU-91
NPI-2441	KPU-92
NPI-2442	KPU-80
NPI-2455	KPU-94
NPI-2456	KPU-95
NPI-2457	KPU-96
NPI-2458	KPU-97
NPI-2459	KPU-98

364

82

Designación alterna	Designación aquí empleada
NPI-2460	t-butil fenilahistina

Descripción Detallada de la Modalidad Preferida

[0109] Cada referencia aquí citada, incluyendo las patentes de los E.U.A. aquí citadas, habrá de considerarse incorporada por referencia totalmente en esta especificación, en toda la extensión permitida por la ley. La solicitud de patentes de los E.U.A. Número de Serie 10/632,531, y la solicitud de patente PCT Número de Serie PCTUS03/24232, ambas presentada sen agosto 1, 2003, y ambas con título, "DEHYDROPHENYLAHISTINS AND ANALOGS THEREOF AND THE SYNTHESIS OF DEHYDROPHENYLAHISTINS AND ANALOGS THEREOF" se incorporan aquí por referencia totalmente.

[0110] La descripción proporciona métodos para la preparación sintética de compuestos, incluyendo compuestos novedosos, incluyendo deshidrofenilahistina y análogos de deshidrofenilahistina, y proporciona métodos para producir inhibidores de ciclo celular farmacéuticamente aceptables, agentes antitumor y agentes antifungales en rendimiento relativamente alto, en donde los compuestos y/o sus derivados están entre los ingredientes activos en estos inhibidores de ciclo celular, agentes antitumor y agentes antifungales. Otros

85

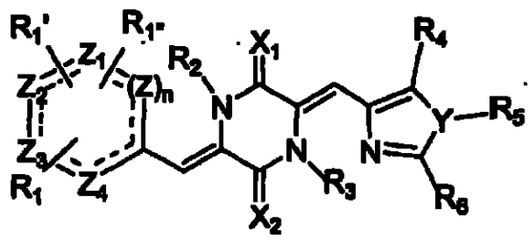
83

objetos incluyen el proporcionar compuestos novedosos que no se obtienen por métodos actualmente disponibles, no sintéticos. También un objeto es proporcionar método para tratar cáncer, particularmente cáncer humano, que comprende la etapa de administrar una cantidad inhibitoria de crecimiento de tumor efectiva de un miembro de una clase de nuevos compuestos antitumor. Esta invención también proporciona un método para evitar o tratar un hongo patogénico en un sujeto que involucra administrar al sujeto una cantidad antifungal efectiva de un miembro de lna clase de nuevos compuestos antifungales, por ejemplo administrar una deshidrofenilahistina o su análogo en una cantidad y manera que proporcione el efecto antifungal pretendido. En la modalidad preferida de los compuestos y métodos para producir y utilizar estos compuestos aquí descritos, pero no necesariamente en todas las modalidades de la presente invención, estos objetivos se satisfacen.

[0111] Aquí se describen también compuestos y métodos para producir una clase de compuestos en donde los compuestos se representan por la Fórmula (I):

96

84



(I)

[0112] en donde:

[0113] R_1, R_4, y R_6, cada uno se elige por separado el grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, ciclo alquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, grupos hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado que incluye alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, grupos C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

85

[0114] R_1' y R_1'' se elige independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

[0115] R, R1' y R1" ya están ligados covalentemente entre sí o no;

[0116] R_2, R_3, y R_5 cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo, C_1-C_{12} alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y

88

86

nitro sustituido, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

[0117] X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno ya sea sin sustituir o sustituido con un grupo R_5 como se definió anteriormente;

[0118] Y se elige del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo R_5 de la parte superior, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

[0119] n es un entero igual a cero, uno o dos;

[0120] Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada uno se eligen por separado de un átomo de carbono, átomo de azufre, átomo de nitrógeno o átomo de oxígeno; y

[0121] los enlaces punteados ya pueden ser enlaces sencillos o dobles.

[0122] El método comprende las etapas de:

[0123] reaccionar una diacildicetopiperazina con un primer aldehído para producir un compuesto intermediario; y

87

[0124] reaccionar el compuesto intermediario con un segundo aldehído para producir la clase de compuestos con la estructura genérica, en donde

[0125] el primer aldehído y el segundo aldehído se eligen del grupo que consiste de un oxazolcarboxaldehído, imidazolcarboxaldehído, un benzaldehído, derivados de imidazolcarboxaldehído, y derivados de benzaldehído, de esta manera formando un compuesto de la Fórmula (I) en donde:

[0126] R_1, R_4, y R_6, cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino

88

sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

[0127] R_1' y R_1'' se eligen independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y fenilo sustituido;

[0128] R_2, R_3, y R_5 cada uno por separado se elige del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo saturado, C_1-C_{12} alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo,

89

heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y nitro sustituido, grupo sulfonilo y sulfonilo sustituido;

[0129] X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, y

[0130] Y se elige de un grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo R_5 de los anteriores, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

[0131] Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada uno se elige por separado de un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

[0132] los enlaces punteados ya pueden ser enlaces sencillos o dobles.

[0133] También se proporcionan sales farmacéuticamente aceptables y ésteres pro-droga de los compuestos de las Fórmulas (I) y (II) y se proporcionan métodos para simplificar esos compuestos por los métodos aquí descritos.

[0134] El término "éster pro-droga" especialmente con referencia a un éster pro-droga del compuesto de la Fórmula (I) sintetizado por los métodos aquí descritos, se refiere a un derivado químico del

98

90

compuesto que se transforma rápidamente *in vivo* para dar por resultado el compuesto, por ejemplo por hidrólisis en sangre o tejidos internos. El término "éster pro-droga" se refiere a derivados de los compuestos aquí descritos formados por la adición de cualquiera de varios grupos formadores de éster que se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos éster pro-droga incluyen pivaloiloximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanil y metoximetilo, así como otros grupos semejantes conocidos en la técnica, incluyendo un grupo (5-R-2-oxo-1, 3- dioxolen-4-il)metilo. Otros ejemplos de grupos éster pro-droga pueden encontrarse por ejemplo en T. Higuchi y V. Stella, en "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A. C. S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); y "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", editado por E. B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (proporciona ejemplos de ésteres útiles como pro-drogas para compuestos que contienen grupos carboxilo).

[0135] El término "éster pro-droga" como se emplea aquí, también se refiere a un derivado químico del compuesto que se transforma rápidamente *in vivo* para dar por resultado el compuesto, por ejemplo por hidrólisis en la sangre. El término "éster pro-droga" se refiere a derivados de los compuestos aquí descritos formados por

93

91

la adición de cualquiera de varios grupos formadores éster que se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos éster pro-droga incluyen pivoiloximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo y metoximetilo, así como otros de estos grupos conocidos en la técnica, incluyendo un grupo (5-R-2-oxo-1, 3-dioxolen-4-il) metilo. Otros ejemplos de grupos éster pro-droga pueden encontrarse por ejemplo en T. Higuchi y V. Stella, en "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A. C. S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); y "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", editado por E. B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (proporcionan ejemplos de ésteres útiles como pro-drogas para compuestos que contienen grupos carboxilo).

[0136] El término "sal farmacéuticamente aceptable", en especial cuando se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la Fórmula (I) sintetizada por los métodos aquí descritos, se refiere a cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, y de preferencia se refiere a una sal de adición de ácido de un compuesto. Ejemplos preferidos de una sal farmacéuticamente aceptable son las sales de metales alcalinos (sodio o potasio), las sales de metales alcalino térreos (calcio o magnesio), o sales de amonio

94

92

derivadas de amoníaco o de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo C_1-C_7 alquilamina, ciclohexilamina, trietanolamina, etilendiamina o tris-(hidroximetil)-aminometano. Con respecto a los compuestos sintetizados por el método que son aminas básicas, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido de ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo ácido hidrohálico, sulfúrico, fosfórico o ácido carboxílico o sulfónico, alifático o aromático, por ejemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metansulfónico, p-toluensulfónico o naftalensulfónico.

[0137] El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se emplea aquí, también se refiere a cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, y de preferencia se refiere a una sal de adición de ácido de un compuesto. Ejemplos preferidos de sal farmacéuticamente aceptable son las sales de metal alcalino (sodio o potasio), las sales de metal alcalino térreo (calcio o magnesio), o sales de amonio derivadas de amoníaco o de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo C_1-C_7 alquilamina, ciclohexilamina, trietanolamina, etilendiamina o tris-(hidroximetil)-aminometano. Con respecto a compuestos

95

93

que son aminas básicas, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido de ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo ácido hidrohálico, sulfúrico, fosfórico o ácido carboxílico o sulfónico alifático o aromático, por ejemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metansulfónico, p-toluensulfónico o naftalensulfónico.

[0138] Composiciones farmacéuticas preferidas aquí descritas incluyen sales farmacéuticamente aceptables y ésteres pro-droga del compuesto de la Fórmula (I) sintetizado por el método aquí descrito. De acuerdo con esto, si la fabricación de formulaciones farmacéuticas involucra mezclado íntimo de los excipientes farmacéuticos y el ingrediente activo en su forma sal, entonces se prefiere el utilizar excipientes farmacéuticos que no son básicos, esto es ya son excipientes acídicos o neutros.

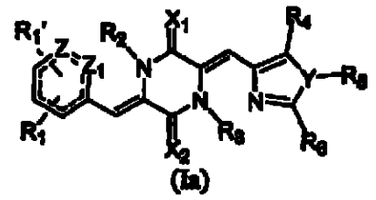
[0139] En modalidades preferidas de los métodos de los compuestos descritos aquí, puede formarse pseudo estructura de tres anillos, planar, relativamente rígida. Para estabilizar esta estructura de pseudo tres anillos planar relativamente rígida, R_3 de preferencia puede seleccionarse que sea hidrógeno.

96

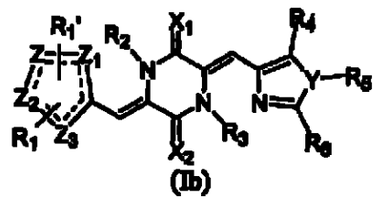
94

[0140] En otras modalidades preferibles de los compuestos y métodos aquí descritos, n es igual a cero o uno, más preferiblemente uno, y Z_2, Z_3 y Z_4 y cada uno por separado se elige de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno, y un átomo de carbono, más preferiblemente al menos uno de Z_2, Z_3 y Z_4 es un átomo de carbono y más preferiblemente al menos dos de Z_2, Z_3 y Z_4 son un átomo de carbono. Todas las Z pueden simultáneamente ser átomos de carbono.

[0141] Todavía otras modalidades preferidas de los métodos y composiciones aquí descritas involucran compuestos que tienen las estructuras de las Fórmulas (Ia) y (Ib), siguientes:



(Ia)



(Ib)

[0142] en donde los grupos variables son como se definen aquí.

97

95

[0143] El término "átomo de halógeno" como se emplea aquí, significa cualquiera de los átomos radio-estables de la columna 7 de la Tabla Periódica de los Elementos, es decir flúor, cloro, bromo o yodo, prefiriéndose flúor y cloro.

[0144] El término "alquilo", como aquí se emplea, significa cualquier hidrocarburo sin ramificar o ramificado, substituido o no substituido, saturado, prefiriéndose C_1-C_6 hidrocarburos sin ramificar, saturados, sin substituir, prefiriéndose con metilo, etilo, isobutilo y ter-butilo. Entre los hidrocarburos saturados substituidos, C_1-C_6 hidrocarburos saturados mono- y di- y per-halógeno substituidos e hidrocarburos amino-substituidos se prefieren, prefiriéndose más con perflurometilo, percloro metilo, perfluoro-ter-butilo y percloro-ter-butilo. El término "substituido" tiene su significado ordinario, como se encuentra en numerosas patentes contemporáneas de la técnica relacionada. *Ver*, por ejemplo, las patentes de los E.U.A. Nos. 6,583,143, 6,509,331; 6,506,787; 6,500,825; 5,922,683; 5,886,210; 5,874,443; y 6,350,759. Específicamente, la definición de substituir es tan amplia como lo dispuesto en la patente de los E.U.A. No. 6,583,143, que define el término substituido como cualesquiera grupos tales como alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo,

98

96

heteroarilalquilo, heterociclo y heterocicloalquilo, en donde al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza con un substituyente. El término "substituido" también es tan amplio como la definición que se dispone de la patente de los E.U.A. No. 6,509,331, que define el término "alquilo substituido" de manera tal que se refiera a un grupo alquilo, de preferencia de 1 a 10 átomos de carbono, que tiene de 1 a 5 substituyentes y de preferencia de 1 a 3 substituyentes, seleccionados del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi substituido, cicloalquilo, cicloalquilo substituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo substituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino substituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiacilamino, ciano, halógeno, hidroxilo, carboxilo, carboxilalquilo, ceto, tioceto, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi substituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterocíclico, heterocicloxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, --SO-alquilo, --SO-alquilo substituido, --SO-arilo, --SO-heteroarilo, --SO_2-alquilo, --SO_2-alquilo substituido, --SO_2-arilo y -SO_2-heteroarilo. Las otras patentes citadas anteriormente también proporcionan definiciones estándar para el término "substituido" que son bien entendidas por aquellos con destreza en la técnica. El término "cicloalquilo" se refiere a cualquier anhídrido hidrocarburo no aromático, de preferencia que tiene cinco

9ft

97

a doce átomos que comprenden el anillo. El término "acilo" se refiere a grupos alquilo o arilo derivados de un oxoácido, con un grupo acetilo que se prefiere.

[0145] El término "alquenilo", como se emplea aquí, significa cualquier hidrocarburo insaturado, sin ramificar o ramificado, substituido o sin substituir, incluyendo hidrocarburos poliinsaturados, con hidrocarburos C_1-C_6 no ramificados, mono-insaturados y di-insaturados, sin substituir que se prefieren, e hidrocarburos mono-insaturados, con substitución di-halógeno más preferidos. En las posiciones R_1 y R_4 del compuesto de la estructura (I) se prefiere particularmente una porción z-isoprenilo. El término "cicloalquenilo" se refiere a cualquier anillo hidrocarburo no aromático, que de preferencia tiene cinco a doce átomos de carbono que comprenden el anillo.

[0146] Los términos "arilo", "arilo substituido", "heteroarilo" y "heteroarilo substituido" como se emplean aquí, se refieren a anillos de hidrocarburo aromático, de preferencia que tienen cinco, seis o siete átomos, y más preferiblemente que tienen seis átomos que comprenden el anillo. "Heteroarilo" y "heteroarilo substituido", se refieren a anillos de hidrocarburo aromático en donde al menos un heteroátomo,

100

98

por ejemplo un átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno, está en el anillo junto con al menos un átomo de carbono.

[0147] El término "alcoxi" se refiere a cualquier éter no ramificado o ramificado, substituido o sin substituir, saturado o insaturado, con C_1-C_6 éteres sin ramificar, saturados, sin substituir preferidos, prefiriéndose metoxi, y también con dimetil, dietil, metil-isobutil y metil-ter-butil también preferidos. El término "cicloalcoxi" se refiere a cualquier anillo hidrocarburo no aromático que de preferencia tiene cinco a doce átomos que comprenden el anillo.

[0148] Los términos "purificado", "substancialmente purificado", y "aislado" como se emplean aquí, se refieren al compuesto que está libre de otros compuestos diferentes con los cuales el compuesto se asocia normalmente en su estado natural, de manera tal que el compuesto de la invención comprende al menos 0.5%, 1%, 5%, 10%, o 20%, y más preferiblemente al menos 50% o 75% de la masa, en peso de una muestra determinada.

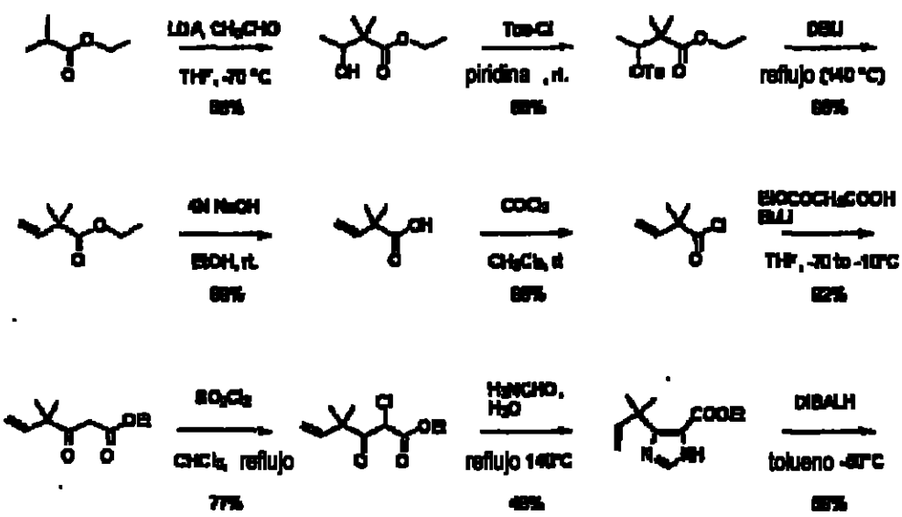
[0149] El compuesto de la Fórmula (I) puede sintetizarse químicamente o producirse a partir de reactivos conocidos y disponibles en la técnica. Por ejemplo, modificaciones de diacildicetopiperazina (diacetildicetopiperazina) se han descrito, por ejemplo por Loughlin *y colaboradores*, 2000 *Bioorg Med Chem Lett*

104

99

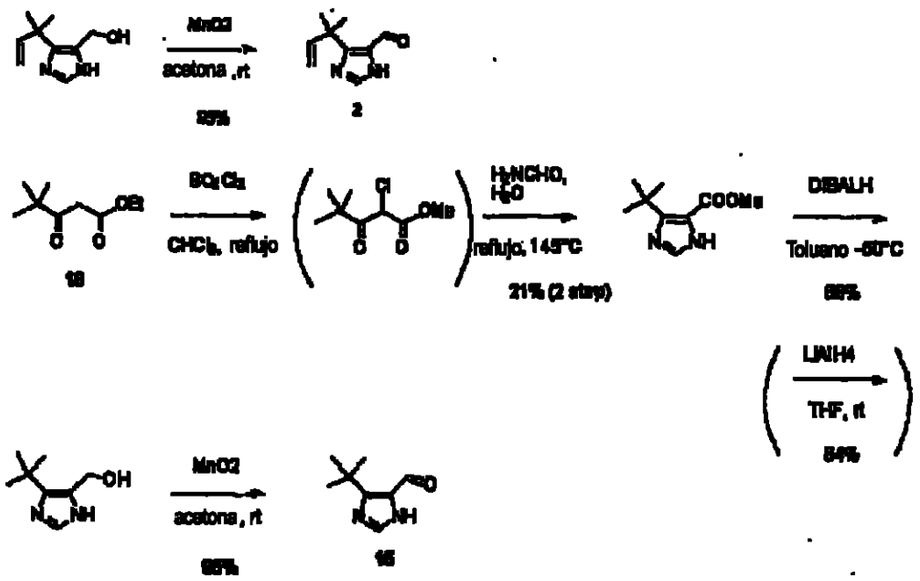
10:91 o por Brocchini *y colaboradores*, en WO 95/21832. La diacildicetopiperazina (diacetildicetopiperazina) puede prepararse por ejemplo por diacetilación de la 2,5-piperazindiona económica (TCI Cat. No. G0100, 25 g) con acetato de sodio y anhídrido de sodio. La estructura diacetilo de la dicetopiperazina activada puede ser reemplazada con otros grupos acilo, para incluir carbamatos tales como Boc (t-butoxicarbonilo), Z (benzoiloxicarbonilo).

[0150] El imidazolcarboxaldehído puede prepararse por ejemplo de acuerdo con el procedimiento descrito en Hayashi *y colaboradores*, 2000 *J Organic Chem* 65:8402, como se ilustra a continuación:



102

100



[0152] El método sintético aquí descrito de preferencia puede realizarse en la presencia de carbonato de cesio con una base en DMF y en una atmósfera de desoxigenada. La atmósfera inerte supera la probable oxidación de átomos de carbono alfa-activados del anillo dicetopiperazina durante el tratamiento con carbonato de cesio (*ver* a continuación) como se reporta, por ejemplo por Watanabe *y colaboradores*, *18th International Congress of Heterocyclic Chemistry in Yokohama, Japan* (30 July 2001), Abstract, página 225.



103

101

Oxidación con aire de Compuestos Carbonilo Activados con Sales de Cesio

[0153] Otras modalidades del método sintético involucran modificaciones a los compuestos empleados en o de otra forma involucrados en la síntesis de compuestos representados por la Fórmula (I). Estos derivados pueden incluir modificaciones al anillo fenilo, introducción de otros sistemas de anillos aromáticos, posición del anillo aromático, alteraciones al sistema de anillo imidazol y/o adicionales modificaciones a la posición 5 en el anillo imidazol. Ejemplos de estas modificaciones se discuten por ejemplo en el Ejemplo 4. El resultado de estas modificaciones incluye aumentar el contenido de nitrógeno del anillo fenilo y/o el compuesto que puede incrementar la solubilidad del compuesto. Otras modificaciones pueden incorporar derivados de conocidos inhibidores de tubulina, de esta manera imitando la actividad de los inhibidores de tubulina. Otras modificaciones pueden simplificar la síntesis del beta-cetoéster involucrado en la producción del imidazolcarboxaldehído empleado en los métodos aquí descritos.

Composiciones Farmacéuticas

[0154] La presente invención también abarca los compuestos aquí descritos, opcionalmente y de preferencia producidos por los métodos aquí descritos, en

109

102

composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable preparado para almacenamiento y subsecuente administración, que tieneN una cantidad farmacéuticamente efectiva de los productos descritos anteriormente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Portadores o diluyentes aceptables para usoS terapéuticos son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Conservadores, estabilizantes, colorantes e incluso agentes saborizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Por ejemplo, benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, pueden agregarse como conservadores. Además, pueden emplearse antioxidantes y agentes de suspensión.

[0155] Las composiciones de deshidrofenilahistina o análogo de deshidrofenilahistina pueden formularse y emplearse como tabletas, cápsulas o elíxires para administración oral; supositorios para administración rectal; soluciones estériles, suspensiones para administración inyectable; parches para administración transdérmica, y depósitos sub-dérmicos y semejantes. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones

105

103

líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de inyección o infusión, o como emulsiones. Excipientes convenientes son por ejemplo, agua, salino, dextrosa, mannitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, hidrocloruro de cisteína, albúmina de suero humano y semejantes. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de substancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes amortiguadores de pH y semejantes. Si se desea, preparaciones que mejoran la absorpción (por ejemplo, liposomas), pueden emplearse.

[0156] Formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas. Solventes o vehículos lipofílicos convenientes incluyen aceites grasos tales como aceite de ajonjolí u otros aceites orgánicos tales como soya, aceite de almendras o de toronja, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como etiloleato o triglicéridos, o liposomas. Suspensiones para inyección acuosa pueden contener substancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sodio,

106

104

sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener adecuados estabilizantes o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

[0157] Preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtener al combinar los compuestos activos con excipienteS sólidos, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar adecuados auxiliares, si se desea, para obtener núcleos de grageas o tabletas. Excipientes convenientes son en particular rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, mannitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes desintegrantes, tales como polivinil pirrolidona entrelazada, agar o ácido algínico o su sal tal como alginato de sodio. Núcleos de grageas se proporconan con revestimientos convenientes. Para este propósito, pueden emplearse soluciones de azúcar concentrada, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco,

107

105

polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilen glicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos convenientes o mezclas de solvente. Pueden agregarse colorantes o pigmentos a las tabletas o revestimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos. Para este propósito, pueden emplearse soluciones de azúcar concentradas, que pueden obtener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilen glicol y/o dióxido de titanio, soluciones de lacas y solventes orgánicos convenientes o mezclas de solventeS. Pueden agregarse colorantes o pigmentos a los revestimientos de grageas o tabletas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos. Estas formulaciones pueden elaborarse utilizando métodos conocidos en la especialidad (*ver*, por ejemplo, las patentes de los E.U.A. Nos. 5,733,888 (Composiciones inyectables); 5,726,181 (compuestos poco solubles en agua); 5,707,641 (Péptidos o proteínas terapéuticamente activas); 5,667,809 (Agente lipofílicos); 5,576,012 (Agentes poliméricos solubilizantes); 5,707,615 (Formulaciones anti-virales); 5,683,676 (Medicamentos en partículas); 5,654,286 (Formulaciones tópicas); 5,688,529

103

106

(Suspensiones orales); 5,445,829 (Formulaciones de liberación prolongada); 5,653,987 (Formulaciones líquidas); 5,641,515 (Formulaciones de liberación controlada) y 5,601,845 (Formulaciones esferoides).

[0158] Además se describen aquí diversas composiciones farmacéuticamente bien conocidas en la técnica farmacéutica para usos que incluyen suministro intraocular, intranasal e intraauricular. Formulaciones farmacéuticas incluyen soluciones oftálmicas acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, tales como gotas para ojos, o en goma gelan (Shedden *y colaboradores*, 2001 *Clin Ther* **23**(3):440-50) o hidrogeles (Mayer *y colaboradores*, 1996 *Ophthalmologica* **210**:101-3); ungüentos oftálmicos; suspensiones oftálmicas, tales como micropartículas, partículas poliméricas pequeñas que contienen droga, que se suspenden en un medio portador líquido (Joshi, A., 1994 *J Ocul Pharmacol* **10**:29-45), formulaciones solubles en lípidos (Alm *y colaboradores*, 1989 *Prog Clin Biol Res* **312**:447-58), y microesferas (Mordenti, 1999 *Toxicol Sci* **52**:101-6); e insertos oculares. Estas formulaciones farmacéuticas convenientes más a menudo y de preferencia se formulan para ser estériles, isotónicas y amortiguadas para estabilidad y comodidad. Composiciones farmacéuticas también pueden incluir gotas y rocíos a menudo preparados para simular

109

107

en muchos aspectos secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de acción ciliar normal. Como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing, 18^{ava} Edición), y es bien conocido por aquellos con destreza en la técnica, formulaciones convenientes son más a menudo y de preferencia isotónicas, ligeramente amortiguadas para mantener un pH de 5.5 a 6.5 y más a menudo y de preferencia incluyen conservadores antimicrobianos y estabilizantes de drogas apropiados. Formulaciones farmacéuticas para suministro intraauricular incluyen suspensiones y ungüentos para aplicación tópica en el oído. Solventes comúnes para estas formulaciones aurales incluyen glicerina y agua.

[0159] Cuando se utiliza como un inhibidor de ciclo celular, un inhibidor de crecimiento de tumor o un compuesto inhibidor de crecimiento de hongos, el compuesto de la Fórmula (I) puede administrarse ya sea por rutas orales o no orales. Cuando se administra oralmente, puede administrarse en forma de cápsulas, tabletas, gránulos, rocíos, jarabes u otras formas. Cuando se administra en forma no oral, puede administrarse como una suspensión acuosa, una preparación aceitosa o semejantes o como un gotero, supositorio, ungüento o semejante, cuando se administra por inyección o infusión, en forma subcutánea, intraperitoneal,

148

intravenosa, intramuscular o semejantes. Similarmente, puede administrarse en forma tópica, rectal o vaginal como se considera apropiada por aquellos con destreza en la especialidad para llevar el compuesto a contacto óptimo con un tumor, de esta manera inhibiendo el crecimiento del tumor. Administración local en el sitio del tumor también se contempla, ya sea antes o después de resección de tumor, como formulaciones de liberación controlada, formulaciones de depósito y suministro de bomba de infusión.

Métodos de Administración

[0160] La presente invención también abarca métodos para producir y para administrar los compuestos químicos descritos y las composiciones farmacéuticas descritas. Estos métodos descritos incluyen, entre otros, (a) administración a través de rutas orales, esta administración incluye administración en forma de cápsulas, tabletas, gránulos, rocíos, jarabes u otras semejantes; (b) administración a través de rutas no orales, esta administración incluye administración como una suspensión acuosa, una preparación aceitosa o semejantes o como un gotero, supositorio, ungüento o semejantes; administración por inyección o infusión, en forma subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o semejantes; así como (c)

109

administración tópica, (d) administración rectal o (e) administración vaginal, como se considere apropiado por aquellos con destreza en la técnica para llevar el compuesto en contacto con tejido vivo; y (f) administración mediante formulaciones de liberación controlada, formulaciones de depósito, y suministro de bomba de infusión. Como ejemplos adicionales de estos modos de administración y como descripción adicional de modos de administración, aquí se describen diversos métodos para administración de los compuestos químicos descritos y composiciones farmacéuticamente que incluyen modos de administración a través de rutas intraocular, intranasal e intraauricular.

[0161] La cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición de deshidrofenilahistina o análogo de deshidrofenilahistina, requerida como una dosis, dependerá de la ruta de administración, el tipo de animal, incluyendo humano a tratar y las características físicas del animal específico bajo consideración. La dosis puede ajustarse a la medida para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicamento concurrente y otros factores que aquellos con destreza en las técnicas médicas reconocerán.

112

110

[0162] Al practicar los métodos, los productos o composiciones pueden emplearse solos o en combinación entre sí, o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Por ejemplo, como se describe aquí, los compuestos aquí descritos son efectivos en el tratamiento de cáncer, cuando se emplean en combinación con otros activos, específicamente otros agentes quimioterapéuticos, por ejemplo biológicos y los quimioterapéuticos específicos CPT-11, Taxotene (docataxel) y paclitaxel. Los compuestos aquí descritos son también efectivos en el tratamiento de cáncer cuando se emplean en combinación con otros activos, incluyendo agentes anti-vasculares, agentes anti-angiogénicos, tales como Erbuitux (Imclone/bristol-Myers) y Iressa (AstraZeneca), otros inhibidores VEGF y biológicos, más específicamente al menos un anticuerpo anti-VEGF, especialmente anticuerpos monoclonales al receptor VEGF, incluyendo DC101, un anticuerpo monoclonal de rata, que bloquea el receptor VEGF de ratón 2(flk-1). Estas combinaciones pueden emplearse *in vivo*, ordinariamente en un mamífero, de preferencia en un humano o *in vitro*. Al emplearlos *in vivo*, los compuestos descritos solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos u otros productos biológicos, pueden administrarse al mamífero en una variedad de formas, incluyendo parenteral,

43

intravenosa, por infusión o inyección, subcutánea, intramuscular, colónica, rectal, vaginal, nasal o intraperitoneal, empleando una variedad de formas de dosis. Estos métodos también pueden aplicarse a prueba de actividad química *in vivo*.

[0163] Como será fácilmente aparente para una persona con destreza en la especialidad, la dosis útil *in vivo* para administrarse y el modo de administración particular, variarán dependiendo de la edad, peso y especies de mamíferos tratadas, los compuestos particulares empleados y el uso específico para los cuales se emplean estos compuestos. La determinación de niveles de dosis efectivos, esto es los niveles de dosis necesarios para lograr el resultado deseado, puede lograrse por una persona con destreza en la técnica, utilizando métodos farmacológicos rutinarios. Típicamente, se inician aplicaciones clínicas de productos en humanos a menores niveles de dosis, con el nivel de dosis que se incrementa hasta que se logra el efecto deseado. En forma alterna, estudios *in vitro* aceptables pueden emplearse para establecer dosis y rutas de administración útiles de las composiciones identificadas por los presentes métodos utilizando métodos farmacológicos establecidos.

112

[0164] En estudios en animales no humanos, aplicaciones de productos potenciales se inician a superiores niveles de dosis, disminuyéndose la dosis hasta que el efecto deseado no se logre más o desaparezcan efectos secundarios adversos. La dosis puede estar en el intervalo ampliamente, dependiendo de los efectos deseados y la indicación terapéutica. Típicamente, dosis pueden estar entre aproximadamente 10 microgramos/kg y 100 mg/kg de peso corporal, de preferencia entre aproximadamente 100 microgramos/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Dosis alternas pueden basarse y calcularse sobre el área superficial del paciente, como se entiende por aquellos con destreza en la técnica. La administración puede ser oral en una base cada tercer día, cada día salteado, diariamente, dos veces al día o tres veces al día.

[0165] La formulación exacta, ruta de administración y dosis pueden seleccionarse por el médico individual en vista de la condición del paciente. *Ver* por ejemplo, Fingl *y colaboradores*, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975. Habrá de notarse que el médico que atiende debe saber como y cuando terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad o a disfunciones del órgano. Por el contrario, el médico a cargo también sabrá ajustar el tratamiento a

HS

113

niveles superiores si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo toxicidad). La magnitud de una dosis de administración en la administración de un desorden de interés, variará con la severidad de la condición a tratar y la ruta de administración. La severidad de la condición puede por ejemplo evaluarse en parte, por métodos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y probablemente la frecuencia de dosis también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. Un programa comparable discutido anteriormente puede emplearse en medicina veterinaria.

[0166] Dependiendo de las condiciones específicas a tratar, estos agentes pueden formularse y administrarse sistémica o localmente. Una variedad de técnicas para formulación y administración pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^{ava} Edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Rutas de administración convenientes pueden incluir oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosal o intestinal; suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramuscular, subcutánea, intramedular, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, por infusión, intraperitoneal, intranasal, o intraocular.

46

114

[0167] Para inyección o infusión, los agentes pueden formularse en soluciones acuosas, por ejemplo en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o amortiguador salino fisiológico. Para esta administración transmucosal, penetrantes apropiados a la barrera a permearse, se emplean en la formulación. Estos penetrantes son en general conocidos en la técnica. El uso de portadores farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos aquí descritos para la práctica de la invención en dosis adecuadas para administración sistémica, está dentro del alcance de la invención. Con selección apropiada de portador y adecuada práctica de fabricación, las composiciones aquí descritas, en particular aquellas formuladas como soluciones, pueden administrarse parenteralmente, tal como por inyección o infusión intravenosa. Los compuestos pueden formularse fácilmente utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas para administración oral. Estos portadores permiten a los compuestos ser formulados como tabletas, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, fangos, suspensiones y semejantes, para ingestión oral por un paciente a tratar.

117

115

[0168] Agentes pretendidos para administrarse intracelularmente, pueden administrarse utilizando técnicas bien conocidas por aquellos con destreza ordinaria en la especialidad. Por ejemplo, estos agentes pueden ser encapsulados en liposomas, después administrados como se describió anteriormente. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa al tiempo de formación de liposomas, se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposomales son tanto protegidos del micro-ambiente externo y debido a que los liposomas se fusionan con las membranas celulares, se suministran eficientemente en el citoplasma celular. Adicionalmente, debido a su hidrofobicidad, pequeñas moléculas orgánicas pueden administrarse directamente en forma intracelular.

[0169] La determinación de las cantidades efectivas está bien dentro de la capacidad para aquellos con destreza en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada que aquí se proporciona. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables convenientes que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden emplearse farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en la

116

forma de tabletas, grageas, cápsulas o soluciones. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse en una forma que de por sí es conocida, por ejemplo mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, preparación de grageas, levitación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

[0170] Compuestos aquí descritos pueden evaluarse por eficacia y toxicidad utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular o de un sub-conjunto de los compuestos, que comparten ciertas moléculas químicas, puede establecerse al determinar toxicidad *in vitro* hacia una línea celular, tal como una línea celular de mamífero, y de preferencia de humano. Los resultados de estos estudios a menudo son predictivos de toxicidad en animales, tales como mamíferos o más específicamente humanos. En forma alterna, la toxicidad de compuestos particulares en un modelo de animal, tales como ratones, ratas, conejos o monos, puede determinarse utilizando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede establecerse utilizando varios métodos reconocidos en la especialidad, tales como métodos *in vitro*, modelos de animales, o pruebas clínicas en humanos. Modelos *in vitro* reconocidos en la especialidad existen para casi toda

119

117

clase de condición, incluyendo las condiciones abatidas por los compuestos aquí descritos, incluyendo cáncer, enfermedad cardiovascular y diversas infecciones fungales. Similarmente, modelos en animales aceptables pueden emplearse para establecer eficacia de productos químicos para tratar estas condiciones. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, la persona con destreza puede guiarse por el estado de la técnica para seleccionar un modelo, dosis y ruta de administración apropiados y régimen. Por supuesto, pruebas clínicas en humanos también pueden emplearse para determinar la eficacia de un compuesto en humanos.

[0171] Cuando se utiliza como un agene anti-cáncer, o un compuesto inhibidor de crecimiento de tumor, los compuestos aquí descritos pueden administrarse ya sea por rutas orales o no orales. Cuando se administran oralmente, pueden administrarse en forma de cápsulas, tabletas, gránulos, rocíos, jarabes u otras de estas formas. Cuando se administran en forma no oral, pueden administrarse como una suspensión acuosa, una preparación aceitosa o semejantes o como un goteo, supositorio, ungüento o semejantes, cuando se administran por inyección o infusión, en forma subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o semejantes. Similarmente, pueden administrarse forma

tópica, rectal o vaginal, como se considere apropiado por aquellos con destreza en la técnica, para llevar al compuesto a contacto óptimo con un tumor, de esta manera inhibiendo el crecimiento del tumor. Administración local en el sitio del tumor u otra condición de enfermedad también se contempla, ya sea antes o después de resección del tumor, o como parte de un tratamiento reconocido en la especialidad para la condición de enfermedad. Formulaciones de liberación controlada, formulaciones de depósito, y suministro de bomba de infusión, se contemplan similarmente. 118

[0172] Cuando se utiliza como un agente anti-cáncer o un agente anti-tumor, puede ser administrado oral o no oralmente a un paciente humano en la cantidad de aproximadamente .0007 mg/día a aproximadamente 7,000 mg/día del ingrediente activo, y más preferible aproximadamente 0.07 mg/día a aproximadamente 70 mg/día del ingrediente activo a, de preferencia, una vez por día o menos, de preferencia, más de dos a aproximadamente diez veces por día. En forma alterna y también de preferencia el compuesto puede de preferencia administrarse en las cantidades establecidas en forma continua por ejemplo por goteo intravenoso. De esta manera, para un paciente que pesa 70 kilogramos, la dosis diaria preferida del ingrediente de tumor activo será

121

119

aproximadamente 0.0007 mg/kg/día a aproximadamente 35 mg/kg/día incluyendo 1.0 mg/kg/día y 0.5 mg/kg/día, y más preferiblemente desde 0.007 mg/kg/día a aproximadamente 0.050 mg/kg/día, incluyendo 0.035 mg/kg/día. Sin embargo, como se entenderá por aquellos con destreza en la técnica, en ciertas situaciones puede ser necesario el administrar el compuesto anti-tumor, en cantidades que exceden o exceden en mucho el intervalo de dosis preferido anteriormente establecido, para tratar en forma efectiva y agresiva tumores particularmente avanzados o letales.

[0173] Cuando se utiliza como un agente antifungal, la cantidad preferible de la deshidrofenilahistina o su análogo efectiva para tratamiento o prevención de un patógeno fungal particular, dependerá en parte de las características del hongo y la extensión de la infección, y puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden emplearse opcionalmente para ayudar en identificar intervalos de dosis óptima. Dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de análisis *in vitro* o de preferencia a partir de modelos de animales. El nivel de dosis preciso deberá determinarse por el médico a cargo u otro proveedor del cuidado de la salud y dependerá de

122

120

factores bien conocidos, incluyendo la ruta de administración, y la edad, peso corporal, sexo y salud general del individuo; la naturaleza, severidad y etapa clínica de la infección; el uso (o no) de terapias concomitantes.

[0174] La dosis efectiva de la deshidrofenilahistina o su análogo típicamente estará en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 mg/kgs, de preferencia aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal de mamífero por día, administrado en una sola o múltiples dosis. En general, el compuesto puede administrarse a pacientes que requieren este tratamiento en un intervalo de dosis diarias de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 mg por paciente.

[0175] Para formular la dosis incluyendo los compuestos aquí descritos como un compuesto inhibidor de crecimiento de tumor, conocidos agentes tensioactivos, excipientes, agentes de alisamiento, agentes de suspensión y sustancias formadoras de película farmacéuticamente aceptables y asistentes de revestimiento y semejantes, podrán emplearse. De preferencia alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y semejantes pueden emplearse como agentes tensiactivos; sacarosa, glucosa, lactosa, almidón,

123

121

celulosa cristalizada, manitol, silicato anhídro ligero, aluminato de magnesio, metasilicato aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrógeno fosfato de calcio, carboximetil celulosa de calcio y semejantes, pueden emplearse como excipientes; estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y semejantes pueden emplearse como agentes de alisamiento; aceite de coco, aceite de oliva, aceite de ajonjolí, aceite de cacahuate, aceite de soya pueden emplearse como agentes de suspensión o lubricantes; acetato ftalato de celulosa como un derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar, o copolímero de dimetil acetato-metacrilato, como un derivado de polivinilo pueden emplearse como agentes de suspensión; y plastificantes tales como éster ftalatos y semejantes pueden emplearse como agentes de suspensión. Además de los ingredientes preferidos anteriores, endulzantes, fragancias, colorantes, conservadores y semejantes, pueden agregarse a la formulación administrada del compuesto, particularmente cuando el compuesto se va a administrar oralmente.

[0176] Las composiciones aquí descritas en composiciones farmacéuticas también pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden prepararse para almacenamiento y

124

122

subsecuente administración. Portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, estas composiciones pueden formularse y emplearse como tabletas cápsulas o soluciones para administración oral; supositorios para administración rectal o vaginal; soluciones o suspensiones estériles para administración inyectable. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de inyección o infusión o como emulsiones. Excipientes convenientes incluyen pero no están limitados a, salino, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albumina, glutamato de sodio, hidrocloruro de cisteína y semejantes. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes amortiguadores de pH y semejantes. Si se desea, pueden emplearse preparaciones para mejora de absorción (por ejemplo liposomas).

[0177] La cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición requerida como una dosis dependerá de

123

la ruta de administración, el tipo de animal a tratar y las características físicas del animal específico bajo consideración. La dosis puede ajustarse a la medida para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que reconocerán aquellos con destreza en la especialidad médica.

[0178] Los productos o composiciones como se describió anteriormente pueden emplearse solos o en combinación entre sí o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Específicamente, los productos de compuestos descritos pueden emplearse solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos o biológicos, incluyen anticuerpos, para el tratamiento de cáncer, o en combinación con otros anti-infecciosos para el tratamiento de infección fungal. Estos productos o composiciones pueden emplearse *in vivo* o *in vitro*. Las dosis útiles y los modos más útiles de administración variarán dependiendo de la edad, peso y animal tratado, los compuestos particulares empleados y el uso específico para los cuales se emplea esta composición o composiciones. La magnitud de una dosis en la administración o tratamiento para un desorden particular, variará con la severidad de la condición a tratar y la ruta de administración, y dependiendo de las condiciones

124

de enfermedad y su severidad, las composiciones podrán formularse y administrarse ya sea sistémicamente o localmente. Una variedad de técnicas para formulación y administración pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

[0179] Para formular los compuestos de la Fórmula (I), de preferencia producidos de forma sintética de acuerdo con los métodos aquí descritos, como un inhibidor de ciclo celular, un inhibidor de crecimiento de tumor o un compuesto antifungal, conocidos agentes tensiactivos excipientes, agentes de alisamiento, agentes de suspensión y sustancias formadoras de película farmacéuticamente aceptables y asistentes de revestimiento y semejantes, podrán emplearse. De preferencia, alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y semejantes pueden emplearse como agentes tensioactivos; sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhídro ligero, aluminato de magnesio, metasilicato aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrógeno fosfato de calcio, carboximetil celulosa calcio y semejantes pueden emplearse como excipientes; estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y semejantes pueden emplearse como

125

agentes de alisamiento; aceite de coco, aceite de oliva, aceite de ajonjolí, aceite de cacahuate, aceite de soya, pueden emplearse como agentes de suspensión o lubricantes; acetato ftalato de celulosa como un derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar, o copolímero de dimetil acetato-metacrilato, ya que un derivado de polivinilo pueden emplearse como agente de suspensión; y plastificantes tales como éster ftalatos y semejantes pueden utilizarse como agentes de suspensión. Además de los ingredientes preferidos anteriores, pueden agregarse endulzantes, fragancias, colorantes, conservadores y semejantes a la formulación administrada del compuesto, producido por el método, particularmente cuando el compuesto se va a administrar oralmente.

[0180] Los inhibidores del ciclo celular, los agentes antitumor y los agentes antifungales que pueden producirse por el método, pueden administrarse en forma oral o no oral a un paciente humano en una cantidad de aproximadamente 0.001 mg/kg/día a aproximadamente 10,000 mg/kg/día del ingrediente activo, y más preferible aproximadamente 0.1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día del ingrediente activo, de preferencia una cada tres días en una base cíclica, una cada día salteado, una vez por día, dos veces por día o menos preferiblemente, más de dos hasta aproximadamente diez veces por día. En

126

forma alterna y también de preferencia, el compuesto producido por el método puede de preferencia administrarse en las cantidades establecidas en forma continua, por ejemplo por goteo intravenoso. De esta manera, por ejemplo en un paciente que pesa 70 kilogramos, la dosis diaria preferida del ingrediente anti-tumor activo sería de aproximadamente 0.07 mg/día a aproximadamente 700 gramos/día, y más preferiblemente, 7 mg/día a aproximadamente 7 gramos/día. Sin embargo, como se entenderá por aquellos con destreza en la técnica, en ciertas situaciones, puede ser necesario el administrar el compuesto anti-tumor producido por el método en cantidades que exceden o incluso exceden en mucho el intervalo de dosis preferido anteriormente establecido, para tratar en forma efectiva y agresiva tumores letales o particularmente avanzados.

[0181] En el caso de utilizar el inhibidor de ciclo celular producido por los métodos como un reactivo de prueba bioquímico, el compuesto producido por los métodos de la invención inhibe el avance del ciclo celular cuando se disuelve en un solvente orgánico o solvente orgánico hidratado, y está directamente aplicado a cualquiera de diversos sistemas de células cultivadas. Solventes orgánicos utilizables incluyen por ejemplo metanol, metilsulfóxido y semejantes. La formulación

127

puede por ejemplo ser un polvo, gránulo u otro inhibidor sólido, o un inhibidor líquido preparado utilizando un solvente orgánico o un solvente orgánico hidratado. Mientras que la concentración preferida del compuesto producida por el método de la invención para utilizar como un inhibidor de ciclo celular generalmente está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µg/ml, la cantidad de uso más apropiada varía dependiendo del tipo de sistema de células cultivadas y el propósito de uso, como se apreciará por personas con destreza ordinaria en la especialidad. También, en ciertas aplicaciones, puede ser necesario o preferido para personas con destreza ordinaria en la técnica, el utilizar una cantidad fuera del intervalo anterior.

[0182] Desde una perspectiva farmacéutica, ciertas modalidades proporcionan métodos para evitar o tratar infecciones fungales y/u hongos patogénicos en un sujeto, involucran administrar al sujeto una composición que incluye una deshidrofenilahistina o su análogo, por ejemplo administrar la deshidrofenilahistina o su análogo en una cantidad y forma que proporcionan el efecto antifungal pretendido.

[0183] Otras modalidades incluyen el tratamiento o prevención de infección en un paciente por

~~230~~

128

un hongo patogénico tales como aquellos citados anteriormente o referidos a continuación.

[0184] Otra modalidad se refiere al tratamiento o prevención de infección en un paciente por un hongo patogénico que es resistente a uno o más de otros agentes antifungales, en especial un agente diferente a deshidrofenilahistina o su análogo, incluyendo por ejemplo amfotericina B o sus análogos o derivados (incluyendo 14(s)-hidroxiamfotericina B metil éster, la hidrazida de amfotericina B con 1-amino-4-metilpiperazina, y otros derivados) otros antibióticos de polieno macrolida, incluyendo por ejemplo nistatina, cicidina, pimaricina y natamicina; flucitosina; griseofulvina; equinocandina o aureobasidina, incluyendo análogos de origen natural y semi-sintéticos; dihidrobenzo[a]naptacenequinona; antifungales de péptido nucleósido incluyendo las polioxinas y nicomicinas; alilaminas tales como naftifina y otros inhibidores de escualeno epoxidasa; y azoles, imidazoles y triazoles tales como por ejemplo clotrimazol, miconazol, ketoconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, terconazol, itraconazol o fluconazol y semejantes. Para agentes antifungales convencionales adicionales y nuevos agentes bajo desarrollo, ver por ejemplo Turner y Rodriguez, 1996 *Current Pharmaceutical Design*, **2**:209-224.

129

Otra modalidad involucra el tratamiento o prevención de infección en un paciente por un hongo patogénico en casos en donde el paciente es alérgico a, de otra forma intolerante con, sin respuesta a uno o más otros agentes antifungales o en el que el uso de otros agentes antifungales de otra forma está contraindicado. Aquellos otros agentes antifungales incluyen entre otros, los agentes antifungales descritos anteriormente y en otra parte aquí.

[0185] En los métodos anteriores para tratamiento o prevención, una deshidrofenilahistina o su análogo, se administra al sujeto en una cantidad antifungal efectiva.

[0186] Otras modalidades se refieren al tratamiento o prevención de infección por un hongo patogénico en un paciente, por administración de una deshidrofenilahistina o su análogo, en conjunto con la administración de uno o más otros agentes antifungales, incluyendo por ejemplo cualquiera de los agentes o tipo de agentes previamente mencionados (por ejemplo en combinación con tratamiento con amfotericina B, de preferencia en una formulación de lípidos o liposomas; un azol o triazol tal como fluconazol, por ejemplo; una aureobasidina; dihidrobenzo[a]naptacenequinona; o una

130

equinocardina) al igual que con una diferente deshidrofenilahistina o su análogo.

[0187] La deshidrofenilahistina o su análogo puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que el otro agente antifungal se administre. En ciertas modalidades, la terapia de combinación permitirá el uso de cantidades reducidas de uno o ambos componentes antifungales respecto a la cantidad empleada, si se utiliza sola.

[0188] Todavía otras modalidades se refieren a la administración de una deshidrofenilahistina o su análogo a un sujeto para tratamiento o prevención de infección por un hongo patogénico, en donde el sujeto está inmunosuprimido o inmunocomprometido, por ejemplo como resultado de desorden genético o enfermedad tal como diabetes o VIH (HIV) u otra infección, quimioterapia o tratamiento de radiación para cáncer u otra enfermedad, o inmunosupresión inducida por droga o de otra forma, en conexión con transplante de tejido u órgano o el tratamiento de un desorden autoinmune. Cuando el paciente se está o será tratado con un agente inmunosupresivo, por ejemplo en conexión con transplante de tejido u órgano, una deshidrofenilahistina o su análogo puede coadministrarse con el o los agentes inmunosupresores para tratar de evitar una infección fungal patogénica.

132

131

[0189] Otro aspecto de esta invención es el tratamiento o prevención de infección por un hongo patogénico en un paciente infectado, o que se sospecha que está infectado, con HIV, por administración de una deshidrofenilahistina antifungal o su análogo, en conjunto con la administración de uno o más terapéuticos anti-HIV (incluyendo por ejemplo inhibidores de HIV proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa o agentes antivirales). La deshidrofenilahistina o su análogo pueden administrarse antes, después o al mismo tiempo que la administración del o los agentes anti-HIV.

[0190] Otro aspecto de esta invención es el tratamiento o prevención de infección por un hongo patogénico en un paciente mediante administración de una deshidrofenilahistina antifungal o su análogo, en conjunto con la administración de uno o más otros compuestos antibióticos, en especial uno o más agentes antibacterianos, de preferencia en una cantidad y régimen efectivos para tratar o evitar infección bacteriana. De nuevo, la deshidrofenilahistina o su análogo pueden administrarse antes, después o al mismo tiempo que la administración del o los otros agentes.

[0191] Infecciones fungales patogénicas que pueden tratarse o evitarse por los métodos descritos incluyen entre otras Aspergillosis, incluyendo

134

132

aspergillosis pulmonar invasiva; Blastomicosis, incluyendo infecciones profundas o rápidamente progresivas y blastomicosis en el sistema nervioso central; Candidiasis, incluyendo candidiasis retrógrada del tracto urinario, por ejemplo en pacientes con cálculos renales, obstrucción del tracto urinario, transplante renal o diabetes mellitus deficientemente controlada; Coccidioidomicosis, incluyendo enfermedad crónica que no responde bien a otra quimioterapia; Criptococosis; Histopolasmosis; Mucormicosis, incluyendo por ejemplo mucormicosis craneofacial y mucormicosis pulmonar; Paracoccidioidomicosis; y Esporotricosis. Habrá de notarse que la administración de una composición que comprende una cantidad antifungal de uno o más de deshidrofenilahistina o sus análogos, puede ser particularmente útil para tratar o evitar una infección fungal patogénica en un sujeto mamífero cuando el hongo es resistente a una o más terapias antifungales, o en donde el uso de una más otras terapias antifungales está contraindicado, por ejemplo como se mencionó anteriormente.

[0192] Composiciones farmacéuticas antifungales que contienen al menos una deshidrofenilahistina antifungal o su análogo, también se proporcionan para utilizar en practicar los métodos descritos. Aquellas

X33

composiciones farmacéuticas pueden ser empacadas juntas con un inserto de empaque apropiado que contiene, *inter alia*, instrucciones e información referentes a su uso antifungal. Composiciones farmacéuticas también se proporcionan que contienen una o más deshidrofenilahistina o su análogo junto con un segundo agente antifungal.

133

Métodos de Tratamiento de Infecciones Fungales

[0193] Ciertas modalidades aquí descritas se refieren a métodos para tratar o evitar una infección fungal patogénica incluyendo por ejemplo Aspergillosis, incluyendo aspergillosis pulmonar invasiva; Blastomicosis, incluyendo infecciones profundas o rápidamente progresivas y blastomicosis en el sistema nervioso central; Candidiasis, incluyendo candidiasis retrógrada del tracto urinario, por ejemplo en pacientes con cálculos renales, obstrucción del tracto urinario, transplante renal o diabetes mellitus deficientemente controlada; Coccidioidomicosis, incluyendo enfermedad crónica que no responde bien a otra quimioterapia; Criptococosis; Histopolasmosis; Mucormicosis, incluyendo por ejemplo mucormicosis craneofacial y mucormicosis pulmonar; Paracoccidioidomicosis; y Esporotricosis. Los métodos pueden involucrar administrar cuando menos una deshidrofenilahistina antifungal o su análogo, como se

136

134

describió anteriormente, a un sujeto humano tal que se trate o evite la infección fungal. En ciertas modalidades, la deshidrofenilahistina o su análogo pueden administrarse en conjunto con administración de una o más no-deshidrofenilahistina o sus agentes antifungales análogos tales como amfotericina B, o un agente imidazol o triazol tal como aquellos mencionados previamente.

[0194] La infección fungal patogénica puede ser tópica, por ejemplo causada entre otros organismos por especies de Candida, *Trichophyton, Microsporum* o *Epiderinophyton* o mucosal, por ejemplo, causada por *Candida albicans* (por ejemplo candidiasis oral y vaginal). La infección puede ser sistémica, por ejemplo provocada por *Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, Coccidiodes, Paracocciciodes, Histoplasma* o *Blastomyces* spp. La infección también puede involucrar micetoma eumicótico, cromoblastomicosis, meningitis criptococal o ficomicosis.

[0195] Adicionales modalidades se refieren métodos para tratar o evitar una infección fungal patogénica seleccionada el grupo que consiste de *Candida* spp. incluyendo *C. albicans, C. tropicalis, C. kefyr, C krusei* y *C. galbrata; Aspergillus* spp. incluyendo *A. fumigatus* y *A. flavus; Cryptococcus neoibrrraans; Blastomyces* spp. incluyendo *Blastomyces dermatitidis;*

135

Pneumocystis carinii; Coccidioides immitis; Basidiobolus ranarum; Conidiobolus spp.; Histoplasma capsulatum; Rhizopus spp. incluyendo R. oryzae y R. microsporus; Cunninghamella spp.; Rhizoniucor spp.; Paracoccidioides brasiliensis; Pseudallescheria boydii; Rhinosporidium *see* beri; y Sporothrix schenckii. De nuevo, el método puede involucrar el administrar una deshidrofenilahistina antifungal no inmunosupresora o su análogo a un paciente que lo requiere, de manera tal que la infección fungal se trata o evita sin inducir un efecto inmunosupresor adverso.

[0196] Adicionales modalidades se refieren a métodos para tratar o evitar una infección fungal patogénica que es resistente a otra terapia antifungal, incluyendo infecciones fungales patogénicas que son resistentes a uno o más agentes antifungales mencionados en otra parte aquí tales como amfotericina B, flucitosina, uno de los imidazoles o triazoles (incluyendo por ejemplo fluconazol, cetoconazol, itraconazol y los otros ejemplos previamente mencionados). Los métodos pueden involucrar administrar al paciente una o más de deshidrofenilahistina antifungal o su análogo, en una cantidad y régimen de dosis de manera tal que se trate o evite una infección fungal resistente a otra terapia antifungal en el sujeto.

138

136

[0197] Adicionales modalidades se refieren a métodos para tratar o evitar una infección fungal patogénica en un paciente que es alérgico a, intolerante de o que no responde a otra terapia antifungal o en quien el uso de otros agentes antifungales de otra forma está contraindicado, incluyendo uno o más otros agentes antifungales mencionados en otra parte aquí, tales como amfotericina B, flucitosina, uno de los imidazoles o triazoles (incluyendo por ejemplo fluconazol, cetoconazol, itraconazol y los otros ejemplos previamente mencionados). Los métodos pueden involucrar administrar al paciente una o más deshidrofenilahistina antifungal o su análogo, en una cantidad tal que la infección fungal se trate o evite.

Deshidrofenilahistina o su análogos en paquete

[0198] Ciertas modalidades se refieren a deshidrofenilahistina o su análogos en paquete, de preferencia deshidrofenilahistina o su análogos antifungales no inmuno supresivos en paquete, este termino se pretende que incluya al menos una deshidrofenilahistina o su análogo, como se describió anteriormente, empacada con instrucciones para administrar la deshidrofenilahistina o su o sus análogos como un agente antifungal, sin provocar un efecto indeseable dentro de un sujeto humano. En algunas

137

modalidades, la deshidrofenilahistina antifungal no inmunosupresora o su análogo es un miembro de uno de los subconjuntos preferidos de compuestos descritos anteriormente. La deshidrofenilahistina o su análogo puede empacarse sólo con instrucciones o puede empacarse con otra deshidrofenilahistina o su análogo, rapamicina u otro ingrediente o aditivo, por ejemplo uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. El paquete puede contener uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Asociado en forma opcional con este o estos recipientes puede estar un aviso en la forma prescrita por una agencia regulatoria gubernamental para la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, este aviso refleja aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o venta para administración humana.

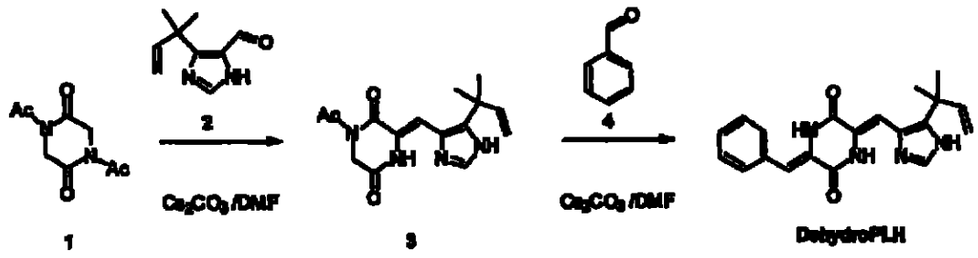
[0199] Los siguientes ejemplos no limitantes se pretenden que describan los métodos preferidos utilizando ciertas modalidades preferidas. Variaciones en los detalles de los métodos particulares empleados y en las composiciones químicas precisas obtenidas, sin duda se apreciarán por aquellos con destreza en la técnica.

EJEMPLO 1

A. Síntesis de Deshidrofenilahistina

138

[0200] La deshidrofenilahistina se sintetiza por condensación de acuerdo con el siguiente esquema de reacción básico, como se muestra en la Figura 1:



N,N'-diacetil-2,5-piperazindiona

[0201] 25.0 g de 2,5-piperazindiona 1 global [2,5-piperazindiona (Aldrich G640-6), 25.0 g, 0.218 mol] en 100 mL de anhídrido acético (Ac_2O) se mezcla con acetato de sodio (NaOAc) (17.96 g, .0218 mol). La mezcla se calienta a 110 grados C por 8 horas utilizando un condensador de doble serpentín bajo una atmósfera de Ar. Después de que Ac_2O se retira por evaporación, el residuo se disuelve en AcOEt, lava con ácido cítrico al 10%, $NaHCO_3$ al 10% y NaCl saturado (tres veces cada una), seca sobre Na_2SO_4, y concentra al vacío. El residuo se tritura con éter para formar un sólido. Este sólido se recristalizó de EtOAc con éter-hexano para dar por resultado 26.4 g (61%) de N,N'-diacetil-2,5-piperazindiona 1.

139

1-Acetil-3-{(Z)-1-[5-(1,1-dimetil-2-propenil)-1H-4-imidazolil]metiliden}]-2,5- piperazindiona 2

[0202] A una solución de 5-(1,1-dimetil-2-propenil) imidazol-4-carboxaldehído (100 mg, 0.609 mmol) en DMF (2 mL) se agrega el compuesto 1 (241 mg, 1.22 mmol) y la solución se evacúa repetidamente en un corto tiempo para retirar oxígeno y lavar por arrastre con Ar, seguido por adición de Cs_2CO_3 (198 mg, 0.609 mmol) y el proceso de evacuación-descarga o lavado por arrastre se repite de nuevo. La mezcla resultante se agita por 5 horas a temperatura ambiente. Después de que el solvente se retira por evaporación, el residuo se disuelve en la mezcla de EtOAc y Na_2CO_3 al 10%, y la fase orgánica se lava con Na_2CO_3 al 10% de nuevo y NaCl saturado por tres veces, seca sobre Na_2SO_4 y concentra al vacío. El aceite residual se purifica por cromatografía en columna en sílice utilizando $CHCl_3$-MeOH (100:0 a 50:1) como un eluyente para dar 60 mg (33 %) de un sólido amarillo pálido 2.

Deshidrofenilahistina

[0203] A una solución de 2 (30 mg, 0.099 mmol) en DMF (0.8 mL) se agrega benzaldehído (51 µl, 0.496 mmol, 5eq) y la solución se evacua repetidamente en corto tiempo para retirar oxígeno y lavar por arrastre con Ar, seguido por la adición de Cs_2CO_3 (53 mg, 0.149 mmol, 1.5

140

eq) y el proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite de nuevo. La mezcla resultante se calienta por 2.5 horas a 80 grados C. (La temperatura debe aumentarse lentamente. Un rápido calentamiento aumenta la producción de isómero E en la porción benzilideno.) Después de que el solvente se retira por evaporación, el residuo se disuelve en EtOAc, lava con agua dos veces y en NaCl saturado tres veces, seca sobre Na_2SO_4 y concentra al vacío. En TLC utilizando $CHCl_3$-MeOH (10: 1), se puede observar un punto con brillante luminiscencia verde-amarilla a 365 nm UV. La pureza de este producto crudo fue más que 75% del análisis de HPLC. El residuo resultante se disuelve en MeOH acuoso al 90% y aplica a columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y eluye utilizando un gradiente lineal de MeOH 70 a 74% en agua durante 16 minutos a un gasto de flujo de 12 mL/min, y la fracción deseada se recolecta y concentra por evaporación para dar 19.7 mg (60%) de deshidrofenilahistina de color amarillo. El perfil HPLC de la deshidrofenilahistina cruda sintética se ilustra en la Figura 2.

[0204] En la purificación de deshidrofenilahistina como se muestra en la Figura 4, un pico mayor fue el compuesto de forma Z deseado de deshidrofenilahistina. La formación de un isómero *E* se

141

observa como un componente menor (aproximadamente 10%), que se eluye en un pico más polar que el isómero Z. Como otros picos menores, los compuestos Z y *E* reducidos en donde se reduce la parte dimetilalilo de deshidrofenilahistina, también se observó. La formación de estos compuestos reducidos se debió al aldehído 2 con una impureza reducida, que se genera durante la reducción con DIBAL-H y no se separa en el proceso subsecuente.

[0205] Estos compuestos menores pueden retirarse por purificación HPLC preparativa, dan por resultado deshidrofenilahistina con la configuración Z en la parte benzilideno en un rendimiento de 60% (20% de rendimiento en dos etapas) con más de 95% de pureza. Los compuestos con configuración *E* en el lado imidazol del anillo dicetopiperazina no se observan en este diagrama HPLC, sugiriendo que la primera reacción del compuesto 1 a 3 en la Figura 1, es *Z* selectiva.

B. Características químicas:

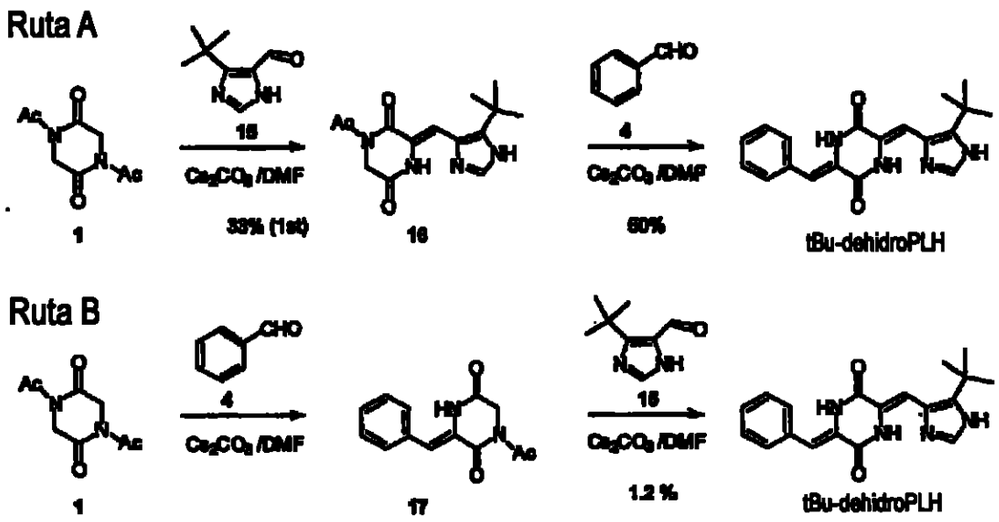
[0206] El compuesto deshidrofenilahistina anterior es un sólido amarillo pálido. Su estructura se confirma por análisis RMN estándar.

EJEMPLO 2

Síntesis y caracterización física de derivados de tBu-deshidrofenilahistina

142

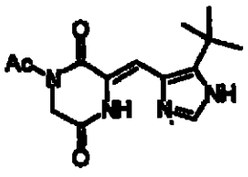
[0207] Derivados estructurales de deshidrofenilahistina se sintetizan de acuerdo con los siguientes esquemas de reacción para producir tBu-deshidrofenilahistina. Síntesis por la Ruta A (*ver* Figura 1) es similar en ciertos aspectos a la síntesis de la deshidrofenilahistina sintetizada como en el Ejemplo 1.



Ruta A:

[0208] N,N'-diacetil-2,5-piperazindiona 1 se prepara como en el Ejemplo 1.

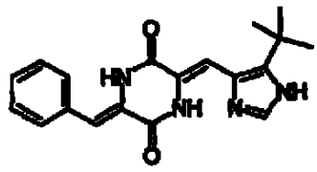
1) 1-Acetil-3-{(Z)-1-[5-ter-butil-1H-4-imidazolil] metiliden}-2,5-piperazindiona (16)



143

[0209] A una solución de 5-ter-butilimidazol-4-carboxaldehído 15 (3.02 g, 19.8. mmol) en DMF (30 mL) se le agrega el compuesto 1 (5.89 g, 29.72 mmol) y la solución se evacua repetidamente en un corto tiempo para retirar oxígeno y limpieza por descarga con Ar, seguido por adición de Cs_2CO_3 (9.7 g, 29.72 mmol) y el proceso de evacuación-limpieza por descarga se repite de nuevo. La mezcla resultante se agita por 5 horas a temperatura ambiente. Después de que el solvente se retira por evaporación, el residuo se disuelve en la mezcla de EtOAc y Na_2CO_3 al 10%, y la fase orgánica se lava con Na_2CO_3 al 10% de nuevo y NaCl saturado tres veces, seca sobre Na_2SO_4 y concentra al vacío. El aceite residual se purifica por cromatografía en columna en sílice utilizando $CHCl_3$-MeOH (100:0 a 50:1) como eluyente para dar 1.90 g (33 %) de un sólido amarillo pálido 16. ^1H RMN (270 MHz, $CDCl_3$) delta 12. 14 (d, br-s, 1H), 9.22 (br-s,1H), 7.57 (s,1H), 7.18, (s, 1H), 4.47 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

2) t-Bu-deshidrofenilahistina



144

[0210] A una solución de 1-acetil-3-{(Z)-1-[5-ter-butil-1*H*-4-imidazolil]metiliden}]-2,5-piperazindiona (**16**)(11 mg, 0.038 mmol) en DMF (1.0 mL), se agrega benzaldehído (19 μL, 0.19 mmol, 5 eq) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y lavar por descarga con Ar, seguido por la adición de Cs_2CO_3 (43 mg, 0.132 mmol, 3.5eq) y el proceso de evacuación-lavado por arrastre se repitió de nuevo. La mezcla resultante se calentó por 2.5 horas a 80 grados C. Después que el solvente se retiró por evaporación, el residuo se disolvió en EtOAc, lavó con agua dos veces y NaCl saturado por tres veces, secó sobre Na_2SO_4 y concentró al vacío. El residuo resultante se disolvió en MeOH aq 90% y aplicó a una columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y eluyó utilizando un gradiente lineal desde 70 a 74% MeOH en agua durante 16 minutos a un gasto de flujo de 12 mL/min, y la fracción deseada se recolectó y concentró por evaporación para dar 6.4 mg (50%) de ter-butil-deshidrofenilahistina de color amarillo. ^1H RMN (270 MHz, $CDCl_3$) delta 12.34 br-s, 1H), 9.18 (br-s, 1H), 8.09 (s,1H), 7.59 (s, 1H), 7.31-7. 49 (m, 5H), 7.01 s, 2H), 1.46 (s, 9H).

[0211] La reacción de deshidrofenilahistina para producir tBu-deshidrofenilahistina es idéntica al Ejemplo 1.

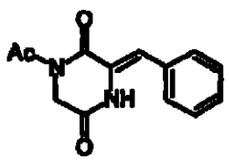
145

[0212] El rendimiento total de la tBu-deshidrofenilahistina recuperada fue 16.5%.

Ruta B:

[0213] N,N'-diacetil-2,5-piperazindiona 1 se preparó como el Ejemplo 1.

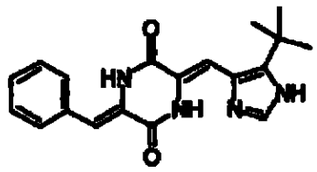
1) 1-Acetil-3-[(-bencilidenl]-2,5-piperazindiona (17)



[0214] A una solución de benzaldehído 4 (0.54 g, 5.05. mmol) en DMF (5 mL) se agrega el compuesto 1 (2.0 g, 10.1 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y lavado por arrastre con Ar, seguido por la adición de Cs_2CO_3 (1.65 g, 5.05 mmoles) y el proceso de evacuación-lavado por arrastre se repitió de nuevo. La mezcla resultante se agita por 3.5 h a temperatura ambiente. Después que el solvente se retira por evaporación, el residuo se disuelve en la mezcla de EtOAc y Na_2CO_3 al 10%, y la fase orgánica se lavó con Na_2CO_3 al 10% de nuevo y NaCl saturado tres veces, secó sobre Na_2SO_4 y concentró al vacío. El sólido residual se recristalizó a partir de MeOH-éter para obtener un sólido blancuzco de 17; rendimiento 1.95 g (79%).

2) t-Bu-deshidrofenilahistina

146



[0215] A una solución de 1-acetil-3-[(Z)-benciliden1]-2,5-piperazindiona (17) (48 mg, 0.197 mmol) en DMF (1.0 mL) se agrega 5-ter-butilimidazol-4-carboxaldehído 15 (30 mg, 0.197 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y se lavado por arrastre con Ar, seguido por la adición de Cs_2CO_3 (96 mg, 0.296 mmol) y lava, el proceso de evacuación-lavado por arrastre se repitió de nuevo. La mezcla resultante se calentó por 14 h a 80 grados C. Después que el solvente se retirará por evaporación, el residuo se disolvió en EtOAc, lavó con agua dos veces y NaCl saturado por tres veces, secó sobre Na_2SO_4 y concentró al vacío. El residuo resultante se disolvió en MeOH aq 90% y aplicó a una columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y eluyó utilizando un gradiente lineal de 70 a 74% de MeOH en agua durante 16 minutos a un gasto de flujo de 12 mL/min, y la fracción deseada se recolectó y concentró por evaporación para dar 0.8 mg (1.2%) de ter-butil-deshidrofenilahistina de color amarillo.

147

[0216] El rendimiento total de la tBu-deshidrofenilahistina recuperado fue 0.9%.

[0217] El perfil HPLC de la tBu-deshidrofenilahistina sintética cruda de la Ruta A y de la Ruta B se ilustra en la Figura 4.

[0218] Otros dos derivados de tBu-deshidrofenilahistina se sintetizaron de acuerdo con el método de la Ruta A. En la síntesis de los derivados tBu- deshidrofenilahistina adicionales, se realizaron modificaciones al compuesto benzaldehído 4.

[0219] La Figura 4 ilustra las similaridades de los perfiles HPLC (columna: YMC- Pack ODS-AM (20 x 250mm); Gradiente: 65% a 75% en un sistema metanol-agua por 20 minutos, después 10 minutos en un sistema de metanol al 100%; Gasto de flujo: 12 mL/min; O.D. 230 nm) de la deshidrofenilahistina sintetizada del ejemplo 1 (Fig. 2) y el compuesto tBu-deshidrophenilahistina anteriormente ejemplificado producido por la Ruta A.

[0220] La secuencia de introducción de los aldehídos es relevante al campo y por lo tanto un aspecto de la síntesis. Un análogo de la deshidrofenilahistina se sintetizó como un control o modelo, en donde el grupo dimetilalilo se cambio al grupo ter-butilo con un impedimento estérico similar en la posición 5 del anillo imidazol.

150

148

[0221] La síntesis de esta "ter-butil (tBu)-deshidrofenilahistina" utilizando la "Ruta A" se mostró anteriormente: particularmente, la secuencia de introducción del aldehído exactamente sigue la síntesis de deshidrofenilahistina y exhibe un rendimiento total de 16.5% de tBu-deshidrofenilahistina. Este rendimiento fue similar al de deshidrofenilahistina (20%). Utilizando la "Ruta B" en donde la secuencia de introducción de los aldehídos es opuesta al de la Ruta "A" para la síntesis de deshidrofenilahistina, solo una cantidad en trazas de la tBu-deshidroPLH deseada se obtuvo con un rendimiento total de 0.9% aunque la introducción del primer benzaldehído **4** diera un rendimiento de 76% del compuesto intermedio **17**. Este resultado indicó que puede ser difícil introducir los imidazol-4-carboxaldehídos **15** altamente voluminosos con un grupo de sustitución que tiene un carbono cuaternario en la posición 5 adyacente en el anillo imidazol, en el compuesto intermedio **17**, sugiriendo que la secuencia para introducir aldehído es un aspecto importante para obtener alto rendimiento de deshidrofenilahistina o un análogo de deshidrofenilahistina empleando la síntesis aquí escrita.

[0222] A partir del análisis HPLC de los productos crudos finales como se muestra en la Figura 4, se observó un muy alto contenido de tBu-

149

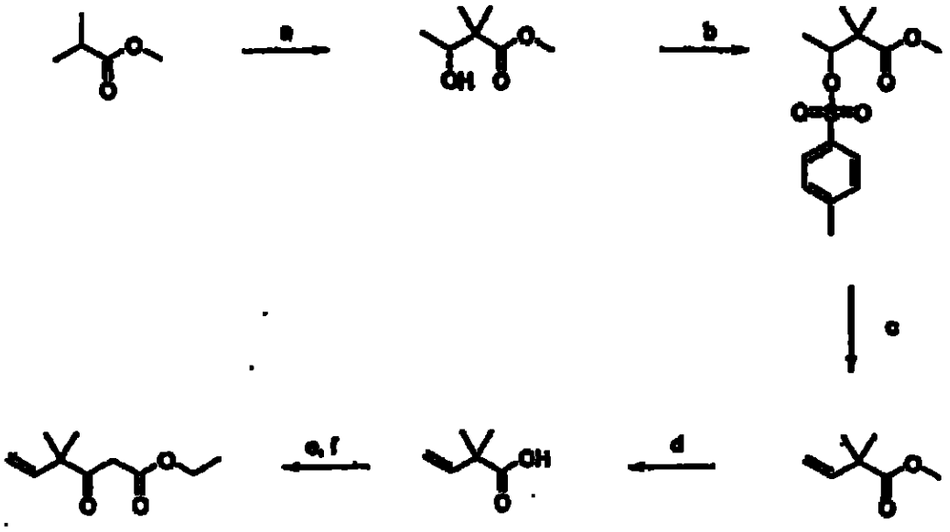
deshidrofenilahistina y de pequeña cantidad formación de subproductos en la muestra en crudo de la Ruta A (izquierda). Sin embargo, una cantidad relativamente menor de la tBu-deshidrofenilahistina deseada y varios otros subproductos se observó en la muestra obtenida utilizando la Ruta B (derecha).

Ejemplo 3

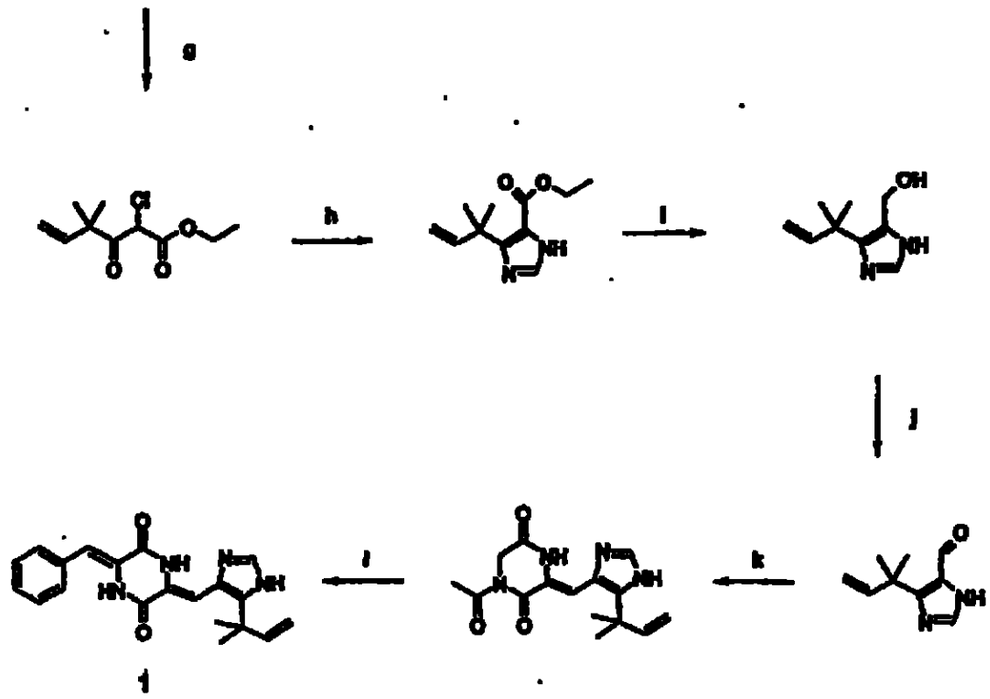
Síntesis alterna a gran escala de

Deshidrofenilahistina y Análogos

Síntesis de 3-Z-Benciliden-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen]piperazin-2,5-diona [Deshidrofenilahistina] (1)



150



1

[0223] Reactivos: a) LDA, CH_3CHO; b) Tos-Cl, piridina; c) DBU; d)NaOH; e) $C_2Cl_2O_2$; f) $KOOCCH_2COOEt$, BuLi; g) SO_2Cl_2; h) H_2NCHO, H_2O; i) $LiAlH_4$; j) MnO_2; k) 1,4-diacetil-piperacin-2,5-diona, Cs_2CO_3; l) benzaldehído, Cs_2CO metil éter de acido 3-Hidroxido-2,2-dimetil-butírico



[0224] Una solución de LDA en heptano/THF/etilbenceno (2 M, 196 ml, 0.39 mol) se agrega

151

bajo argón a una solución de metil isobutirato (45 ml, 0.39 mol) en THF (270 ml) a -60 grados y la mezcla resultante se agita durante 30 min. Una solución de acetaldehído (27 ml, 0.48 mol) en THF (45 ml) pre-enfriada a -60 grados , se agrega lentamente y la solución resultante se agita por 30 minutos más. Cloruro de amonio saturado (50 ml) se agrega y la solución se deja que caliente a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrae con etil acetato y los extractos se lavan con HCl (2 M), bicarbonato de sodio y después salmuera. La capa orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, filtra, después se evapora para dar un aceite claro (52.6 g). Destilación 76-82 grados /30 mm de Hg dio metil éster de ácido 3-hidróxido-2, 2-dimetil butílico puro (42.3 g, 74%). (Burk *et al., J. Am. Chem. Soc.*, 117:4423-4424 (1995)).

[0225] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.15 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H); 1.17 (s, 6H); 2.66 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, -OH); 3.71 (s, 3H, -OMe); 3.87 (app quinteto, *J* =6.4 Hz, 1H, H3).

Metil éster de ácido 2,2-Dimetil-3-(tolueno-4-sulfoniloxi)-butírico

152



[0226] A una solución enfriada (0 grados) de metil éster de ácido 3-hidróxido-2, 2-dimetil-butílico (52.0 g, 0.36 mol) en piridina (100 ml), se agrega gradualmente cloruro de p-toluen sulfonilo (69.0 g, 0.36 mol). La mezcla se enfría para calentar a temperatura ambiente y se agita durante 60 horas. La reacción de nuevo se enfría en hielo y se acidifica por adición de HCl (2 M). La solución resultante se extrae con etil acetato, los extractos se lavaron con HCl, después salmuera, secan y evaporan para dar un aceite que forma un precipitador blanco al reposar. Esta mezcla se disuelve en la cantidad mínima de etil acetato y después se agrega petróleo ligero para producir un precipitado blanco que se recolecta y lava con más petróleo ligero. El filtrado se evaporó parcialmente y una segunda cosecha de cristales se obtuvo y agrega a la primera para dar por resultado metil éster de ácido *2,2-dimetil-3-(toluen-4-sulfoniloxi)-butírico* (81.2 g, 76%).

[0227] ^{1}H RMN (400 NMz, $CDCl_3$) delta 1.12 (s, 3H); 1.13 (s, 3H); 1.24 (d, J = 6.4 Hz, 3H); 2.45 (s, 3H,

153

-*PhMe*) 3. 58 (s, 3H, -*OMe*); 4.94 (cuarteto, *J* = 6.4 Hz, 1H, H3), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H).

[0228] Evaporación del filtrado final dio por resultado crudo adicional metil éster de ácido 2,2-dimetil-3-(toluen-4-sulfoniloxi)-butírico (19.0 g, 18%).

Metil éster de ácido 2,2-Dimetil-but-3-enoico

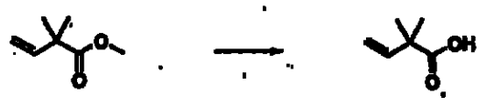


[0229] Una solución de metil éster de ácido 2,2-dimetil-3-(toluen-4-sulfoniloxi)-butírico (18.06 g, 0.06 mol) en DBU (15 ml) se calienta 140-160 por 3.5 horas. Se deja que la mezcla enfríe a temperatura ambiente y después se diluye con éter. La mezcla se lava con HCl (1 M), bicarbonato de sodio y después salmuera. La capa etérea se seca y parcialmente evapora para dar una solución concentrada de metil éster de ácido 2,2-dimetil-but-3-enoico (10 g). (Savu y Katzenellenbogen, *J. Org Chem*, **46**:239-250 (1981)). Mayor evaporación se evita debido a la volatilidad de producto (p.e. 102 grados). (Tsaconas *et al.*, *Aust. J. Chem.*, 53:435-437 (2000)).

[0230] ^{1}H RMN (400 NMz, $CDCl_3$) delta 1.31 (s, 6H); 3.68 (s, 3H); 5.06 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, $-CH=CH_2$);

5.11 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, -CH=CH_2); 6.03 (dd, *J* = 17.1, 10.7 Hz, 1H, -CH=CH_2).

Ácido 2, 2-Dimetil-but-3-enoico



[0231] La solución etérea anterior de metil éster de ácido 2,2-dimetil-but-3-enoico (10 g) se diluye con etanol (25 ml), hidróxido de sodio (4 M, 22 ml) se agrega y la mezcla se agita durante la noche. La solución se evapora parcialmente para retirar el metanol y la mezcla de resultante se agrega a HCl (1 M, 100 ml). El producto se extraen con etil acetato y los extractos se secaron y evaporaron para dar ácido 2,2-dimetil-but-3-enoico (6.01 g, 88% 2 etapas). (Hayashi *et al.*, *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000).

[0232] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.33 (s, 6H); 5.11 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, -CH=CH_2); 5.15 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, -CH=CH_2); 6.05 (dd, *J* = 17.2, 10.8 Hz, 1H, -CH=CH_2).

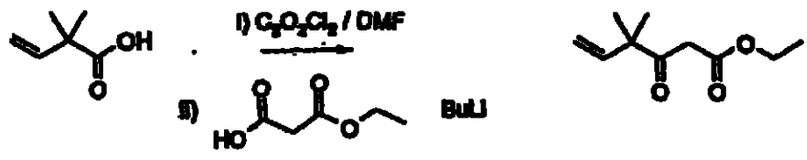
[0233] *Hidrógeno malonato de monoetilo* (Wierenga and Skulnick, "Aliphatic y Aromatic beta-keto Esters from Monoetil Malonate: Etil 2-Butyrylacetate," Organic *Syntheses* Collective Volume 7, 213).



155

[0234] Etil malonato de potasio (25.0 g, 0.15 mol) se suspende en agua (15.6 ml) y enfría en un baño de hielo. HCl concentrado (12.5 ml) se agrega por goteo durante 30 minutos, después la mezcla se agita por 10 minutos más. El precipitado se filtra, después se lava dos veces con éter. El filtrado se separa y la parte acuosa se extrae con éter. Las soluciones etéreas combinados se secan ($MgSO_4$) y evaporan para dar por resultado, como un aceite, monoetil hidrógeno malonato (19. 2 g, 99%) que se seca al vacío durante la noche (o 50 grados /1 mm por 1 hora) antes de uso.

Etil éster de ácido 4,4-Dimetil-3-oxo-hex-5-enoico



[0235] Cloruro de hexalilo (3.83 ml, 43.9 mmoles) se agrega por gotas a una solución enfriada (0 grados) de ácido 2,2-dimetil-but-3-enoico (5.0 g, 43.9 mmoles) y DMF (1 gota) en diclorometano anhidro (25 ml). La mezcla se agitador una hora a 0 grados, por 16 horas a temperatura ambiente. Destilación fraccional (121 grados

/760 mm de Hg) dio por resultado cloruro de 2,2-dimetil-but-3-enoilo (4.1 g, 71%). 156

[0236] Monoetil hidrógeno malonato (7.2 g, 0.05 mol) y bipiridilo (pocos miligramos) se disolvieron en THF (90 ml) y el sistema se lavó con descarga con nitrógeno. La solución se enfrió a -70 grados , después BuLi (2.5 M en hexanos, 37 ml, 0.09 mol) se agrega. Después de la adición de solo ~10 ml de BuLi, la solución viró a rosa y el THF (15 ml) adicional se requirió para activar agitación magnética. El baño de enfriamiento se retiró y el BuLi restante se agregó, la temperatura se dejó que alcanzara -10 grados, ante lo cual la solución viró a incolora. La mezcla de nuevo se enfrió a -60 grados y una solución de cloruro 2,2-dimetil-but-3-enoilo (4.1 g, 0.03 mol) en THF (12 ml) se agregó por gotas. Después de completar la adición, la mezcla se dejó que calentara a 0 grados y se agitó por 3 horas, después se agregó a una mezcla 1:1 de éter/HCl 1M (260 ml) a 0 grados y agitó por 1.5 h adicionales. La capa orgánica se retiró, lavó con HCl (1 M), solución de bicarbonato de sodio, salmuera, después se secó y evaporó para dar etil éster de ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enoico (5.6 g, 98%). (Hayashi *et al.*, *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000). Destilación con un horno Kugelrohr (160 grados /1 mm de Hg) dio por resultado el material puro.

159

157

[0237] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.26 (s, 6H); 1.27 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH_2CH_3); 3.51 (s, 2H); 4.18 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, -CH_2CH_3); 5.20 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, -$CH=CH_2$); 5.21 (d, *J* = 9.6 Hz,1H, -$CH=CH_2$); 5.89 (dd, *J* = 17.7, 9.6 Hz, 1H, -$CH=CH_2$).

Etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enoico



[0238] Cloruro de sulfurilo (0.84 ml, 10.4 mmol) se agrega a una solución enfriada (0 grados) de etil éster de ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enoico (1.83 g, 9.93 mmol) en cloroformo (7 ml). La mezcla resultante se dejó que calentara a temperatura ambiente y agitó por 30 minutos, después de lo cual se calentó el reflujo por 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con cloroformo, después se lavó con bicarbonato de sodio, agua, después salmuera. La parte orgánica se secó y evaporó para dar por resultado como un aceite café, etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enoico (2.01 g, 93%). (Hayashi *et al. et al.*, *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000).

[0239] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, -CH_2CH_3); 1.33 (s, 3H); 1.34 (s, 3H); 4.24

160

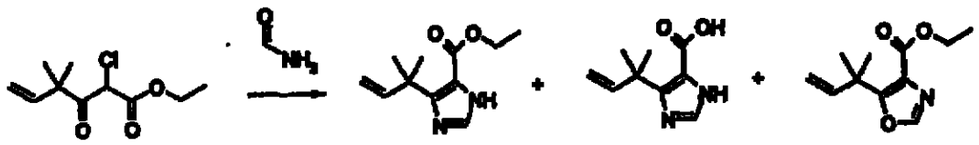
158

(q, J = 7.0 Hz, 2H, $-CH_2CH_3$); 5.19 (s, 1H; 5.28 (d, J = 16.9 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.29 (d, J = 10.9 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.96 (dd, J = 16.9, 10.9 Hz, 1H, $-CH=CH_2$)

[0240] LC/MS t_R = 8.45 (219.3 $[M(Cl^{37})+H]^+$ min.

[0241] Este material se reacciona sin mayor purificación.

Etil éster de ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico



[0242] Una suspensión de etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enoico (19.4 g, 0.09 mol) y agua (1.94 ml, 0.11 mol) en formamida (36.8 ml) se agitó brevemente, después se distribuyó en ampolletas de 15 x 18 ml. Las ampolletas se sellaron y calentaron a 150 grados por 5 horas seguidas. Después de enfriar a temperatura ambiente, los contenidos de las ampolletas se combinaron y extrajeron exhaustivamente con cloroformo. Los extracto se secaron y evaporaron para dar una solución de formamida concentrada (14.7 g). Esto se agregó a una columna de sílice (diámetro 7 cm, altura 11 cm) empacada con MeOH 1%/Et_3N 1% en cloroformo. Elución de la columna con 2 L de esta mezcla seguido por 2 L de MeOH 2%/ Et_3N 1% en cloroformo dió por resultado en las

464

159

primeras fracciones, un compuesto que se sospecha es etil éster de ácido *5-(1,1-dimetil-alil)-oxazol-4-carboxílico* (1.23 g. 7%).

[0243] HPLC (214nm) t_R = 8.68 (50.4%) min.

[0244] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, $-CH_2CH_3$); 1.54 (s, 6H); 4.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, $-CH_2CH_3$); 5.03 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.02 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.26 (dd, *J* = 17.4, 10.4 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 7.83 (s, 1H).

[0245] LCMS t_R = 8.00 (210.1 $[M+H]^+$, 361.1 $[2M+H^+]$) min.

[0246] Recuperado de posteriores reacciones fue el etil éster de ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico deseado (3.13 g, 17%). (Hayashi *et al.*, *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000)).

[0247] HPLC (214nm) t_R = 5.52 (96.0%) min.

[0248] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); 1.57 (s, 6H); 4.35 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H); 5.04-5.14 (m, 2H, $-CH=CH_2$); 6.28 (dd, *J* = 18.0, 10.4 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 7.52 (s, 1H).

[0249] LC/MS t_R = 5.30 (209.1$[M+H]^+$, 417.2 $[2M+H]^+$) min.

[0250] Adicional etil éster de ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico también se

160

recuperó de la columna (3.59 g, 19%) que fue de menor pureza pero aún lo suficiente para mayor reacción.

[0251] Otro subproducto aislado de una reacción similar (escala menor) por mayor elución de la columna con MeOH 5% real Et_3N 1% en cloroformo, fue un compuesto que se sospecha es el ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico (0.27 g, 9%).

[0252] HPLC (245nm) t_R = 5.14 (68.9%) min.

[0253] ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) delta 1.45 (s, 6H); 4.97 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.01 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.28 (dd, *J* = 17.7, 10.6 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 7.68 (s, 1H).

[0254] LCMS t_R = 4.72 (181.0 $[M+H]^+$, 361.1 $[2M+H]^+$) min.

[5-(1,1-Dimetil-alil)-3H-imidazol-4-il]-metanol



[0255] Una solución de etil éster de ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico (3.13 g, 15.0 mmol) en THF (60 ml), se agrega por gotas a una suspensión de hidruro de litio de aluminio (95% suspensión, 1.00 g, 25.0 mmol) en THF (40 ml) y la mezcla te quita temperatura ambiente por 4 h. Se agrega agua

161

hasta que se cesó el desprendimiento del gas, la mezcla se agitó por 10 minutos, después se filtro a través de un embudo sinterizado. El precipitado se lavo con THF, después con metanol, el filtrado y los lavados se combinaron, evaporaron, después secaron por congelamiento para dar [5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-il]-metanol (2.56 g, 102%). Agua residual se retira al formar el azeótropo con cloroformo antes de mayor reacción (ver Hayashi *et al.*, *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000)).

[0256] HPLC (240nm) t_R = 3.94 (56.8%) min.

[0257] ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD) delta 1.43 (s, 6H); 4.57 (s, 2H); 5.01 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.03 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.10 (dd, *J* = 17.7, 10.5 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 7.46 (s, 1H).

[0258] LC/MS t_R = 3.77 (167.3 $[M+H]^+$) min.

5-(1,1-Dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carbaldehído



[0259] Dióxido de manganeso (20 g, 0.23 mol) se agrega a una solución de [5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-il]-metanol (2.56 g, 0.02 mol) en acetona (300 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 5 horas. La mezcla se filtró a través de

162

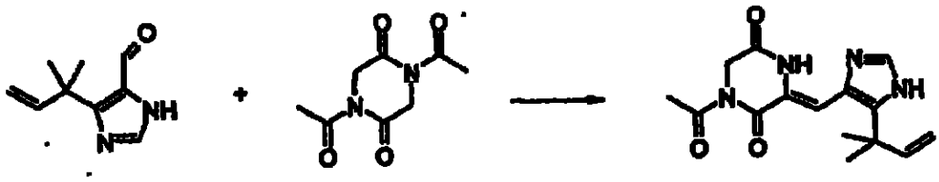
papel filtro y el residuo se lavó con acetona. El filtrado y los lavados se combinan y evaporan para dar 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carbaldehído (1.82 g, 51%). (Hayashi *et al.*, *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000)).

[0260] HPLC (240nm) t_R = 4.08 (91.5%) min.

[0261] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.56 (s, 6H); 5.16 (d, *J* = 10. 6 Hz, 1H, -CH=CH_2); 5.19 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, -CH=CH_2); 6.22 (dd, *J* = 17.3, 10.6 Hz, 1H, -CH=CH_2); 7.75 (s, 1H), 10.02 (s, 1H, HCO).

[0262] LC/MS t_R = 3.75 (165.2[M+H]$^+$) min.

1-Acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona



[0263] A una solución de 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carbaldehído (1.78 g, 0.01 mol) en DMF (35 ml) se agrega 1,4-diacetil-piperazin-2,5-diona (8.59 g, 0.04 mol) y la mezcla se evacua, luego lava por arrastre con argón. El proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite dos veces mas después se agrega carbonato de cesio (3.53 g, 0.01 mol). El proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite tres veces más, después la mezcla

165

163

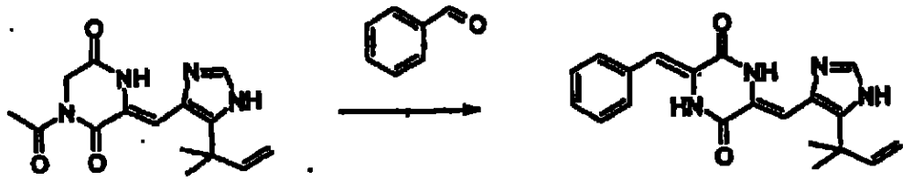
resultante se calienta a 45 grados por 5 horas. La mezcla de reacción se evapora parcialmente (calentamiento con alto vació) hasta que queda un pequeño volumen y la solución resultante se agrega por gotas a agua-hielo (50 ml). El precipitado amarillo se recolecta, lava con agua, después seca por congelamiento para dar por resultado 1-acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (1.18 g, 36%). (Hayashi, Personal Communication (2001)).

[0264] HPLC (214nm) t_R = 6.01 (72.6%) min.

[0265] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.53 (s, 6H); 2.64 (s, 3H); 4.47 (s, 2H); 5.19 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.23 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.06 (dd, *J* = 17.3, 10.7 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 7.16 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 9.47 (bs,1H); 12.11 (bs,1H) [observado ~2% 1,4-diacetil-piperazin-2,5-diona contaminación delta 2.59 (s, 6H); 4.60 (s, 4H).]

[0266] LC/MS t_R = 6.65 (303.3 $[M+H]^+$, 605.5 $[2M+H]^+$) min. (n.b. diferente sistema empleado).

3-Z-Benciliden-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona



164

[0267] A una solución de 1-acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (2.91 g, 9.62 mmol) en DMF (70 ml) se agrega benzaldehído (4.89 ml, 48.1 mmol) y la solución se evacua luego lava por arrastre con argón. El proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite dos veces más, después carbonato de cesio (4.70 g, 14.4 mmol) se agrega. El proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite tres veces mas después la mezcla resultante se calienta bajo el gradiente de temperatura mostrado a continuación.

[0268] Después de un tiempo total de 5 horas, se dejó que la reacción enfriara a temperatura también la mezcla se agrego a agua enfriada por hielo (500 ml). El precipitado se recolectó, lavó con agua 0(300 ml), después secó por congelamiento para dar por resultado un sólido amarillo (2.80 g). Este material se disolvió en cloroformo (250 ml) filtró a través de papel filtro y evaporó para dar azeótropo con el agua restante. El precipitado amarillo residual (2.70 g, HPLC (214 nm) t_R = 7.26 (93.6%) min.) se disolvió parcialmente en cloroformo (20 ml), la suspensión se sonicó por 5 minutos, después del sólido se recolectó y secó al aire para dar por resultado 3-Z-benciliden-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (1.82 g,

167

165

54%) (Hayashi, Personal Communication (2001)), p.f. 239-240 grados (desc.).

[0269] HPLC (214nm) t_R = 6.80 (1.92) min, 7.33 (95.01%).

[0270] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.53 (s, 6H); 5.18 (d, J = 17.6 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.21 (d, J = 11.0 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.06 (dd, J = 17.6, 11.0 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.99 (s, 1H, -C-C=CH); 7.00 (s, 1H, -C-C=CH); 7.30-7.50 (m, 5 x ArH); 7.60 (s, H2"); 8.07 (bs, NH); 9.31 (bs, NH); 12.30 (bs, NH).

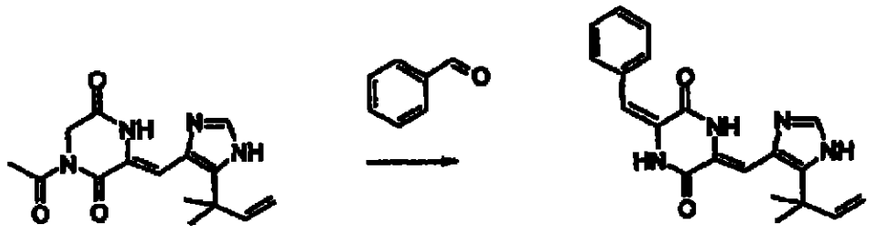
[0271] LC/MS t_R = 6.22 (349.3 $[M+H]^+$, isómero E), 6.73 (349.5 $[M+H]^+$, 697.4 $[2M+H]^+$, isómero Z) min.

[0272] ESMS m/z 349.5 $[M+H]^+$, 390.3 $[M+CH_4CN]^+$.

[0273] Evaporación de la solución de cloroformo dió adicional 3-Z-benciliden-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (0.76 g, 29%).

[0274] HPLC (214nm) t_R = 7.29 (84.5%) min.

3-E-Benciliden-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona



166

[0275] Purificación de HPLC preparativa dió muestra cruda de material sintetizado como con anterioridad produjo el isómero geométrico 3-E-benciliden-6-[5"-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (1.7 mg).

[0276] HPLC (214nm) t_R = 6.75 (87.79) min.

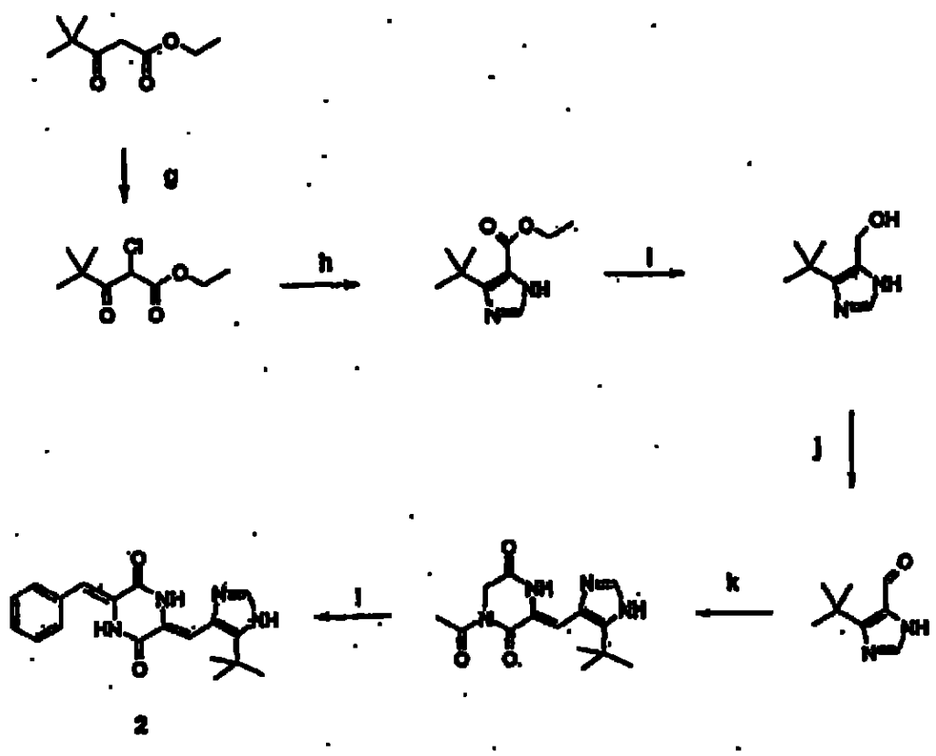
[0277] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.52 (s, 6H); 5.19 (d, J = 20.8 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 5.22 (d, J = 14.0 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.05(dd, J = 18.0, 10.4 Hz, 1H, $-CH=CH_2$); 6.33 (s, 1H, C-C=CH); 6.90-7.65 (m, 7H).

[0278] ESMS m/z 349.5 $[M+H]^+$, 390.4 $[M+CH_4CN]^+$.

Síntesis de 3-Z-benciliden-6-(5"-ter-butil-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona (2)

~~169~~

167



2

[0279] Reactivos: g) SO_2Cl_2; h) H_2NCHO, H_2O; i) $LiAlH_4$; j) MnO_2; k) 1,4diacetil-piperazin-2,5-diona, Cs_2CO_3; 1) benzaldehído, Cs_2CO_3

Etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-pentanoico



[0280] Cloruro de sulfurilo (14.0 ml, 0.17 mol) se agrega a una solución enfriada (0 grados) de etil pivaloilacetato (27.17 g, 0.16 mol) en cloroformo (100 ml). La mezcla resultante se deja que se caliente a temperatura ambiente y agita por 30 minutos, después de

168

lo cual se calienta al reflujo por 2.5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluye con cloroformo, después lava con bicarbonato de sodio, agua y después salmuera.

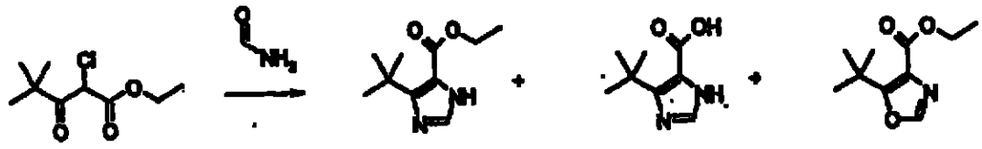
[0281] La fase orgánica se secó y evaporó para dar por resultado como un aceite claro etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-pentanoico (33.1 g, 102%). (Durant *et al.*, "Aminoalkilimidazols y Process for their Production." Patente No. GB1341375 (Gran Bretaña, 1973)).

[0282] HPLC (214nm) t_R = 8.80 (92.9%) min.

[0283] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.27 (s, 9H); 1.29 (t, J = 7.2 Hz, 3H); 4.27 (q, J = 7.2 Hz, 2H); 5.22 (s, 1H).

[0284] ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) delta 13.8, 26.3, 45.1, 54.5, 62.9, 165.1, 203.6.

Etil éster de ácido 5-ter-Butil-3H-imidazol-4-carboxílico



[0285] Una solución de etil éster de ácido 2-cloro-4, 4-dimetil-3-oxo-pentanoico (25.0 g, 0.12 mol) en formamida (47.5 ml) y agua (2.5 ml) se agitó, después surtió en ampolletas de 15 x 8 ml. Todas las ampolletas se sellaron y después calentaron a 150 grados por 3.5

169

horas. Se dejó que las ampolletas se enfriaran a temperatura ambiente, luego se agregó agua (20 ml) y la mezcla se extrajo exhaustivamente con cloroformo. El cloroformo se retiró para dar una solución de forma mida concentrada (22.2 g) que se agregó a una columna de sílice de evaporación instantánea (diámetro 6 cm, altura 12 cm) empacada en MeOH 1%/Et_3N 1% en cloroformo. La elución de la columna con 2.5 L de esta mezcla seguida por un L de MeOH 2%/Et_3N 1% en cloroformo dió en sus primeras reacciones, un producto que se sospecha es etil éster de ácido *5-ter-butil-oxazol-4-carboxílico* (6.3 g, 26%).

[0286] HPLC (214nm) t_R = 8.77 min.

[0287] ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); 1.43 (s, 9H); 4.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H); 7.81 (s, 1H).

[0288] ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) delta 14.1, 28.8, 32.5, 61.3, 136.9, 149.9, 156.4, 158.3.

[0289] ESMS *m/z* 198.3 $[M+H]^+$, 239.3 $[M+CH_4CN]^+$.

[0290] LC/MS t_R = 7.97 (198.1 $[M+H]^+$) min.

[0291] De posteriores reacciones fue recuperado etil éster de ácido 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carboxílico (6.20 g, 26%). (Durant *et al.*, "Aminoalkylimidazols y Process for their Production." Patent No. GB 1341375 (Great Britain, 1973)).

170

[0292] HPLC (214nm) t_R = 5.41 (93.7%) min.

[0293] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); 1.47 (s, 9H); 4.36 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H); 7.54 (s, 1H).

[0294] ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) delta 13.7, 28.8, 32.0, 59.8, 124.2, 133.3, 149.2, 162.6.

[0295] ESMS *m/z* 197.3 $[M+H]^+$, 238.3 $[M+CH_4CN]^+$.

[0296] Mayor elución de la columna con un L de MeOH 5%/Et_3N 1% dió un compuesto que se sospecha es ácido *5-ter-butil-3H-imidazol-4-carboxílico* (0.50 g, 2%).

[0297] HPLC (245nm) t_R = 4.68 (83.1%) min.

[0298] ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD) delta 1.36 (s, 9H); 7.69 (s, 1H).

[0299] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.37 (s, 9H); 7.74 (s, 1H).

[0300] ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3SO) delta 1.28 (s, 9H); 7.68 (s, 1H).

[0301] ESMS *m/z* 169.2 $[M+H]^+$, 210.4 $[M+CH_4CN]^+$.

(5-ter-butil-3H-imidazol-4-il)-metanol



[0302] Una solución de etil éster de ácido 5-ter-butil-3-imidazol-4-carboxílico (3.30 g, 16.8 mmol) en

193

171

THF (60 ml), se agrega por gotas a una suspensión de hidruro de litio de aluminio (suspensión 95%, 0.89 g, 22.2 mmol) en THF (40 ml) y la mezcla se agita a temperatura ambiente por 3 horas. Se agrega agua hasta que cesó el desprendimiento de gas, la mezcla se agitó por 3 minutos, después se filtró a través de un embudo sinterizado. El precipitado se lavó con THF, después con metanol, el filtrado y el lavado se combinaron y evaporaron. El residuo se secó por congelamiento durante la noche para dar, como un sólido blanco (5-ter-butil-3H-imidazol-4-il)-metanol (2.71 g, 105%). (Durant *et al.*, "Aminoalkylimidazols y Process for their Production." Patent No. GB1341375 (Great Britain, 1973)).

[0303] HPLC (240nm) t_R = 3.70 (67.4%) min.

[0304] ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD) delta 1.36 (s, 9H); 4.62 (s, 2H); 7.43 (s, 1H).

[0305] 13C RMN (100 MHz, CD_3OD) delta 31.1, 33.0, 57.9, 131.4, 133.9, 140.8.

[0306] LC/MS t_R = 3.41 (155.2 $[M+H]^+$) min.

[0307] Este material se emplea sin mayor purificación.

5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído

172



[0308] Dióxido de manganeso (30 g, 0.35 mol) se agrega a una solución heterogénea de (5-ter-butil-3H-imidazol-4-il)-metanol (4.97 g, 0.03 mol) en acetona (700 ml) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente por 4 h. La mezcla se filtró a través de un cojín de celite y el cojín se lavó con acetona. El filtrado y lavado se combinaron y evaporaron. Los residuos se trituraron para dar por resultado como un sólido incoloro, 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído (2.50 g, 51%). (Hayashi, Personal Communication (2000)).

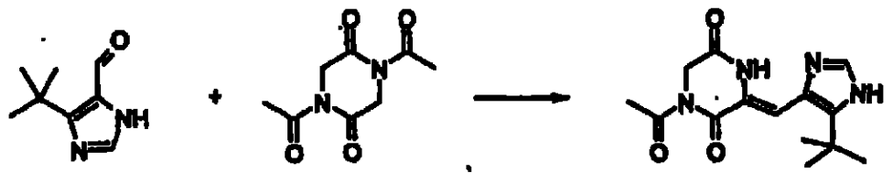
[0309] HPLC (240nm) t_R = 3.71 (89.3%) min.

[0310] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.48 (s, 9H); 7.67 (s, 1H); 10.06 (s, 1H).

[0311] LC/MS t_R = 3.38 (153. 2 $[M+H]^+$) min.

[0312] Evaporación del filtrado de la trituración dió adicional 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído (1.88 g, 38%).

1-Acetil-3-(5'-ter-butil-IH-imdazol-4'-Z-ilmetilen) piperazin-2,5-diona



173

[0313] A una solución de 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído (2.50 g, 164.4 mmol) en DMF (50 ml) se agrega 1,4-diacetil-piperazin-2,5-diona (6.50 g, 32.8 mmol) y la solución se evacua, lava por arrastre con argón. El proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite dos veces más, después se agrega carbonato de cesio (5.35 g, 16.4 mmol). El proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite tres veces más, después la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente por 5 h. La mezcla se evapora parcialmente (calor y alto vacío) hasta que quedó un pequeño volumen y la solución resultante se agregó por gotas al agua (100 ml). El precipitado amarillo se recolectó, después secó por congelamiento para dar por resultado 1-acetil-3-(5'-ter-butil-1H-imidazol-4'-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona (2.24 g, 47%). (Hayashi, Personal Communication (2000)).

[0314] HPLC (214nm) t_R = 5.54 (94.4%) min.

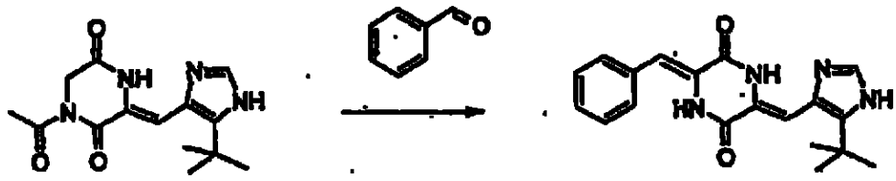
[0315] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.47 (s, 9H); 2.65 (s, 3H), 4.47 (s, 2H); 7.19 (s, 1H); 7.57 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 12.14 (s, 1H).

174

[0316] ^{1}H RMN (100 MHz, $CDCl_3$+CD_3OD) delta 27.3, 30. 8, 32.1, 46.5, 110.0, 123.2, 131.4, 133.2, 141.7, 160.7, 162.8, 173.0.

[0317] LC/MS t_R = 5.16 (291.2 $[M+H]^+$, 581.6 $[2M+H]^+$ min.

3-Z-Benciliden-6-(5"-ter-butil-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona



[0318] A una solución de 1-acetil-3-(5'-ter-butil-1H-imidazol-4'-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona (2.43 g, 8.37 mmol) en DMF (55 ml) se agrega benzaldehído (4.26 ml, 41.9 mmol) y la solución se evacua, luego lava por arrastre con nitrógeno. Proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite dos veces más, después carbonato de cesio (4.09 g, 12.6 mmol) se agrega. El proceso de evacuación-lavado por arrastre se repite tres veces más, después la mezcla resultante se calienta bajo el gradiente de temperatura como se muestra a continuación. Después de un tiempo total de 5 horas, la reacción se deja que enfrié a temperatura ambiente y la mezcla se agrega a agua enfriada por hielo (400 ml). El precipitado se recolecta, lava con agua, luego seca por congelamiento

AF

175

para dar un sólido amarillo (2.57 g, HPLC (214nm) t_R = 6.83 (83.1%) min.). Este material se disuelve en cloroformo (100 ml) y evapora para formar azeótropo con agua restante, resultando en un aceite café. Este se disuelve en cloroformo (20 ml) y enfría en hielo. Después de 90 minutos, el precipitado amarillo se recolectó y secó al aire para dar por resultado 3-Z-benciliden-6-(5"-ter-butil-1H-imidazol-4"-Zilmetilen)-piperazin-2,5-diona (1.59 g, 56%). (Hayashi, Personal Communication (2000)).

[0319] HPLC (214nm) t_R = 6.38 (2.1%), 6.80 (95.2) min.

[0320] ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) delta 1.46 (s, 9H); 7.01 (s, 1H, -C-C=CH); 7.03 (s, 1H, -C-C=CH); 7.30-7.50 (m, 5H, Ar); 7.60 (s, 1H); 8.09 (bs, NH); 9.51 (bs, NH); 12.40 (bs, NH).

[0321] LC/MS t_R = 5.84 (337.4 $[M+H]^+$, isómero E), 6.25 (337.4 $[M+H]^+$, 673.4 $[2M+H]^+$, isómero Z) min.

[0322] ESMS *m/z* 337.3 $[M+H]^+$, 378.1 $[M+CH_4CN]^+$.

[0323] Evaporación de la solución del cloroformo dió adicional 3-Z-benciliden-6-(5"-ter-butil-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen)-piperazin-2, 5-diona (0.82 g, 29%). HPLC (214nm) t_R = 6.82 (70.6%) min.

Experimental General

[0324] Bicarbonato de sodio se refiere a una solución al 5%.

128

176

[0325] Solventes orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio a menos de que se establezca de otra forma.

Condiciones Analíticas

Condiciones RMN

[0326] Análisis ^1H RMN (400 MHz) se realizó en una máquina de RMN Varian Inova Unity 400 MHz. Las muestras se corrieron en cloroformo deuterado que contiene TMS al 0.1% (a menos que se especifique de otra forma). Desplazamientos químicos se refieren con respecto a TMS (0.00 ppm) o CH_3OH a 3.30 ppm para muestras que se corren en CD_3OD. Constantes de acoplamiento se expresan en hertz (Hz).

Condiciones HPLC Analíticas

[0327] Condiciones de sistema 6:

[0328] RP-HPLC se realiza en una columna Rainin Microsorb-MV C18 (5 m, 100 ALFA) 50 x 4.6 mm.

[0329] Amortiguador A: TFA acuoso 0.1%

[0330] Amortiguador B: TFA 0.1% en MeCN 90% acuoso.

[0331] Gradiente: 0-100% de amortiguador B durante 11 minutos.

[0332] Gasto de Flujo: 1.5 mL/min

Condiciones LCMS

177

[0333] LCMS se corre en un instrumento Perkin-Elmer Sciex API-100.

[0334] Condiciones LC:

[0335] Análisis HPLC de fase inversa

[0336] Columna: Monitor 5 m C18 50x4.6 mm

[0337] Solvente A: TFA 0.1% en agua

[0338] Solvente B: TFA 0.085% en MeCN acuoso 90%

[0339] Gradiente: 0-100% B sobre 11.0 minutos

[0340] Gasto de Flujo: 1.5 mL/min

[0341] Longitud de Onda: 214 nm

[0342] Condiciones MS:

[0343] fuente de iones: rocío de iones

[0344] Detección: Conteo de iones

[0345] Gasto de flujo al espectrómetro de masas: 300 µL/min después de separar de la columna (1.5 mL/min).

Condiciones ESMS

[0346] ESMS se realiza en un Perkin Elmer/Sciex-API III LC/MS/MS utilizando una entrada de electro rocío o electro nebulización.

[0347] Solvente: AcOH 0.1% en MeCN acuoso en 60%

[0348] Gasto de Flujo: 25 µL/min

[0349] Rocío de iones: 5000V

178

[0350] Placa de orificio: 55 V

[0351] Tiempo de adquisición: 2.30 min

[0352] Intervalo de exploración: 100-1000 amu/z

[0353] Tamaño de escalón: 0.2 amu/z

Condiciones de Purificación RP-HPLC Preparativa

[0354] Purificación HPLC de fase inversa se llevó a cabo utilizando Nebula con la columna Waters XterraMS (19x50 mm, 5 μm, C18) utilizando las siguientes condiciones:

[0355] Solvente A: TFA acuoso hasta el 0.1%

[0356] Solvente B: TFA 0.1% en MeCN acuoso 90%

[0357] Gradiente: sobre a minutos 5-95% B

[0358] Gasto de Flujo: 20 mL/min

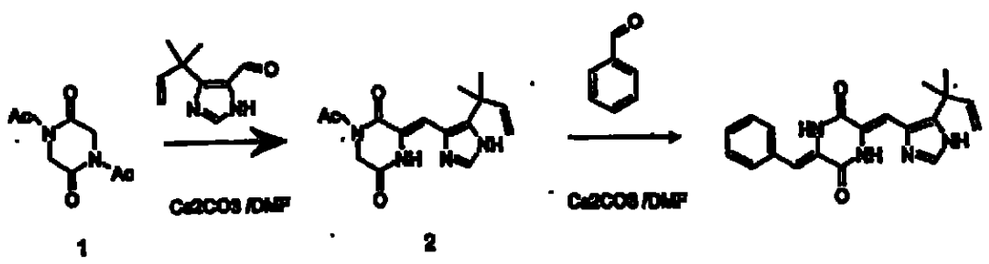
[0359] Longitud de Onda: 214 nm

[0360] Las abreviaturas son como sigue: br s: broad singulete amplio; BuLi: n-butil litio; d: doblete; DBU: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno; ESMS: espectrometría de masas de electro rocío; HCl: ácido clorhídrico; HPLC: cromatografía de liquido de alto desempeño; LCMS: espectrometría de masas de cromatografía liquida; LD: diisopropilamida de litio; M+: Ión molecular; m: multiplete; MeCN: acetamicilo; M: espectrometría de masa; MW: peso molecular; RMN: resonancia magnética nuclear; q: cuarteto; s: singulete;

179

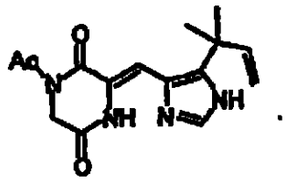
: triplete; t_R: tiempo de retención; TFA: ácido trifloracético; THF: tetrahidrofurano;

Procedimiento detallado para la síntesis de Deshidrofenilahistina



1 2

1-Acetil-3-{(-1-[5-(1,1-dimetil-2-propenil)-1H-4-imidazolil]metiliden}]-2,5- piperazindiona (2)



[0361] A una solución de 5-(1,1-dimetil-2-propenil) imidazol-4-carboxaldehído (100 mg, 0.609 mmol) en DMF (2 mL) se agrega el compuesto 1 (241 mg, 1.22 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y lavado por arrastre con Ar, seguido por la adición de Cs_2CO_3 (198 mg. 0.609 mmol) y se repite de nuevo el proceso de evacuación-lavado por

180

descarga. La remoción oxígeno de presión debido a que esta remoción se consigue que disminuye la oxidación del carbono alfa en la posición 6 del anillo dicetopiperacina. La mezcla resultante se agita por 5 horas a temperatura ambiente. Después que el solvente se retira por evaporación el ácido se disuelve en una mezcla de EtOAc y Na_2CO_3 10%; y la fase orgánica se lava con Na_2CO_3 al 10% de nuevo y NaCl saturado por tres veces, seca sobre Na_2CO_3 y concentra al vacío. El aceite residual se purifica por cromatografía en columna en sílice utilizando $CHCl_3$-MeOH (100: 0 a 50: 1) como un eluyente para dar 60 mg (33%) como un sólido amarillo pálido 2.

Deshidrofenilahistina

[0362] A una solución de 2 (30 mg, 0.099 mmol) en DMF (0.8 mL), se agrega benzaldehído (51 µL, 0.496 mmol, 5 eq) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y lavar por arrastre con Ar, seguido por la adición de Cs_2CO_3 (53 mg, 0.149 mmol, 1.5eq) y el proceso de evacuación-lavado por arrastre se repitió de nuevo. La mezcla resultante se calenta por 2.5 h a 80 grados C. (La temperatura debe aumentarse lentamente. Un rápido calentamiento aumenta la producción de isómero E en la porción bencilideno). Después que el solvente se retiró por evaporación, el residuo se disolvió en EtOAc, lavó con agua dos veces y

181

NaCl saturado por tres veces, secó sobre Na_2SO_4 y concentró al vacío. En TLC utilizando $CHCl_3$-MeOH (10:1), se puede observar un punto con luminiscencia amarillo-verde brillante a 365 nm UV. La pureza de este producto crudo fue mayor que 75% a partir del análisis de HPLC. El residuo resultante se disolvió en MeOH aq al 90% y aplicó a una columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y eluyó usando un gradiente lineal desde 70 a 74% de MeOH en agua durante 16 min a un gasto de flujo de 12 mL/min, y la fracción deseada se recolectó y concentró por evaporación para dar 19.7 mg (60%), aunque los rendimientos no se optimizan para cada etapa, de deshidrofenilahistina de color amarillo.

EJEMPLO 4

Características Biológicas de Deshidrofenilahistina y Análogos de Deshidrofenilahistina

A. Evaluación Biológica

[0363] Las características biológicas de tBu-deshidrofenilahistina sintetizada y deshidrofenilahistina se evalúan tanto en células de colon humano HT29 como células de adenocarcinoma prostático PC-3.

[0364] HT-29 (ATCC HTB-38) un adenocarcinoma colorectal humano se mantiene en medio completo de McCoy (medio McCoy 5A con L-glutamina y HEPES 25mM suplementado con FBS al 10%, piruvato de Na 1mM, NEAA 1X, L-glutamina

182

2 mM, y Pen/Strep a 100IU/ml y 100 µg/ml, respectivamente). PC-3 (ATCC CRL-1435), un adenocarcinoma de próstata humano, se mantiene en medio completo F12K (medio F12K suplementado con FBS al 10%; Glutamina 2mM; HEPES 1%; y Pen/Strep a 100 IU/ml y 100 µg/ml, respectivamente). Se cultivaron líneas celulares a 37 grados C, CO_2 al 5% en un incubador y humidificaron al 95%.

[0365] Para ensayos de citotoxicidad de tumor células HT-29 o PC-3 se sembraron a 5,000 células/pozo en 90 µl de medio completo en una placa de cultivo de tejido de fondo claro de pared negra Corning 3904 y la placa se incubó durante la noche para permitir que las células sedimentaran y entraran a crecimiento de fase log. Soluciones de material 20 mM de deshidrofenilahistina y tBu-deshidrofenilahistina se prepararon en DMSO al 100% y almacenaron a -20 grados C. Diluciones en serie concentradas 10X de los dos compuestos se prepararon en medio de cultivo apropiado para concentraciones finales en el intervalo de 2.0×10^{-5} M a 2.0×10^{-10} M. Volúmenes de diez µl de las diluciones en serie de 10X se agregaron a los pozos de prueba en triplicado y las placas regresaron al incubador por 48 horas. La concentración final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

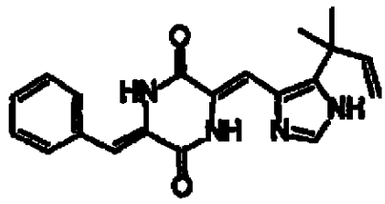
183

[0366] Después de 48 horas de exposición a la droga, 10 µl de 0.2 mg/ml de resazurina (que se obtiene de Sigma-Aldrich Chemical Co.) en PBS libre de Mg^{2+}, Ca^{2+} se agregan a cada pozo y las placas se regresan al incubador por 3 a 4 horas. Las placas se retiraron y se midió la fluorescencia de resazurina utilizando excitación de 530 nm y filtros de emisión de 590 nm en un fluorímetro de fusión (Packard Instruments). El colorante resazurina sin células se empleó para determinar el fondo, que se substrajo de los datos para todos los pozos experimentales. Los datos se analizaron utilizando el soporte lógico Prism (GraphPad Software). Los datos se normalizaron al promedio de las células tratadas con medio solo (100% del crecimiento celular) y los valores EC_{50} se determinaron utilizando un algoritmo para ajuste de curva de dosis-respuesta sigmoidal estándard.

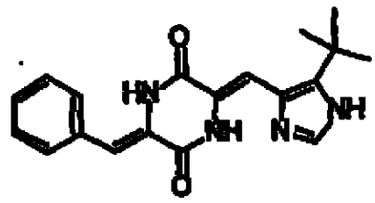
[0367] Como se indica en la Tabla 1 siguiente, tBu-deshidrofenilahistina demuestra aproximadamente una actividad citotóxica cuatro veces mayor en comparación con

Tabla 1. Efecto Citotóxico de deshidrofenilahistina y derivado.

184



Dehidrofenilahistina



tBu-dehidrofenilahistina

	EC_{50} (nM)	
Célula	Δ PLH	tBu-Δ PHL
HT29	48	13
PC-3	5.4	1.0

[0368] *Ver también* Figura 41 para datos adicionales de células HT-29, PC-3, y P-388.

B. Estructura y Estudio de Actividad de Derivados de Deshidrofenilahistina

[0369] Los efectos citotóxicos de fenilahistina, deshidrofenilahistina y diversos derivados de deshidrofenilahistina se examinaron en células de leucemia murina P388, céulas de colon humano HT-29 y células de adenocarcinoma prostático PC-3.

[0370] Como se explicó anteriormente, HT-29 un adenocarcionama colorectal humano se mantiene en medio completo de McCoy (medio de McCoy 5A con L-glutamina y HEPES 25mM suplementado con FBS al 10%, piruvato de Na 1mM, NEAA 1X, L-glutamina 2mM, y Pen/Strep a 100IU/ml y

185

100μg/ml, respectivamente). PC-3, un adenocarcinoma de próstata humano se mantiene en medio completo F12K (medio F12K suplementado con FBS al 10%; Glutamina 2mM; HEPES 1%; y Pen/Strep a 100IU/ml y 100μg/ml, respectivamente). Líneas celulares se cultivaron a 37 grados C, CO_2 al 5% en un incubador humidificado al 95%.

[0371] Para ensayos de citotoxicidad de tumor, células HT-29 o PC-3 se sembraron a 5,000 células/pozo en 90 μl de medio completo en placas de cultivo de tejido de fondo claro, con pared negra Corning 3904 y las placas se incubaron durante la noche, para permitir que las células se sedimenten y entren a crecimiento de fase log. Soluciones de material 20 mM de deshidrofenilahistina y tBu-deshidrofenilahistina se prepararon en DMSO al 100% y almacenaron a -20 grados C. Diluciones seriales concentradas 10X de los dos compuestos se prepararon en medio de cultivo apropiado para concentraciones finales en el intervalo de 2.0×10^{-5} M a 2.0×10^{-10} M. Volúmenes de 10 μl de las diluciones en serie 10X se agregaron a los pozos de prueba en triplicado y las placas regresaron al incubador por 48 horas. La concentración final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

[0372] Después de 48 horas de exposición a droga 10 μl de 0.2 mg/ml de resazurina (que se obtiene de Sigma-Aldrich Chemical Co.) en PBS libre de Mg^{2+}, Ca^{2+}

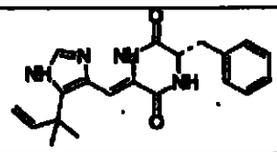
+185

186

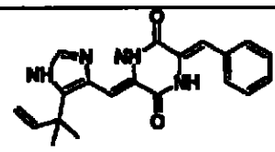
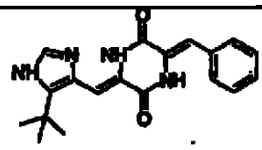
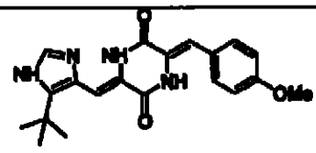
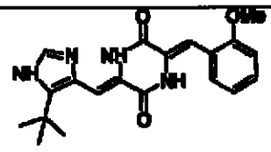
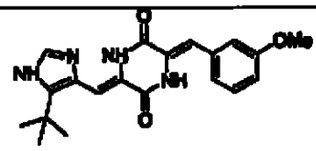
se agrega a cada pozo y las placas se regresaron al incubador por 3-4 horas. Las placas se retiraron y se midió la florescencia de resazurina utilizando filtros de excitación de 530 nm y filtros de emisión 590 nm en un fluorímetro Fusion (Packard Instruments). El colorante de resazurina sin células se empleó para determinar el fondo, que se sustrajo de los datos para todos los pozos experimentales. Los datos se analizaron utilizando el programa Prism (GraphPad Software). Los datos se normalizaron al promedio de las células tratadas con medio solamente (100% de crecimiento celular) y valores EC_{50} se determinaron, utilizando un algoritmo de ajuste de curva de dosis-respuesta sigmoidal estandard.

[0373] Valores EC_{50} e IC_{50} de fenilahistina, deshidrofenilahistina y derivados de deshidrofenilahistina se resumen en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Estudio SAR de fenilahistina o deshidrofenilahistina y de derivados de deshidrofenilahistina

COMPUESTO	ESTRUCTURA	EC_{50} (nM)		IC_{50} (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
(-)-Fenil-		1600	n.t.	833± 153

187

COMPUESTO	ESTRUCTURA	EC_{50} (nM)		IC_{50} (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
ahistina				(n=5)
KPU-1 Δ PLH		48	4.7	36± 12.8 (n=5)
KPU-2 tBu-Δ PLH		13	1	31.8± 5.0 (n=5)
KPU-6 tBu- Δ PLH-p-OMe		>2000	n.t.	9333± 5457 (n=3)
KPU-8 tBu- Δ PLH-o-OMe		89		315± 137 (n=4)
KPU-9 tBu- Δ PLH-M-OMe		31		20.8± 68 (n=4)
Colchi-cina	---			208± 68

188

COMPUESTO	ESTRUCTURA	EC_{50} (nM)		IC_{50} (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
				(n=4)

[0374] Modificaciones al anillo fenilo tienen un efecto significante en las actividades citotóxicas. En comparación con la actividad de tBu-deshidrofenilahistina (#6), la actividad del grupo metoxi en la posición meta (KPU-9) exhibió la más alta actividad que los otros derivados con una IC_{50} de 20.8±3.3 nM en células P388. El derivado KPU-9 también exhibe citotoxicidad en células HT-29 (EC_{50} 31nM). Deshidrofenilahistina, tBu-deshidrofenilahistina (KPU-2) y el derivado KPU-9 todos exhiben citotoxicidad en células P388.

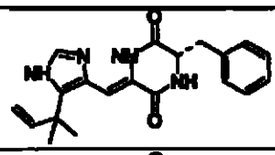
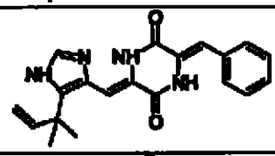
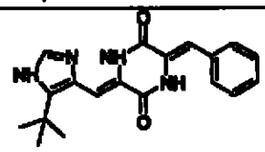
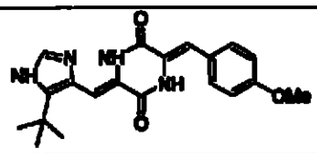
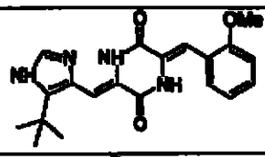
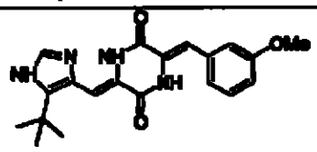
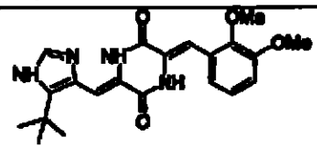
C. Estructura y Estudio de Actividad de Derivados de Deshidrofenilahistina Adicionales

[0375] Los efectos citotóxicos de fenilahistina, deshidrofenilahistina y diversos derivados adicionales de deshidrofenilahistina se examinaron en células de colon humano HT-29 y en células de adenocarcinoma prostático PC-3 utilizando la metodología descrita anteriormente.

194

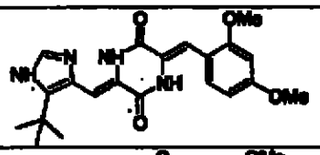
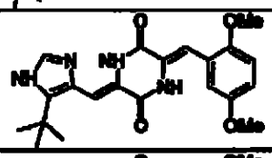
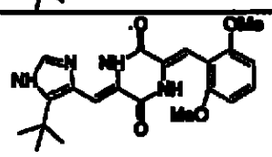
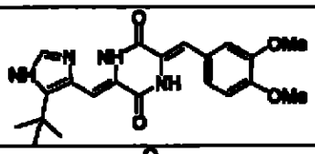
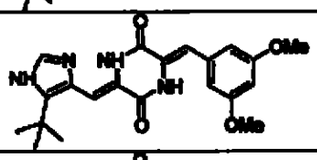
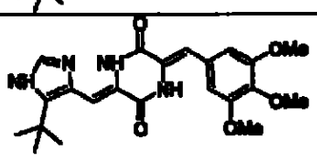
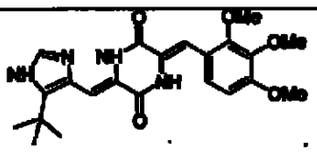
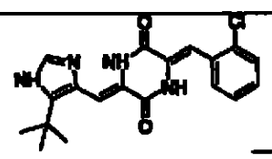
189

Table 3. SAR Estudio SAR de fenilahistina, deshidrofenilahistina y de derivados de deshidrofenilahistina adicionales

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.	EC_{50} (nM)	
				HT-29	PC-3
(-)-Fenilahistinaa		-	350.41	1600	n.t.
KPU-1 Δ PLH		-	348.40	48	4.7
KPU-2 tBu-Δ PLH		-	336.39	13	1
KPU-6 tBu-Δ PLH-p-OMe		-	366.41	>2000	n.t.
KPU-8 tBu-Δ PLH-o-OMe		-	366.41	89	
KPU-9 tBu-Δ PLH-m-OMe		-	366.41	31	
KPU-14 tBu-Δ PLH-2,3-diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	610	96%

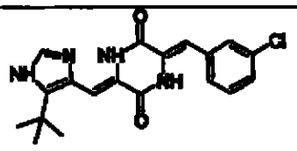
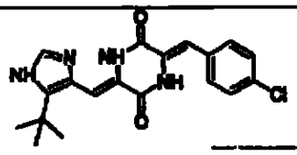
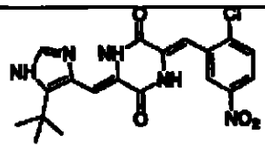
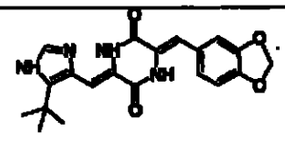
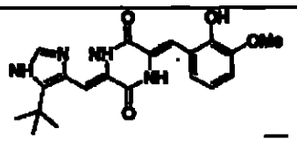
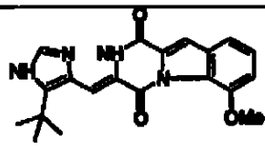
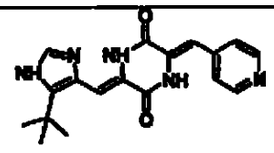
192

190

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.	EC_{50} (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-12 tBu-Δ PLH-2,4-diOMe		-	396.44	4980	
KPU-10 tBu-Δ PLH-2,5-diOMe		-	396.44	1350	
KPU-15 tBu-Δ PLH-2,6-diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	4430	96%
KPU-13 tBu-Δ PLH-3,4-diOMe		-	396.44	2130	
KPU-16 tBu-Δ PLH-3,5-diOMe		-	396.44	42	82%
KPU-11 tBu-Δ PLH-3,4,5-triOMe		-	426.47	>20 μM	
KPU-17 tBu-Δ PLH-p-OMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)	4060	94%
KPU-18 tBu-Δ PLH-o-Cl		TFA	370.83 848.86 (+TFA)	42	100%

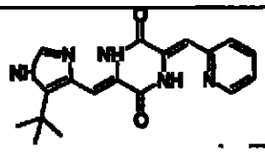
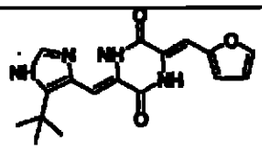
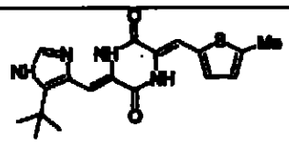
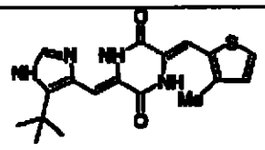
193

191

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.	EC_{50} (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-19 tBu-Δ PLH-m-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	20	98%
KPU-20 tBu-Δ PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	545	
KPU-21 tBu-Δ PLH-2Cl-5-NO_2		TFA	415.83 529.85 (+TFA)	51	100%
KPU-22 tBu-Δ PLH-3,4-metilen-dioxi		TFA	380.40 494.42 (+TFA)	82	95%
KPU-23 tBu-Δ PLH-2-OH-3-OMe (o-vainillina)		TFA	382.41 496.44 (+TFA)	5870	86%
KPU-24 tBu-Δ PLH-ciclized-3-OMe		TFA	364.40 487.42 (+TFA)	7040	100%
KPU-25 tBu-Δ PLH-4-piridil		TFA	377.38 565.42 (+2TFA)	544	98%

194

192

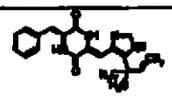
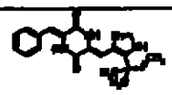
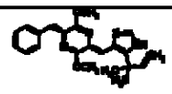
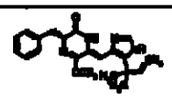
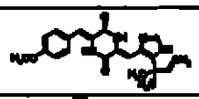
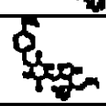
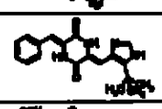
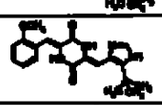
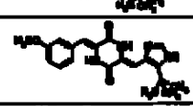
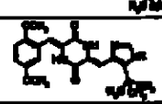
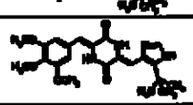
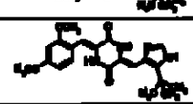
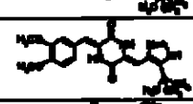
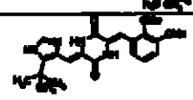
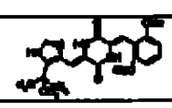
COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.	EC_{50} (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-28 tBu-Δ PLH-2-piridil		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	>20 μm	99%
KPU-26 tBu-Δ PLH-2-furil		TFA	326.35 440.37 (+TFA)	600	88%
KPU-27 tBu-Δ PLH-5-Me-2-tienil		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	80	97%
KPU-29 tBu-Δ PLH-3-Me-2-tienil		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	44	81%

[0376] Ensayo de citotoxicidad adicional se realizaron como se describió anteriormente bajo este ejemplo, utilizando fluorescencia de Resazurina como un indicador de viabilidad celular. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3.1.

Table 3.1. Estudio de fenilahistina, deshidrofenilahistina y de derivados de deshidrofenilahistina adicionales

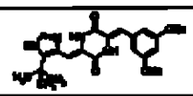
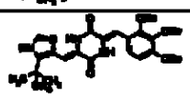
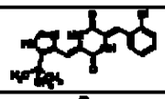
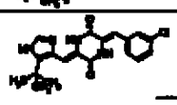
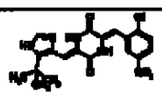
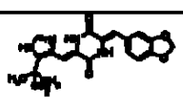
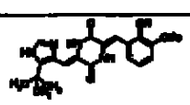
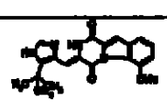
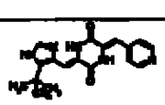
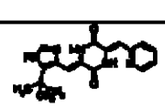
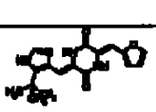
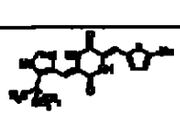
NPI	Estructura	Nombre químico

193

NPI	Estructura	Nombre químico
2350		(-)-(S)-Halimida, (-)- (S)-Fenilahistina, (-)-(S)-PLH
2352		Deshidrofenilahistina, delta-PLH KPU-1
2354		KPU-4, D,L-bislactim-PLH
2355		KPU-5, D,L-monolactim-PLH
2356		KPU-6
2357		KPU-7
2358		t-butil-delta-PLH, KPU-2
2359		KPU-8
2360		KPU-9
2361		KPU-10
2362		KPU-11
2363		KPU-12
2364		KPU-13
2365		KPU-14, tBu-delta-PLH-2,3-diOMe
2366		KPU-15, tBu-delta-PLH-2,6-

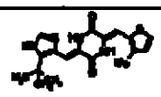
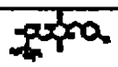
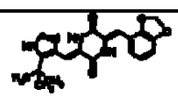
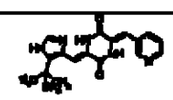
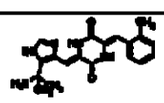
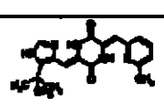
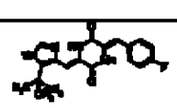
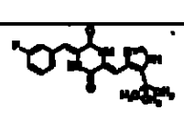
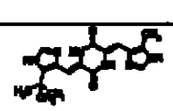
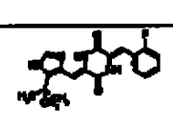
~~196~~

194

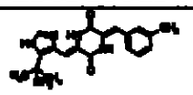
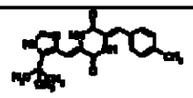
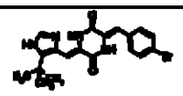
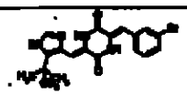
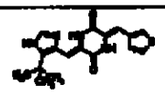
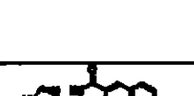
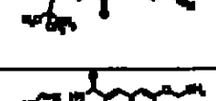
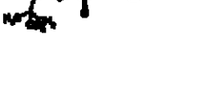
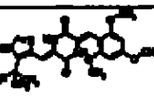
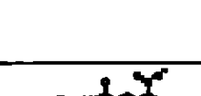
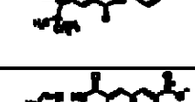
NPI	Estructura	Nombre químico
		diOMe
2367		KPU-16, tBu-delta-3,5-diOMe
2368		KPU-17, tBu-delta-PLH-2,3,4-triOMe
2369		KPU-18, tBu-delta-PLH-o-Cl
2370		KPU-19, tBu-delta- 2370-PLH-m-Cl
2371		KPU-21, tBu-delta-PLH-2-Cl-5-NO2
2372		KPU-22, tBu-delta-PLH-3,4-metilen-dioxi
2373		KPU-23, tBu-delta-PLH-2-OH-3-OMe (o-vainillina)
2374		KPU-24, tBu-delta-PLH-ciclizado-3-MeO
2375		KPU-25, tBu-delta-PLH-4-piridil
2376		KPU-28, tBu-delta-PLH-2-piridil
2377		KPU-26, tBu-delta-PLH-2-furil
2378		KPU-27, tBu-delta-PLH-5-Me-2-tienilo

197

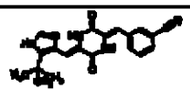
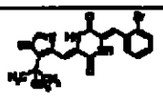
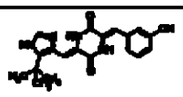
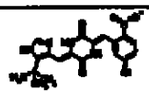
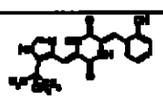
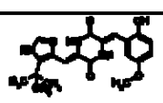
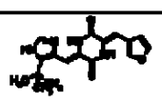
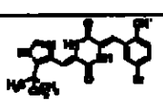
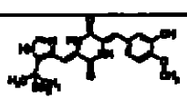
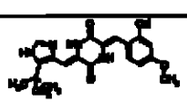
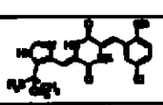
195

NPI	Estructura	Nombre químic
2379		KPU-29, tBu-delta-PLH-3-Me-2-tienilo
2380		KPU-20; t-butil-delta-PLH-p-Cl + sal TFA (MW: 484)
2381		KPU-30, tBu-delta-PLH-2,3-metilendioxi; sal TFA (MW: 494.42)
2382		KPU-31, tBu-delta-PLH-3-piridil; 2 sal TFA (MW 565.42)
2383		KPU-32, tBu-delta-PLH-o-Me; sal TFA (MW: 464.44)
2384		KPU-33, tBu-delta-PLH-3-Me-2-piridil; sal 2 TFA (MW: 579.45)
2385		KPU-34, tBu-delta-PLH-4-F; TFA sal (MW: 468.40)
2386		KPU-35, tBu-delta-PLH-m-F; sal TFA (MW: 468.40)
2387		KPU-36, tBu-delta-PLH-5-Me4-im; sal 2TFA (MW: 584.47)
2388		KPU-37, tBu-delta-PLH-o-F, sal TFA (MW: 468.40)

196

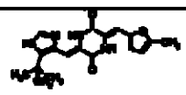
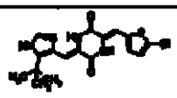
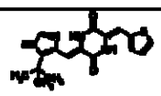
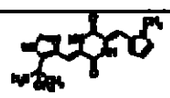
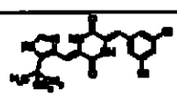
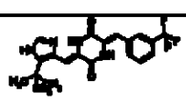
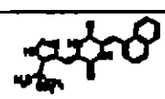
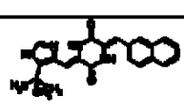
NPI	Estructura	Nombre químic
2389		KPU-38, tBu-delta-PLH-m-Me; TFA salt (MW: 464.44)
2390		KPU-39, tBu-delta-PLH-P-Me; Sal TFA (MW: 464.44)
2391		KPU-40, tBu-delta-PLH-p-Br; Sal TFA (MW: 529.31)
2392		KPU-41, tBu-delta-PLH-m-Br; Sal TFA (MW: 529.31)
2393		KPU-42, tBu-delta-PLH-3-thienyl; Sal TFA (MW: 456.44)
2394		KPU-43, tBu-delta-PLH-p-CN; Sal TFA (MW: 475.42)
2395		KPU-44, tBu-delta-PLH-m-EtO; Sal TFA 2395 (MW: 494.46)
2396		KPU-45, tBu-delta-PLH-2,4,6-TriOMe; Sal TFA (MW: 540.49)
2397		KPU-46, tBu-delta-PLH-o-NO2; Sal TFA (MW: 495.41)
2398		KPU-47, tBu-delta-PLH-NO2; Sal TFA (MW: 495.41)
2399		KPU-48, tBu-delta-PLH-p-

197

NPI	Estructura	Nombre químico
		NO2; Sal TFA (MW: 495.41)
2400		KPU-49, tBu-delta-PLH-m-CN; Sal TFA (MW: 475.42)
2401		KPU-50, tBu-delta-PLH-o-Br; Sal TFA (MW: 529.31)
2402		KPU-51, tBu-delta-PLH-m-OH; Sal TFA (MW: 466.41)
2403		KPU-52, tBu-delta-PLH-2-NO2-5-Cl; sal TFA (MW: 529.85)
2404		KPU-53, tBu-delta-PLH-o-OH; Sal TFA (MW: 466.41)
2405		KPU-54, tBu-delta-PLH-2-OH-5-OMe; Sal TFA (MW: 496.44)
2406		KPU-55, tBu-delta-PLH-3-furanyl, Sal TFA (MW: 440.37)
2407		KPU-56, tBu-delta-PLH-2-OH-5-Br; Sal TFA (MW: 545. 31)
2408		KPU-57, tBu-delta-PLH-3-OH-4-OMe; Sal TFA (MW; 496.44)
2409		KPU-58, tBu-delta-PHL-2-OH-4-OMe; Sal TFA (MW: 496.44)
2410		KPU-59, tBu-delta-PLH-2-OH-

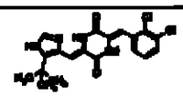
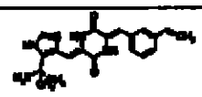
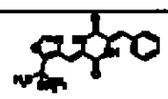
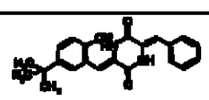
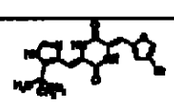
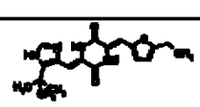
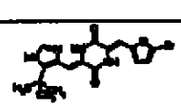
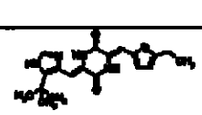
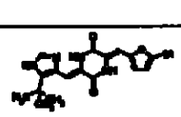
200

198

NPI	Estructura	Nombre químico
		5-Cl; Sal TFA (MW: 500.86)
2411		KPU-60, tBu-delta-PLH-5-Me-2-furanilo; Sal TFA (MW: 454.40)
2412		KPU-61, tBu-delta-PLH-5-Cl-2-tionolo; Sal TFA (MW: 490.88)
2413		KPU-62, tBu-delta-PLH-2-tionilo; Sal TFA (MW: 456.44)
2414		KPU-64, tBu-delta-PLH-3,5-diCl; Sal TFA (MW 519.30)
2415		KPU-63, tBu-delta-PLH-N-Me-2-pyrrole; Sal TFA (MW: 453.42)
2416		KPU-65, tBu-delta-PLH-m-CF3; Sal TFA 2416 (MW 518.41)
2417		KPU-66, tBu-delta-PLH-1-naptalen; Sal TFA (MW 500.47)
2418		KPU-67, tBu-delta-PLH-2-naptalen; Sal TFA (MW 500.47)

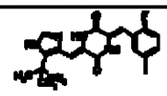
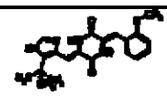
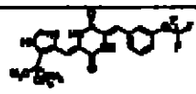
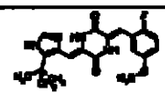
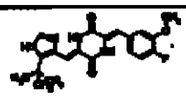
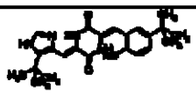
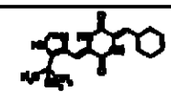
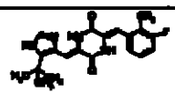
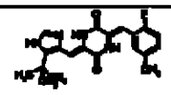
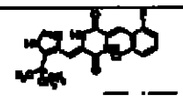
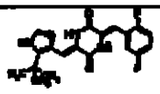
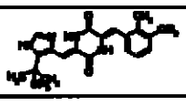
201

199

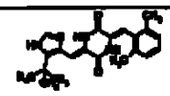
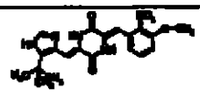
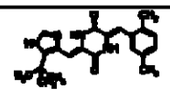
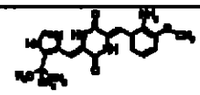
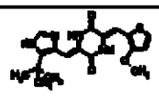
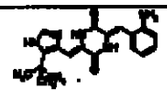
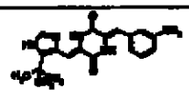
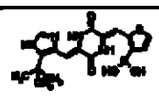
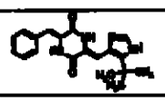
NPI	Estructura	Nombre químico
2419		KPU-68, tBu-delta-PLH-2,3-diCl; Sal TFA (MW 519.30)
2420		KPU-69, tBu-delta-PLH-m-Vinil; Sal TFA (MW 476.45)
2421		KPU-70, tBu-delta-PLH-oxazol; Sal TFA (MW 451.40)
2422		KPU-71, tBu-delta-PLH-2-Hidroxibenzil); Sal TFA (MW 495.91)
2423		KPU-72, tBu-delta-PLH-4-Br-2-tionilo; Sal TFA (MW 484.49)
2424		KPU-73, tBu-delta-PLH-5-Et-2-tionilo; Sal TFA (MW 535.34)
2425		KPU-74 tBu-delta-PLH-5-Br-2-furilo; Sal TFA (MW 519.27)
2426		KPU-75, tBu-delta-PLH-5-Et-2-furilo; Sal TFA (MW 468.43)
2427		KPU-76, tBu-delta-PLH-5-Cl-2-furilo; Sal TFA (MW 474.82)

202

200

NPI	Estructura	Nombre químico
2428		KPU-77, tBu-delta-PLH-2-F-5-l; Sal TFA (MW 594.30)
2429		KPU-79, tBu-delta-PLH-2-(Metiltio); Sal TFA (MW 496.50)
2430		KPU-80, tBu-delta-PLH-m-OCF3; Sal TFA (MW)
2431		KPU-81, tBu-delta-PLH-2-F5-OMe; Sal TFA (MW)
2432		KPU-82, tBu-delta-PLH-4-F-3-OMe; Sal TFA (MW)
2433		KPU-83, tBu-delta-PLH-2-OH-5-tBU; Sal TFA (MW)
2434		KPU-84, tBu-delta-PLH-ciclohexano; Sal TFA (MW)
2435		KPU-86, tBu-delta-PLH-2-Me-3 Sal TFA (MW)
2436		KPU-87, tBu-delta-PLH-2-F-5-Me; Sal TFA (MW)
2437		KPU-88, tBu-delta-PLH-2-Cl-6-F; Sal TFA (MW)
2438		KPU-89, tBu-delta-PLH-2,5-di-F; Sal TFA (MW)
2439		KPU-90, tBu-delta-PLH-2,3-

201

NPI	Estructura	Nombre químico
		di-Me; Sal TFA (MW)
2440		KPU-91, tBu-delta-PLH-2,6-di-Me; Sal TFA (MW)
2441		KPU-92, tBu-delta-PLH-2-NO2-3-OMe; Sal TFA (MW)
2442		KPU-93, tBu-delta-PLH-2,5-diMe; Sal TFA (MW)
2455		KPU-94, tBu-delta-PLH-2-NH2-3-OMe; Sal TFA
2456		KPU-95, tBu-delta-PLH-3-OMe-2-furyl; Sal TFA
2457		KPU-96, tBu-delta-PLH-2-NH2; Sal TFA
2458		KPU-97, tBu-delta-PLH-m-NH2; Sal TFA
2459		KPU-98, tBu-delta-PLH-3-B(OH)2-2-tienilo; Sal TFA
2460		(-)-tBu-PLH

(Continuación)

NPI	EC_{50} (M)		% cytotox.		n
	Promedio	SD	Promedio	SD	

202

	EC_{50} (M)		% cytotox.		
2350	3.94E-07	9.49E-08	87	2	5
2352	4.26E-08	1.08E-08	86	2	5
2354	>2E-05	NA	4	NA	2
2355	>2E-05	NA	13	NA	2
2356	6.57E-06	NA	63	NA	2
2357	8.25E-06	NA	63	NA	2
2358	1.49E-08	3.77E-09	86	2	5
2359	7.55E-08	2.47E-08	87	3	3
2560	2.61E-08	8.54E-09	87	3	3
2361	9.70E-07	NA	86	NA	2
2362	8.19E-06	NA	78	NA	2
2363	5.08E-06	NA	79	NA	2
2364	2.02E-06	NA	76	NA	2
2365	8.68E-07	NA	84	NA	2
2366	5.17E-06	NA	81	NA	2
2367	4.54E-08	1.21E-08	87	2	3
2368	4.80E-06	NA	78	NA	2
2369	4.63E-08	1.35E-08	86	3	3
2370	2.45E-08	8.73E-09	85	3	3
2371	5.34E-08	4.85E-09	86	3	3
2372	8.73E-08	1.10E-08	84	4	3

205

203

	EC_{50} (M)		% cytotox.		
2373	5.36E-06	NA	79	NA	2
2374	6.92E-06	NA	58	NA	2
2375	5.48E-07	NA	82	NA	2
2376	>2E-05	NA	39	NA	2
2377	7.12E-07	NA	80	NA	2
2378	8.52E-08	1.35E-08	85	3	3
2379	4.70E-08	1.30E-08	86	3	3
2380	7.09E-07	NA	81	NA	2
2381	5.20E-07	NA	82	NA	2
2382	1.03E-07	1.16E-08	86	3	3
2383	4.58E-08	1.15E-08	86	3	3
2384	>2E-05	NA	37	NA	2
2385	5.01E-07	8.48E-08	81	5	3
2386	1.31E-08	5.32E-09	85	2	5
2387	2.35E-06	NA	84	NA	2
2388	3.00E-08	1.65E-08	86	3	3
2389	4.67E-08	9.64E-09	86	3	3
2390	4.83E-07	6.15E-08	84	4	3
2391	7.14E-07	NA	82	NA	2
2392	3.11E-08	7.29E-09	87	3	3
2393	5.58E-08	6.23E-09	86	3	3

204

	EC_{50} (M)		% cytotox.		
2394	>2E-05	NA	14	NA	2
2395	4.59E-08	1.02E-08	85	4	3
2396	>2E-05	NA	2	NA	2
2397	5.03E-08	1.24E-08	86	4	3
2398	4.47E-08	1.19E-08	86	3	3
2399	>2E-05	NA	23	NA	2
2400	3.56E-08	1.40E-08	85	3	3
2401	4.05E-08	1.09E-08	86	3	3
2402	3.64E-07	1.86E-07	86	2	4
2403	9.97E-08	2.63E-08	86	2	5
2404	6.10E-06	1.23E-06	66	10	3
2405	>2E-05	NA	25	12	4
2406	3.59E-08	1.03E-08	86	2	5
2407	>2E-05	NA	13	6	3
2408	7.48E-06	8.62E-07	66	4	3
2409	>2E-05	NA	8	10	4
2410	>2E-05	NA	37	17	3
2411	5.72E-08	2.00E-08	85	2	5
2412	1.65E-07	3.32E-08	85	3	3
2413	2.74E-08	6.29E-09	88	2	3
2414	1.17E-07	3.14E-08	88	3	3

207

205

	EC_{50} (M)		% cytotox.		
2415	9.49E-08	5.05E-09	87	3	3
2416	4.40E-08	7.40E-09	87	2	3
2417	1.49E-08	2.12E-09	88	2	3
2418	1.73E-06	NA	83	NA	2
2419	2.99E-08	4.46E-09	88	2	3
2420	1.70E-08	1.52E-09	88	2	3
2421	2.22E-08	3.28E-09	88	2	3
2422	>2E-05	NA	14	NA	2
2423	1.71E-07	1.86E-08	86	3	3
2424	1.32E-07	2.56E-08	87	3	3
2425	3.05E-08	8.71E-09	87	3	3
2426	2.42E-07	NA	86	NA	2
2427	3.82E-08	8.88E-09	87	2	3
2428	4.17E-08	7.78E-09	87	2	3
2429	2.86E-08	3.59E-09	87	2	3
2430	1.43E-08	4.93E-09	87	2	3
2431	2.03E-08	2.12E-09	88	2	3
2432	4.93E-07	NA	85	NA	2
2433	8.53E-06	NA	80	NA	2
2434	7.89E-08	1.41E-08	87	3	3
2435	3.34E-08	6.66E-09	86	3	3

206

	EC_{50} (M)		% cytotox.		
2436	2.50E-08	3.52E-10	86	3	3
2437	2.49E-08	1.31E-09	86	2	3
2438	3.07E-08	2.14E-09	87	3	3
2439	2.96E-09	2.27E-10	87	3	3
2440	4.30E-07	NA	85	NA	2
2441	6.63E-07	NA	83	NA	2
2442	8.82E-08	1.40E-08	87	3	3
2455	3.49E-07	NA	87	NA	2
2456	1.25E-07	3.68E-08	88	2	3
2457	4.32E-07	NA	86	NA	2
2458	3.10E-08	1.71E-09	87	3	3
2459	2.53E-08	4.31 E-09	88	3	3
2460	2.55E-07	1.24E-07	87	2	5

EJEMPLO 5

Otros análogos de deshidrofenilahistina

A. Modificaciones para la síntesis de derivados de deshydrofenilahistina

[0377] Otros derivados de deshidrofenilahistina se sintetizan utilizando las técnicas anteriores solos o en conjunto con otras técnicas de síntesis orgánica bien conocidas.

207

[0378] Modificaciones a la diacildicetopiperazina y el primer y segundo aldehídos involucrados en el método de síntesis, varían de acuerdo con el derivado deseado a producir. Los derivados que se sintetizan:

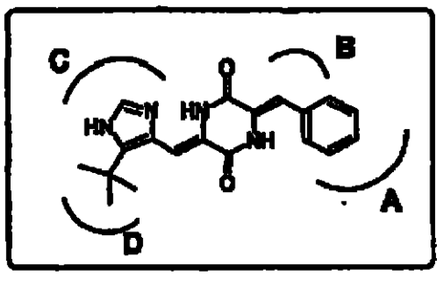
A) modifican el anillo fenilo y/o introducen otros sistemas de anillo aromático,

B) alteran la posición del anillo aromático,

C) alteran el sistema de anillo aromático imidazol, y/o

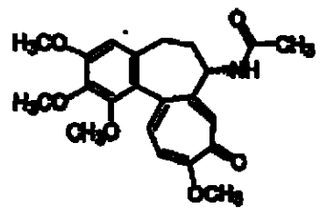
D) modifican la posición 5 en el anillo imidazol.

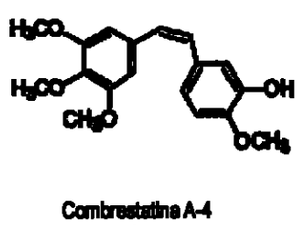
[0379] La figura siguiente ilustra regiones del compuesto deshidrofenilahistina modificadas para producir derivados de deshidrofenilahistina. Ejemplos no limitantes de modificaciones se describen y basado en esta descripción, se entenderá por aquellos con destreza en la especialidad.

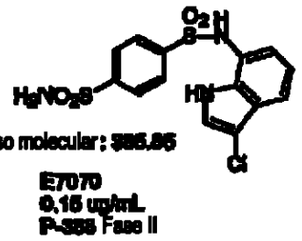


208

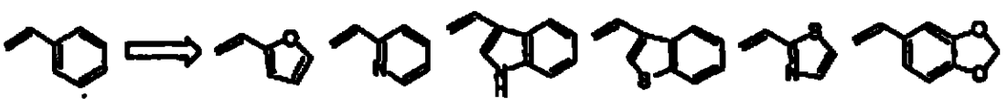
A 1) Modificación del anillo fenilo basado en la estructura de conocidos compuestos anti-tubulina, Alquilo, Halógeno, Alcoxi, Acetilo, Sulfonamida, Amino, Hidroxilo, Nitro, etc.







2) introducción de otros sistemas de anillo aromático



B Posición del anillo aromático

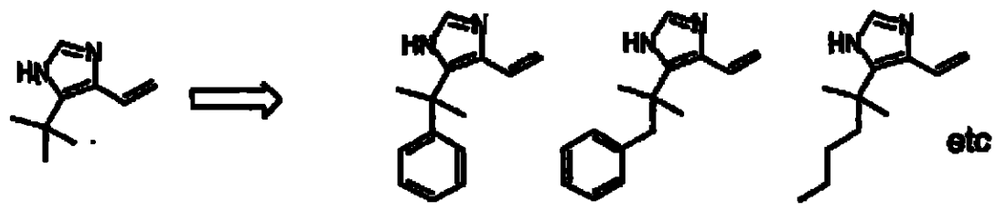


C Cambio al otro sistema de anillo

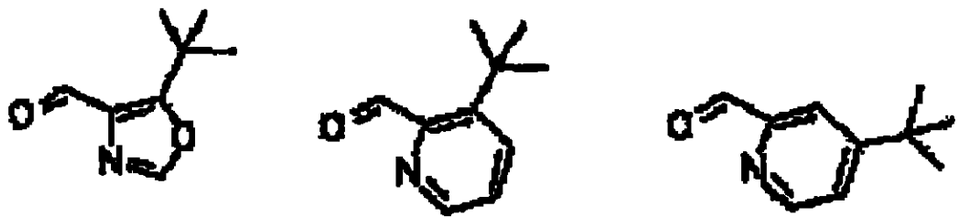


D Mayor modificación de la posición 5 en el anillo imidazol

209



[0297] La expansión en las modificaciones anteriores al compuesto deshidrofenilahistina, derivados del compuesto pueden incluir las siguientes substituciones en el anillo fenilo (A): $-CF_3$, $-SO_2NH_2$ ($-SO_2NR_1R_2$), $-SO_3H$, $-CONH_2$ ($-CONR_1R_2$), -COOH, etc. Otros sistemas de anillo (C) también pueden incluir lo siguientes:



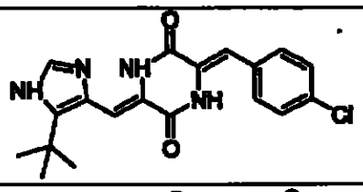
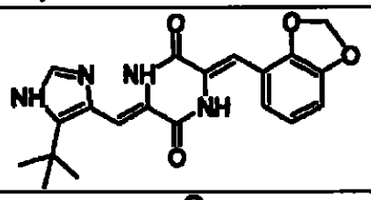
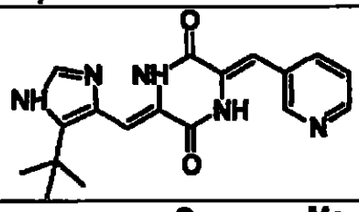
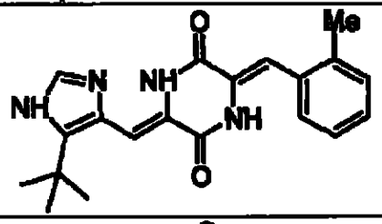
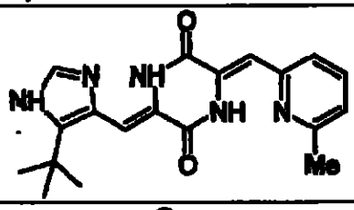
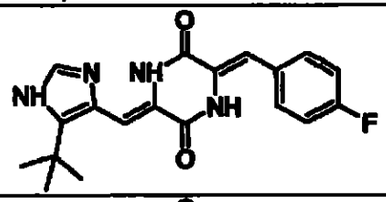
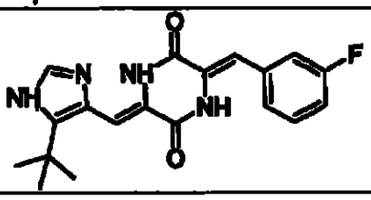
B. Ejemplos de derivados de deshidrofenilahistina sintetizados

[0380] Ejemplos adicionales de derivados de deshidrofenilahistina sintetizados se describen en la Tabla 4.

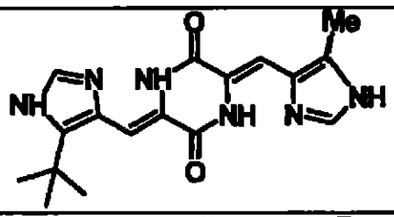
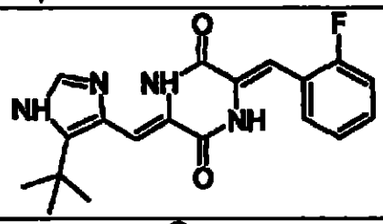
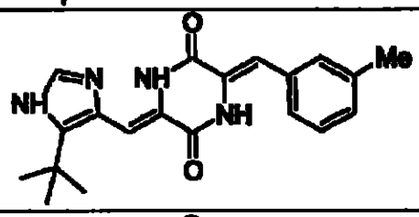
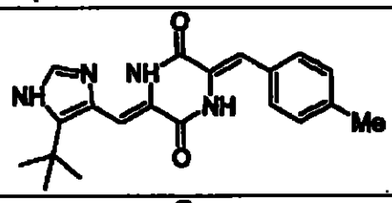
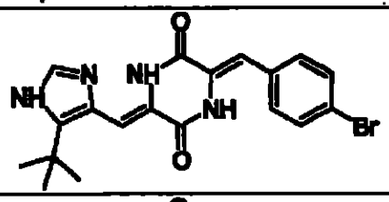
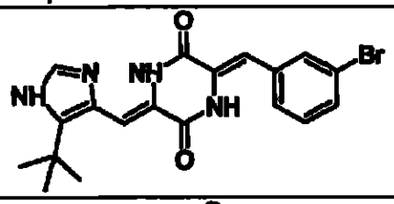
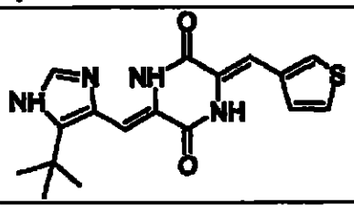
Tabla 4. Derivados sintetizados adicionales de deshidrofenilahistina

212

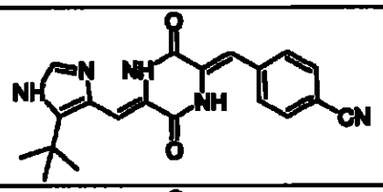
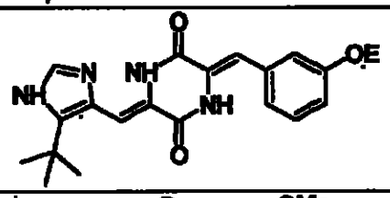
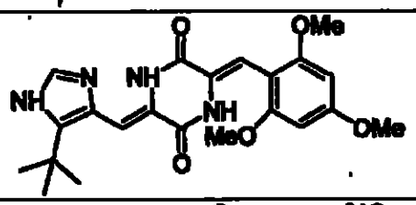
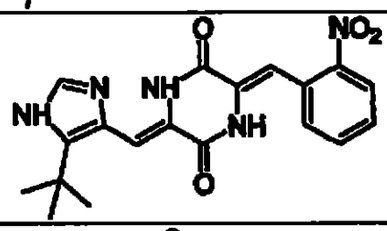
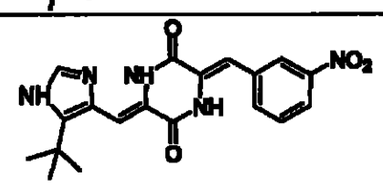
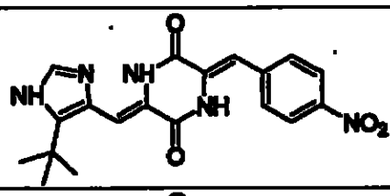
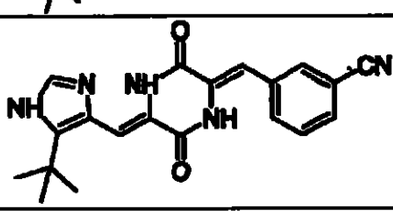
210

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-20 tBu-Δ PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)
KPU-30 tBu-Δ PLH-2,3-metilendioxi		TFA	380.40 494.42 (+TFA)
KPU-31 tBu-Δ PLH-3-piridil		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)
KPU-32 tBu-Δ PLH-o-Me		TFA	350.41 464. 44 (+TFA)
KPU-33 tBu-Δ PLH-3-Me-2-piridil		2TFA	351.40 579.45 (+2TFA)
KPU-34 tBu-Δ PLH-4-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-35 tBu-Δ PLH-m-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)

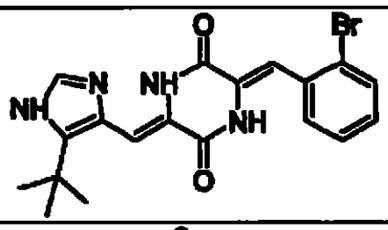
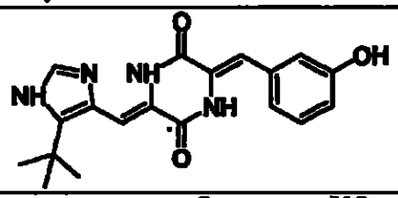
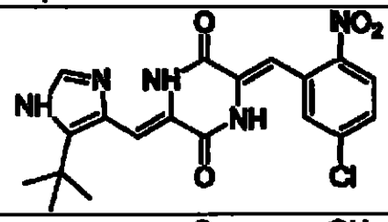
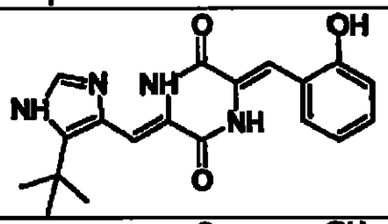
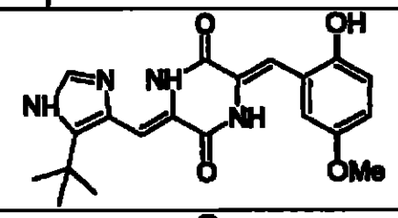
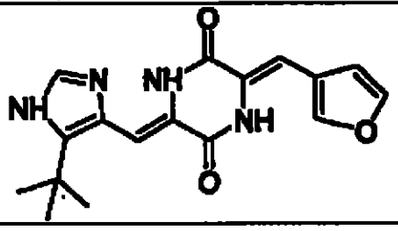
211

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-36 tBu-Δ PLH-5-Me-4-im		2TFA	356.42 584.47 (+2TFA)
KPU-37 tBu-Δ PLH-o-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-38 tBu-Δ PLH-m-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-39 tBu-Δ PLH-p-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-40 tBu-Δ PLH-p-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-41 tBu-Δ PLH-m-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-42 tBu-Δ PLH-3-tienilo		TFA	342.42 456.44 (+TFA)

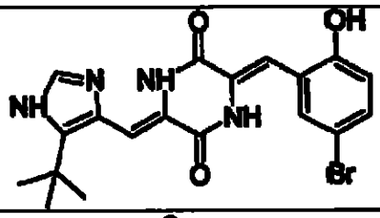
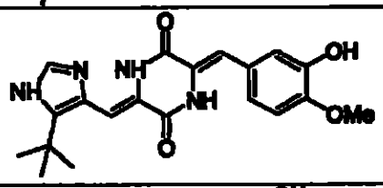
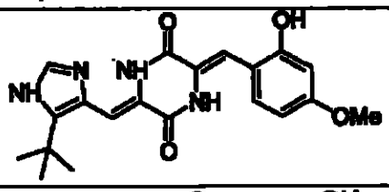
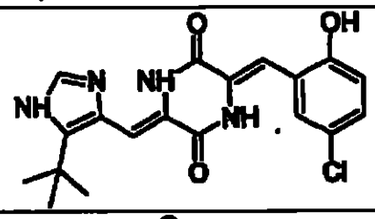
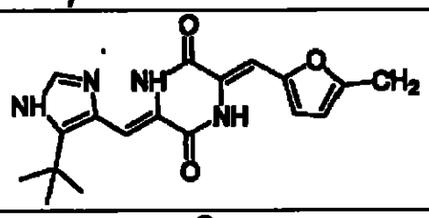
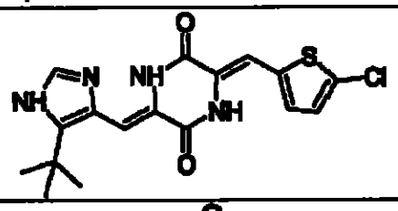
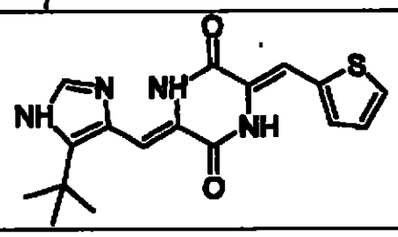
212

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-43 tBu-Δ PLH-p-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)
KPU-44 tBu-Δ PLH-m-EtO		TFA	380.44 494.46 (+TFA)
KPU-45 tBu-Δ PLH-2,4,6-TriOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)
KPU-46 tBu-Δ PLH-o-NO_2		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-47 tBu-Δ PLH-m-NO_2		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-48 tBu-Δ PLH-p-NO_2		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-49 tBu-Δ PLH-m-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)

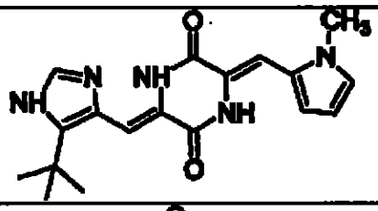
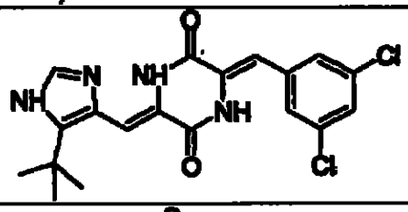
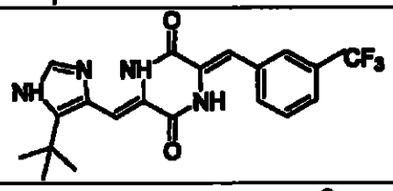
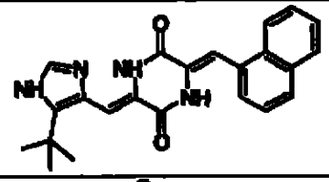
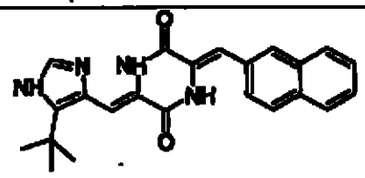
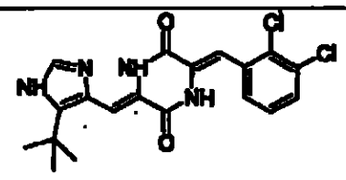
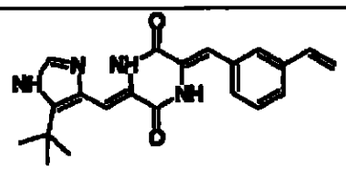
213

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-50 tBu-Δ PLH-o-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-51 tBu-ΔPLH-m-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-52 tBu-Δ PLH-2-NO_2-5-Cl		TFA	415.83 529.85 (+TFA)
KPU-53 tBu-Δ PLH-o-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-54 tBu-ΔPLH-2-OH-5-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-55 tBu-Δ PLH-3-furanilo		TFA	326.35 440.37 (+TFA)

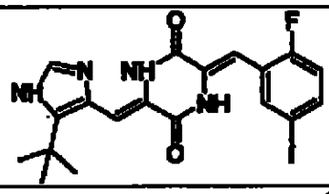
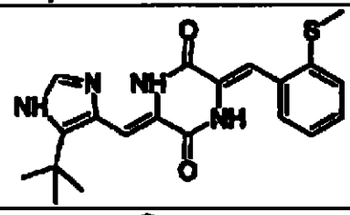
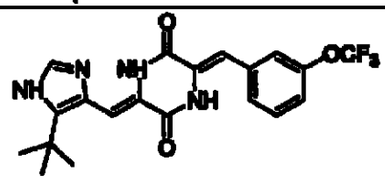
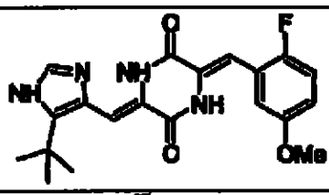
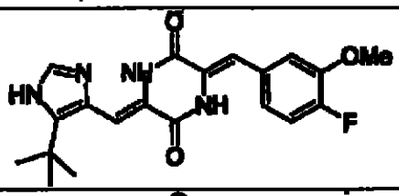
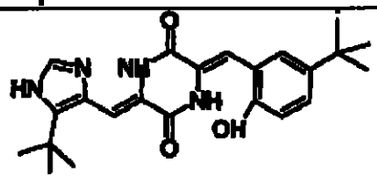
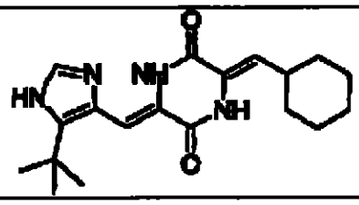
214

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-56 tBu-Δ PLH-2-OH-5-Br		TFA	431.28 545.31 (+TFA)
KPU-57 tBu-Δ PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-58 tBu-Δ PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-59 tBu-Δ PLH-2-OH-5-Cl		TFA	386.83 (+TFA) 500.86
KPU-60 tBu-Δ PLH-5-Me-2-furanilo		TFA	340.38 454.40 (+TFA)
KPU-61 tBu-Δ PLH-5-Cl-2-tionilo		TFA	376.86 490.88 (+TFA)
KPU-62 tBu-Δ PLH-2-tionilo		TFA	342.42 456.44 (+TFA)

215

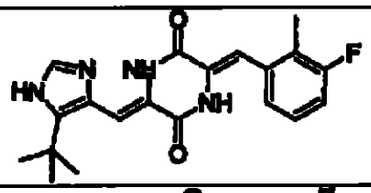
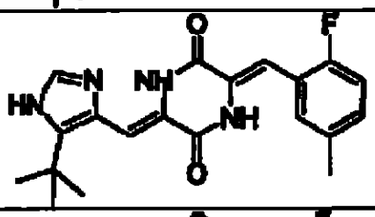
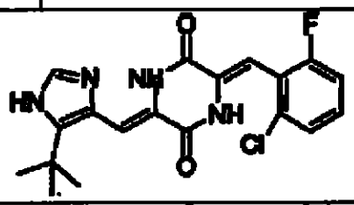
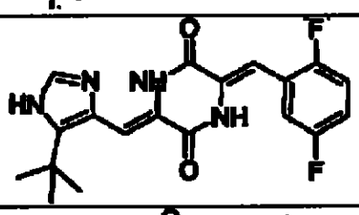
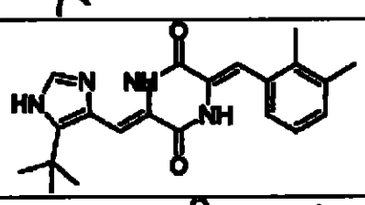
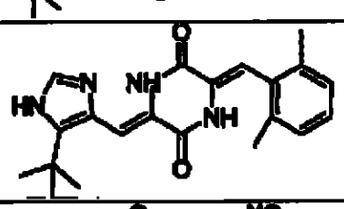
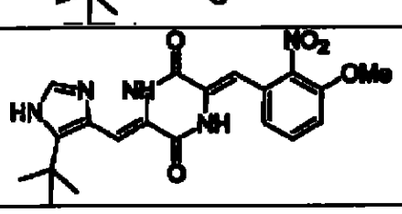
COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-63 tBu-Δ PLH-N-Me-2-pirrol		TFA	339.39 453.42 (+TFA)
KPU-64 tBu-Δ PLH-3,5-diCl		TFA	405.27
KPU-65 tBu-Δ PLH-m-CF_3		TFA	404.39
KPU-66 tBu-Δ PLH-1-Naftaleno		TFA	386.44
KPU-67 tBu-Δ PLH-2-Naftaleno		TFA	386.44
KPU-68 TBu-Δ PLH-2,3-diCl		TFA	405.27
KPU-69 TBu-Δ PLH-m-Vinilo		TFA	362.42

216

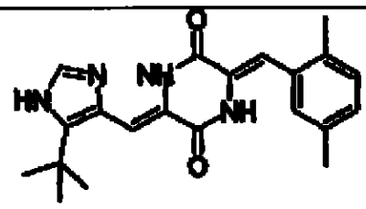
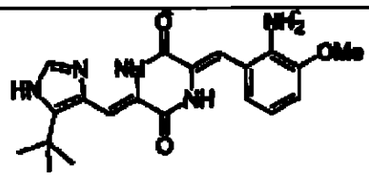
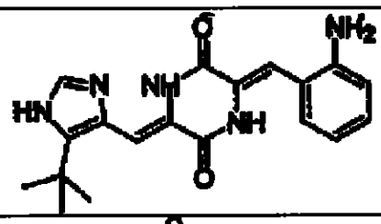
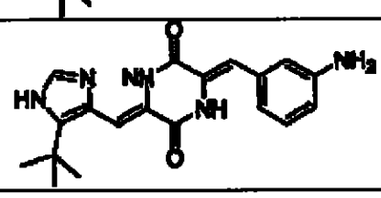
COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-77 TBu-Δ PLH-2-F-5-I		TFA	480.28
KPU-79 tBu-Δ PLH-2-(Metiltio)		TFA	368.45
KPU-80 TBu-Δ PLH-m-OCF_3		TFA	420.38
KPU-81 TBu-Δ PLH-2-F-5-OMe		TFA	384.38
KPU-82 TBu-Δ PLH-4-F-3-OMe		TFA	384.38
KPU-83 TBu-Δ PLH-2-OH-5-tBu		TFA	408.39
KPU-84 TBu-Δ PLH-ciclohexano		TFA	341.39

218

217

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-86 TBu-Δ PLH-2-Me-3-F		TFA	368.39
KPU-87 TBu-Δ PLH-2-F-5-Me		TFA	368.39
KPU-88 TBu-Δ PLH-2-Cl-6-F		TFA	388.83
KPU-89 TBu-Δ PLH-2,5-di-F		TFA	372.38
KPU-90 TBu-Δ PLH-2,3-di-Me		TFA	364.38
KPU-91 TBu-Δ PLH-2,6-di-Me		TFA	364.38
KPU-92 tBu-Δ PLH-2-NO_2-3-OMe		TFA	411.39

218

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	FORMA SAL	M.W.
KPU-93 TBu-Δ PLH-2,5-diMe		TFA	364.38
KPU-94 tBu-Δ PLH-2-NH_2-3-OMe		TFA	381.399
KPU-96 TBu-Δ PLH-2-NH_2		TFA	351.41
KPU-97 TBu-Δ PLH-m-NH_2		TFA	351.41

C. Evaluación de derivados de dehidrofenilahistina

[0381] La evaluación de derivados descritos anteriormente se estima de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3. Evaluación adicional de los derivados, se extiende a actividades específicas tales como determinar el efecto inhibitorio en proliferación celular, los efectos en un mecanismo celular específico (es decir función microtublar), efectos en avance del ciclo celular, evaluación de actividad anti-tumor *in*

219

vitro contra líneas de células de cáncer, etc. Algunos protocolos del método de evaluación se dan a continuación.

1) Efecto Inhibitorio de Proliferación Celular de Deshidrofenilahistina y sus Análogos

[0382] En cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos, se colocan 100 μl de células A-549 derivadas de cáncer pulmonar humano preparadas a 10^5 células/ml en un medio de cultivo obtenido al agregar suero de feto bobino al 10% a medio de cultivo EMEM (Nissui Seiyaku Co., Ltd.) que tiene efecto antitumor contra células A-549 derivadas de cáncer pulmonar humano. Solución de metanol del derivado obtenido por los ejemplos anteriormente citados se agregan a los pozos de la hilera más superior, los especimenes se diluyen por el método de dilución semi-log y agregan, y la placa se incuba en un incubador de gas bióxido de carbono a 37 grados C por 48 horas. El resultado se agrega en lotes de 10 μl con reactivo MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrabromuro) (1 mg/ml • PBS), seguido por incubación en un incubador con gas de óxido de carbono a 37 grados C por 6 horas. El medio de cultivo se descarta y el cristal producido en las células se disuelve en 100 μl/pozo de dimetilsulfóxido. Absorción de luz de 595 nm se mide con

220

un lector de microplacas. Al comparar las absorciones de luz de las células sin tratar con las de las células tratadas con un espécimen de una concentración conocida, se calcula la concentración de espécimen que inhibe la proliferación celular 50% (IC_{50}).

2) Actividad Inhibitoria de Ciclo Celular de Dehidrofenilahistina y Sus Análogos

[0383] La cepa celular A431 se deriva de cáncer pulmonar humano. Medio de cultivo EMEM que contiene el suero bovino fetal al 10% y solución de amino ácido no esencial MEM al 1% (SIGMA M2025), se utiliza para incubar células A431 a 37 grados C en un incubador saturado con gas de óxido de carbono al 5% y vapor de agua. El espécimen refinado de dehidrofenilahistina obtenido por los métodos anteriores se agrega a las células en la fase de crecimiento log y el avance del ciclo celular se analiza por citómetro de flujo y observaciones de microscopio.

[0384] El efecto en el avance de ciclo celular de células HeLa se ilustra en la Figura 42.

EJEMPLO 6

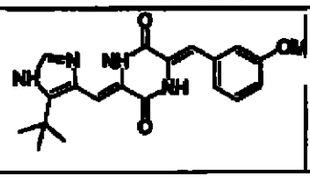
Relación de Estructura-Actividad de Derivados de Deshidrofenilahistina Sintetizados (DeshidroPLH)

1) Generalidad en síntesis de derivados

221

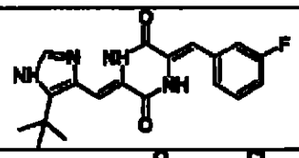
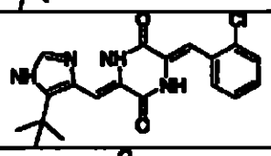
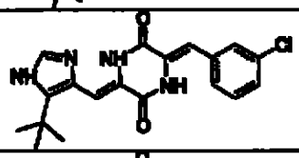
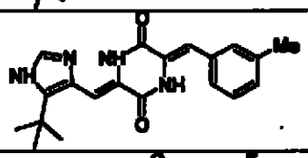
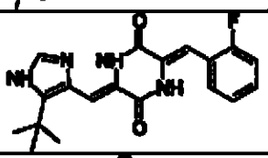
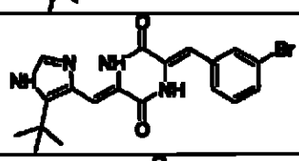
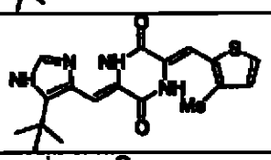
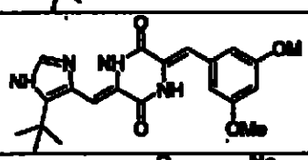
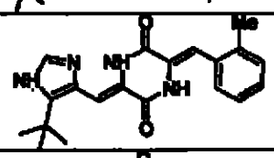
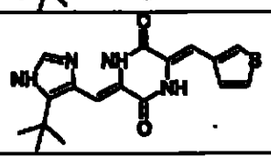
[0385] Muchos, aunque no todos los derivados de deshidroPLH descritos aquí incluyen una, dos o tres modificaciones en el anillo fenilo (Figura 5 a continuación). Los derivados se sintetizaron por los métodos descritos anteriormente. Como se ilustra en la Tabla 5, ciertos compuestos mostraron actividad citotóxica más potente que deshidroPLH y tBu-deshidroPLH. El compuesto más potente que exhibe un valor EC_{50} de 3 nM fue **KPU-90**. Este valor fue 16-veces y 4-veces superior que el de deshidroPLH y tBu-deshidroPLH, respectivamente. Estos derivados tienen mono-substitución en las posiciones -o o -m del anillo fenilo con los átomos de halógeno tales como átomos de flúor y cloro o el grupo metilo, vinilo o metoxi. Derivados con substituciones a estructuras heteroarilo tales como anillos naftaleno, tiofeno y furano, también producen una actividad potente. **KPU-35, 42, 69, 80 y 81** también mostraron superior actividad que tBu-deshidroPLH.

Tabla 5. Derivados deshidroPLH potentes sintéticos

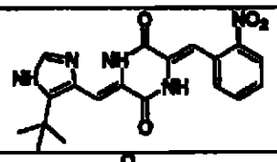
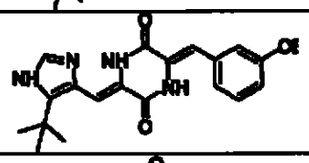
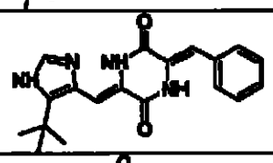
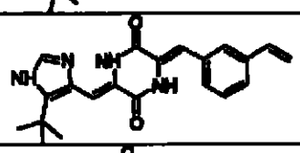
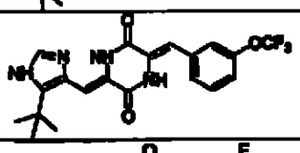
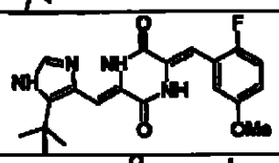
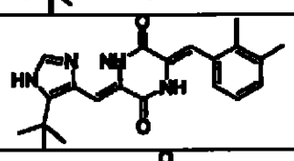
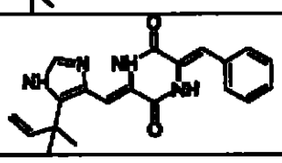
Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-9		31

224

222

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-35		10
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-38		45
KPU-37		21
KPU-41		31
KPU-29		44
KPU-16		42
KPU-32		42
KPU-42		54

223

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-46		44
KPU-44		43
tBu-ΔPLH (KPU-2)		13
KPU-69		16
KPU-81		13
KPU-88		19
KPU-90		3
DeshidroPL (KPU-1)		48

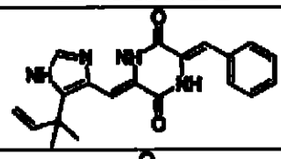
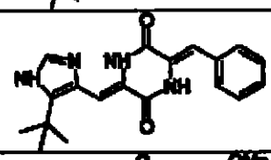
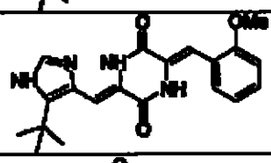
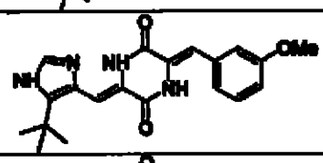
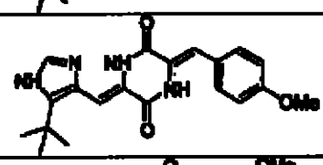
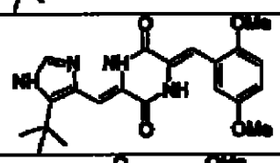
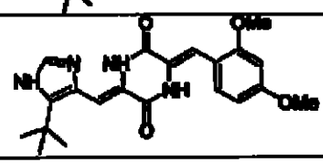
2) Introducción de los grupos metoxi al anillo fenilo

[0386] La Colchicina reconoce el mismo sitio de enlace en beta-tubulina que PLH. Colchicina tiene cuatro grupos metoxi característicos en sus anillos A y

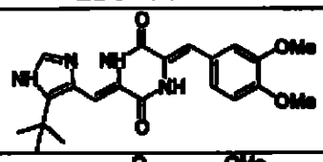
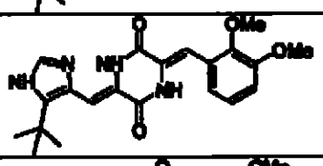
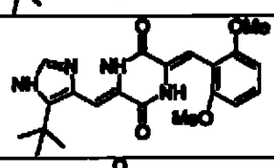
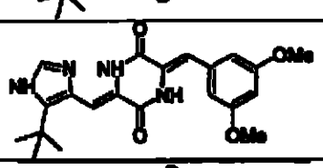
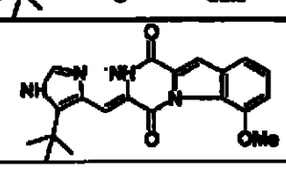
224

B. Una serie de substituciones con los grupos metoxi sencillos o múltiples se realizó y los resultados de actividad citotóxica se ilustran en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto de substitución de grupo metoxi en la proliferación de células HT-29

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
DeshidroPLH (KPU-1)		48
tBuΔPLH (KPU-2)		13
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-10		1350
KPU-12		4980

225

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-13		2130
KPU-14		610
KPU-15		4430
KPU-16		42
KPU-24		7040

[0387] El resultado demostró que las substituciones en las posiciones *-m* u *-o* aumentan la actividad citotóxica contra células HT-29. **KPU-9** y 16 mostraron alta actividad. Los derivados metoxi con triple substitución (**KPU-11, 17** y **45**) también mostraron actividad. La estructura de **KPU-24** se asignó por análisis MASS.

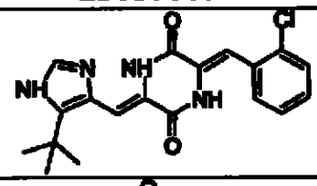
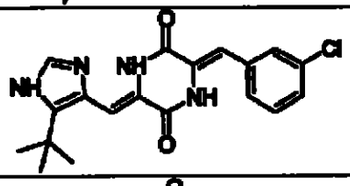
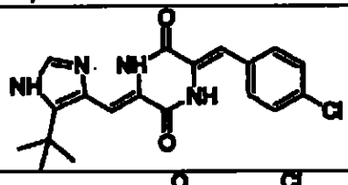
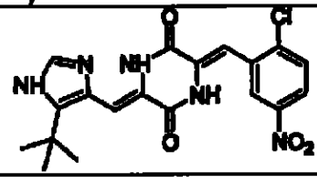
3) Modificación con grupos que retiran electrones

226

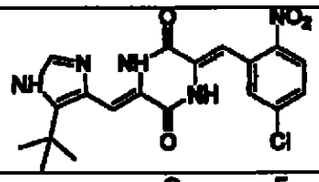
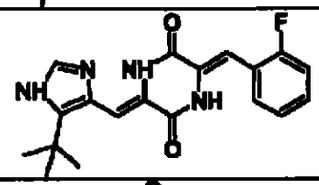
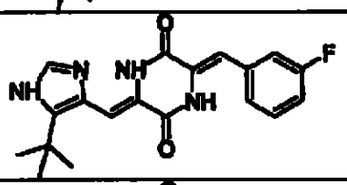
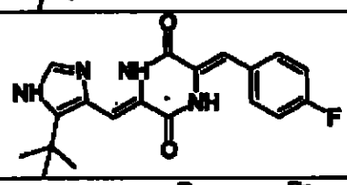
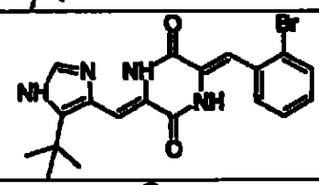
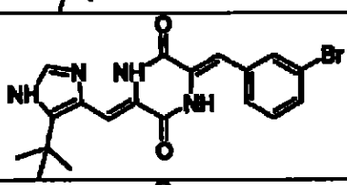
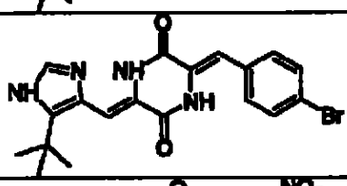
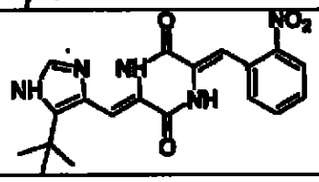
[0388] Para estudiar la relación de actividad de estructura más expandida en el anillo fenilo, una serie de diferentes grupos funcionales se introduce, que incluyen tanto grupos que retiran como donan electrones. El resulto de citotoxicidad contra células HT-29 se muestra en las Tablas 7 y 8, respectivamente.

[0389] Substitución en las posiciones *-o* o *-m* aumentó efectivamente la actividad. Estos resultados fueron bien consistentes con el caso de grupo metoxi.

Tabla 7. Efecto del grupo que retiene electrones en proliferación de células HT-29

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-20		545
KPU-21		51

227

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-52		110
KPU-37		21
KPU-35		10
KPU-34		466
KPU-50		38
KPU-41		31
KPU-40		623
KPU-46		44

228

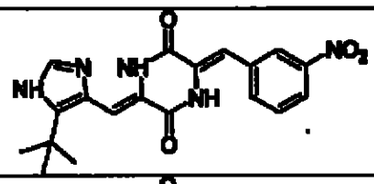
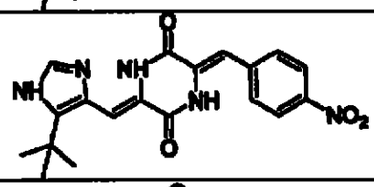
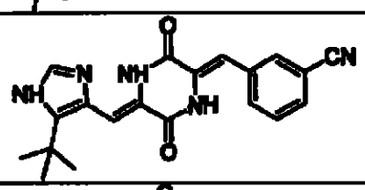
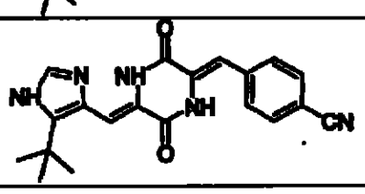
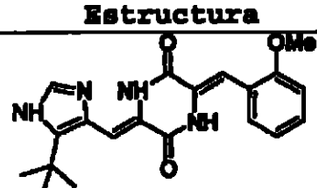
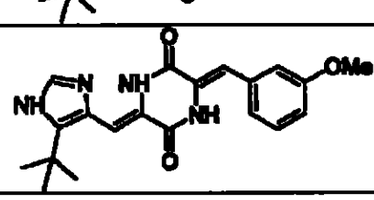
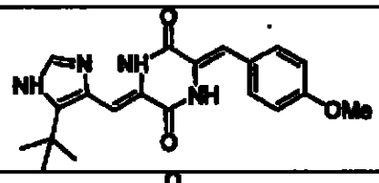
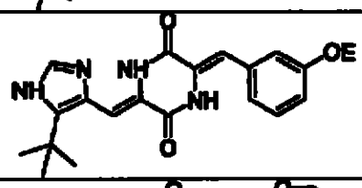
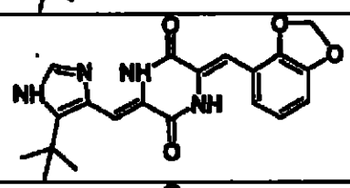
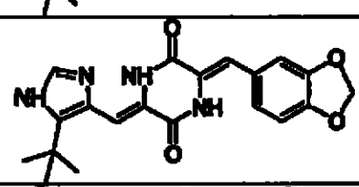
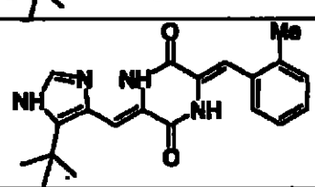
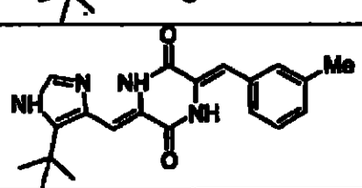
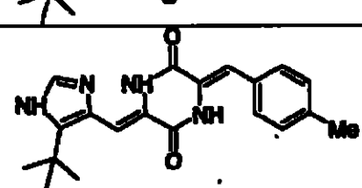
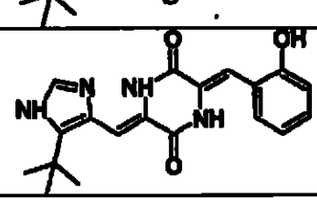
Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-47		40
KPU-48		>20 μM
KPU-49		28
KPU-43		>20 μM

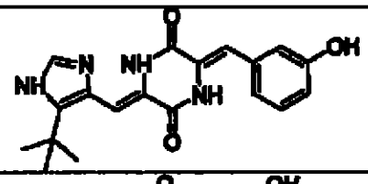
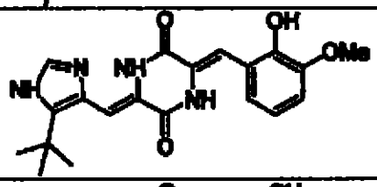
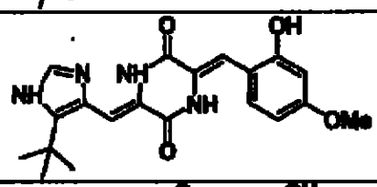
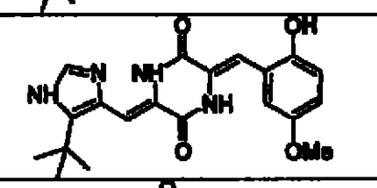
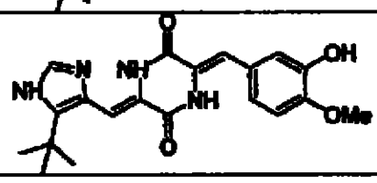
Tabla 8. Efecto del grupo donador de electrones en la proliferación de células HT-29

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-8		89
KPU-9		31

229

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-6		6730
KPU-44		43
KPU-30		477
KPU-22		82
KPU-32		42
KPU-38		45
KPU-39		460
KPU-53		> 20 μM

230

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-51		617
KPU-23		5870
KPU-58		>20 μM
KPU-54		>20 μM
KPU-57		>20 μM

[0390] La presente descripción no se liga por o limita por ninguna teoría científica particular. Sin embargo, se aprecia que personas con destreza en la especialidad pueden interpretar los resultados aquí presentados, para sugerir que un grupo funcional relativamente más pequeño, que afecta menos impedimento estérico, puede ser preferido para producir actividad más potente, y grupos ligeramente más grandes tales como el grupo etoxi (cuando se comparan con el grupo metoxi) o el

231

átomo de Br (cuando se compara con el átomo de Cl) pueden afectar impedimento estérico desfavorable para interacción con, por ejemplo el sitio de enlace tubulina. Aún más, debido a que la propiedad eléctrica de estos substituyentes no afecta la actividad, se sugiere que estos substituyentes relativamente pequeños no interactúen directamente con el sitio de enlace de beta-tubulina, si no que restringe la conformación de deshidroPLH adecuado para el enlace o unión. O, como otra hipótesis posible, la propiedad hidrofóbica puede ser un factor más importante en el sitio de enlace para las posiciones *-o* o *-m* en la beta-tubulina, ya que la introducción del grupo hidroxilo hidrofílico, que puede formar el enlace de hidrógeno como un donador de hidrógeno, disminuye drásticamente la actividad.

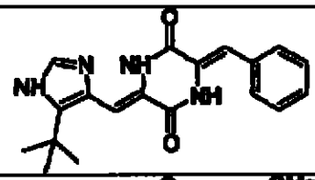
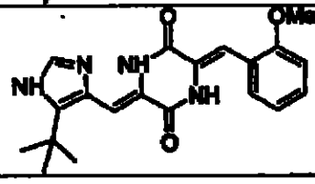
[0391] Como se muestra en la Tabla 9, el efecto de los substituyentes en la actividad citotóxica en la posición *-o* puede ordenarse, como en el caso de la posición *-m*, como se muestra en la Tabla 10. Los compuestos que tienen grupos funcionales efectivos, que muestran superior actividad que tBu-deshidroPLH, también pueden ser adicionalmente modificados. Ya que la migración de la estereoquímica de *Z* a *E* bajo la irradiación de luz visible se observa, substituyentes que disminuyen la densidad de electrones en los dobles

232

enlaces conjugados puede contribuir a la reducción de la migración *Z* a *E* por la luz, resulta en más estructuras físicoquímicamente estables. La temperatura también puede afectar esta migración.

[0392] Modificación en dos partes del anillo puede ser preferida para el desarrollo de compuestos potentes pero también biológicamente estables. El anillo fenilo de la fenilahistina se oxida por el citocromo P-450. La doble modificación que reduce la densidad de electrones del anillo fenilo puede por lo tanto ser efectiva para evitar oxidación P-450. De esta manera, la combinación del pequeño grupo que retira electrones tal como el átomo de flúor al elemento que puede incrementar la actividad tal como -OMe, -Me, -Cl, -F y Br, puede resultar en compuestos de drogas más potentes y biológicamente estables.

Tabla 9. Resumen de modificación en la posición -o

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-2		48
KPU-8		89

233

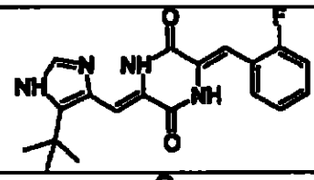
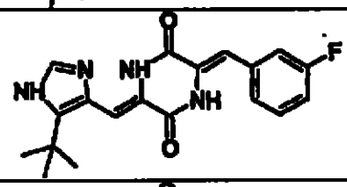
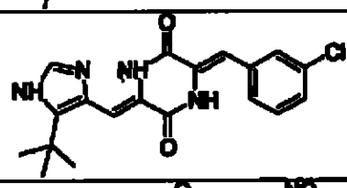
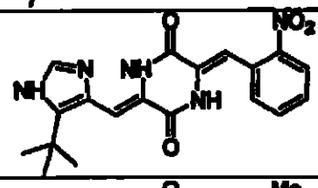
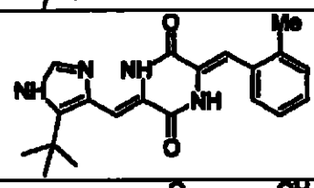
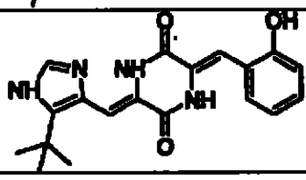
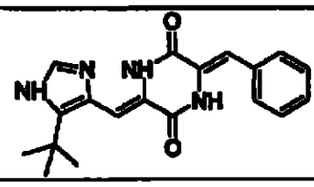
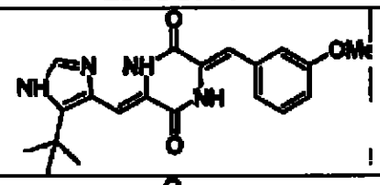
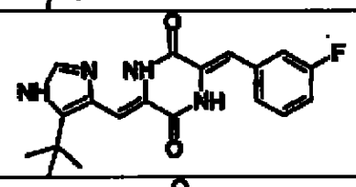
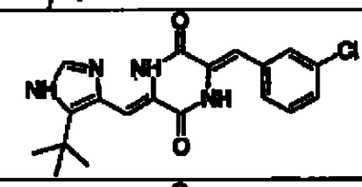
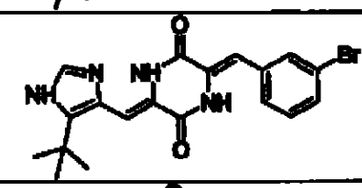
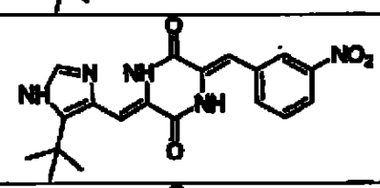
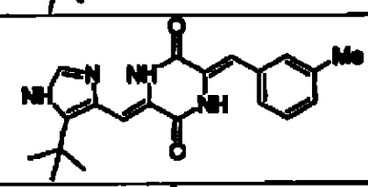
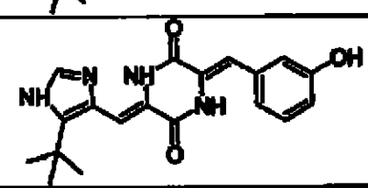
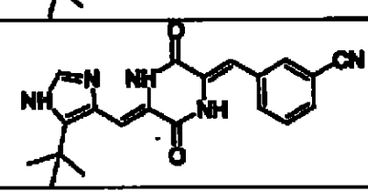
Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-37		21
KPU-18		42
KPU-50		38
KPU-46		44
KPU-32		42
KPU-53		>20 μM

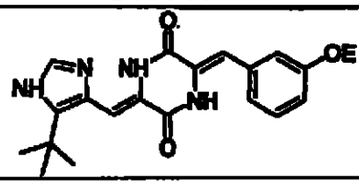
Tabla 10. Resumen de modificación en la m-posición

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-2		48

234

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-19		20
KPU-41		31
KPU-47		40
KPU-38		45
KPU-51		617
KPU-49		28

235

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KUP-44		43

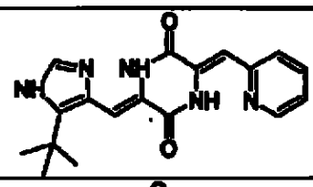
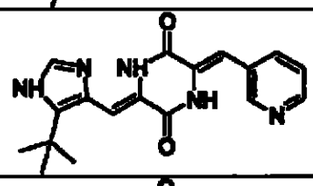
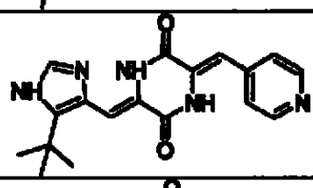
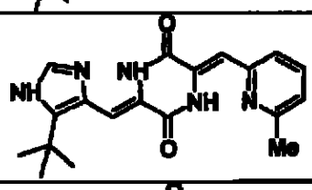
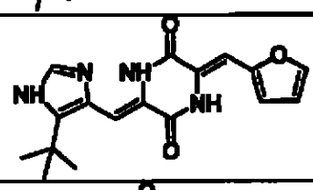
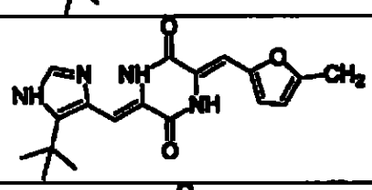
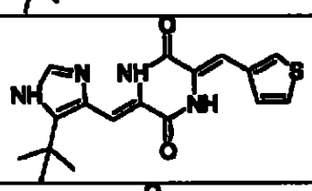
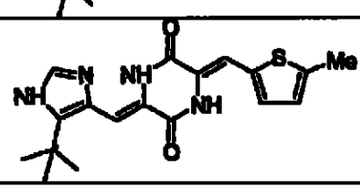
4) Substitución del anillo fenilo en aril-heterociclos

[0393] El anillo fenilo también puede ser reemplazado por grupos heteroarilo. El resultado de estos reemplazos en términos de la actividad citotóxica se ilustra en la Tabla 11. Ya que los átomos de nitrógeno arílicos pueden formar un enlace de hidrógeno con un grupo NH del anillo dicetopiperazina y restringir la conformación de la molécula entre anillos piridina y dicetopiperazina a una estructura uniplanar, la conformación activa de deshidroPLH requerirá un cierto nivel de ángulo dihédrico formado por la repulsión estérica entre un átomo de hidrógeno de amida del anillo dicetopiperazina y un átomo de hidrógeno-o del anillo fenilo (Figura 6).

Tabla 11. Efecto del reemplazo con el anillo heteroarilo en proliferación de células HT-29

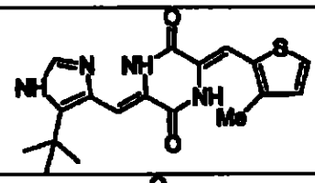
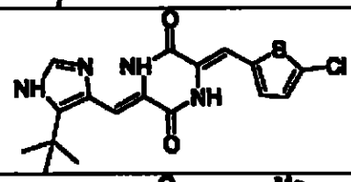
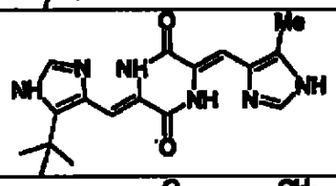
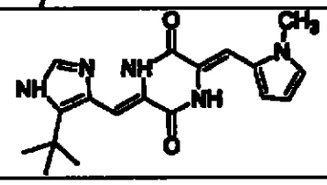
Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)

236

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KPU-28		>20 μM
KPU-31		96
KPU-25		544
KPU-33		>20 μM
KPU-26		600
KPU-60		71
KPU-42		54
KPU-27		80

239

237

Compuesto	Estructura	EC_{50} (nM)
KUP-29		44
KPU-61		184
KPU-36		2790
KPU-63		105

[0394] El reemplazar el anillo fenilo con un grupo furano o tiofeno más pequeño, por ejemplo **KPU-29** o **-42**, exhibe actividad. El anillo fenilo puede cambiarse a otra estructura aromática, mientras que se mantiene la actividad potente.

5) Metabolismo de fenilahistina

[0395] En el reciente estudio, (±)-fenilahistina se trató con microsoma hepático de rata o hepático humano P450s. En el caso humano, al menos siete metabolitos se detectaron, y dos de ellos, es decir P1 y P3, fueron metabolitos principales, representan más del 60% de los metabolitos recuperados.

238

[0396] Ya que no hay estructura exo-olefina en tBu-deshidroPLH, derivados sintetizados presentes no tienen oxidización como P1 y P4. Sin embargo, oxidizaciones tales como P3 y P5 se forman durante el metabolismo hepático. Diversos derivados, que evitan este metabolismo, son efectivos para evitar oxidación P450 en el anillo fenilo. El anillo imidazol también puede modificarse para evitar la oxidación desfavorable.

6) Estabilidad físico-química de deshidroPLH

[0397] La estabilidad físico-química es uno de los problemas desfavorables de deshidroPLH. En fenilahistina, ya que no estructura olefina adicional en la parte benzilo, no hay este problema. Sin embargo, en deshidroPLH, la porción benzilideno puede activarse fácilmente, probablemente con la luz visible, y la migración *Z* a *E* frecuentemente ocurre debido a la existencia de más larga conjugación del doble enlace. La migración ocurrió incluso bajo luz de la habitación normal. En el ensayo citotóxico, algunos de los compuestos migran a la forma *E* durante la incubación, aunque esta migración probablemente se equilibra en la proporción 1:1 en el caso de deshidroPLH. Esta migración puede ser controlada. La migración *Z* a *E* también se conoce en combretastatina A4, un mismo tipo de inhibidor

244

239

de tubulina, y unos cuantos estudios para mejorar este problema se reportaron.

7) Síntesis de Prodroga

[0398] La forma *E* también puede emplearse como una prodroga de deshidroPLH o de uno o más de estos análogos, incluyendo aquellos análogos descritos aquí. Una de las propiedades indeseables de las drogas anti-tubulina, involucra su baja selectividad entre tejidos de tumor e intactos, aunque estas drogas pertenecen a una de las terapias diana u objetivo moleculares. Esto provoca efectos secundarios indeseables. Sin embargo, si el compuesto funciona selectivamente solo en tejidos de tumor, efectos secundarios negativos de las drogas anti-microtúbulos pueden reducirse. Ya que la deshidroPLH (forma *Z*) puede producirse a partir de su isómero *E* por irradiación con luz visible, la forma *E* se administra y se realiza foto irradiación solo en el sitio de tumor, entonces solo el tumor se daña por la forma *Z* foto-producida y el efecto adverso a los tejidos intactos, se reduce.

[0399] La forma *E* puede ser protegida químicamente por la adición de un grupo acilo voluminoso pero biodegradable, que se introduce en el anillo dicetopiperazina como una prodroga. Este grupo acilo puede ser escindido por la proteasa en el cuerpo. Por lo

240

tanto, el compuesto *E* acilado se mantiene antes de administración, después de administración se cambia a la forma *E* real, que puede migrar a la forma *Z bioactiva* por foto irradiación local.

[0400] El esquema sintético de esta forma acil-*E* de tBu-deshidroPLH se resume en la Figura 9.

EJEMPLO 7

Formulaciones Farmacéuticas de las Deshidrofenilahistinas Sintetizadas

1) Formulaciones Administradas Intravenosamente, por Goteo, Inyección, Infusión o Semejantes

[0401] A frascos que contienen 5 g de glucosa en polvo, se agregan a cada uno asépticamente 10 mg de un compuesto sintetizado por el método y sellan. Después de cargarse con nitrógeno, helio u otro gas inerte, los frascos se almacenan en un sitio frío, oscuro. Antes de uso, los contenidos se disuelven en etanol y agregan a 100 ml de una solución de agua con sal fisiológica al 0.85%. La solución resultante se administra como un método para inhibir el crecimiento de un tumor canceroso en un humano a quien que se le diagnostica tener este tumor entre aproximadamente 10 ml/día a aproximadamente 1000 ml/día, en forma intravenosa, por goteo o mediante una inyección subcutánea o intraperitoneal, como se

241

considere apropiado por aquellos con destreza ordinaria en la especialidad.

2) Formulación para Administrarse Oralmente O Semejantes

[0402] Una mezcla que se obtiene por mezclado completo de 1 g de un compuesto sintetizado por el método, 98 g de lactosa y 1 g de hidroxipropil celulosa, se forma en gránulos por cualquier método convencional. Los gránulos se secan y ciernen completamente para obtener una preparación de gránulos adecuada para empaque en botellas o por termo sellado. Las preparaciones de gránulos resultantes se administran oralmente entre aproximadamente 100 ml/día a aproximadamente 1000 ml/día, dependiendo de los síntomas, como se considere apropiado por aquellos con destreza ordinaria en la especialidad para tratar tumores cancerosos en humanos.

3) Formulación para Administrarse Tópicamente

[0403] La administración a un individuo de una cantidad efectiva del compuesto también puede lograrse tópicamente al administrar el o los compuestos directamente al área afectada de la piel del individuo. Para este propósito, el compuesto administrado o aplicado está en la forma de una composición que incluye un portador tópico farmacológicamente aceptable, tal como un gel, un ungüento, una loción o una crema, que incluye sin limitación, portadores tales como agua, glicerol,

242

alcohol, propilen glicol, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres de ácidos grasos o aceites minerales. Otros portadores tópicos incluyen petróleo líquido, isopropil palmitato, polietilen glicol, etanol (95%), polioxietilen monolaurato (5%) en agua, o lauril sulfato de sodio (5%) en agua. Otros materiales tales como anti-oxidantes, humectantes, estabilizantes de viscosidad y agentes similares pueden agregarse según sea necesario. Mejoradores de penetración percutáneos tales como Azone también pueden ser incluidos. Además, en ciertas instancias, se espera que el compuesto pueda colocarse dentro de dispositivos dispuestos en, sobre o bajo la piel. Estos dispositivos incluyen parches, implantes e inyecciones que liberan el compuesto en la piel, ya sea por mecanismos de liberación pasivos o activos.

EJEMPLO 8

Farmacología *In vitro* de KPU-2, KPU-35 y t-butil fenilahistina

[0404] Los estudios de eficacia *in vitro* realizados con KPU-2, KPU-35 y t-butil fenilahistina incluyen: A) un panel de seis líneas celulares de tumor, B) estudios en células de tumor resistentes a múltiples drogas, y C) estudios para determinar el mecanismo de acción.

243

A). Estudio de KPU-2, KPU-35 y t-butil fenilahistina en un panel de seis líneas de células de tumor

[0405] Las siguientes líneas celulares (fuente en paréntesis) se emplearon: HT29 (tumor de colon humano; ATCC; HTB-38), PC3 (tumor de próstata humana; ATCC; CRL-1435), MDA-MB- 231 (tumor de pecho humano; ATCC; HTB-26), NCI-H292 (tumor de pulmón de células no pequeñas humanas; ATCC;CRL-1848), OVCAR-3 (tumor de ovario humano; ATCC; HTB-161),B16-F10 (melanoma murino; ATCC; CRL-6475) y CCD-27sk (fibroblastos humanos normales; ATCC; CRL- 1475). Se mantuvieron células a densidades sub-confluentes en sus medios de cultivo respectivos.

[0406] Se realizaron ensayos de citotoxicidad como se describió anteriormente en el Ejemplo 4, utilizando fluorescencia de Resazurina como un indicador de viabilidad celular.

[0407] Los compuestos descritos son agentes efectivos contra una variedad de diferentes y distintas líneas de células de tumor. Específicamente, por ejemplo KPU-2 y KPU-35 fueron más efectivos en la línea celular de tumor HT-29, tanto en términos de potencia (activo en el intervalo nanomolar bajo) y eficacia (de mayor respuesta en términos del efecto citotóxico máximo); t-butil-fenilahistina exhibe su más grande potencia contra la línea de células de tumor PC-3, aunque la más grande

246

244

eficacia se exhibió contra la línea celular HT-29; KPU-2 y KPU-35 en general fueron 10-40 veces más potentes que t-butil-fenilahistina mientras que la eficacia fue similar para todos los tres compuestos en las diferentes líneas celulares de tumor; las líneas celulares de tumor HT-29, PC-3, MDA-MB-231 y NCI-H292 todas responden similarmente a los compuestos NPI, mientras que B16-F10 parece ser algo menos sensible. La t-butil-fenilahistina exhibió una diferencia marcada entre fibroblastos normales y las líneas de células de tumor, con una proporción en el intervalo de >20 - >100, excepto por la línea de células OVCAR-3.

Tabla 12 Actividad de KPU-2, KPU-35 y t-butol fenilahistina en el Monitoreo de Panel de Tumor

Línea Celular	KPU-2			KPU-35		
	Promedio	SD	n	Promedio	SD	n
HT-29 Colon						
IC_{50} nM	9.8	2.4	4	8.2	2.0	4
% de Citotoxicidad	82.5	5.3	4	81.3	4.0	4
PC-3 Próstata						

247

245

Línea Celular	KPU-2			KPU-35		
	Promedio	SD	n	Promedio	SD	n
IC_{50} nM	13.4	0.7	4	13.2	2.5	4
% de Citotoxicidad	60.3	2.1	4	56.8	1.0	4
MDA-MB-231 Pecho						
IC_{50} nM	13.8	1.9	3	9.7	4.2	4
% de Citotoxicidad	56.7	7.2	3	59.3	5.6	4
NCI-H292 Pulmón						
IC_{50} nM	17.5	1.1	4	15.9	1.1	4
% de Citotoxicidad	70.5	2.9	4	68.5	2.9	4
OVCAR-3 Ovario						
IC_{50} nM						
% de Citotoxicidad	>20,000 45.8	- 3.0	4 4	>20,000 39	- 2.2	4 4
B16-F 10 Melanoma						
IC_{50} nM	37.1	26.3	4	32.3	19.9	4
% de Citotoxicidad	71.8	2.5	4	72.0	2.2	4

246

Línea Celular	KPU-2			KPU-35		
	Promedio	SD	n	Promedio	SD	n
CCD-27sk Fibroblasto						
IC_{50} nM	9.2	2.9	4	7.4	2.6	4
% de Citotoxicidad	64.3	2.4	4	60.8	1.9	4

(CONTINUACIÓN)

Línea Celular	t-butil-fenilahistina		
	Promedio	SD	n
HT-29 Colon			
IC_{50} nM	420	473	3
% de Citotoxicidad	888	0.2	3
PC-3 Próstata			
IC_{50} nM	174	-	2
% de Citotoxicidad	59.5	-	2
MDA-MB-231 Pecho			
IC_{50} nM	387	-	2
% de Citotoxicidad	65.5	-	2
NCI-H292			

249

247

Pulmón			
IC_{50} nM	384	194	3
% de Citotoxicidad	65	5	3
OVCAR-3 Ovario			
IC_{50} nM	>20,000	-	2
% de Citotoxicidad	37	-	2
B16-F 10 Melanoma			
IC_{50} nM	736	650	3
% de Citotoxicidad	74	2	3
CCD-27sk			
Fibroblastos	>20,000	-	2
IC_{50} nM	45	-	2
% de Citotoxicidad			

B). Líneas Celulares Resistentes a Drogas

[0408] Uno de los retos principales en el uso de agentes quimioterapéuticos en oncología clínica es el desarrollo de resistencia al efecto de la droga por las células de tumor. Hay varios mecanismos para el desarrollo de resistencia, cada uno de los cuales tendrá efectos diferenciales en drogas quimioterapéuticas. Estos mecanismos incluyen incrementada expresión de bombas de evacuación dependientes de ATP tales como la P-glicoproteína codificada por *MDR1* o la resistencia de múltiples drogas asociada a proteína 1 codificada por

248

MRP1. Absorción de droga reducida, alteración de la diana de la droga, reparación creciente de daño de ADN inducido por droga, alteración de la ruta apoptótica y la activación de enzimas citocromo P450 son otros ejemplos de mecanismos por los cuales las células de cáncer se veulven resistentes a las drogas anticáncer. Los compuestos selectos se estudiaron en tres diferentes líneas celulares que exhiben dos diferentes mecanismos de resistencia; la sobre-expresión de la P-glicoproteína y actividad de topoisomerasa II alterada.

1) Par de Líneas de Células de Tumor de Sarcoma Uterino Humano: MES-SA (Sensible a Taxol) y MES-SA/Dx5 (Resistente a Taxol).

[0409] Esta línea celular expresa elevado mdr-1mRNA y P-glicoproteína (un mecanismo de bomba de extrusión). Pretratamiento con cicloesporina-A (CsA) bloquea P-glicoproteína y reinstala la actividad en la línea celular resistente por aquellos compuestos para los cuales la resistencia se debe a elevada P-glicoproteína.

[0410] Como puede verse en la Tabla 13, KPU-2, y KPU-35 tiene la misma potencia en la línea celular resistente que en la línea sensible y la potencia de t-butl-fenilahistina fue solo ligeramente reducida. Pretratamiento con cicloesporina A (CsA) no altera la potencia de los compuestos selectos. En contraste, taxol

249

fue virtualmente inactivo en la línea de células resistentes a MES-SA/DX5, mientras que este compuesto fue muy potente en la línea de células sensibles. Tratamiento con CsA restauró la sensibilidad a taxol de la línea celular MES-SA/DX5. La línea celular MES-SA/DX5 también mostró reducida susceptibilidad a etopósido (60 veces), doxorubicina (34 veces) y mitoxantrona (20 veces).

[0411] Estos datos indican que los efectos de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina no son susceptibles al mecanismo de resistencia relacionada al taxol (p-glicoproteína) en esta línea celular y que no ocurre resistencia cruzada de taxol a estos compuestos selectos en este modelo.

Tabla 13 Actividad de KPU-2 KPU-35, t-butil-fenilahistina y Taxol en Líneas de Células de Tumor de Sarcoma Uterino Humano Resistentes a Taxol MES-SA/DX5 Taxol y Sensibles a Taxol MES-SA

Compuesto de Estudio	Sensible a MES-SA		Resistente a MES-SA/DX5	
	Sin CsA	Pre-trat. CsA	Sin CsA	Pre-trat. CsA

252

200

	IC_{50} nM	IC_{50} nM	Proporción Sin CsA	IC_{50} nM	Proporción MES-SA	IC_{50} nM	Proporción Sin CsA
KPU-2							
Estudio I	8.5	-	-	10.5	1.2	-	-
Est. II	19.4	27.4	1.4	21.7	1.1	37.8	1.74
KPU-35							
Estudio I	6.6	-		5.2	0.8	-	-
Est. II	3.9	2.0	0.5	2.5	0.6	6.7	2.7
t-butil-fenila-histina							
Est. I	144	-	-	825	5.7	-	-
Est. III	122	162	1.3	694	4.3	622	0.9
Taxol							
Estudio I	4.4	-	-	>20,000	>455	-	-
Est. II	13.3	7.6	0.6	>>100	>>8	40	0.25
Est. III	7.3	2.8	0.4	>24,000	>3000	2.0	0.001

[0412] *Ver* también los datos adicionales presentados en la Figura 43.

251

2) Par de Líneas Celulares de Leucemia Promielocítica Aguda Humana: HL-60 (Sensible a Mitoxantrona) y HL-60/MX-2 (Resistente a Mitoxantrona)

[0413] Esta línea celular se considera que tiene propiedades de resistencia atípicas a drogas, con alterada actividad catalítica de topoisomerasa II sin sobre-expresión de P-glicoproteína.

[0414] Como puede verse en la Tabla 14, estos resultados indican que las potencias de los compuestos novedosos selectos son muy similares en las líneas celulares HL-60 sensibles y resistentes. En contraste, Mitoxantrona pierde eficacia por un factor de 24-veces en la línea celular resistente a HL-60/MX-2.

[0415] De esta manera, KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina no son susceptibles a los mismos mecanismos de resistencia que Mitoxantrona en esta línea celular, y no hay resistencia cruzada de Mitoxantrona a estos compuestos novedosos selectos en este modelo.

Tabla 14. Actividad de KPU-2, KPU-35, t-butil-fenilahistina y Mitoxantrona en el Par de Líneas Resistente y Sensible a Tumores de Leucemia Promielocítica Aguda Humana HL-60

Compuesto	HL-60 Sensible	HL-60 Resistente

252

	IC_{50} nM	IC_{50} nM	Proporción a Sensible
KPU-2	6.4	8.17	1.28
KPU-35	9.2	7.3	0.79
t-butil-fenilahistina	255	175	0.69
Mitoxantrona	202	4870	24.1

3). Par de Línea Celular de Carcinoma de Pecho Humano: MCF-7 (Sensible a Taxol) y MCF-7/ADR (Resistente a Taxol)

[0416] Este estudio involucra KPU-2 en comparación con taxol. KPU-2 demostró potencias similares tanto en miembros sensibles como resistentes de este par de líneas celulares. En contraste, el taxol virtualmente fue inactivo en la línea celular resistente mientras que hubo baja potencia nanomolar en la línea celular sensible (Tabla 15).

[0417] Estos estudios confirman en una línea celular de tumor humano diferente, que la resistencia a taxol no se transfiere a KPU-2.

Tabla 15. Actividad de KPU-2 y Taxol en el Par de Líneas Celulares Resistente y Sensible a Carcinoma de Pecho Humano MCF-7

Compuesto	MCF-7 Sensible	MCF-7/ADR Resistente

253

	IC_{50} nM	IC_{50} nM	Proporción a Sensible
KPU-2	39.6	27.4	0.69
Taxol	2.6	>>100	>>38

C) Estudios del Mecanismo de Acción

1). Acción en Función de Microtúbulos

[0418] Células endoteliales de vena umbilical humana (HuVEC de Cambrex) se emplearon en este estudio, para evaluar los efectos de KPU-2 y t-butil-fenilahistina en comparación con colchicina y taxol en tubulina por tinción por alfa-tubulina.

[0419] Treinta minutos de exposición a KPU-2, t-butl-fenilahistina o colchicina (todos a 2 μM) inducen despolimerización de microtúbulos como se indicó por la falta de estructura de microtúbulos intacta en contraste con la observada en el control de DMSO y formación de ampollas de membrana celular (una clara indicación de apoptosis) en las células HuVEC, mientras que taxol no induce despolimerización de microtúbulos bajo estas condiciones. La colchicina es un agente despolimerizante de microtúbulos conocido mientras que el taxol es un agente estabilizante de tubulina. Resultados similares se obtienen cuando células CCD-27sk se exponen a KPU-2 o colchicina.

254

2). Inducción de Apoptosis

[0420] Apoptosis y su des-regulación juegan un papel importante en oncología; la inducción selectiva del ciclo de muerte celular programado en células de tumor es la meta de muchos programas para descubrimiento de drogas quimioterapéuticas. Esta inducción de apoptosis puede demostrarse por diferentes métodos, incluyendo la formación de ampollas en membrana celular característica, fragmentación de ADN, hiperfosforilación del factor antiapoptósico Bcl-2, activación de la cascada caspasa y escisión del poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP).

[0421] Los signos característicos de muerte celular apoptósica incluyen formación de ampollas en membrana celular, ruptura de núcleos, encogimiento de célula y condensación y finalmente muerte celular, muy distintivos de muerte celular necrótica. KPU-2 induce los cambios morfológicos típicos asociados con las etapas tempranas de apoptosis en células de tumor de próstata humano. Un hallazgo similar fue también clara en el tratamiento de células HuVEC con KPU-2.

3). **Fragmentación de ADN**

[0422] Una característica de etapa posterior de la apoptosis es escisión de ADN internucleosomal que resulta en un patrón de escalera distintivo que puede visualizarse por electroforesis en gel. Este enfoque se

255

empleó para estudiar el efecto de KPU-2 en formación de escala de ADN (DNA) en células Jurkat (línea de leucemia de células T humana) en comparación con halimida y deshidrofenilahistina (KPU-1). Formulación de escalera de ADN inducida por KPU-2 a la concentración 1 nM mientras que halimida y KPU-1 fueron mucho menos potentes.

4). Activación de la Cascada Caspasa

[0423] Varias enzimas en la cascada caspasa se activan durante apoptosis, incluyendo Caspasa-3, -8 y -9. La actividad de Caspasa-3 se supervisa en células Jurkat después de tratamiento con KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina.

[0424] Los resultados indican que caspasa-3 se activa en una forma dependiente de dosis por tratamiento con todos los tres compuestos en una forma similar a halimida. La activación de caspasa-3 ocurrió sobre un intervalo de concentración similar para IC_{50}s de citotoxicidad en la línea celular Jurkat (Tabla 16).

Tabla 16 Citotoxicidad de KUP-2, KUP-35 y t-butil-fenilahistina en Células Jurkat

Compuesto NPI	Citotoxicidad

256

	Potencia IC_{50} nM	Eficacia % de Muerte Celular
KPU-2	11	94
KPU-35	5	93
t-butil-fenilahistina	165	93
Mitoxantrona	41	99

5). Escisión de Polimerasa Poli (ADP-ribosa) (PARP) en Células Jurkat

[0425] Para estimar la habilidad de estos compuestos para inducir apoptosis en células Jurkat, se supervisó la escisión de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). PARP es una proteína nuclear de 116 kDa que es uno de los objetivos o dianas intracelulares principales de Caspasa-3. La escisión de PARP genera un producto estable de 89 kDa, y este proceso puede supervisarse fácilmente por técnica western. La escisión de PARP por caspasas es uno de los sellos característicos de apoptosis, y como tal sirve como un marcador excelente para este proceso. KPU-2 a 100 nM induce escisión de PARP en células Jurkat, 10 horas después de exposición de las células al compuesto. KPU-2 parece ser más activo que cualquiera de halimida o KPU-1.

6). Permeabilidad Vascular Mejorada en Células HuVEC

257

[0426] Compuestos que despolimerizan microtúbulos (es decir combretastatina A-4-fosfato, ZD6126) se ha mostrado que inducen colapso vascular en tumores *in vivo*. Este colapso vascular se precede por una inducción rápida de permeabilidad de células vasculares inicialmente a electrolitos y poco después a grandes moléculas. La permeabilidad mejorada de células HuVEC a un dextrano etiquetado fluorescente se utiliza como un ensayo substituto para colapso vascular.

[0427] KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina todas rápidamente (dentro 1 hora) inducen significante permeabilidad de monocapa tHuVEC, en una proporción similar a colchicina. El agente estabilizante de microtúbulos taxol fue inactivo en este ensayo (Figura 12).

7). Perfil en un Tamiz Amplio de Quinasa

[0428] KPU-2 se monitoreo inicialmente a una concentración de 10 μM en un panel de 60 quinasas diferentes; la concentración de ATP fue 10 μM. Cuatro quinasas se inhibieron en más de 50% en el tamizado primario y las IC_{50} se determinaron en el tamizado secundario se presentan en la Tabla 17. Todos los valores IC_{50} están en el intervalo micromolar bajo, que indican que la inhibición de estas quinasas no se

258

relacionan a las bajas actividades nanomolares observadas por citotoxicidad de células de tumor.

Tabla 17. Actividad de KPU-2 contra Quinasas Selectas

Quinasa	IC50 (μM)
CDK1/Ciclina B (humano)	10.1
c-RAF (humano)	8.9
JNK3 (rata)	6.8
Lyn (ratón)	11.1

EJEMPLO 9

Farmacología *In Vivo*

[0429] Estudios preliminares con KPU-2 se realizaron utilizando los modelos de semi-injerto de MX-1 (pecho) y HT-29 (colon) y el modelo de tumor de leucemia murino P-388, en el ratón. Otros modelos de tumor seleccionados en base a la actividad en el panel de tumor *in vitro* fueron las líneas celulares DU-145 (próstata), MCF-7 (pecho), y A549 (pulmón). El tumor pancreático humano (MiaPaCa-2) también se incluyó. Los compuestos novedosos se estudiaron como monoterapia y en combinación con un agente quimioterapéutico clínicamente empleados. La dosis de los compuestos novedosos selectos se determinaron a partir de la prueba de tolerabilidad aguda (Dosis Máxima Tolerada (MTD = Maximally Tolerated Dose))

259

y se ajustaron de ser necesario durante cada estudio. Las dosis de los agentes quimioterapéuticos empleados clínicamente se seleccionaron en base a estudios históricos.

[0430] KPU-2 fue el primer compuesto a estudiarse en estos cinco modelos de tumor. Siguiendo los resultados iniciales de este estudio, todos los tres compuestos se compararon en los modelos de xeno-injerto HT-29 de tumor de colon humano, DU-145 de próstata humana y MCF-7 de tumor de pecho humano.

[0431] Los modelos anteriores todos utilizan la técnica de implante de xenoinjerto subcutáneo y todos son potencialmente sujetos a efectos selectivos de un compuesto en la vasculatura subcutánea que produce una actividad anti-tumor amplificada (o aparente). A fin de superar esta posibilidad, se han incorporado en la investigación otros dos modelos de tumor. Uno de estos es la observación de metástasis de pulmón después de la inyección intravenosa de células de tumor de melanoma de ratón B16-F10. El otro modelo es el implante de células de tumor de pecho humano MDA-231 en el panículo graso mamario de ratón. Mientras que este último modelo es un modelo de xeno-injerto, la vasculatura subcutánea no juega un papel.

Métodos

260

1). Modelos de Xenoinjerto

[0432] Los animales empleados fueron de (excepto como se indique para estudios individuales): ratones desnudos hembra (*nu/nu*) entre 5 y 6 semanas de edad (~20g, Harlan); tamaño de grupo fue 9-10 ratones por grupo, a menos de que se indique de otra forma.

[0433] Las líneas celulares empleadas para implante de tumor fueron: tumor de colon humano HT-29; tumor de pecho humano MCF-7; tumor pulmonar de células no pequeñas humanas A549; tumor de páncreas humano MiaPaCa-2; tumor de próstata humano DU-145.

[0434] Compuestos novedosos selectos se administraron como monoterapia mediante la ruta intraperitoneal (i.p.) a las dosis indicadas para el estudio individual; para los estudios en combinación, los agentes de quimioterapia de referencia selectos se inyectaron 15-30 min antes del compuesto.

[0435] Los vehículos empleados en estos estudios fueron: DMSO al 12.5%, Cremaphor al 5% y aceite de cacahuate al 82.5% para los compuestos novedosos selectos; (1:3) Polisorbato 80: etanol al 13% para taxotere; (1:1) Cremaphor: etanol para paclitaxel; para irinotecan hidrocloruro cada ml de solución contiene 20 mg de hidrocloruro de irinotecan, 45 mg de polvo de NF sorbitol, y 0.9 mg de ácido láctico, el pH se ajusta a

261

7.4 con NaOH o HCl. Diluciones de salino se emplean para lograr las concentraciones de inyección empleadas para los compuestos de referencia.

Modelo de tumor de colon humano HT-29

[0436] Se implantaron subcutáneamente (s.c.) animales por trocar con fragmentos de tumores HT-29 recolectados de tumores de crecimiento s. c. en anfitriones ratones desnudos. Cuando el tamaño de tumor alcanzó 5 mm x 5 mm (aproximadamente 10-17 días) los animales se formaron en grupos de tratamiento y de control. Los ratones se pesaron dos veces semanalmente y se obtuvieron medidas de tumor utilizando compáses de calibre semanalmente dos veces, partiendo de Día 1. Las mediciones de tumor fueron convertidas en peso de tumor en mg estimado utilizando la fórmula $(W^2xL)/2$. Cuando el peso de tumor estimado del grupo de control alcanzó un promedio de 1000 mg, los ratones se pesaron, sacrificaron y el tumor se retiró. Los tumores se pesaron y el peso promedio de tumor por grupo se calculó y se determinó la inhibición de crecimiento de tumor (TGI = tumor growth inhibition) para cada grupo (100% menos el cambio en el peso promedio del tumor tratado/el cambio en el peso promedio de tumor de control x 100.

[0437] En este modelo, a menos que se note de otra forma para el estudio individual, los compuestos

264

262

novedosos selectos se inyectaron intraperitonealmente cada tercer día por 15 días [1, 4, 8, 11 y 15 (q3dx5)]; CPT-11 se administró intraperitonealmente los días 1, 8 y 15(qwx3).

Modelo de tumor de pecho humano MCF-7

[0438] Ratones desnudos hembra (~20 g) se implantaron s.c. con gránulos de estrógeno de liberación de 21 días (0.25 mg), 24 horas antes del implante s.c. con fragmentos de tumor MCF-7 (recolectados de tumores s.c. en anfitriones de ratones desnudos). El estudio procedió como se describe en el modelo HT-29, utilizando taxotere como el agente de quimioterapia estándar.

[0439] En este modelo, a menos que de otra forma se anote para el estudio individual, los compuestos novedosos se inyectaron mediante la ruta intraperitoneal diariamente, los Días 1-5, inclusive (qdx5); se administró intravenosamente taxotere los Días 1, 3 y 5 (qodx3).

Modelo de tumor de pulmón humano A549

[0440] En animales s.c. se implantaron por trocar con fragmentos de tumores A549 recolectados de tumores de crecimiento s.c. en anfitriones de ratones desnudos. Cuando el tamaño del tumor alcanza 5 mm x 5 mm (aproximadamente 10-17 días) los animales se aparearon en grupos de tratamiento de control. El resto del estudio

263

procedió como se describe para el modelo HT-29, utilizando taxotere y CPT-11 como los agentes de quimioterapia estándar.

[0441] En este modelo, a menos que de otra forma se anote para el estudio individual, los compuestos probados se administraron mediante la ruta intraperitoneal en un programa de dosis aq3dx5 para la combinación CPT-11 o en un régimen de dosis qdx5 para la combinación con taxotere; CPT-11 se administró mediante la ruta intraperitoneal en un programa qwx3; taxotere se administró intravenosamente en un régimen de dosis qodx3.

Modelo de tumor de páncreas humano MiaPaCa-2

[0442] En animales se implantaron s.c. por trocar fragmentos de tumores MiaPaCa-2 recolectados de tumores de crecimiento s.c. en anfitriones de ratones desnudos. Cuando el tamaño del tumor alcanza 5 mm x 5 mm (aproximadamente 10-17 días) los animales se aparearon en grupos de tratamiento de control. El resto del estudio procedió como se describe para el modelo HT-29, utilizando gemcitabine como el agente de quimioterapia estándar.

[0443] En este modelo, a menos que de otra forma se anote para el estudio individual, los compuestos de prueba administraron cada tercer día mediante la ruta intraperitoneal los Días 1, 4, 7, 10 y 15(q3dx5);

264

gemcitabine mediante la ruta intraperitoneal los Días 1, 4, 7 y 10 (q3dx4).

Modelo de tumor de próstata humana DU-145

[0444] Ratones macho se implantaron s.c. por trocar con fragmentos de tumores DU-145 recolectados de tumores de crecimiento s.c. en anfitriones de ratones desnudos macho. Cuando los tumores alcanzaron ~5 mm x 5 mm (a aproximadamente 13-17 días) los animales se aparearon en grupos de tratamiento de control. El resto del estudio procedió como para el modelo HT-29, utilizando taxotere como el agente de quimioterapia estándar.

[0445] En este modelo, a menos que de otra forma se anote para el estudio individual, los compuestos de prueba se administraron mediante la ruta intraperitoneal los Días 1, 3, 5, 8 y 11 (q3dx5); taxotere se administró intravenosamente los Días 1, 3 y 5 (q2dx3).

2). Modelos de tumor de implante no subcutáneo

[0446] Los animales empleados fueron: ratones desnudos hembra (*nu/nu*) (estudio MDA-231) o ratones B6D2F1 (estudios B16-F10) entre 5 y 6 semanas de edad (~20g, Harlan); el tamaño de grupo fue de 10 ratones por grupo a menos de que de otra forma se indique.

265

[0447] Las líneas celulares empleadas fueron: tumor de pecho humano MDA-MB-231 y células de melanoma murino B16-F10.

[0448] Compuestos NPI se administraron como monoterapia mediante la ruta intraperitoneal a las dosis indicadas para el estudio individual; para los estudios de combinación, los agentes de quimioterapia de referencia selectos se inyectaron 15-30 min antes del compuesto NPI.

Tumor de pecho humano MDA-231

[0449] Ratones desnudos hembra se inyectaron en el panículo o almohadilla grasa mamaria con $2x10^6$ células MDA-231 recolectadas de cultivo de células *in vitro*. Cuando el tamaño de tumor alcanzó 5 mm x 5 mm (aproximadamente 14-28 días), los animales se aparearon en grupos de tratamiento de control. El estudio procedió como se describe para el modelo HT-29, utilizando paclitaxel como el agente de quimioterapia estándar.

[0450] En este modelo, a menos que de otra forma se anote para el estudio individual, los compuestos de prueba se administraron mediante la ruta intraperitoneal los Días 1, 4, 8, 11 y 15(q3dx5); paclitaxel se administró mediante la ruta intraperitoneal los Días 1-5(qdx5).

Modelo de melanoma murino metastásico B16-F10

268

266

[0451] Ratones recibieron células B16-F10 (preparadas de un cultivo de células *in vitro* de células B16-F10) por la ruta iv el Día 0. El Día 1, Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de control y se inició el tratamiento. Los ratones se pesaron dos veces semanalmente, partiendo el Día 1. Todos los ratones se sacrifican el Día 16, se retiran los pulmones, pesan y las colonias de superficie se contaron. Los resultados se expresan como promedio ratones tratados/promedio de colonias de ratones de control (T/C) x 100%). La inhibición de crecimiento de metástasis (MGI = metastasis growth inhibition) es el número sustraído del 100%. Paclitaxel fue el agente de quimioterapia estándar empleado en este estudio.

[0452] En este modelo, a menos que de otra forma se anote para el estudio individual, los compuestos de prueba se administran mediante la ruta intraperitoneal los Días 1-5 (qdx5); paclitaxel se administró intravenosamente los Días 1-5(qdx5).

[0453] Cuando sea apropiado ($n \geq 3$), se presentan resultados como promedios ± SEM. Análisis de estudios estadísticos con varios grupos se realizan utilizando ANOVA con la prueba post Neuman-Keuls, a menos que se indique de otra forma. Una prueba-t de una cola también se utiliza con base en la hipótesis que el

269

267

compuesto o droga o la combinación reducirá el crecimiento del tumor.

Resultados

Estudios en el modelo de xenoinjerto de tumor de colon humano HT-29

1. Evaluación *In Vivo* de KPU-2 +/-CPT-11 en el modelo de xenoinjerto tumor de colon humano HT-29

[0454] Este estudio estima cambios en concentración de dosis y régimen de dosis para KPU-2 solo y en combinación con un quimioterapéutico relevante CPT-11 en el modelo HT-29.

[0455] KPU-2 se administra a dosis de 7.5 mg/kg ip diariamente por cinco días (qdx5), 3.75 mg/kg ip bid por cinco días, 7.5 mg/kg ip cada segundo día por 10 días (qodx5) y 7.5 mg/kg ip cada tercer día por 15 días(q3dx5). La combinación de CTP-11 con NPI- 2358 a una dosis de 7.5 mg/kg ip q3dx5 resulta en un efecto significativamente mayor que para cualquier compuesto solo que resistió la duración del estudio (Figura 13). Esas observaciones durante la porción en la vida de la duración del estudio se confirmaron por los pesos de tumor finales de grupo promedio en la autopsia, para la cual sólo el grupo en combinación exhibió un peso de tumor significativamente menor estadísticamente que los de control. Además, la diferencia entre los pesos

268

promedio de tumor de la terapia de combinación y los grupos de monoterapia CPT-11 fue estadísticamente significante (Figura 14). Cuando los pesos de tumor final individuales en la autopsia se examinan, es claro el mayor efecto de la co-terapia (Figura 14). TGI de co-terapia fue 78% en comparación con 38.9% para CPT-11 solo. TGI para el grupo de terapia combinada excede el criterio NCI de 58% para un resultado positivo.

2. Estudios de quimioterapia estándar KPU-2 +/- contra cinco modelos de xenoinjerto de tumor humano

[0456] Este estudio consiste de cinco ramificaciones diferentes, cada una con su propio protocolo, sincronización, régimen de dosis y compuesto de referencia. Cada ramificación se considerará dentro de la presentación del modelo de tumor particular.

[0457] El objetivo de la ramificación HT-29 del estudio era investigar una dosis ligeramente superior de KPU-2 (10 mg/kg ip q3dx5) en el modelo de xenoinjerto de tumor de colon humano HT-29 en comparación con aquellos empleados en el estudio descrito anteriormente, en donde se observó una sinergia marcada entre KPU-2 (7.5 mg/kg ipq3dx5) y CPT-11 (100 mg/kg ipqwx3).

[0458] Como puede observarse en la Figura 15, la combinación de KPU-2 y CPT-11 en este modelo resulta en una sinergia marcada en la inhibición de crecimiento

269

de tumor, con el crecimiento de tumor que es casi completamente inhibido hasta el día de tratamiento 29 en el grupo de terapia de combinación. La terapia combinada mantiene eficacia y el crecimiento de tumor estimado para este grupo fue significativamente menor que para cualquier grupo de monoterapia. De acuerdo con esto, la administración de KPU-2 y CPT-11 inhibe el crecimiento de tumor y es tratamiento de antitumor efectivo.

[0459] Las observaciones de la porción en vida del estudio (crecimiento de tumor estimado, Figura 15) son sostenidas por la medición de los pesos de los tumores cortados en la autopsia (Figura 16). Los pesos de tumor para el grupo de combinación fueron significativamente menores que los controles ($p < 0.01$), como los pesos de tumor para CPT-11 solo ($p < 0.05$).

[0460] Cuando los pesos de tumor final individual se consideran (Fig 16), el tamaño de tumor para el grupo de combinación fue generalmente más pequeño que para los otros grupos de tratamiento o de control. TGI del grupo de combinación fue 65.8%, indicando un efecto positivo por el criterio NCI, mientras que la monoterapia no alcanza el criterio NCI de >58%.

3. Estudio de actividad de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina en el estudio de xenoinjerto de tumor de colon humano HT-29

272

270

[0461] Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 17 y la Tabla 18. Los grupos de terapia en combinación todos indican una sinergia marcada entre los compuestos novedosos y CPT-11. Los pesos de tumor individuales demostraron la efectividad del tratamiento de co-terapia (Figura 18). En cada caso, TGI para el grupo combinado sobrepasa el criterio de NCI para un efecto positivo, mientras que TGI para la monoterapia CPT-11 no alcanza este nivel.

Tabla 18.

Compendio de estudios realizados en el modelo de tumor de colon humano HT-29.

Descripción de Estudio		**Compuesto NPI**		**Agente quimioterapéutico**	
Estado número	**Punto extremo**	**Número, mg/kgip**	**Resulta-dos TGI %**	**Nombre, dosis**	**Resul-tado TGI%**
2164	TGI	KPU-2 7.5 qdx5 7.5 q3dx5	Sin Efecto Sin Efecto	CPT-11 100 ip qwx3	39*
2288	TGI	KPU-2	Sin	CPT-11	36.5*

271

Descripción de Estudio		Compuesto NPI		Agente quimioterapéutico	
Estado número	Punto extremo	Número, mg/kgip	Resulta-dos TGI %	Nombre, dosis	Resul-tado TGI%
		10→7.5 q3dx5	Efecto	100 ip qwx3	
2139	TGI	KPU-2 7.5 q3dx5	Sin Efecto	CPT-11 100 ip qwx3	32.7
2139	TGI	KPU-35 10→7.5 q3dx5	Sin Efecto	CPT-11 100 ip qwx3	32.7
2139	TGI	t-butil-fenila-histina 30 q3dx5	Sin Efecto	CPT-11 100 ip qwx3	32.7

(CONTINUACIÓN)

Descripción de Estudio	Combinación	Comentarios

272

Estado número	Resultado TGI%	Excede el criterio NCI (TGI≥58 %)	
2164	78 **;#	Combinación	Sinergia
2288	65.8 **	Combinación	Sinergia Ver Texto
2139	80.7 **,#	Combinación	Sinergia
2139	83.3 **,##	Combinación	Sinergia 1 + Día 13 1 + Día 27
2139	77.7 *,#	Combinación	Sinergia

*p <0.05 vs Control; **p <0.01 vs Control; # p <0.05 vs CPT-11 Solo; ## p <0.01 vs CPT-11 Solo;

+ = Número de Muertes

4. Compendio de los efectos de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina en combinación con CPT-11 en el modelo de xenoinjerto de tumor de colon humano HT-29

[0462] Cuando se combina con CPT-11, KPU-2 mejora el efecto de CPT-11, el agente quimioterapéutico estándar, a un nivel que excede en mucho el criterio NCI de TGI ≥58% para un efecto positivo. Los resultados

273

generados en los tres estudios son muy comparables tanto para observaciones en vida (Figura 19) como para los pesos de los tumores cortados en la autopsia (Figura 20).

Estudios en el modelo de xenoinjerto de tumor de próstata humano DU-145

[0463] Dos estudios se han completado con este modelo: el primer estudio involucra copiar solo y en combinación con taxotere; el segundo estudio comparó KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina solos y en combinación con taxotere.

1. Efecto de KPU-2 en Combinación con Taxotere en el Modelo de Xenoinjerto de Tumores de Próstata Humana DU-145

[0464] Como puede verse de los datos obtenidos durante la porción en vida de este estudio (Fig. 21), el tratamiento más efectivo del tumor de próstata humano DU-145 fue una terapia combinada de KPU-2 más taxotere. El efecto del tratamiento fue más pronunciado al inicio del estudio y parece que se reduce conforme avanza el estudio. De los días de tratamiento 20-27, la terapia de combinación proporciona una TGI aparente que excede el criterio NCI (TGI $\geq$58%), y el peso de tumor estimado de la terapia combinada fue significativamente menor que para cualquier mono-terapia.

274

2. Actividad en KPU-2 KPU-35 y t-butil-fenilahistina solo en Combinación con Taxotere en el Modelo de Xenoinjerto de Próstata Humana DU-145

[0465] Con base en los datos obtenidos con KPU-2 en combinación con taxotere en el estudio descrito anteriormente, un segundo estudio que compara KPU-2 con KPU-35 y t-butil-fenilahistina solo y en combinación con taxotere se inició.

[0466] Las observaciones realizadas durante la porción en vida de este estudio indican que la combinación ya sea de KPU-2 o KPU-35 con taxotere tiene mayor reducción en crecimiento de tumor que para taxotere solo (Figura 22). El crecimiento de tumor fue casi completamente bloqueado por KPU-35 en combinación con taxotere.

[0467] Los pesos de tumores cortados en autopsia confirmaron las observaciones realizadas durante el segmento en vida del estudio. La combinación de cualquiera de KPU-2 (Figura 23) o KPU-35 (Figura 24) con taxotere, fue significativamente mas efectiva que taxotere solo para bloquear el crecimiento de tumor. En el caso de KPU-35, tres de diez ratones mostraron evidencia por encogimiento de tumor. Los índices de inhibición de crecimiento de tumor indican una inhibición marcada de de crecimiento de tumor para KPU-2 (grupo

275

promedio = 74.1%) y un casi total bloqueo para KPU-35 (grupo promedio = 92.5%). Taxotere solo no alcanza el criterio establecido por NCI para un efecto positivo (TGA >58%).

5. Estudios en el Modelo de xenoinjerto de Tumor de Pecho Humano MCF-7

[0468] Este estudio compara los efectos de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina en el modelo de xenoinjerto de tumor de pecho humano MCF-7. Las dosis de los compuestos se administraron los días 1, 2, 3, 4, y 7; taxotere se administra los días 1, 3 y 7.

[0469] Los compuestos novedosos selectos tienen activación temprana, efectos estadísticamente significantes cuando se emplean en combinación con taxotere en ese modelo, aparentemente en forma casi completa bloquea el crecimiento de tumor estimado. (Figura 25). De los tres compuestos, KPU-2 parece ser el mas efectivo, con t-butil-fenilahistina que también exhibe una potenciación significante de taxotere.

6. Estudios en Modelo de Xenoinjerto de Tumor Pulmonar de Células Non Pequeñas Humanas A549

[0470] Las observaciones en vida durante su estudio (Figura 26) indican que la combinación de KPU-2 (7.5 mg/kg ip, qdx5) con taxotere, resultó en una inhibición marcada de crecimiento de tumor en comparación

278

276

con el control de cualquier grupo de monoterapias. Eso se confirmó por los pesos de tumor de autopsia, ya que el promedio del grupo de co-terapia fue significativamente menor que el de taxotere solo o el grupo de control (Figura 27). os pesos de tumor de grupo de co-terapia formaron un enjambre de bajos pesos de tumor,indicando la consistencia de efecto.

[0471] Cuando se calcula el índice de crecimiento de tumor, el grupo de co-terapia tuvo un TGI de 74.4% en comparación con el grupo de control en exceso sobado del criterio NCI para un efecto positivo (TGI ≥58%). Taxotere solo tuvo TGI de 26.1%.

7. Estudios en Modelo de Xenoinjerto Ortotópico de Tumor de Pecho Humano MDA-231

[0472] Este modelo involucra la colocación del tejido de tumor humano en el panículo o almohadilla grasa mamaria de ratón, un sustituto del ambiente natural. De esta manera, la posibilidad de un efecto positivo debido a una acción específica en el lecho vascular subcutáneo se evita. Este estudio comparó el efecto de KPU-2 (7.5 mg/kg ip, q3dx5) solo y en combinación con paclitaxel (16 mg/kg ip, qdx5).

[0473] A tres semanas en el estudio hubo una inhibición significante del crecimiento de tumor en el grupo de terapia en combinación, un efecto altamente

~~276~~

277

significante. Ese efecto parece ser más marcado que para taxotere solo (Figura 28).

8. Estudios en el Modelo de Tumor Metastásico B16 F10 de Melanoma Murino

[0474] Este estudio examinó el efecto de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina solos y en combinación con paclitaxel en el numero de metástasis que aparecen en la superficie del pulmón 16 días después de la inyección intravenosa de células de melanoma B16 F10 al ratón. Este modelo no es un modelo de xenoinjerto; sin embargo no involucra un alto grado de vacularización en la masa de tumor.

[0475] En este modelo, el suplemento más efectivo fue KPU-2 solo (Figura 29), que tiene un conteo de metástasis promedio de aproximadamente 10% menor que para paclitaxel (MGIs de 41.6% y 35.0 %, respectivamente). Mientras que ese estudio no establece por sí mismo que la terapia de combinación es más efectiva que la mono-terapia, indica que KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilahistina son más efectivos en tumores altamente vascularizados.

EJEMPLO 10

Ensayos para Actividad contra Hongos Patogénicos

[0476] La actividad comparativa de una deshidrofenilahistina o su análogo contra hongos

280

278

patogénicos, respecto a compuestos antifungales conocidos descritos anteriormente para utilizar en determinar la deshidrofenilahistina o su valor AF/IS de análogo, se mide directamente contra el organismo fungal, por ejemplo por adaptación de placa de micro-titulación del método de macro-dilución de caldo NCCLS descrito en *Diagn Micro and Infect Diseases* **21**:129-133 (1995). La actividad antifungal también puede determinarse en modelos de animales enteros de infección con fungal. Por ejemplo, se puede emplear el modelo de razón trazado con esteroides de mucormicosis pulmonar (Goldaill, L. Z. & Sugar, A.M. 1994 *J Antimicrob Chemother* **33**:369-372). A manera de ilustración, en estos estudios, una cantidad de animales no se les da dehidrofenilahistina o su análogo, diversas dosis de dehidrofenilahistina o su análogo (y/o) combinaciones con uno o más otros agentes antifungales (o un control positivo) por ejemplo Anfotericina B), respectivamente empezando antes, al tiempo de, o subsecuente a la infección con el hongo. Los animales pueden tratarse una vez cada 24 horas con la dosis selecta de dehidrofenilahistina o su análogo, control positivo o vehículo solo. El tratamiento se continúa por un número predeterminado de días, por ejemplo hasta diez días. Los animales se observaron por cierto tiempo después del periodo de tratamiento, por ejemplo para un

279

total de tres semanas, con mortalidad que se estima diariamente. Los modelos pueden involucrar modelos de infección sistémica, pulmonar, vaginal y otros con o sin otros tratamientos (por ejemplo tratamiento con esteroides) diseñado para imitar a un sujeto humano susceptible a infección.

[0477] Para ilustrar adicionalmente, un método para determinar las eficacias terapéuticas *in* vivo (ED_{50}, por ejemplo, expresadas en mg de dehidrofenilahistina o su análogo/kg de sujeto) es un sistema de modelo de roedor. Por ejemplo, un ratón se infecta con el patógeno fungal tal como por infección intravenosa con aproximadamente diez veces la dosis letal 50% del patógeno (10^6 *células de C. albicans/ratón)*. Inmediatamente después de la infección fungal, los compuestos de dehidrofenilahistina se suministran al ratón a un volumen de dosis predeterminada. ED_{50} se calcula por el método de Van der Waerden (*Arch Exp Pathol Pharmakol* 195:389-412, 1940) a partir de la tasa de supervivencia registrada el 20° día post-infección. En general, animales de control sin tratar mueren de 17 a 13 días posteriores a la infección.

[0478] En otras modalidades ilustrativas, *C. albicans* Wisconsin (C43) y *C. tropicalis* (C112), desarrolladas en placas inclinadas de agar dextrosa

282

280

Sabouraud (SDA) por 48 h a 28 grados C, se suspenden en salino y ajustan a 46% de transmisión a 550 nm en un espectrofotómetro. El inóculo se ajusta adicionalmente por hematocitómetro y confirma por conteo de placas desde aproximadamente 1 o 5 x 10^7 CFU/ml. Ratones CF-1 se infectan por inyección de 1 o 5 x 10^6 CFU en la vena de la cola. Agentes antifungales se administran intravenosamente o subcutáneamente en etanol: agua (10:90), 4 h posteriores a infección y una vez diariamente después por 3 o 4 días más. La supervivencia se supervisa diariamente. ED_{50} puede definirse como aquella dosis que permite 50% de supervivencia de ratones.

EJEMPLO 11

Evaluación de Actividad Antimicótica

[0479] Benzimidazoles y griseofulvina son agentes anti-tubulina capaces de ligar a microtúbulos fungales. Una vez ligados, estos compuestos interfieren con la división celular y transporte intercelular en organismos sensibles, resultando en muerte celular. Comercialmente, los benzimidazoles se emplean como agentes fungicidas en medicina veterinaria y control de enfermedades de plantas. Una amplia variedad de especies fungales incluyen *Botrytis cinerea*, *Beauveria bassiana*, *Helminthosporium solani*, *Saccharomyces cerevisiae* y

291

Aspergillus son susceptibles a estas moléculas. Consideraciones respecto a toxicidad y creciente resistencia a drogas sin embargo ha impactado negativamente su uso. La griseofulvina se emplea químicamente para tratar infecciones de tiña en la piel, cabello y uñas, provocadas por *Tricofiton* sp., *Microsporum* sp., y *Epidermofiton, floccosum*. Su espectro antifungal sin embargo se restringe esta clase de organismos fungales. La genotoxicidad también es un efecto secundario significante. Terbinafina, mientras que es un tratamiento de primera línea alterno es más costoso. Además, la resistencia clínica recientemente se ha observado en *Trichophyton rubrum* (el agente causativo mayor para todas las infecciones de dermatofitos).

[0480] En *Candida albicans*, la formación de microtúbulos/micro-filamentos se afecta cuando las células se exponen a los inhibidores de microtúbulos nucodazol y cloropropano. Estos resultados validan adicionalmente la exploración de inhibidores de sitio de esqueleto como agentes anti-micóticos efectivos. De acuerdo con esto, varios de los compuestos aquí descritos se evaluaron para actividad anti-micótica.

[0481] Específicamente, los compuestos descritos se evaluaron en paralelo con inhibidores de microtobulina comerciales disponibles así como agentes

282

antifungales reconocidos. Los compuestos de prueba y controles empleados en este estudio: (-)-Fenilahistina, KPU-1, KPU-2, KPU-11 y KPU-17, KPU-35, t-butil fenilahistina, Colchicina (inhibidor de microtubulina, deshila aprobado contra 3 aislados de Candida) Benomil (inhibidor de microtubulina, de ser aprobado contra 3 aislados de *Candida*) Griseofulvina (inhibidor de microtubulina, comercial y control antibiótico para prueba contra 6 aislados de dermatófitos), Amfotericina B (controla antibiótico para prueba contra 3 aislados de *Candida*), Itraconazol (controla antibiótico para prueba contra dos aislados de *Aspergillus*).

[0482] Microorganismos con los que estos compuestos fueron probados, incluyen: *Candida albicans, Candida glabrata, Aspergilus fumigatus, Trichofiton rubrum, Trichofiton mentagrofites, Epidermofiton floccosum*. Excepto por *Candida glabrata* (un aislado) dos aislados de tal especie fueron probados.

[0483] La prueba de susceptibilidad antifungal se logró de acuerdo con los métodos establecidos en National Committee for Clinical Laboratory Standards, M38-A "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Approved Standard". Esto incluye prueba en RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato, un tamaño de

283

inóculo de 0.4-5 x 10^4, e incubación a 30 o 35 grados C por 48 horas. La concentración inhibitoria mínima (MIC = minimum inhibitory concentration) se define como la concentración mas baja que resulta en una reducción de 80% en turbidez en comparación con un tubo de control libre de drogas. Las concentraciones de drogas fueron 0.03-16 µg/ml para los compuestos investigados, 0.015-8 µg/ml para itraconazol y griseofulvina.

[0484] La concentración inhibitoria mínima (MIC) en la cual un compuesto evita el crecimiento del microorganismo diana se estimó de acuerdo con la versión modificada de protocolo NCCLS. Se determinaron concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) en el primer intervalo de 24 horas en donde el crecimiento pudo determinante en el tubo de control libre de droga. La MIC definida fue la concentración más baja que exhibe una reducción del 80% de turbidez en comparación con el control de crecimiento. La concentración letal mínima (MLC = minimum lethal concentration) se determinó al aplicar una capa de 0.1 µl de la concentración de MIC concentración sobre MIC. MLC se declaró en la primer concentración que exhibe 5 o menos colonias de crecimiento fungal que representan un exterminio de 99.95%. Cuando se obtiene una MIC, se determina una constitución fungicida mínima (MFC = minimum fungicidal

286

284

concentration) para estimar la naturaleza fungistática/fungicida del compuesto. Este procedimiento involucra diluir muestras de células tratadas con drogas (retiradas de pozos de prueba que contiene compuesto en y sobre MIC) a concentraciones compuestas que significativamente están por debajo de la concentración inhibitoria y depositarlas en placas de agar. El compuesto se califica como fungistático si las células son capaces de reanudar el crecimiento y fungicida si no es posible re-crecimiento debido a que el compuesto extermino a los organismos.

[0485] Compuestos aquí descritos se muestran efectivos contra dos especies de *Trichophyton*. *T. rubrum* es el agente causativo principal para infecciones dermatofíticas humanas y será el organismo clave para hacer diana en el desarrollo del agente clínico.

[0486] Los compuestos KPU-2, KPU-11 y KPU-17, KPU-35 y t-butil-fenilahistina fueron equivalentes en potencia o en algunos casos más potentes que la que griseofulina, un agente farmacéutico estándar actual, empleado para tratar infecciones dermatofíticas.

[0487] Los compuestos (-)-Fenilahistina y KPU-1 fueron significativamente menos potentes que los otros compuestos con los que pueden encontrar T. rubrum más

287

285

débiles pero mas comparables con los otros contra el aislado sensible *T. mentagroplites*.

[0488] En aquellos casos cuando una MFC puedo determinarse, los resultados indican que estos compuestos son de naturaleza fungistática (ver tablas 19 y 20).

Tabla 19. Actividad Antifungal de Deshidrofenilahistina y sus Análogos.

Compuestos	MICs y MFCs, µg/ml				
	C. albicans 90028		*C. albicans* 10231		*C. glabrata*
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC
(-)-Fenilahistina	>70	ND**	>70*	ND	>70
KPU-1	>68*	ND	>68	ND	>68
KPU-2	>32	ND	>32	ND	>32
KPU-11 y KPU-17	>32	ND	>32	ND	>32
KPU-35	>32	ND	>32	ND	>32
t-butil fenilahistina	>32	ND	>32	ND	>32
Amfotericina B	0.5	0.5	0.5	0.5	1
Griseofulvina	ND	ND	ND	ND	ND
Itraconazol	ND	ND	ND	ND	ND
Colchicina	>128	ND	>128	ND	>128
benomil	64	>512	64	>512	64

286

(CONTINUACIÓN)

Compuestos	MICs y MFCs, µg/ml				
	C. glabrata	*A. fumigatus* aislado #1		*A. fumigatus* aislado #2	
	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
(-)-Fenilahistina	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-1	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-2	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-11 y KPU-17	ND	>16	ND	0.06	>16
KPU-35	ND	>16	ND	<0.03	0.125
t-butil fenilahistina	ND	>16	ND	<0.03	0.125
Amfotericina B	ND	ND	ND	ND	ND
Griseofulvina	ND	ND	ND	0.5	ND
Itraconazol	ND	1	ND	ND	ND
Colchicina	ND	ND	ND	ND	ND
Benomil	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 20. Actividad Antifungal de Deshidrofenlahistina y sus Análogos

Compuesto	MICs y MFCs, µg/ml

287

	T. rubrum aislado #1		*T. rubrum* aislado #2		*T. mentagrophytes* aislado #1	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
NPI2350	>16	ND	0.16	>16	16	>16
NPI2352	>16	ND	0.25	>16	4	>16
NPI2358	>16	ND	<0.03	0.125	2	>16
NPI2362	0.06	>16	<0.03	<0.03	1	>16
NPI2386	<0.03	0.125	<0.03	0.06	1	>16
NPI2460	<0.03	0.125	<0.03	<0.03	4	>16
amfotericina B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Griseofulvina	0.5	ND	<0.015	ND	1	ND
Itraconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Colchicina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
benomil	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Compuesto	MICs y MFCs, µg/ml					
	T. mentagrophytes aislado #2		*E. floccosum* aislado #1		*E. floccosum* aislado #2	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
NPI2350	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2352	>16	ND	>16	ND	>16	ND

240

288

Compuesto	MICs y MFCs, µg/ml					
	T. mentagrophytes aislado #2		*E. floccosum aislado #1*		*E. floccosum aislado #2*	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
NPI2358	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2362	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2386	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2460	>16	ND	>16	ND	>16	ND
Amfotericina B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Griseofulvina	2	ND	2	ND	4	ND
Itraconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Colchicina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
benomil	ND	ND	ND	ND	ND	ND

EJEMPLO 12

Evaluando Actividad de Diana Vascular

[0489] Tumores y condiciones neoplásicas pueden tratarse utilizando los compuestos aquí descritos. La oclusión del suministro de sangre de tumores con agentes de diana u objetivo vascular (VTAs = vascular targeting agents) inducen la regresión de los tumores. Los compuestos aquí descritos incluyen NPU-02 y KPU-35, por ejemplo puede ser como VTAs. Muchos VTAs exhiben sus

289

defectos vasculares al interactuar en el sitio de la enlace colchicina en microtúbulos. Esta interacción induce un colapso característico, rápido y oclusión de la vasculatura establecida en el tumor y por lo tanto compromete a la estabilidad de vasos existentes que llevan a necrosis.

[0490] Puede ocurrir colapso vascular por ejemplo dentro de 30 o 60 minutos de exposición a VTA e involucra cambiar la forma de las células invadidas y proliferantes, pero no las estáticas inmaduras, en la porción central del tumor. Este efecto diferencial en términos vasculares proporciona un raciocinio para efectos selectivos en el tumor debido al superior porcentaje de células endotetiales inmaduras proliferantes en los vasos sanguíneos de tumor contra vasos de sangre normal. VTAs puede clasificarse en tres espectros superpuestos de actividad: (1) potentes efectos vasculares y citotóxicos, (2) potentes efectos vasculares con débil citotoxicidad y (3) potentes de efectos citotóxicos con vasculares débiles.

Actividad de Diana Vascular In Vivo de KPU-02 y KPU-35

[0491] Modelos en animales son esenciales para investigar nuevas terapias que inhiben la angiogénesis inducida por tumor, hacen blanco o diana en la

290

vasculatura de tumor establecida e inhiben el crecimiento de tumor.

[0492] Un modelos de cáncer de pecho "pseudo-ortotópico" singenéico murino, se empleó para atender estos aspectos. Torres Filho et al., Microvascular Research (1995) 49,212-226, que se incorpora aquí por referencia totalmente. Para crear el "medio pseudo-ortotópico", la cubierta de una cámara de colgajo de piel dorsal se retira y pequeños trozos de panículo graso mamario de ratones donadores se implantaron en la cámara. En la parte superior del injerto de panículo graso, esteroides de tumor que contienen células de tumor mamario N202 transducidos con proteína fluorescente verde Histona (H2B)-proteína fluorescente verde (GFP), se aplicaron. El uso de células transducidas H2B-GFP permite visualizar crecimiento de tumor y supervisar mitosis y apotosis.

[0493] La video microscopía de fluorescencia permite el estudio relativamente no-invasivo de micro-circulación de tumor en ratones concientes. Este modelo puede proporcionar datos respecto al efecto de compuestos en vasculatura de tumor, crecimiento de tumor, mitosis y apotosis y es útil para examinar la actividad de compuestos ya sea solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Utilizando este modelo, KPU-02 y

291

KPU-35 se mostró que inducen un colapso vascular rápido lo que conduce a necrosis central, y la regresión de tumores establecidos después de una sola administración i.v.

[0494] El día 12 de crecimiento de tumor, se trataron ratones i.v. con una infusión de 2 minutos de 5 mg/kg de KPU-35, una infusión i.v. de 5 minutos de 10 mg/kg de KPU-02, o bolo de vehículo (10% solutol (P/P) + 2% DMSO en agua). El día 13, infusiones de 15 minutos de 10mg/kg de KPU-02, KPU-35 o vehículo se administraron. Fueron bien tolerados los tratamientos con KPU-02 o KPU-35. Se observaron ratones por dos días adicionales. El área de tumor, gasto de flujo de sangre y densidad vascular dentro y que circunda el tumor, se visualizaron. Observaciones en tiempo real se registraron en diversos puntos en tiempo utilizando fotos fijas y video microscopía.

[0495] Este estudio demuestra el rápido colapso de vasculatura central después del tratamiento i.v. sencillo con cualquiera de KPU-02 o KPU-35. Los cambios en funciones vasculares resultaron en necrosis de tumor central significante, sin un efecto observado en la vasculatura del panículo graso circundante o piel (Figura 30). Estas observaciones soportan la selectividad y especificidad de KPU-02 y KPU-35, que ambos

292

individualmente pueden interrumpir o romper la vasculatura establecida de tumor.

Actividad In Vivo de KPU-02 en xenoinjerto de tumor humano

[0496] Cuando KPU-02 se administra con CPT-11 (Irinotecan), Taxotere o Paclitaxel, actividad anti-tumor marcada se vió en los modelos de xenoinjerto de tumor de colón humano (HT-29), pecho (MCF-7; MDA-MB231) y pulmón (A549) (Tabla 21). El efecto de KPU-02 en el modelo HT-29 fue robusto, reproducible en tres estudios y mostró un efecto dependiente de dosis, es decir 7.5 mg/kg fue estadísticamente mayor que 2.5 mg/kg (Figuras 32, 33).

Actividad *In Vitro* de KPU-02 y KPU-35 en células HuVEC

[0497] Los efectos *in vivo* anteriormente descritos de KPU-02 y KPU-35 en la vasculatura de tumor fueron soportados por los efectos *in vitro* de los mismos compuestos en células HuVEC. Células endoteliales de vena umbilical humana se consideran un buen modelo *in vitro* de endotelio de tumor, que se considera "inmaduro". El endotelio de tumor carece de células de pared-vascular de soporte y crecientemente dependientes de la red de microtúbulos por integridad de la vasculatura de tumor. Por lo tanto, la ruptura de la red de microtúbulos de tumor provoca colapso vascular.

295

293

KPU-02 induce rápida despolimerización de tubulina en células HuVEC.

[0498] Células de vena endotelial umbilical humana (HuVECs; Cambrex CC2519A) se mantuvieron en densidades subconfluentes en medio EGM-2 (Cambrex). Las células se cultivaron en un incubador 37 grados C En 5% CO_2 y aire humidificado al 95%. Para ensayos de extinción con tubulina, células HuVEC se sembraron a una densidad de $3x10^4$ células/ml en EGM-2 en portaobjetos o cubiertas compatibles con cultivo de tejido (Fisher). Las placas se regresaron al incubador por 2 días.

[0499] Soluciones estándar (20 mM) de los compuestos de prueba se prepararon en DMSO al 100%. Diluciones concentradas 400X de los compuestos se prepararon en DMSO al 100%. Volúmenes de 5 µl de las diluciones se agregaron a pozos individuales, que resultan en una concentración final de 200 nM. La concertación final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras. Las placas se regresaron al incubador por 30 minutos. Células HuVEC se trataron por 30 min con KPU-02 o KPU-35 200 nM.

[0500] Las células se enjuagaron en dPBS antes de fijación en formalina amortiguada neutra 10% (v/v) por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de fijación alfa-tubulina se visualiza por inmuno-fluorescente

296

294

indirecta. Específicamente, las células se impermeabilizaron en triton X-100/dPBS 0.2% (v/v) por 10 minutos. Las células se lavaron antes de transferir las cubiertas a una cámara humidificada, se bloquearon las cubiertas por dos horas en amortiguador de anticuerpo (BSA 2%(v/v) /Tween20 0.1% (v/v)/dPBS). Las cubiertas se incubaron con 50 µl de alfa-tubulina de ratón 0.1 µg/ml (Molecular Probes) en amortiguador de anticuerpo por una hora antes de lavar e incubación con 50 µl de 1 µg/ml FITC cabra anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories) por una hora en la oscuridad. Finalmente las células se lavaron y trataron con 2 µg/ml de DAPI (Molecular Probes) por 10 minutos antes de enjuagar en H_2O y montar con medida de montaje Vectashield (Vector Labs). Las células se formaron en imagen utilizando un objetivo de inmersión de aceite 60x en un microscopio vertical (Olympus BX51). Las imágenes fueron capturadas digitalmente utilizando una cámara CCD y soporte lógico o programa Magnafire 2.0 (Olympus). Post-procesamiento de imagen se realizó en Photoshop Elements 2.0 (Adobe) y en Microsoft Powerpoint.

[0501] La Figura 33 muestra que KPU-02 y KPU-35 rápidamente inducen despomelarización de tubulina en células HuVEC.

KPU-02 induce permeabilidad en mono-capa dependiente de

299

295

dosis en células HuVEC.

[0502] Células endoteliales de vena umbilical humana (HuVECs; Cambrex CC2519A) se mantuvieron a densidades subconfluentes en medio EGM-2 (Cambrex). Las células se cultivaron en una incubadora 37 en CO_2 al 5% y aire humidificado al 95%. Para ensayos de permeabilidad de mono capa, células HuVEC se sembraron a $1x10^5$ células/ml en medio EGM-2 en injertos de Fluoroblock de 3.0 µm revestido con Fibronectina (Becton Dickinson) en placas de 24 pozos. Las placas se regresaron al incubador por 4 días para permitir que las células alcanzaran confluencia.

[0503] Soluciones estándar (20 mM) de los compuestos de prueba se prepararon en DMSO al 100%. Diluciones seriales concentradas 10X de los compuestos se prepararon en EGM-2. Volúmenes 10 µl de diluciones en serie se agregaron a los injertos de prueba en duplicado resultando en concentraciones finales en el intervalo de 2 µM a 2 nM. La concertación final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras. Las células se trataron con 2nM-2µM KPU-02 por 15 minutos.

[0504] FITC-Dextrano (50 mg/ml) en dPBS de (38.2 kDa; Sigma) se diluye 2.5 veces en EGM-2, 10 µl de FITC-Dextran se agrega a cada injerto. La concentración final de FITC-Dextran fue 1 mg/ml. Las placas se regresaron al

298

296

incubador y 30 minutos después la fluorescencia de las cámaras inferiores de los pozos de 24 placas se leyó utilizando un fluorimétro Fusion (Packard Bioscience) con filtros de $lambda_{ex}$ = 485 nm y $lambda_{em}$ = 530 nm.

[0505] La Figura 34 muestra que KPU-02 es capaz de inducir permeabilidad de mono-capa en una forma dependiente de dosis. Los resultados ilustrados en la Figura 34 representan el promedio ± S. D. de tres experimentos independientes.

Flujo de Sangre en el modelo de Sarcoma de Rata P22 con ^{125}I-IAP

[0506] flujo de sangre en tumor se estima en un modelo utilizando una técnica cuantitativa de ^{125}I-yodo-antipirina (IAP) en ratas que tienen un número de sarcoma de rata P22. KPU-02 (15 mg/kg, IP) redujo en forma marcada y selectiva el flujo de sangre de tumor al 23% de vehículo a 1 hora después de administración; flujo de sangre permaneció marcadamente reducido 24 horas después (59% del vehículo). En contraste, el flujo de sangre en tejidos no-tumorales concentrado en una proporción mucho menor a 1 hora (ver Figura 35).

[0507] La reducción de flujo de sangre a 24 horas posteriores a la dosis fue mas variable entre tejidos para KPU-02 en comparación con el vehículo como se

294

297

ilustra en la Figura 36. El flujo de sangre al tumor fue el más afectado. Otros tejidos exhibieron una pequeña reducción del flujo de sangre. Flujo de sangre de músculo esquelético pareció incrementarse a 24 horas posteriores a la dosis.

[0508] Los efectos de KPU-02 observados a 1 hora parecen ser de más duración y mas selectivos para el flujo de sangre de tumor que lo previamente reportado para CA4P utilizando la misma técnica.

[0509] En un experimento con el modelo de sacroma de rata P22, se demostró que KPU-02 7.5 Y 15 mg/kg IP(n=2 por dosis) produce una necrosis de tumor dependiente de dosis por 24 horas posteriores a la dosis, con la más alta dosis que resulta en una necrosis casi total del tumor como se ilustra en la Figura 37. Todos los tumores en las ratas tratadas como KPU-02 mostraron evidencia de necrosis, mientras que tumores en las ratas tratadas con vehículo, no. Los VTAs que han entrado en una clínica (por ejemplo, CA4P, ZD6126, AVE8062) muestran efectos cualitativos similares en la sangre de tumor utilizando la metodología IAP (o tecnología similar) para demostrar flujo de sangre reducido en el tumor de sarcoma de rata P22 y en humanos utilizando la técnica dce-MRI. Ver Stevenson JP, Rosen M, Sun W, Gallagher M, Haller DG,

300

298

Vaughn D, et al., "Phase I trial of the antivascular agent combretastatin A4 phosphate on a 5-day schedule to patients with cancer: magnetic resonance imaging evidence for altered tumor blood flow," *J Clin Oncol* 2003 ; 21 (23): 4428-38; Evelhoch JL, LoRusso PM, He Z, DelProposto Z, Polin L, Corbett TH, et al., "Magnetic resonanceimaging measurements of the response of murine and human tumors to the vascular-targeting agent ZD6126," *Clin Cancer Res* 2004; 10(11) : 3650-7; y Gadgeel SM, LoRusso PM, Wozniak AJ, Wheeler C. "A dose-escalation study of the novel vascular-targeting agent, ZD6126, in patients with solid tumors," *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: abstract 438; cada uno de los cuales aqui se incorpora por referencia totalmente.

Terapia de Combinación con Agentes Dirigidos a Microtúbulos.

[0510] Los hallazgos de que VTAs dañan selectivamente la vasculatura en la parte central del tumor contra la periferia, que recupera funcionalidad, soportan usar estos agentes en combinación con agentes quimioterapéuticos (Taxol, Vinblastine y Cisplatina), radiación e inhibidores de angiogénesis dirigidos contra VEGF y EGF. Los nuevos VTAs suplementaran en vez de suplantar a estas terapias y deberán proporcionar mayores

309

299

actividades anti-tumor.

Tratamiento de otras condiciones

[0511] Además de cáncer, pueden tratarse otras enfermedades utilizando los VTAs aquí descritos. Las condiciones que incluyen otros neoplasmas, retinopatías y cualquier otra condición o enfermedad que se basa en suministro de sangre, de preferencia suministro de sangre de nueva vasculatura a fin de permanecer viable y/o proliferar.

[0512] Muchas condiciones están asociadas con vasculatura excesiva o inapropiada. Ejemplos de condiciones asociadas con vasculatura excesiva incluyen desordenes inflamatorios tales como inflamación inmune y non-inmune, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico y soriasis; desordenes asociados con invasión inapropiada o inoportuna de vasos tales como retinopatía diabética, glaucoma neovascular, retinopatía de pre-madurez, degeneración macular, rechazo de injerto córneo, fibroplasia retrolental, rubeosis, proliferación capilar en placas arterioesclerósicas y osteoporosis; y desordenes asociados con cáncer, incluyendo por ejemplo tumores sólidos, metástasis de tumor, tumores transportados en la sangre tales como leucemia, angiofibromas, sarcoma de kaposi, tumores benignos tales como hemangiomas, neuromas

300

300

acousticos, neurofibromas, tracomas, y granulomas piogénicos, así como otros cánceres que requieren vascularización para soportar el crecimiento de tumor. Ejemplos tradicionales de enfermedades dependientes de vasculatoria incluyen por ejemplo el síndrome Osler-Webber; angiogénesis miocardíacas, neovascularización de placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas y granulación de heridas. Además, la vasculatura excesiva también está asociada con problemas clínicos como partes de implantes biológicos y mecánicos (implantes de tejido/órgano, endoprótesis o cánulas intraluminales, etc.). Los presentes compuestos y composiciones pueden emplearse para hacer diana en la vasculatura, de preferencia a hacer diana vasculatura enferma sobre vasculatura de tejido no enfermo y de esta manera los compuestos y composiciones pueden emplearse en el tratamiento de estas condiciones. Otras enfermedades en donde la vascularización juega un papel, y en los cuales pueden emplearse los presentes compuestos y composiciones, se conocen por aquellos con destreza en la especialidad.

[0513] Ejemplos de retinopatías incluyen degeneración macular relacionada a la edad (ARMD = age-related macular degeneration), retinopatía diabética y semejantes. Angiogénesis patológica es un factor

368

301

contribuyente principal para una cantidad de retinopatías que colectivamente son la causa principal de ceguera en el mundo desarrollado. Kahn y Hiller Am J Ophthalmol (1974) 78,58-67, que se incorpora aquí por referencia totalmente. Por ejemplo, la neovascularización retinal y de disco ocurre en 30-50% de los pacientes con retinopatía diabética por más de 20 años. Yanko et al., Retina (2003) 23, 518-522, que aquí se incorpora por referencia totalmente. Además, neovascularización es una complicación seria en 10% de los pacientes con degeneración macular. Ferris et al Arch Ophthalmol (1984), 102,1640-1642, que aquí se incorpora totalmente por referencia.

[0514] Agentes de diana vascular tales como Combretastatina A-4 (CA-4) se ha mostrado que provocan la ruptura de nuevos vasos en tejido neovásico. Griggs et al Br J Cancer (2001)84, 832-835, que aquí se incorpora por referencia totalmente. Adicionalmente, CA-4P se muestra que inhibe la neovascularización retinal que ocurre durante la retinopatía proliferativa. Griggs et al Am J Path (2002) 160,1097-1103, que aquí se incorpora por referencia totalmente. Finalmente, fosfato de CA-4P se demuestra que suprime el desarrollo de neovascularizaión retinal inducida por VEGF e inhibe el desarrollo y/o causa regresión parcial de neovascularización coroidal. Nambu et

304

302

al., Invest Ophthalmology & Visual Sci (2003) 44,3650-3655, que aquí se incorpora por referencia totalmente. Los compuestos aquí descritos pueden emplearse para tratar retinopatía. Por ejemplo, las metodologías de Griggs (2001 y 2002) y Nambu se emplean para tratar retinopatías. Además, los compuestos y composiciones aquí descritas pueden emplearse para tratar estas retinopatías al aplicar los compuestos y/o composiciones al área diana en una cantidad efectiva para reducir densidad vascular y/o proliferación vascular.

Tabla 21. Efecto de KPU-02 en combinación con quimioterapia en modelos de xenoinjerto de tumor humano

Tumor	**Dosis**	**Referencia**
Modelo	**KPU-02**	**Quimioterapéutica**
(# Estudios)	**(mg/kg ip)**	
Colon	7.5	CPT-11
HT29	Días	Días 1,8,15
(3)	1,4,8,11,15	
Pecho		Taxotere
MCF-7	7.5	Días
(2)	qdx5	1,3,5
Pecho	7.5	Paclitaxel
MDA-231	Días	qdx5

308

303

Tumor Modelo (# Estudios)	Dosis KPU-02 (mg/kg ip)	Referencia Quimioterapéutica
(1)	1,4,8,11,15	
Pulmón		Taxotere
A549	7.5	Días
(1)	qdx5	1,3,5

Tabla 21 (Continúa)

Tumor	Inhibición de crecimiento de tumor (%)		Regresión de tumor (#/total)	
Modelo (# Estudios)	Referencia Agente	KPU-02+ Referencia	Agente de referencia	NPI + Referencia
Colon				
HT29 (3)	37±3	79±8	0/30	4/30
Pecho				
MCF-7 (2)	12;58	26;81	0/20	3/20
Pecho				
MDA-231 (1)	53	71	1/10	0/10

306

304

Tumor	Inhibición de crecimiento de tumor (%)		Regresión de tumor (#/total)	
Modelo (# Estudios)	Referencia Agente	KPU-02+ Referencia	Agente de referencia	NPI + Referencia
Pulmón				
A549 (1)	26	74	0/10	0/10

EJEMPLO 13

Relación de Estructura-Actividad

[0515] El efecto de actividad de diversas modificaciones en el anillo fenilo de tBu-deshidroPLH se ilustra por los datos en la Figura 38. Es aparente que la sustitución con grupos relativamente hidrofóbicos y funcionales menores en la posición -*m* u -*o*, aumenta o mantiene la actividad citotóxica en las células HT-29 mientras que sustituciones en la posición -*p*, disminuye la actividad. Mientras que no se está ligado por ninguna teoría particular, estos datos sugieren un reconocimiento riguroso del anillo fenilo por tubulina.

[0516] Análisis 3D-QSAR (CoMFA) (ver Figura 39)

307

305

también soporta la existencia de campos estéricamente favorables en las posiciones -*m* y -*o* y campos estéricamente desfavorables existen en la posición -*p*. Análisis de cristales de rayos X (ver Figura 40) indica que la conformación de derivados potentes requiere una cierta cantidad de ángulo dihédrico entre el anillo fenilo y la plantilla cor pseudo-tricíclica formada por DKP y anillos imidazol. De esta manera, modificación con la restricción de conformación apropiada del anillo fenilo, puede producir actividad potente. Mientras que no se está ligado por ninguna teoría particular, puede ser que el modo de enlace de derivados PLH en el sitio de enlace colchicina de tubulina es diferente de colchicina y sus homólogos conocidos.

EJEMPLO 14

Acción *In Vitro* en Microtúbulos

Purificación de proteína de microtúbulos y tubulina

[0517] La proteína de microtúbulo (MTP) se prepara como se describió previamente (Farrell KW y Wilson L. (1987). Complejos tubulina-colchicina envenenan diferencialmente extremos opuestos de microtúbulos. Biochemistry 23 (16): 3741-8, que aquí se incorpora por referencia totalmente). Preparaciones de MTP consisten de 70% de tubulina y 30% de proteínas asociadas con

309

306

microtúbulos (MAPs = microtubule-associated proteins) se aislaron de cerebro bovino por tres ciclos de polimerización caliente y despolimerización en frío en PEM100 (1-4 ácido piperazindietansulfónico 100 mM (Pipes), $MgSO_4$ 1 mM, EGTA 1 mM, pH 6.8) y GTP 1 mM. MTP se congeló por goteo en nitrógeno líquido y almacenó a -70 grados C hasta usar. La tubulina se purifica a partir de proteína de microtúbulos por cromatografía de fosfocelulosa (PC-tubulina) y almacena en PEM50 (Pipes 50 mM, $MgSO_4$ 1 mM, EGTA 1 mM, pH 6.8). Concentración de proteína se determina por un ensayo Bradpord (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) utilizando albúmina de suero bovino como la norma (Bradpord, 1976).

Agentes de prueba

[0518] Soluciones estándar de KPU-02 se prepararon a una concentración de 20 mM en DMSO. Soluciones estándar de Combretastatina A4 (Nacional Cancer Institute, Bethesda, MD) (CA4) se preparan a una concentración de 5 mM en DMSO. Colchicina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) (CLC) se prepara a una concentración de 3 mM en agua. Todos los agentes se protegieron de la luz ambiente con tubos Eppendorf ámbar. Diluciones en serie se realizaron en DMSO y/o PEM50 a las concentraciones deseadas.

309

307

Determinación de Masa de Polímero de Microtúbulos en Estado Estable

[0519] MTP (2 mg/ml) se polimerizó en microtúbulos en la presencia de un intervalo de concentraciones de drogas en PEM100 que contienen GTP 1 mM y una concentración de DMSO final de 0.5%. Las muestras se supervisaron por dispersión de luz a 350 nm a 37 grados C por 75 minutos.

[0520] Reacciones de polimerización se centrifugaron y las concentraciones de proteínas de microtúbulos en el sobrenadante, una medida de tubulina soluble en estado estable, y el precipitado, una medida de polímero de microtúbulos, se utiliza para calcular la inhibición de polimerización. Después de incubación, los microtúbulos polimerizados se separaron y sedimentaron de MTP sin polimerizar por centrifugación (150,000 x g, 45 minutos, 37 grados C). El sobrenadante se retiró, y los precipitados de microtúbulos se despolimerizaron en H_2O desionizada (24 horas, 0 grados C) antes de determinación de proteína por el ensayo Bradford.

[0521] El por ciento de inhibición se calculó en dos formas y los valores obtenidos de las dos formas se compararon. En una forma, una proporción de la proteína de microtúbulos en el precipitado, droga a no droga, se

310

308

calculó. Otra proporción de proteína de microtúbulos en el precipitado al sobrenadante, droga a no droga también se calculó. Los números estuvieron en cercana conformidad y los previos valores se emplearon debido a que se sometieron a menos variancia y perturbación experimental.

Distribuciones de Longitud Promedio de Microtúbulos

[0522] Microscopía electrónica de transmisión se emplea para determinar la distribución de longitud promedio de microtúbulos en la ausencia o presencia del agente probado. A 75 minutos y antes de sedimentación, alícuotas de 10 µl de los experimentos de masa de polímero, se fijaron por dilución en 290 µl de glutaraldehído al 0.2% amortiguado con PEM100. Treinta microlitros de muestra fija se sedimentan en rejillas de microscopio electrónico de malla 150 ICG revestida con formvar por 90 segundos. El exceso de muestra se succionó por capilaridad con papel filtro Whatman. Treinta microlitros de citocromo C (1 mg/ml) se aplican por 30 segundos para mejorar la resolución de protofilamentos y facilitar la tinción negativa. Uranil acetato (1.5%) se aplica por 20 segundos y el exceso se absorbe por capilaridad. Se vieron rejillas en un microscopio electrónico Jeol-1200EX11 a amplificación de 2000X y 30,000X. El Zeiss MOPHI se empleó para determinar

309

distribuciones de longitud de microtúbulos y longitudes promedio por al menos 100 microtúbulos por muestra.

Ensayos de competencia CLC

[0523] PC-tubulina (0.2 mg/ml) se incuba en PEM50 con GTP 1 mM, DMSO al 1%, 10 μM de agente probado y 7-25FM[^{3}H] CLC por 120 minutos a 37 grados C. Medición de enlace y [^{3}H] CLC fue seguida por ensayo de enlace filtro de celulosa-DEAE como se describió previamente (Wilson, 1970). Este método depende de la adsorción de tubulina al papel filtro impregnado con DEAE-celulosa. Papel filtro Whatman DE81 se pre-humectó con PEM50 antes de aplicación de la muestra. El volumen total de reacción de 100 μl se aplica a discos de 2.5 cm de papel filtro, sobre parafilm, en hielo. Los discos de papel se lavaron por inmersión en cinco cambios sucesivos de 50 ml de PEM50, 5 minutos/lavado, 4 grados C, para retirar toda la colchicina sin ligar. Los discos de papel con colchicina ligada a tubulina adherente se contaron directamente en un frasco de destelleo que contiene 2 ml de solución de proteína Beckman Coulter Ready Protein Solution (Fullerton, CA). Todos los discos se lavaron en conjunto. Enlace despreciable de CLC sin ligar a los discos de papel ocurre en controles, ya sea en la presencia o ausencia de tubulina.

312

310

[0524] Los valores K_i se calcularon por regresión linear de un trazo doble recíproco de los datos experimentales en Microsoft Excel. El valor K_m de tubulina para CLC bajo las condiciones experimentales se determinó primero, con x que interseca igual a $-1/K_m$ en la presencia de droga, fue determinado experimentalmente. La K_i se determina utilizando la relación $K_{m\ app} = alfa\ K_m$, y para inhibición competitiva $alfa = K_m(1 + [I]/K_i)$.

Espectroscopía de Fluorescencia

[0525] Mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B. PC-tubulina (0.2 mg/ml) se incuba en PEM50, GTP 2 mM, DMSO al 3%, con KPU-02 0-30 μM. La interacción de KPU-02 con tubulina se reporta por fluorescencia de ácido 4,4'-dianilino-1, 1'-binaftil-5, 5'-disulfónico, sal dipotasio (bis-ANS; Molecular Probes, Eugene, OR), con una longitud de onda de excitación de 395 nm y un máximo de longitud de onda de emisión de 487 nm. Los pasos de banda de excitación y emisión fueron 10 nm. Este experimento se realizó dos veces.

[0526] El fluoróforo bis-ANS sondea la superficie hidrofóbica de proteínas y un cambio en intensidad de las señales de fluorescencia bis-ANS es un resultado de un cambio en el área superficial accesible al

313

311

solvente de una proteína. Si hay algún cambio en conformación que modifique la interacción tubulina-bis-ANS ante enlace de ligando, entonces bis-ANS puede emplearse para reportar enlaces.

[0527] PC-tubulina (0.2 mg/ml) se incuba con KPU-02 0-30 μM a 25 grados C por 20 minutos. Bis-ANS (25 μM) después se agrega e intensidades de fluorescencia relativas de muestras se midieron a 25 grados C en 15 minutos. Espectros de blanco de amortiguador se recolectaron y mostraron que KPU-02 más bis-ANS producen fluorescencia despreciable en el intervalo de longitud de onda experimental.

[0528] La K_d se determina al ajustar datos experimentales en Sigmaplot y Microsoft Excel utilizando la ecuación $F = ((-F_{max} xL)/ (K_d + L)) + F_0$ donde F es la intensidad de fluorescencia de bis-ANS-tubulina en la presencia de concentración total de ligando L, F_{max} es la intensidad de fluorescencia bis-ANS de tubulina totalmente con ligando, y F_0 es fluorescencia bis-ANS en la ausencia de droga. F_{max} se determina al trazar $1/(F_0-F)$ contra 1/L y extrapolar a 1/L =0. La fracción de sitios de enlace B ocupada por KPU-02 se determina utilizando la siguiente relación: $B=(F_0-F)/(F_0-F_{max})$. La concentración de ligando libre se determina con L_{free} = L-B [C] en donde [C] es la

314

312

concentración molar de sitios de enlace de ligando considerando un solo sitio de enlace por dímero de tubulina.

Inhibición de polimerización de microtúbulos por KPU-02

[0529] KPU-02, CA4, y CLC se ensayaron por su capacidad para alterar la polimerización de tubulina rica en MAP (MTP) (2 mg/ml) en un sistema libre de células *in vitro*. Inicialmente, la inhibición de polimerización se ensayó utilizando tubulina libre de proteínas asociada con microtúbulos, purificada con fosfocelulosa (datos no mostrados). KPU-02 fue un inhibidor más potente hacia MTs ensamblado con glicerol y semillas de DMSO en comparación con MTs ensamblados en la presencia de MAPs que co-purifican con tubulina. Aunque el polímero de microtúbulos en la ausencia de MAPs estabilizante no alcanza a estar estable en un periodo de dos horas, estos ensayos demuestran que KPU-02 interactúa directamente con tubulina purificada y que no ejerce su efecto primario a través de un MAP.

[0530] KPU-02 y CA4 inhiben polimerización de MT más poderosamente que CLC como se mide por análisis de dispersión de luz (Figura 44) y de sedimentación (Figura 45). MTP (2 mg/ml) se polimeriza en microtúbulos en la presencia de un intervalo de concentraciones de droga y

345

313

permite alcanzar estado estable como se verifica por dispersión de luz a 350 nm. La Figura 41 ilustra espectros de turbidez de polimerización de proteína de microtúbulos en la presencia del vehículo de droga DMSO (◊), 1.25 μM(□), 2.5 μM(▬), y 5 μM (○) NPI-2358 (a), CA4 (b) y CLC (c). KPU-02 y polimerización inhibida por CA4 con potencias comparables. La Figura 45 ilustra inhibición de polimerización de microtúbulos en la ausencia o presencia de un intervalo de concentraciones de KPU-02 (○), CA4 (□), y colchicina (◊). La masa total de polímero después de 75 minutos de ensamblado se determinó por sedimentación. Barras de error son valores de desviación estándar de tres experimentos. La concentración en la cual se inhibió la polimerización en 50% (IC_{50}), es 2.4 ± 0. 4 μM for KPU-02, 2.2 ± 0.3 μM para CA4, y 7.6 ± 2.4 μM para CLC (Tabla 22). (Variancias obtenidas por análisis estadístico se reportan como valores de desviación estándar a menos de que de otra forma se establezca). A concentraciones superiores a IC_{50} para polimerización *in vitro* de tubulina rica en MAP, MTP exhibe cinética de agregación, sugiriendo que KPU-02 y CA4 secuestran proteína para evitar el ensamblado de microtúbulos.

Tabla 22. Concentraciones para inhibición de polimerización de microtúbulos.

346

314

Compuesto	Promedio de masa de polímero. IC50±sd (μM)	n
KPU-02	2.4±0.4	4
CA4	2.2±0.3	3
CLC	7.6±2.4	3

[0531] Como se ilustra en la Figura 44, todos los tres agentes probados producen una inhibición dependiente de concentración de la extensión de polimerización de microtúbulos desde 1.25-5 μM. Hay dos diferencias importantes a notar entre los espectros. Primero, la velocidad inicial de incremento en absorbancia sobre el tiempo, disminuye al aumentar la concentración de droga (Figura 44A y 44B). Los espectros indican que hay un periodo de retardo para formación de MT en la presencia de KPU-02 y CA4. Drogas que reducen en forma significativa y rápida el conjunto competente de ensamblado, soluble de tubulina, disminuirá la velocidad inicial de polimerización. En contraste, la velocidad inicial de polimerización está sin cambio en todas las concentraciones de CLC (Figura 44C). En segundo, MTP en la presencia de KPU-02 o CA4 no alcanza estado estable a altas concentraciones de droga (sobre 5 μM), como se muestra por los valores de absorbancia que aumentan

317

315

linealmente con el tiempo (Figuras 44A y 44B). En contraste, MTP en la presencia de CLC alcanza estado estable a altas concentraciones de droga (Figura 44C).

[0532] La cantidad de droga requerida para inhibir polimerización en 50% (IC_{50}), se determina a partir del análisis de la relación lineal entre el decremento en polímero de microtúbulos sedimentado por centrifugación con el incremento en concentración de droga (Figura 45). Las barras de error en la Figura 45 representan valores de desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Decremento en longitud promedio de microtúbulos medida por microscopía electrónica de transmisión

[0533] Se realizó microscopía electrónica de transmisión en reacciones de polimerización de microtúbulos-agentes, para describir el polímero formado en estado estable y evaluar conclusiones tomadas de los espectro de dispersión de luz. KPU-02, CA4, y CLC todas disminuyen las longitudes de los microtúbulos formados en estado estable. MTs fueron progresivamente más cortos al aumentar la concentración de la droga (Figuras 46, 47 y 48). La Figura 46 ilustra histogramas de frecuencia de longitudes promedio de microtúbulos *in vitro* en estado estable en la presencia de (A) KPU- 02, (B) CA4, y (C)

316

316

CLC. El Zeiss MOPIII se emplea para determinar distribuciones de longitud de microtúbulos y longitudes promedio. Al menos 100 microtúbulos por concentración de droga se contaron. La Figura 47 ilustra microscopía de electrones utilizada para registrar microtúbulos en la ausencia o presencia de los compuestos probados. A 75 minutos, muestras de los experimentos de masa de polímeros se fijaron y tiñeron y vieron en un microscopio electrónico Jeol-1200EX11 a una ampliación de 2000x. Microfotografía electrónicas representativas de microtúbulos ricos en MAP formados *in vitro* en estado estable en la presencia de (A) KPU-02, (b) CA4, y (C) CLC. La barra de escala, 10 μM. La Figura 48 ilustra un resumen gráfico de disminución de longitud de MT en estado estable en la presencia de KPU-02, CA4, y colchicina. Las barras negras, 1.25 μM, y barras sombreadas, 2.5 μM de droga. En la presencia de KPU-02, y CA4, MTs son progresivamente más cortos con incrementada concentración de droga, hasta que la concentración de la droga en la cual MTP exhibe cinética de agregación como se detecta por turbidez, y no se observan MTs. Barras de error son valores de desviación estándar de la medición de al menos 100 microtúbulos.

[0534] KPU-02, CA4 y CLC no afectan la nucleación MT. Los numerosos microtúbulos cortos formados

319

317

en las reacciones de polimerización evidencian que la presencia de KPU-02, CA4, o CLC no afecta la nucleación. Si la nucleación se afectara, entonces menos y más largos microtúbulos, en oposición a numerosos y más cortos microtúbulos se hubieran observado en las muestras de control contra las tratadas con droga.

[0535] KPU-02 y CA4 fueron comparativamente potentes para disminuir la longitud de MT promedio. A 1.25μM, la más baja concentración de droga analizada por microscopía de electrones, KPU-02 y CA4 disminuyen la longitud de MT promedio en aproximadamente 70%, y CLC por 40% (Figura 48).

[0536] A concentraciones de droga sobre IC_{50} para polimerización de microtúbulos *in vitro* no se observan microtúbulos por microscopía de electrones para KPU-02 y CA4. En contraste, se observaron microtúbulos por microscopía de electrones para todas las concentraciones de CLC ensayado. A las concentraciones sobre IC_{50}, la proteína de microtúbulos en la presencia de KPU-02 y CA4 exhibe cinética de agregación, caracterizada por un aumento lineal en absorbancia de luz con el tiempo (Figuras 44A y 44B), mientras que en la presencia de CLC, la dispersión de luz de polímero alcanza estado estable (Figura 44C). A pesar de la observación de que MTP con

330

318

KPU-02 o CA4 aumentan absorbancia a 350nm con el tiempo, no se observaron agregados de proteína específicos de droga.

Espectroscopía de fluorescencia

[0537] Tubulina (0.2 mg/ml) se incubó con un intervalo de concentraciones de KPU-02 por 20 minutos a 25 C en PEM50 y GTP 2 mM. La fluorescencia de bis-ANS neutralizada por KPU-02 en una forma dependiente de concentración (Figura 49A). Para KPU-02 y tubulina como se mide por análisis de regresión no lineal de intensidad de fluorescencia bis-ANS al máximo de emisión, K_d = 10±1.6 μM (error estándar) (Figura 49B). El trazo doble recíproco de datos de enlace, considerando un sitio de enlace sencillo para KPU-02 por dímero de tubulina, produce una constante de disociación de 6.4 μM (Figura 49C). Los dos diferentes valores de Kd obtenidos por métodos de análisis de regresión lineal y no lineal, fueron suficientemente cercanos y los valores se consideraron aproximadamente equivalentes. La Figura 49A ilustra espectros de emisión de fluorescencia de tubulina en la presencia de incremento de KPU-02. El enlace de droga resulta en neutralización de su fluorescencia bis-ANS. La Figura 49B ilustra máximos de emisión de fluorescencia a 487 nm ajustado para obtener la K_d de tubulina para KPU-02, 10μM, desviación estándar 1.6

321

319

μM. Inserto, residuales. La Figura 49C ilustra la transformación doble recíproca de datos de enlace considerando un mol de droga/mol de dímero de tubulina.

Inhibición competitiva de enlace CLC

[0538] KPU-02 y CA4 inhibieron en forma competitiva enlace de CLC con tubulina (Figura 50). La Figura 50 ilustra los resultados de un ensayo de inhibición en donde tubulina purificada con fosfocelulosa (0.2 mg/ml) se incuba con diversas concentraciones de [^{3}H] CLC en la ausencia (◊), o presencia de KPU-02 10 μM (○) o CA4 10 μM (□). K_m de Tubulina-CLC fue 11±4.4 μM y las constantes de inhibición para KPU-02 y CA4 fueron 3.2 ± 1.7 μM y 2.4 ± 0.3μM, respectivamente. Las constantes se calcularon para tres experimentos independientes. La reacción de enlace de colchicina-tubulina depende de tiempo y temperatura y la constante de disociación de enlace es K_d = 0.1-1 μM, dependiendo de las condiciones del ensayo (Wilson L and Meza. (1973) The mechanism of action of colchicine. Colchicine bindinf properties of sea urchin sperm tail outer doublet tubulin. Journal of Cell Biology 58 (3): 709-19, que aquí se incorpora por referencia totalmente). Bajo las condiciones de prueba, la K_m de tubulina para CLC es 11 ± 4.4 μM. La K_m puede considerarse la K_d total de tubulina para CLC, sin embargo, debido a la

320

dependencia del tiempo de enlace de CLC, la K_m es mayor que los valores reportados para K_d. Las K_i para KPU-02 y CA4 fue 3.2±1.7μM y 2.4 ± 0.3 μM, respectivamente. La K_i se define como la cantidad de droga requerida para inhibir enlace de CLC en 50% y se basa en la cantidad de CLC radioactivo que se liga a tubulina. La K_i es una medida de la capacidad de la droga para competir con CLC; no es una medida directa de la disociación de enlace de droga-tubulina debido al método en el cual se reporta la afinidad de enlace.

Resultados

A todas las concentraciones de CLC ensayadas, la tubulina rica en MAP alcanzó estado estable. En contraste, a superiores concentraciones de droga KPU-02 o CA4, tubulina rica en MAP no polimeriza a estado estable y microtúbulos no se observaron por microscopía de electrones. KPU-02 y CA4 disminuyen efectivamente la concentración de la tubulina disponible. Esta disminución en el conjunto de tubulina soluble aumenta la concentración crítica de MT y evita la polimerización. Las cantidades estequiométricas de KPU-02 y CA4 requeridos para disminuir la masa de polímero *in vitro* a acoplar con los datos que la proteína de microtúbulos no alcanza a estado estable sobre esas concentraciones, sugiriendo que

323

321

KPU-02 y CA4 actúan por un mecanismo de secuestro en donde la tubulina soluble se liga y evita que polimerice.

Observaciones por microscopía de electrones en los microtúbulos ricos en MAP de estado estable, formados en la presencia de los agentes probados, fueron consistentes con el mecanismo propuesto en que KPU-02 y CA4 secuestran tubulina. Hubo una disminución dependiente de concentración en la longitud de microtúbulos promedio en la presencia de KPU-02, CA4, y CLC. En la presencia de KPU-02 y CA4, hubo una disminución dependiente de la concentración de droga en el estado inicial de polimerización, indicando que estas drogas reducen la tubulina disponible para elongación. Esta disminución en la velocidad de polimerización inicial no se vió con CLC debido a su lenta asociación con tubulina. Además, se formaron microtúbulos a concentraciones de CLC sobre su IC_{50} para polimerización, pero no se formaron microtúbulos a concentraciones de KPU-02 o CA4 sobre su IC_{50} para polimerización. Mientras que no se está ligado por ninguna teoría particular, la concentración de tubulina soluble ligada por KPU-02 o CA4 debe estar bajo la concentración crítica requerida para que proceda a la polimerización de tubulina.

[0539] Los estudios de enlace indican que

324

322

tubulina tiene una menor afinidad para KPU-02 que para CLC. Inhibición de enlace de CLC con tubulina por KPU-02 y CA4 ocurre dentro de un periodo de incubación de 20 minutos, indicando que la asociación de KPU-02 y CA4 con tubulina se aproxima al equilibrio relativamente más rápido que para CLC (datos no mostrados). KPU-02 inhibe competitivamente el enlace de CLC con tubulina en un sitio superpuesto con el sitio de enlace de CLC, consistente con estudios que caracterizan fenilahistina (halimide) (Kanoh K, Kohno S, Kataka J, Takahashi J and Uno I. (1999) (-) - Fenilahistina frena células en mitosis al inhibir la polimerización de tubulina. The Journal of Antibiotics 52 (2): 134-141, que se incorpora aquí por referencia totalmente). CA4, un análogo estructural de CLC, también inhibe en forma competitiva el enlace de CLC. Sin estar ligados por ninguna teoría particular, parece ser que a pesar de que comparten una región de enlace tubulina con CLC, KPU-02 y CA4, interactúan con tubulina e inhiben microtúbulos por un mecanismo distinto de CLC.

EJEMPLO 15.

Acción in vivo en microtúbulos

Estudios de cultivo celular

[0540] Células de carcinoma de pecho humano MCF7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA)

305

323

transfectados en forma estable con GFP-alfa-tubulina (Clontech, Palo Alto, CA) se cultivaron en medio Tagle modificado con Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 5%, penicilina al 0.1%/estreptomicina y aminoácidos no esenciales (Sigma) en matraces de cultivo de tejidos de 250 ml o placas de seis pozos de 35-mm (tiempo de duplicación, 29 horas) a 37 grados C en CO_2 al 5%. Se incubaron células con KPU-02, CA4, o CLC, preparadas como se describen en el Ejemplo 14, al reemplazar el medio original con un volumen igual de medio que contiene la concentración requerida del agente probado o vehículo DMSO, y la incubación se continúa a 37 grados C por 20 horas.

Avance Mitótico

[0541] La fracción de células en mitosis ahora concentración de droga dada (índice de mitótico), se determina en la línea de células de cáncer de pecho MCF7. Las células se revistieron a una densidad de $3x10^4$ células/ml en placas de seis pozos. Después de 24 horas, las células se incubaron en la ausencia o presencia de droga en un intervalo de concentraciones (1 nM a 1 μM) por 20 horas. Se recolectó medio y células se enjuagaron con versene (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, Na_2PO_4 8.1 mM y EDTA 0.5 mM), desprendieron con tripsina y agregaron de nuevo al medio para asegurar que las células mitóticas

326

324

flotantes y deficientemente conectadas se incluyeran en el análisis. Las células se fijaron con formalina al 10% en PBS durante la noche a 37 grados C, permeabilizaron del metanol por 10 minutos y tiñeron con 4, 6-diamino-fenilindol (DAPI) para visualizar núcleos. Las células teñidas se dispersaron en cubreobjetos en medio de montajes Vectashield (Burlingame, CA) y sellaron el portaobjetos con barniz de uñas. Microscopia de fluorescencia se empleo para determinar índices mitóticos. Los resultados fueron desviación promedio estándar de 4-7 experimentos en donde 300 células se contaron por cada concentración. La Ic_{50} fue la concentración de droga que indujo experimentalmente 50% de la acumulación mitótica máxima a 20 horas.

Microscopia de Inmunofluorescencia.

[0542] Se prepararon células para avance mitótico, excepto que las células se sembraron en cubreobjetos tratados con L-lisina (50 µg/ml, sigma) el día de la tinción, las células se enjuagaron en PBS y fijaron en formalina al 10% durante la noche a 37 grados C. las células se enjuagaron en PBS, permeabilizaron en metanol a -20 grados C e hidrataron con PBS. Los cubreobjetos se trataron con suero de cabra normal al 20% en PBS/BSA (1%) por una hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron en un cóctel monoclonal de ratón de

322

325

anti-alfa- y beta-tubulina, DM1A/DM1B diluido en PBS/BSA por 1 hora a temperatura ambiente, luego tiñeron con anticuerpos secundarios y conjugados con FITC y DAPI. Los cubreobjetos se montaron utilizando medio de anti-desvanecimiento Prolong (Molecular Probes, Eugene OR).

Preparación de Células para Análisis y Dinámica de Microtúbulos.

[0543] Se prepararon células para avance mitótico, excepto que para promover dispersión celular, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio que se han pre-tratados con poli-L-licina (50 µg/ml, sigma) por 2 horas, seguido por laminina y fibronectina (10 µg/ml, sigma) por 1 hora a 37 grados C. las células se incubaron condroma o DMSO por 20 horas y privaron de suero. Antes de análisis, los cubreobjetos se transfirieron a medio de registro o grabación (medio de cultivo que carece de rojo-fenol y bicarbonato de sodio amortiguado con HEPES 25mM y suplementado con 3.5 g/L de sacarosa). Para evita fotoblanqueado, se agrega Oxyrase (30 µl/ml, Oxyrase Inc., Mansfield, OH) al medio de grabación inmediatamente antes de sellar las celdas en una cámara circunscrita con dobles cubreobjetos.

Microscopia a Intervalos y Adquisición de Imagen

[0544] Microtúbulos se observaron utilizando una

326

326

microscopia de fluorescencia Nikon Eclipse E800 con un lente objetivo plan apochromat 1. 4N. A. x 100. La platina se circunscribió en una caja Pyrex y mantuvo a 36 ± 1 grado C mediante un sistema de calentamiento con aire forzado. 30 imágenes de cada célula se adquirieron a intervalos de 4-s utilizando una cámara digital Photometrics Cool SNAP HQ (Tucson, AZ) dirigida por el programa Metamorph (Universal Imaging, Media, PA) a 10 MHz, con un tiempo de exposición de 300 ms, una ganancia de 2, y combinación 2 x 2 para mejorar la brillantez.

Análisis de Dinámica de Microtúbulos

[0545] Las ubicaciones de los extremos plus de microtúbulos con el tiempo fueron seguidas utilizando la aplicación Metamorph Track Points exportada a Microsoft Excel y analizada utilizando el programa Real Time Measurement. Las longitudes de microtúbulos individuales se graficaron como una función del tiempo. El crecimiento individual y las velocidades de recortado se terminaron por regresión lineal. Cambios de $\geq$ 0.5 μm entre dos puntos se consideraron eventos de crecimiento o acortamiento, y cambios de < 0.5 μM entre dos puntos, se consideraron periodos de dinámica o pausa atenuadas. Al menos 25 microtúbulos se analizaron para cada condición. Los resultados son la desviación promedio y estándar de al

329

327

menos tres experimentos independientes.

[0546] La frecuencia de catástrofe basada en tiempo para cada microtúbulo se calculó al dividir el numero de catástrofes por microtúbulo por el tiempo dedicado en el crecimiento o atenuación. La frecuencia rescate basada en tiempo por microtúbulos, se calcula al dividir el número total de rescates por microtúbulo pro el tiempo dedicado en el acortamiento. Las frecuencias de rescate y catástrofe basadas en distancia, se calcularon generalmente al dividir el número de transiciones por la longitud desarrollada o acortada, respectivamente. Microtúbulos que fueron visibles por $\leq$ 2 min se incluyeron en el análisis de frecuencia. La dinámica estructural (dinamicity) por microtúbulos se calcula como la longitud de crecimiento y recortada dividida pro la extensión de vida total del microtúbulo. Microtúbulos que fueron visibles por $\geq$ 0.3 min se incluyeron en el análisis de dinamicidad.

Avance de Ciclo celular Bloqueado en prometa-fase

[0547] El intervalo concentración para KPU-02, CA4 y CLC sobre el cual las células se acumulan en mitosis, fue determinado. Después de 20 horas, 60-70% de las células se inhibieron en la prometa-fase, en comparación con 30-40% de células en meta-fase en estudios

330

328

en despolimerizadores MT tales como los vinca alcaloides y 2-metoxisodiol y los estabilizantes de MT tales como taxol, epotilona B y discodermolida (Jordan MA (2002) *Current Medicinal Chemistry-Anti-cáncer Agents* 2: 1-17, (que aquí se incorpora por referencia totalmente). La concentración de droga necesaria para 50% de bloqueo mitótico máximo (IC_{50}) se evalúa entre 1 nM y 1 μM de droga (Figura 51). La Figura 51 ilustra curvas de respuesta [Droga] para inhibición de avance mitótico por KPU-02, CA4, y CLC. Células MCF7 se cultivaron en la presencia de NPI-2358 (o), CA4(□), y colchicina (◊). Para evaluar índices mitóticos, células MCF7 se revistieron a una densidad de 3 x 10^4 células/ml en placas de 6 pozos. Después de 24 horas, las células se incubaron en la ausencia o presencia de droga sobre un intervalo de concentraciones (1 nM a 1 μM) por 20 horas. Las células se fijaron y tiñeron con DAPI para visualizar los núcleos. Microscopía de fluorescencia se utiliza para determinar índices mitóticos. Los resultados son la desviación promedio y estándar de tres o cuatro experimentos en donde 300 células se contaron por cada concentración de droga. El bloque mitótico IC_{50} para KPU-02 fue 17.4 ± 1.2 nM, CA4 fue 5.4 ± 0.7 nM, y CLC fue 23.8 ± 3.1 nM (Tabla 23).

Tabla 23. Inhibición de avance mitótico.

328

329

Compuesto	Promedio de bloque mitótico. IC_{50}±sd (nM)	n
KPU-02	17.4±1.2	4
CA4	5.4±0.7	3
CLC	23.8±3.1	4

[0548] La mayoría de los agentes dirigidos a MT bloquean mitosis en la transición de meta-fase a ana-fase. El bloque mitótico en la transición de meta-fase a ana-fase, se asocia con supresión de la dinámica de MT. Sin estar ligados por ninguna teoría particular el bloque prometa-fase previo, junto con el agotamiento de polímetro MT, sugiere un distinto mecanismo de acción para KPU-02 en comparación con otras drogas despolimerizantes de MT, por ejemplo vinblastina, que a bajas concentraciones estabilizan la dinámica de MT.

Despolimerización del huso acromático y el arreglo de interfase MTs

[0549] KPU-02, CA4, y CLC se observaron como despolimerizadores de microtúbulos potentes en células MCF7. Aunque microtúbulos de huso acromático son más susceptibles a despolimerización y/o inhibición de polimerización que los microtúbulos de arreglo de

338

330

interfase, ambas poblaciones de microtúbulos fueron afectadas (Figura 52). La Figura 52 ilustra imágenes de microscopia de inmuno-fluorescencia de células MCF7. Arreglos de interfase son relativamente más estables a polimerización por KPU-02, CA4 CLC que los husos acromáticos. Se prepararon células y sembraron para avance mitótico y trataron con el bloque mitótico IC_{50} para cada droga por 20 horas. Se incubaron células en un cóctel monoclonal de ratón de anti-alfa-y-beta-tubulina, DM1A/DM1B después tiñeron con anticuerpo secundario conjugado FITC y DAPI. a-d, Tubulina en control (a), KPU-02 (b), CA4 (c), y CLC (d) células tratadas, y e-h, ADN en control (e) células tratadas con KPU-02(f), CA4 (g), y CLC (h). Flechas estrechas indican polímero de huso acromático y cromosomas mitóticos y flechas más gruesas indican arreglo de interfase y núcleos.

[0550] A IC_{25} para bloque mitótico, KPU-02 altera dramáticamente la morfología del huso. La Figura 53A-C ilustra imágenes de microscopia de inmuno-fluorescencia de células MCF7 tratadas con KPU-02 (A), CA4 (B), y CLC (C) por 20 horas. Destrucción de huso acromático con creciente concentración de drogas. 1-4, Alfa y beta tubulina en control (1), una concentración de IC_{25} para bloque mitótico (2), la IC_{50} para bloque mitótico (3), y dos veces la IC_{50}

333

331

para el bloque mitótico (4); 5-8, correspondiente a imágenes de ADN para los paneles adjuntos. No hubo husos normales, bipolares en IC_{25} para KPU-02 o CA4 (Figuras 53A y B). Células tratadas con compuesto tuvieron husos monopolares o bipolares con cromosomas no congregados. En contraste, husos bipolares normales persisten en IC_{25} para CLC (Figura 53C). En IC_{50} para KPU-02, 75% de las células mitóticas contienen focos o ásteres de tubulina, y las células restantes no tuvieron polímero mitótico detectable. En la presencia CLC, la mitad de las células fueron bipolares con cromosomas no congregados y la mitad restante fueron monopolares. A concentraciones del doble IC_{50} para bloque mitótico, hubo poco polímero MT detectable en células mitóticas tratadas como KPU-02, CA4, o CLC.

[0551] Los conjuntos de interfase de microtúbulos fueron más resistentes a despolimerización que los husos acromáticos para todos los compuestos examinados (Figura 52). Sin embargo, un decremento cualitativo en polímeros se observa en una forma dependiente de dosis para todos los tres compuestos (Figura 54 A-C). La Figura 54A-C ilustra imágenes de microscopia de inmunofluorescencia de células MCF7 tratadas con KPU-02 (a), CA4 (b), y CLC (c) por 20 horas. Despolimerización de interfase de MT con creciente

332

concentración de drogas. 1-4, Alfa y beta tubulina en control (1), una concentración IC_{25} para bloque mitótico (2), IC_{50} para bloque mitótico (3), 2X IC_{50} para bloque mitótico (4); 5-8 imágenes correspondientes de ADN para los paneles adjuntos. Supuestamente, se secuestra tubulina en estas células de interfase a pesar de la presencia de MAPs estabilizantes intracelulares, tal como tubulina rica en MAP se secuestran en ensayos de masa de polímero *in vitro*.

Falte de supresión o modulación de inestabilidad dinámica de MT en células MCF7 vivas

[0552] KPU-02, así como CA4 no tiene un efecto medible en la inestabilidad dinámica de MT a concentraciones que afectan 25% (Tabla 24) o 50% (Tabla 25) del bloque mitótico máximo en células MCF7. Sin estar ligados por ninguna teoría en particular estos datos sugieren que el mecanismo anti-proliferativo de acción KPU-02 (y CA4) se debe primordialmente a inhibición de polimerización de MT en vez de supresión de dinámicas de microtúbulos.

Tabla 24. Inestabilidad dinámica en el bloque mitótico

	Control	sd	NPI-2358	Sd
Velocidades				

335

333

	Control	sd	NPI-2358	Sd
Promedio (μM/min)				
Crecimiento	9.03	4.66	11.89	6.23
Acortamiento	32.85	18.06	31.87	15.12
Duración Promedio (min) Crecimiento	0.41	0.27	0.31	0.15
Acortamiento	0.20	0.07	0.20	0.07
Atenuación	0.58	0.38	0.73	0.36
Por ciento de tiempo dedicado Crecimiento	41.83		29.66	
Acortamiento	18.57		20.53	
Atenuación	39.60		49.81	
Frecuencia de catástrofe (min -1)	1.15		1.27	
Rescate	3.05		2.79	
Din. (μm/min)	9.87		10.07	
MTs/células	16/30		11/33	
Minutos	40.66		43.69	

336

334

Tabla 24 (continúa)

	CA4	sd	CLC	sd
Velocidades Promedio (μM/min) Crecimiento	10.59	4.75	11.31	8.46
Acortamiento	40.21	18.90	29.17	17.13
Duración Promedio (min) Crecimiento	0.27	0.12	0.26	0.14
Acortamiento	0.21	0.09	0.23	0.29
Atenuación	0.45	0.32	0.56	0.43
Por ciento de tiempo dedicado Crecimiento	35.31		33.07	
Acortamiento	25.19		25.96	
Atenuación	39.50		40.97	
Frecuencia de catástrofe (min -1)	1.52		1.57	

335

	CA4	sd	CLC	sd
Rescate	1.90		2.95	
Din. (μm/min)	13.87		11.31	
MTs/células	13/39		8/26	
Minutos	39.62		35.29	

Tabla 25. Inestabilidad dinámica MT en el bloque mitótico

	Control	sd	NPI-2358	Sd
Velocidades Promedio (μM/min) Crecimiento	9.03	4.66	10.63	6.78
Acortamiento	32.85	18.06	34.06	12.84
Duración Promedio (min) Crecimiento	0.41	0.27	0.30	0.18
Acortamiento	0.20	0.07	0.22	0.08
Atenuación	0.58	0.38	0.61	0.41
Por ciento de tiempo dedicado	41.83		33.02	

338

336

	Control	sd	NPI-2358	Sd
Crecimiento				
Acortamiento	18.57		20.92	
Atenuación	39.60		46.06	
Frecuencia de catástrofe (min -1)	1.15		1.22	
Rescate	3.05		2.60	
Din. (μm/min)	9.87		10.64	
MTs/células	30/16		25/11	
Minutos	40.66		33.13	

Tabla 25 (continúa)

	CA4 sd	sd
Velocidades Promedio (μM/min) Crecimiento	11.21	5.64
Acortamiento	29.88	18.87
Duración Promedio (min) Crecimiento	0.33	0.18
Acortamiento	0.22	0.08
Atenuación	0.55	0.44

337

Por ciento de tiempo dedicado Crecimiento	43.64	
Acortamiento	20.13	
Atenuación	36.23	
Frecuencia de catástrofe (min -1)	1.09	
Rescate	2.79	
Din. (μm/min)	10.91	
MTs/células	29/9	
Minutos	39.14	

[0553] Los ejemplos descritos anteriormente se establecen solo para ayudar en la comprensión de la invención. De esta manera, una persona con destreza en la técnica apreciará que los métodos y compuestos descritos abarcan y de otra forma pueden proporcionar adicionales derivados de deshidrofenilahistinas.

[0554] Una persona con destreza en la técnica fácilmente apreciará que la presente invención está bien adaptada para obtener, por ejemplo los fines y ventajas mencionados, así como otros inherentes. Los métodos y

340

338

procedimientos aquí descritos actualmente son representativos de modalidades preferidas y son ejemplares y no se pretenden como limitaciones en el alcance de la invención. Cambios ahí y otros usos se les ocurrirán a aquellos con destreza en la técnica que son abarcados dentro del espíritu de la invención.

[0555] Será fácilmente aparente para una persona con destreza en la técnica que variantes sustituciones y modificaciones pueden realizarse en la invención aquí descrita, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención.

[0556] Como se mostró anteriormente, todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta especificación son indicativas de los niveles de aquellos con destreza en la técnica a la cual se refiere la invención. Todas las patentes y publicaciones aquí se incorporan por referencia en la medida permitida por la ley, de manera tal que cada patente y publicación individual pueda ser tratada como se indica específica e individualmente para incorporarse por referencia.

[0557] La invención descrita en forma ilustrativa aquí, convenientemente puede practicarse en la ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente aquí. Los

344

339

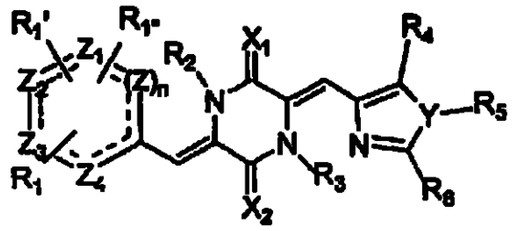
términos y expresiones que se han empleado, se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que el uso de estos términos y expresiones indique la exclusión de equivalentes de las características constadas y descritas o sus porciones. Se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención. De esta manera, habrá de entenderse que aunque la presente invención se ha descrito específicamente por modalidades, preferencias y características, modificaciones y variaciones opcionales de los conceptos aquí descritos pueden ser contemplados por aquellos con destreza en la técnica y que dichas modificaciones y variaciones se consideran que caben dentro del alcance de la invención.

342

340

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura de la fórmula (I)



(I)

en donde:

R_1, R_4, y R_6, cada uno se elige por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado que incluye alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino,

341

amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

R_1' y R_1'' se elige cada uno independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

R, R_1' y R_1'' están ligados ya sea covalentemente entre sí o no covalentemente;

394

342

R_2, R_3, y R_5 cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo saturado, C_1-C_{12} alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y nitro sustituido, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno ya sea sin sustituir o sustituido con un grupo R_5 como se definió anteriormente;

Y se elige del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con R_5, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

n es un entero igual a cero, uno o dos;

Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada uno se eligen por separado de un átomo de carbono, átomo de azufre, átomo de nitrógeno o átomo de oxígeno; y

346

343

los enlaces punteados pueden ser enlaces sencillos o dobles;

y en donde dicho compuesto reduce la proliferación vascular o densidad vascular.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno de R_2, R_3, R_5 y R_6 es un átomo de hidrógeno.

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno de X_1 y X_2 es un átomo de oxígeno.

4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R_4 es un C_1-C_{12} alquilo saturado.

5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el C_1-C_{12} alquilo saturado es un grupo butilo terciario.

6. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R_1 comprende un fenilo sustituido.

7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el grupo fenilo sustituido es metoxibenceno.

346

344

8. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque n es igual a cero o uno.

9. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque n es igual a uno.

10. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque n es igual a uno y Z, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son cada uno un átomo de carbono.

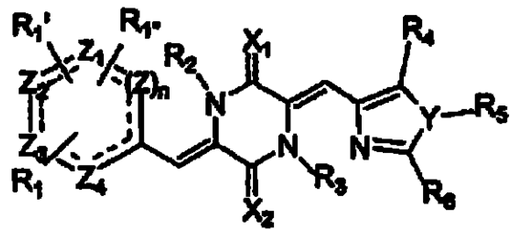
11. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R^4 se elige del grupo que consiste de un átomo de halógeno, ter-butilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ammino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

344

345

12. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es KPU-02.

13. Un compuesto que tiene la estructura de la Formula (I):



(I)

en donde:

R_1, R_4, y R_6, cada uno se elige por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado que incluye alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y C_1-C_{24} alquilo

348

346

saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

R_1' y R_1" se elige cada uno independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

349

347

R, R_1' y R_1" están ligados ya sea covalentemente entre sí o no covalentemente;

R_2, R_3, y R_5 cada uno se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos C_1-C_{12} alquilo saturado, C_1-C_{12} alquenilo insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, y nitro sustituido, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

X_1 y X_2 se eligen por separado del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno ya sea sin sustituir o sustituido con un grupo R_5 como se definió anteriormente;

Y se elige del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con R_5, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

n es un entero igual a cero, uno o dos;

350

348

Z, por cada n separada, si no es cero, y Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 cada uno se eligen por separado de un átomo de carbono, átomo de azufre, átomo de nitrógeno o átomo de oxígeno; y

los enlaces punteados pueden ser enlaces sencillos o dobles;

y en donde dicho compuesto apunta preferncialmente a la vasculatura de tumor contra vasculatura de tejido sin tumor.

14. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque cada uno de R_2, R_3, R_5 y R_6 es un átomo de hidrógeno.

15. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque cada uno de X_1 y X_2 es un átomo de oxígeno.

16. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R_4 es un C_1-C_{12} alquilo saturado.

17. El compuesto de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el C_1-C_{12} alquilo saturado es un grupo butilo terciario.

354

349

18. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R_1 comprende un fenilo sustituido.

19. El compuesto de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el grupo fenilo sustituido es metoxibenceno.

20. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque n es igual a cero o uno.

21. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque n es igual a uno.

22. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque n es igual a uno y Z, Z_1, Z_2, Z_3 y Z_4 son cada uno un átomo de carbono.

23. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R^4 se elige del grupo que consiste de un átomo de halógeno, ter-butilo, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ammino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos, hidroxi, carboxi, -CO-O-R_7, ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado, y carbonilo -CCO-R_7, en donde R_7 se elige de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y

352

350

C_1-C_{24} alquilo saturado, C_1-C_{24} alquenilo insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, nitro sustituido, fenilo, y grupos fenilo sustituidos;

24. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el compuesto es KPU-02.

25. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el compuesto de la reivindicación 1.

26. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el compuesto de la reivindicación 13.

353

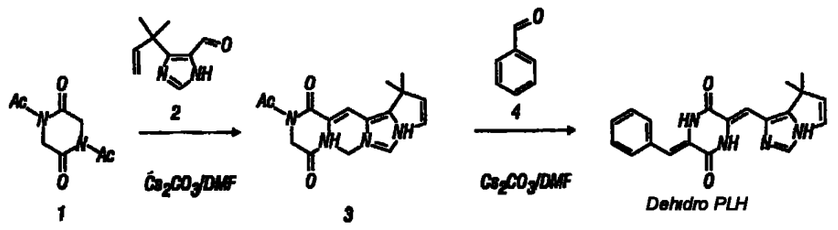


FIG. 1

352

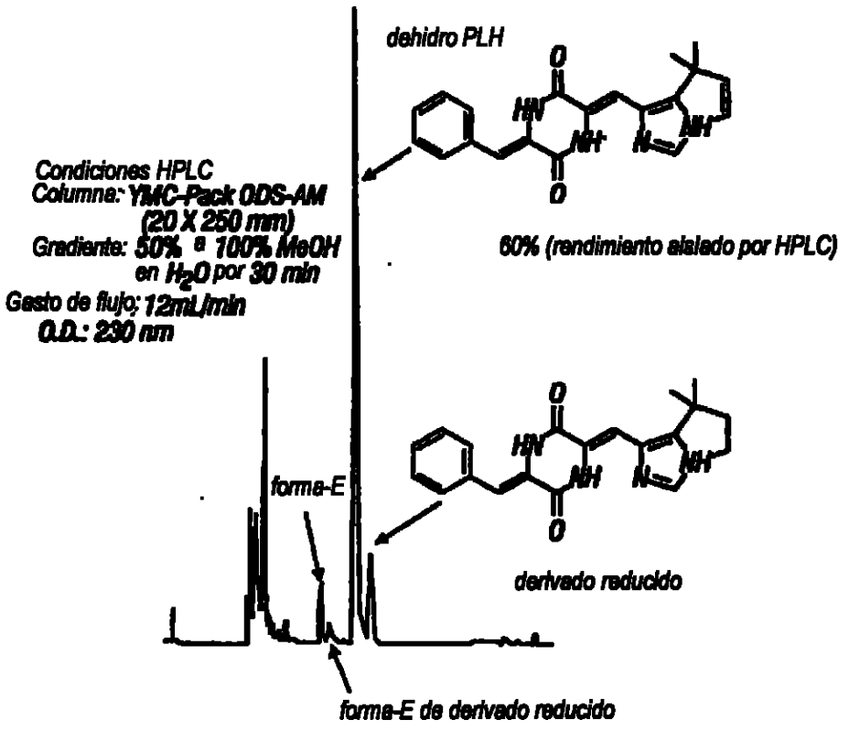

dehidro PLH
Condiciones HPLC
Columna: YMC-Pack ODS-AM
(20 X 250 mm)
Gradiente: 50% a 100% MeOH
en H_2O por 30 min
Gasto de flujo: 12mL/min
O.D.: 230 nm
60% (rendimiento aislado por HPLC)
forma-E
derivado reducido
forma-E de derivado reducido

FIG. 2

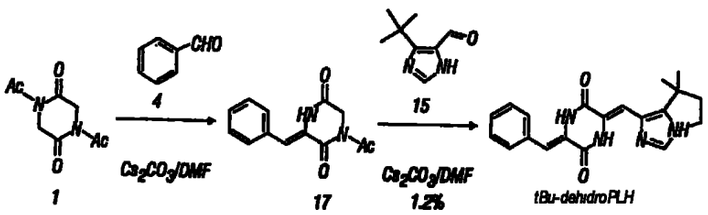

Ac
N
O
N
Ac
O
1
CHO
4
Cs2CO3/DMF
HN
17
15
Cs2CO3/DMF
1.2%
NH
tBu-dehydroPLH

FIG. 3

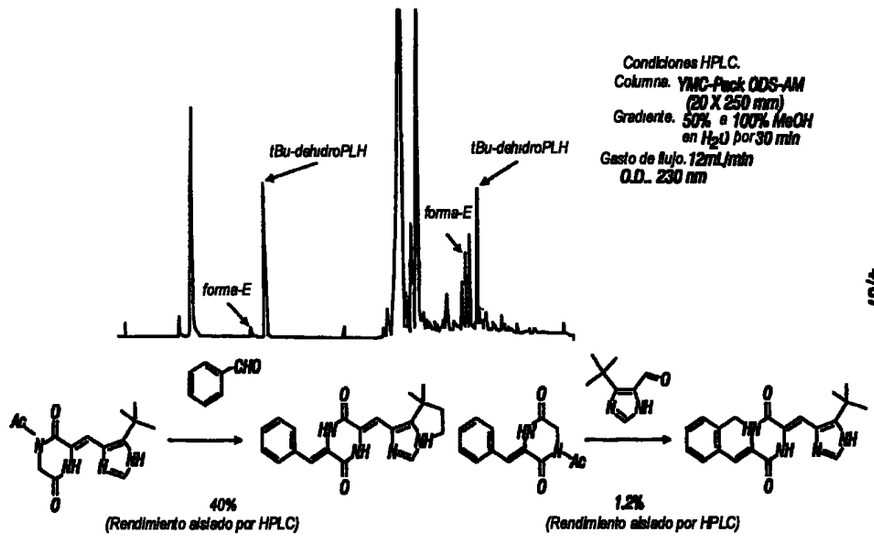

Condiciones HPLC.
Columna. YMC-Pack ODS-AM (20 X 250 mm)
Gradiente. 50% a 100% MeOH en H2O por 30 min
Gasto de flujo. 12mL/min
O.D.. 230 nm
tBu-dehidroPLH
tBu-dehidroPLH
forma-E
forma-E
CHO
40%
(Rendimiento aislado por HPLC)
1.2%
(Rendimiento aislado por HPLC)

FIG. 4

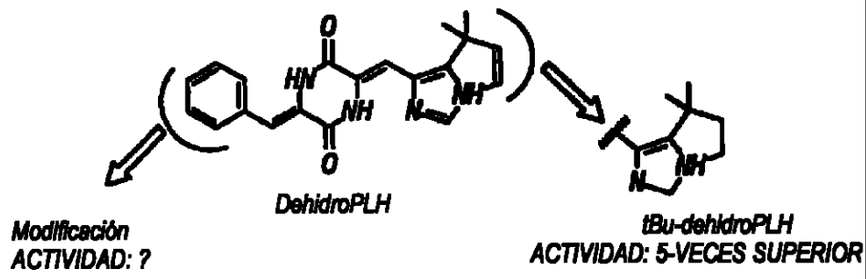

DehidroPLH
Modificación
ACTIVIDAD: ?
tBu-dehidroPLH
ACTIVIDAD: 5-VECES SUPERIOR

FIG. 5

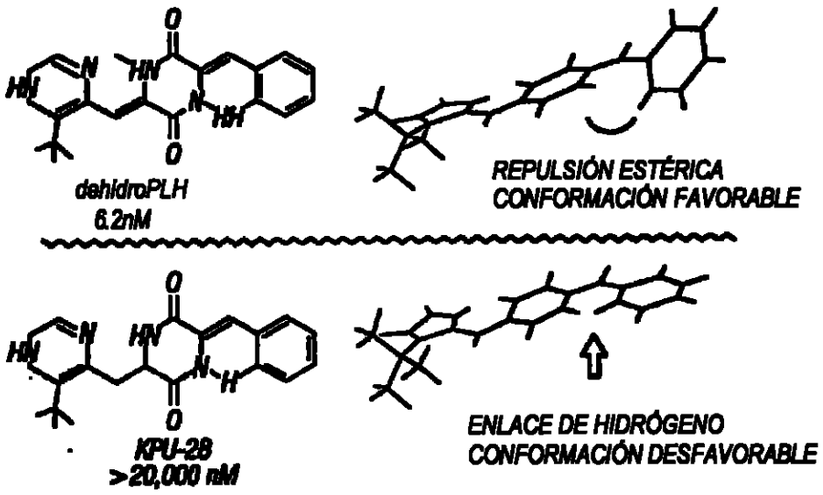

dehidroPLH
6.2nM
REPULSIÓN ESTÉRICA
CONFORMACIÓN FAVORABLE
KPU-28
>20,000 nM
ENLACE DE HIDRÓGENO
CONFORMACIÓN DESFAVORABLE

FIG. 6

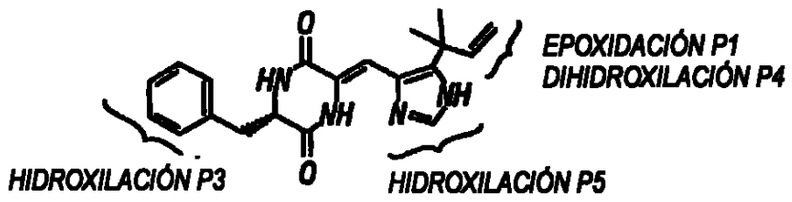

EPOXIDACIÓN P1
DIHIDROXILACIÓN P4
HIDROXILACIÓN P3
HIDROXILACIÓN P5

FIG. 7

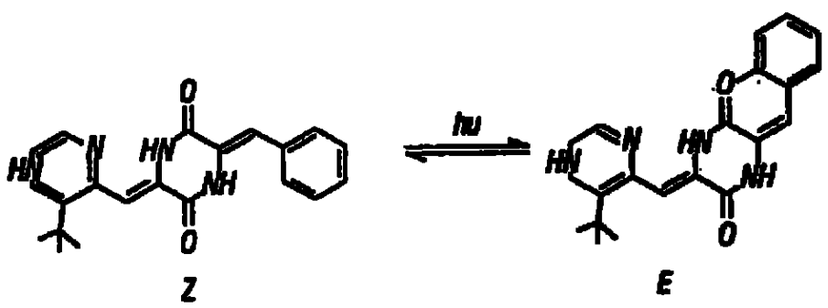

hν
Z
E

FIG. 8

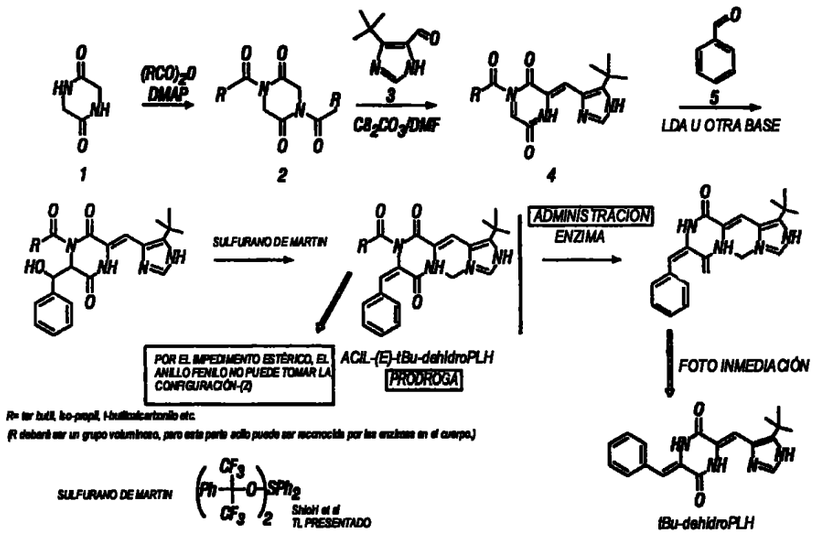

(RCO)2O
DMAP
1
2
3
Cs2CO3/DMF
4
5
LDA U OTRA BASE
SULFURANO DE MARTIN
ADMINISTRACION
ENZIMA
POR EL IMPEDIMENTO ESTÉRICO, EL ANILLO FENILO NO PUEDE TOMAR LA CONFIGURACIÓN-(Z)
ACIL-(E)-tBu-dehidroPLH
PRODROGA
FOTO INMEDIACIÓN
tBu-dehidroPLH
R= ter butil, iso-propil, t-butiloxicarbonilo etc.
(R deberá ser un grupo voluminoso, para esta parte sólo puede ser reconocida por las enzimas en el cuerpo.)
SULFURANO DE MARTIN
Shioiri et al
TL PRESENTADO

FIG. 9

715T

358

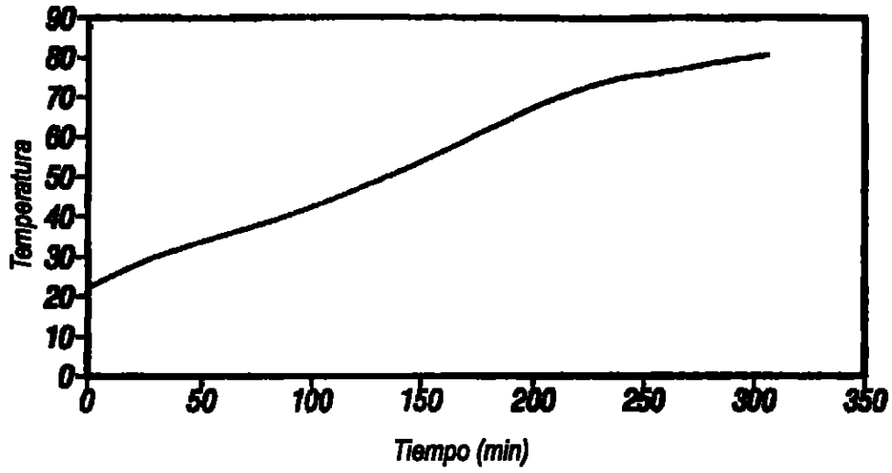


FIG. 10

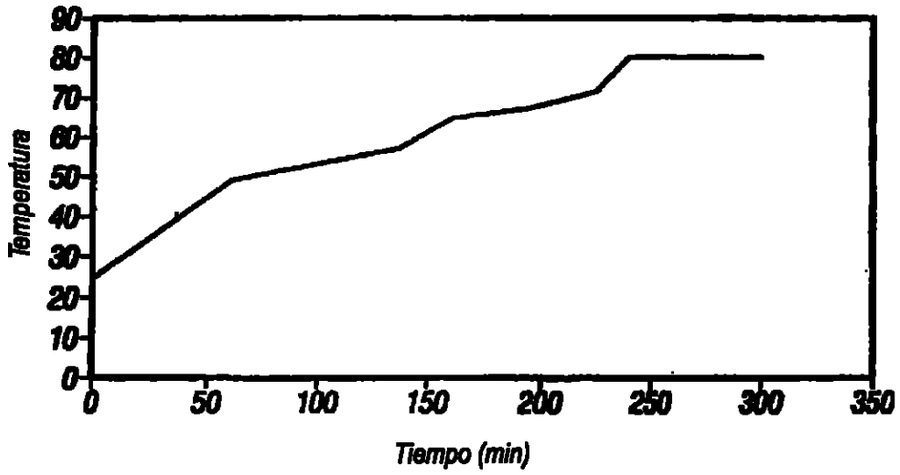


FIG. 11

359

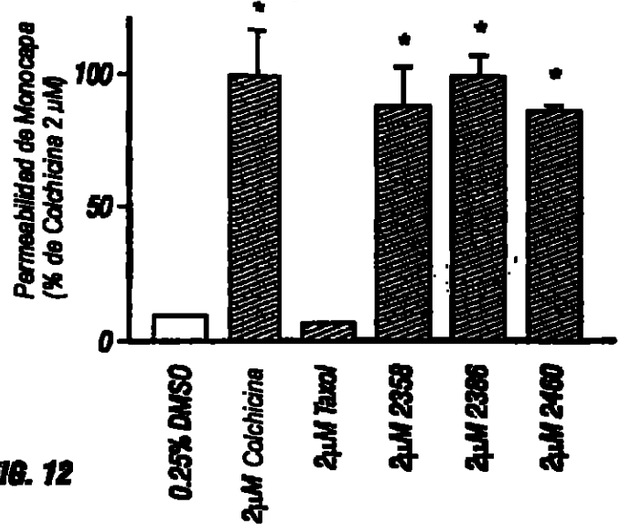
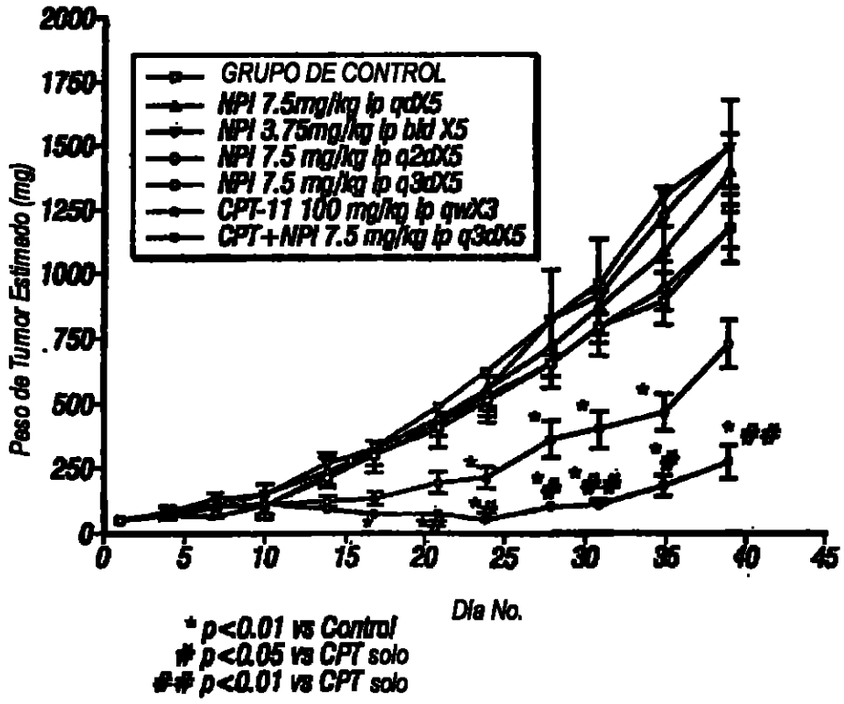


FIG. 12



* p<0.01 vs Control
\# p<0.05 vs CPT solo
\#\# p<0.01 vs CPT solo

FIG. 13

360

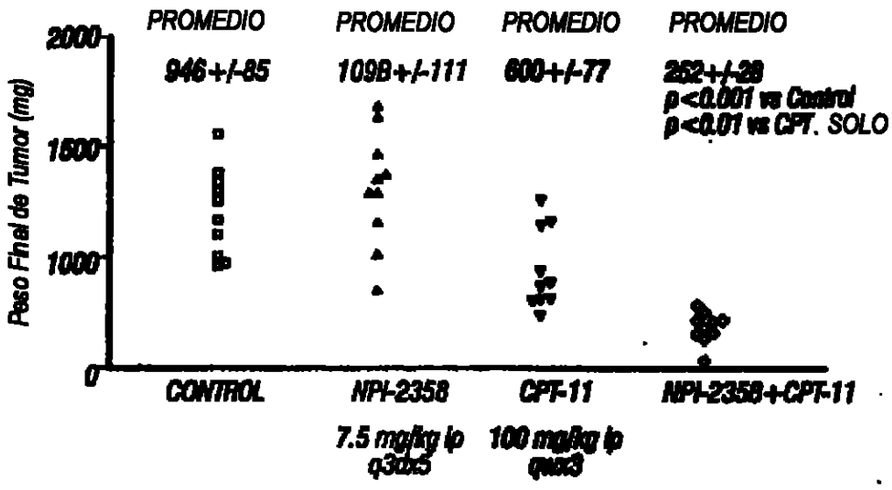


FIG. 14

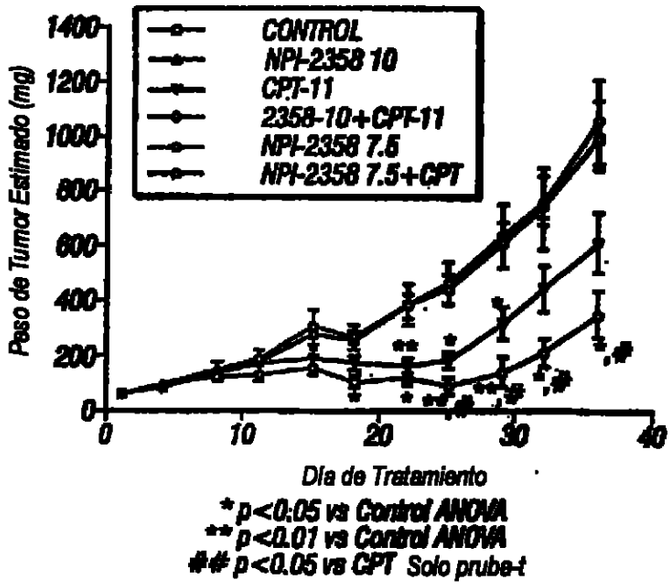


FIG. 15

361

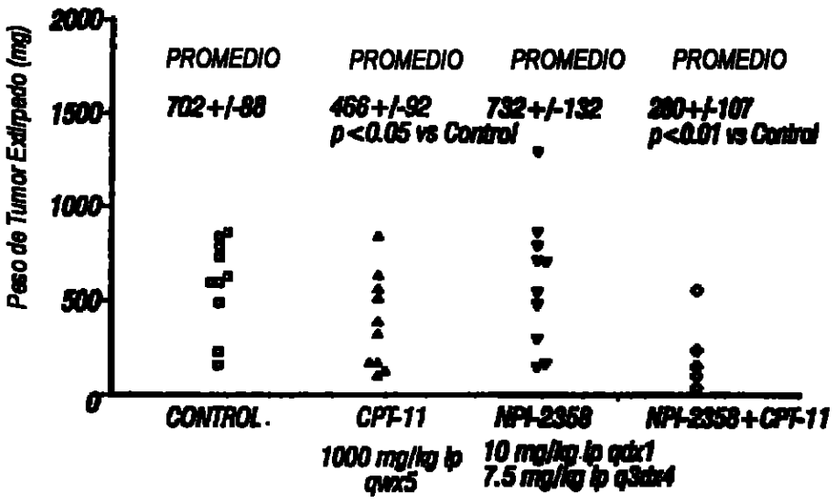


FIG. 18

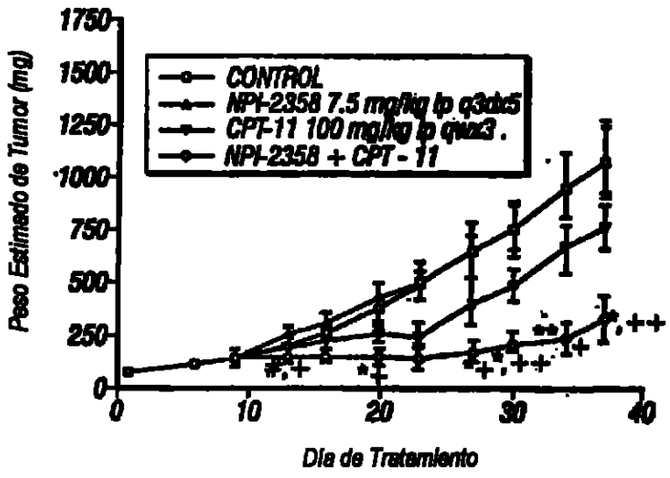


FIG. 17A

364

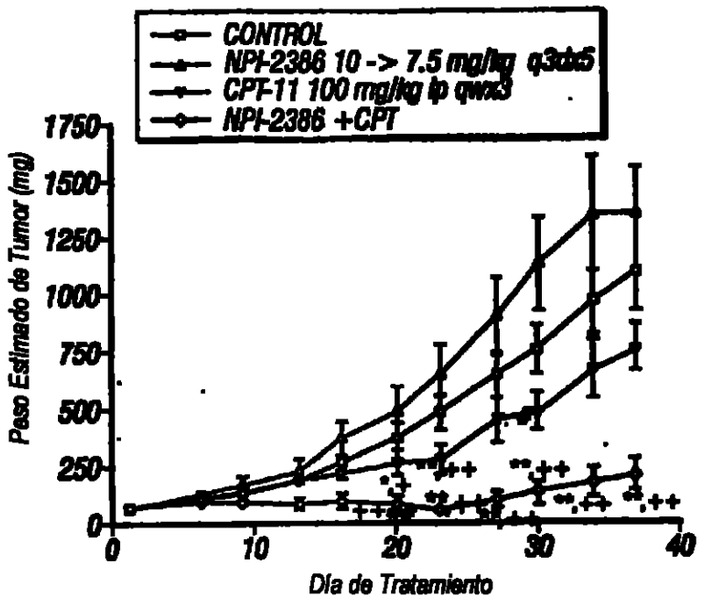


FIG. 17B

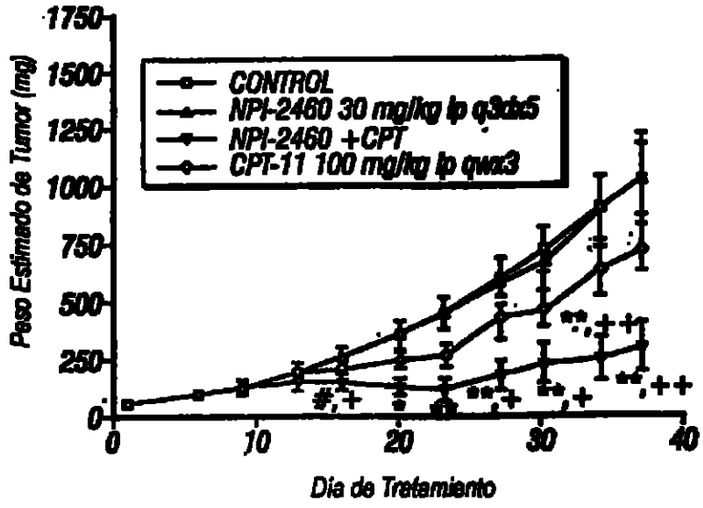


FIG. 17C

363

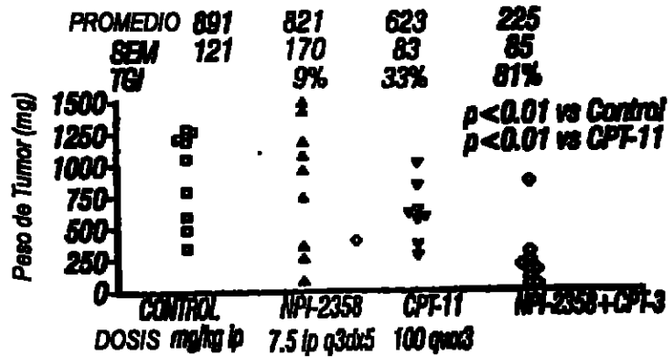


FIG. 18A

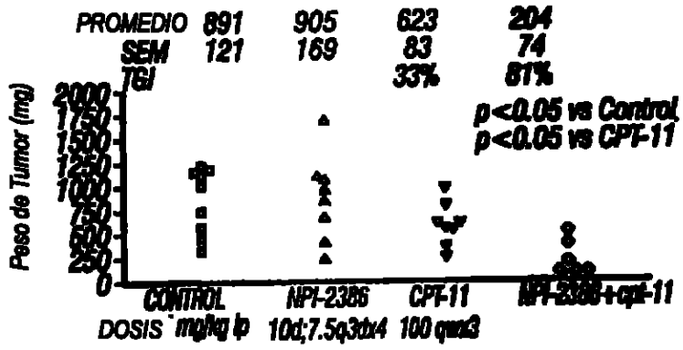


FIG. 18B

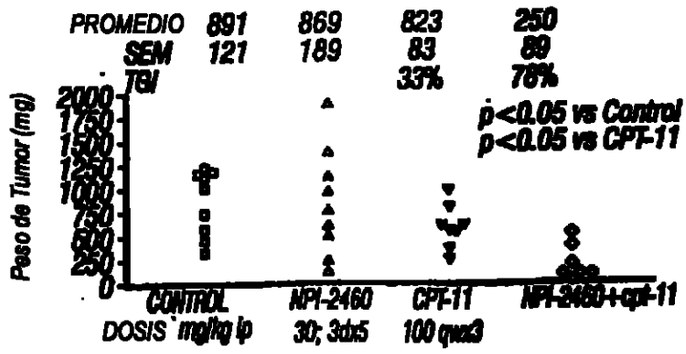


FIG. 18C

366

364

Estudio 2164

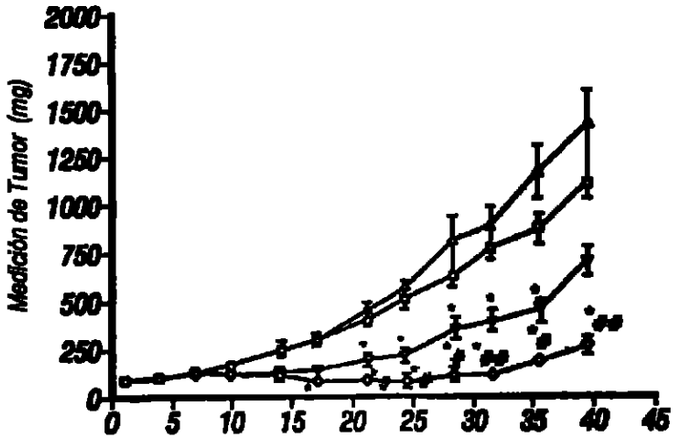


FIG. 18A

* p <0.05 vs Control
** p <0.01 vs Control
p <0.05 vs CPT Solo
p <0.01 vs CPT Solo

Estudio 2288

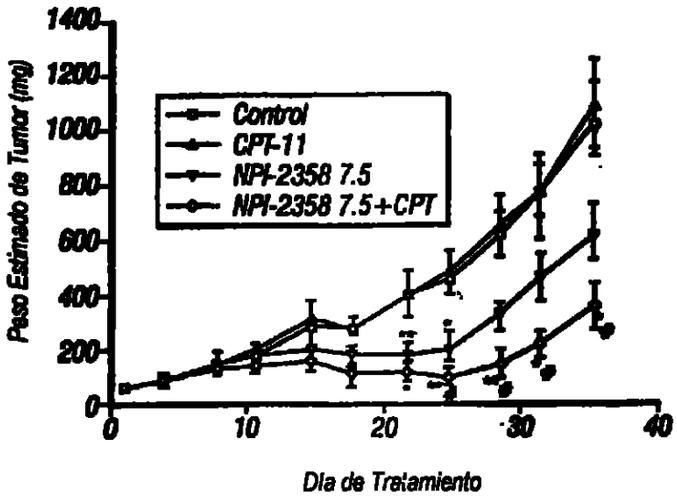


FIG. 18B

365

Estudio 2139

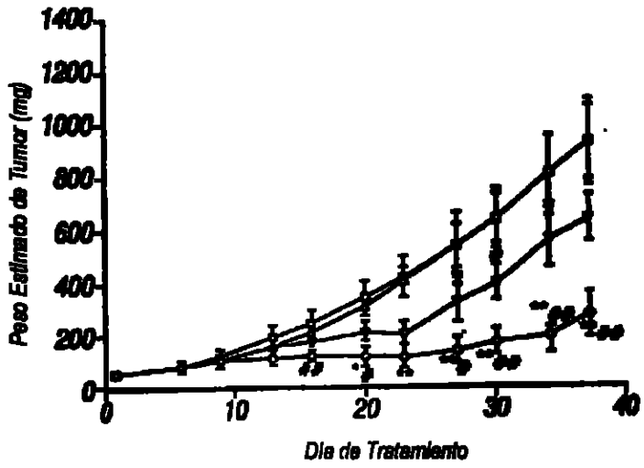


FIG. 19C

Estudio 2164

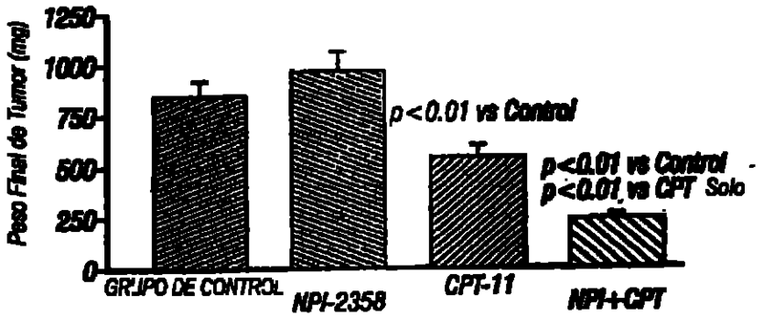


FIG. 20A

366

Estudio 2288

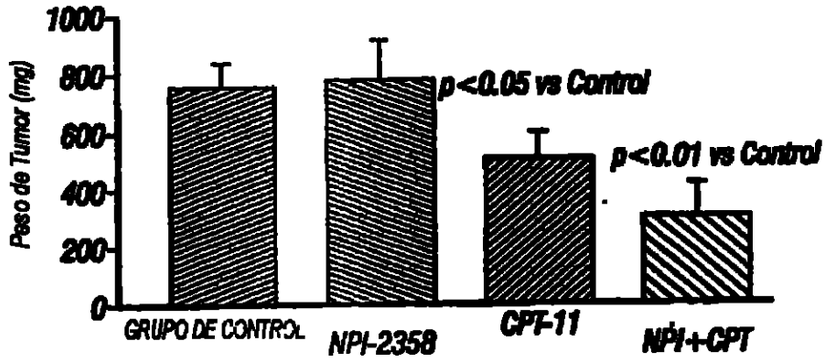


FIG. 20B

Estudio 2139

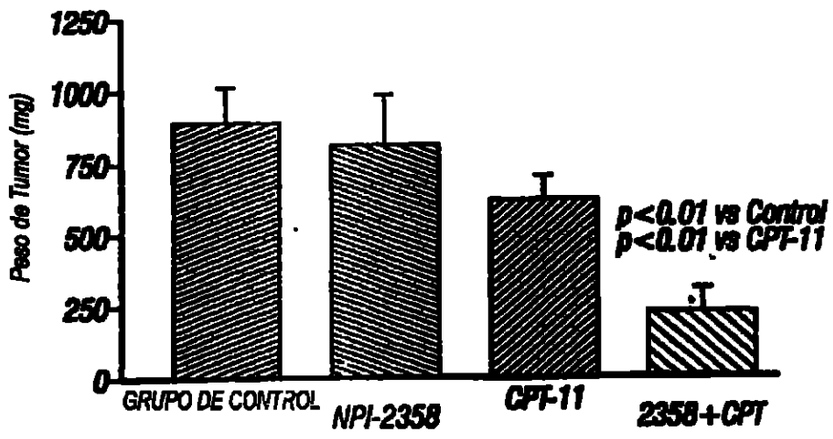


FIG. 20C

369

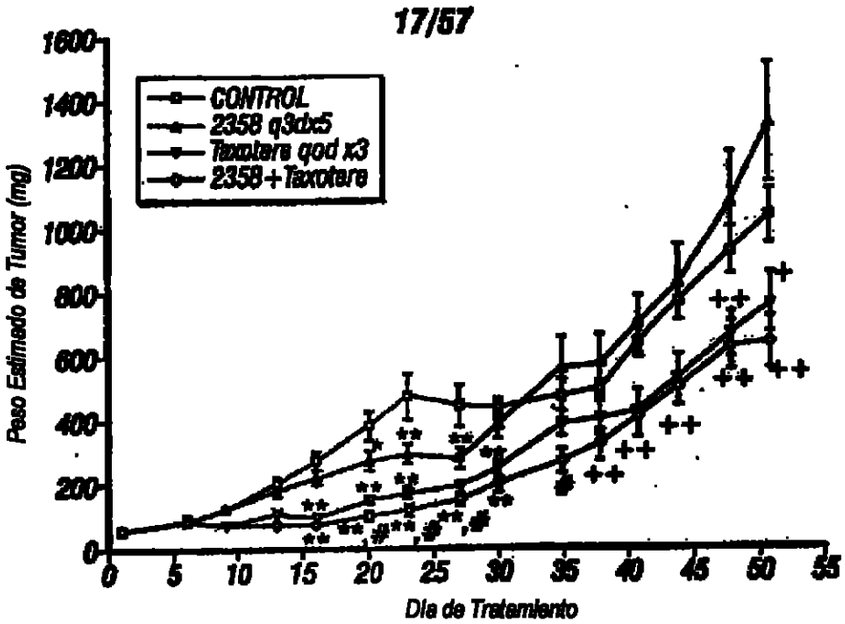
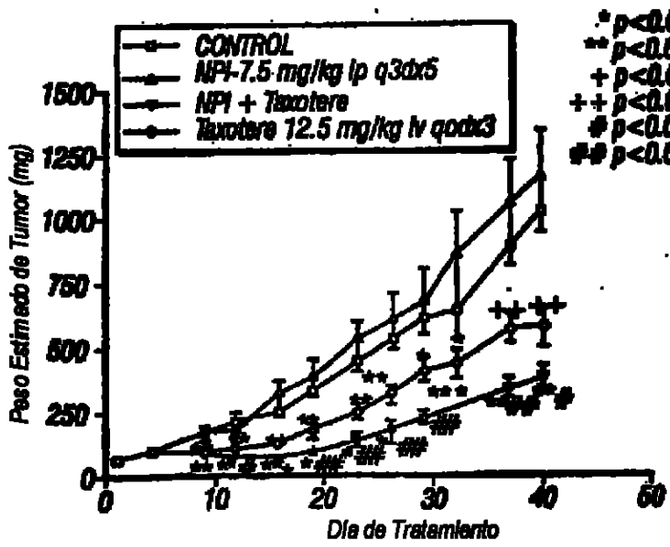


FIG. 21

* p<0.05 vs Control, ANOVA
** p<0.01 vs Control, ANOVA
p<0.05 vs Taxotere solo, prueba-t
+ p<0.05 vs Control, prueba-t
++ p<0.01 vs Control, prueba-t



* p<0.05 vs Control, ANOVA
** p<0.01 vs Control, ANOVA
+ p<0.05 vs prueba-t
++ p<0.01 vs prueba-t
p<0.05 vs Taxotere prueba-t
p<0.01 vs Taxotere prueba-t

FIG. 22A

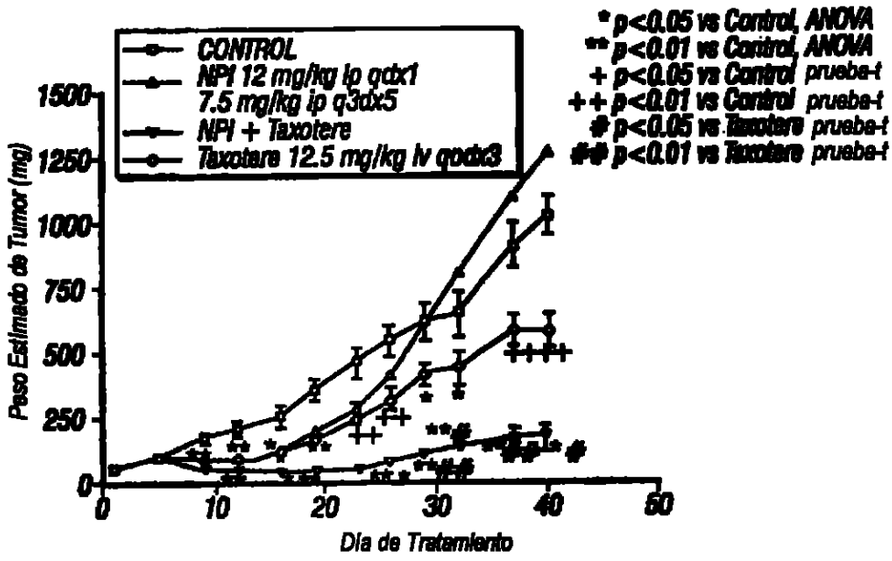


FIG. 22B

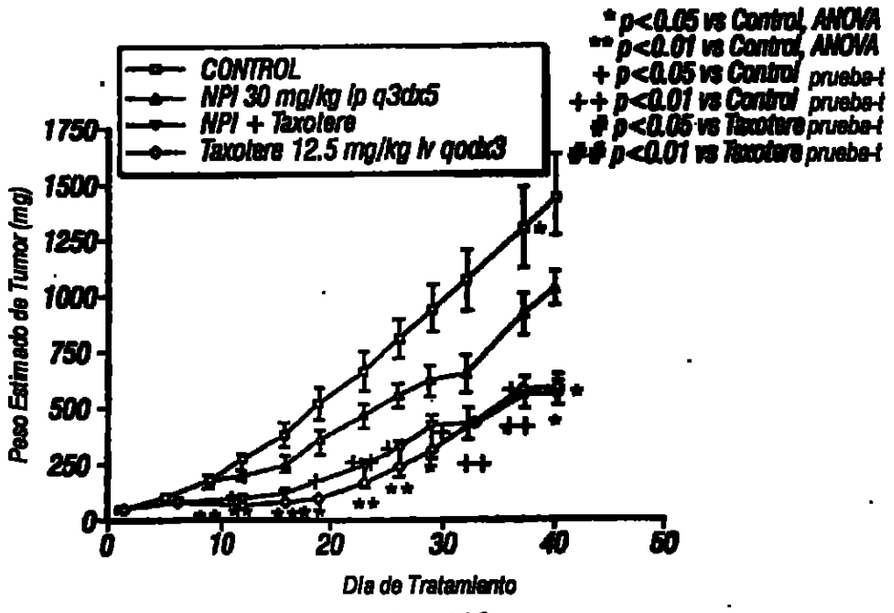


FIG. 22C

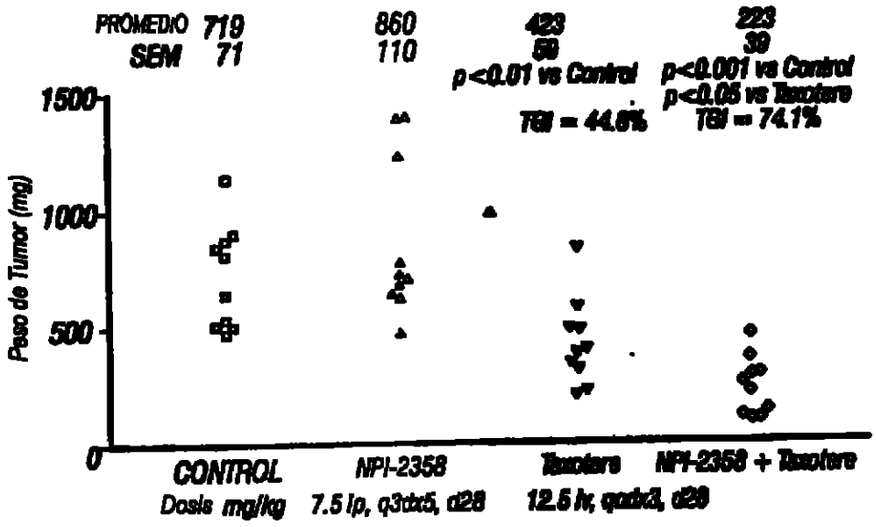

PROMEDIO 719 860 423 223
SEM 71 110 59 39
p<0.01 vs Control
p<0.001 vs Control
p<0.05 vs Taxotere
TGI = 44.6%
TGI = 74.1%
1500
1000
500
0
Peso de Tumor (mg)
CONTROL
NPI-2358
Taxotere
NPI-2358 + Taxotere
Dosis mg/kg
7.5 ip, q3dx5, d28
12.5 iv, qodx3, d28

FIG. 23

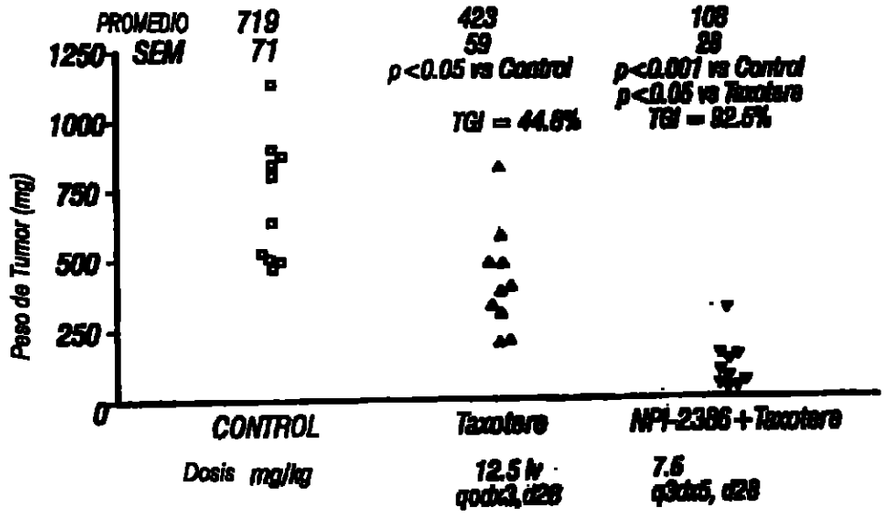

PROMEDIO 719 423 108
SEM 71 59 28
p<0.05 vs Control
p<0.001 vs Control
p<0.05 vs Taxotere
TGI = 44.6%
TGI = 92.5%
1250
1000
750
500
250
0
Peso de Tumor (mg)
CONTROL
Taxotere
NPI-2386+Taxotere
Dosis mg/kg
12.5 iv
qodx3,d28
7.5
q3dx5, d28

FIG. 24

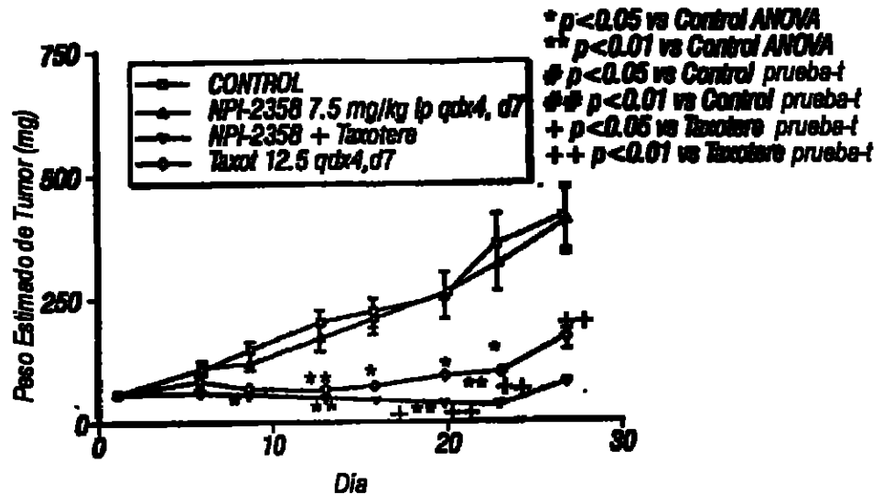
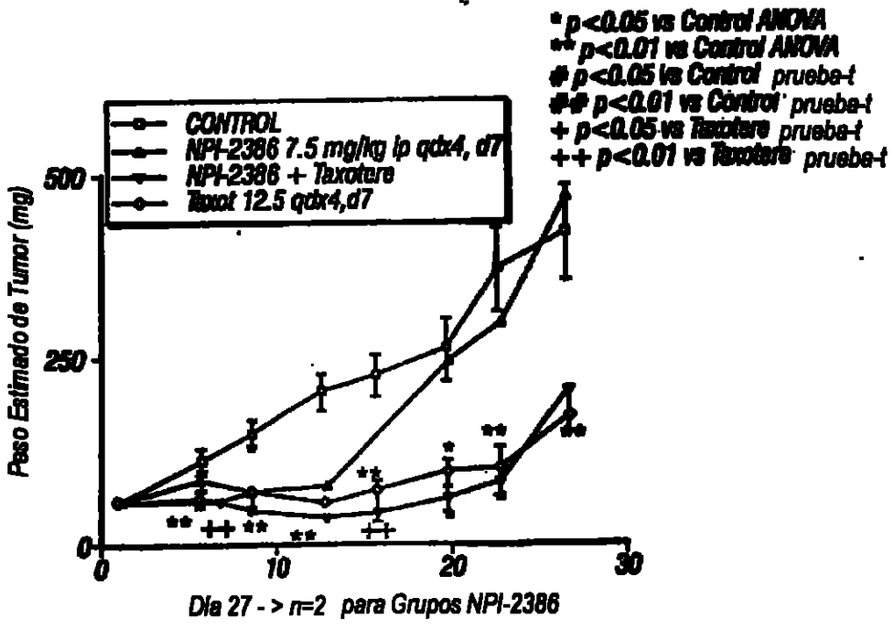


FIG. 25A



Dia 27 - > n=2 para Grupos NPI-2386

FIG. 25B

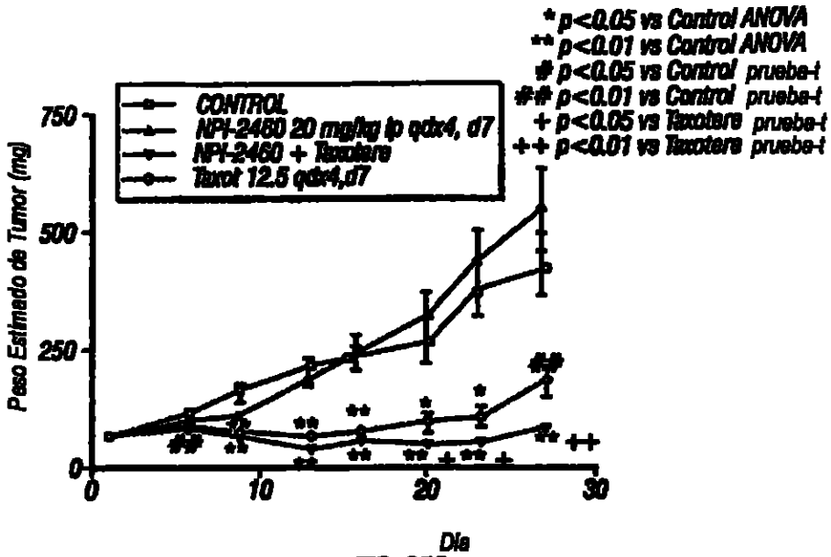


FIG. 25C

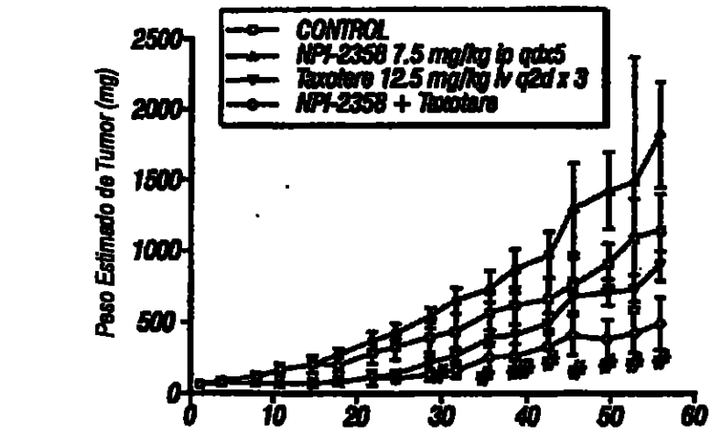


FIG. 26

372

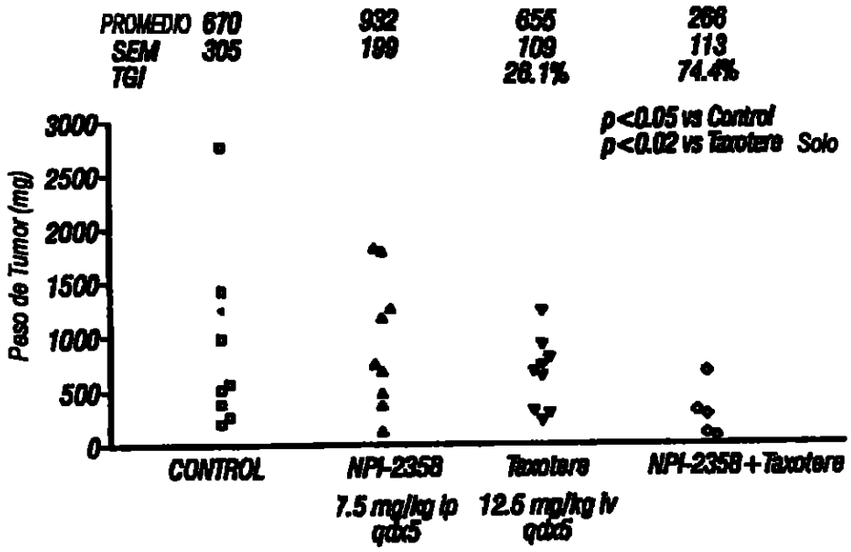


FIG. 27

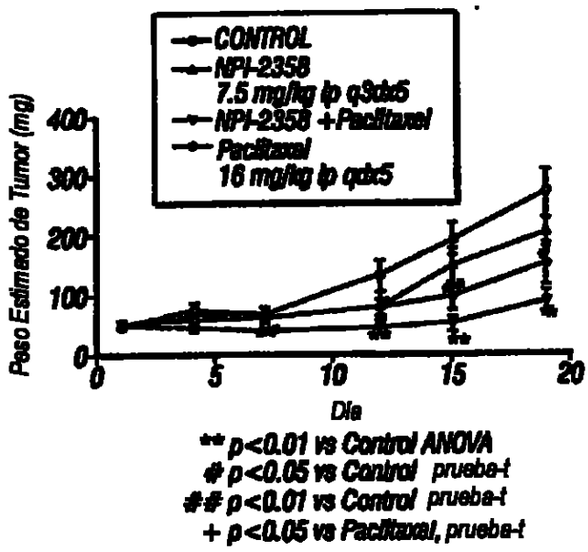


FIG. 28

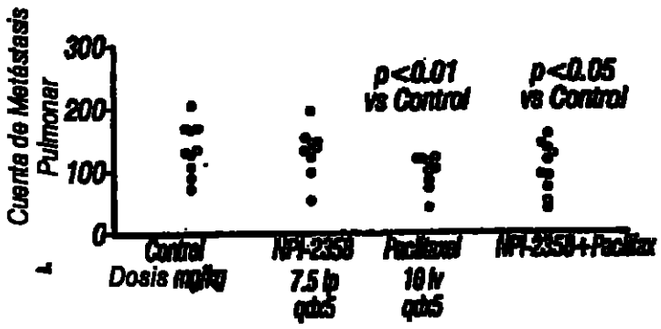


FIG. 29A

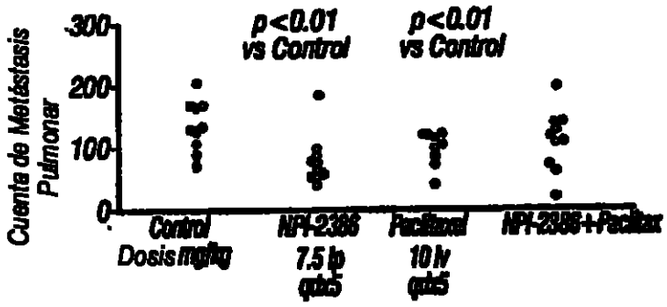


FIG. 29B

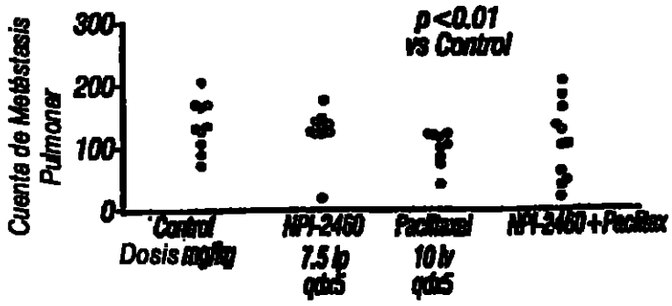


FIG. 29C

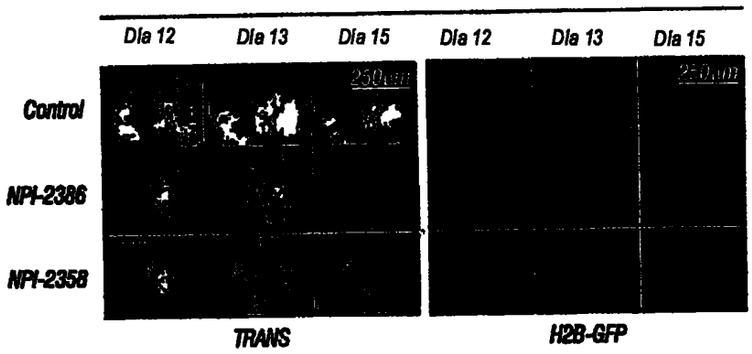

Dia 12
Dia 13
Dia 15
Dia 12
Dia 13
Dia 15
250um
250um
Control
NPI-2386
NPI-2358
TRANS
H2B-GFP

FIG. 30I

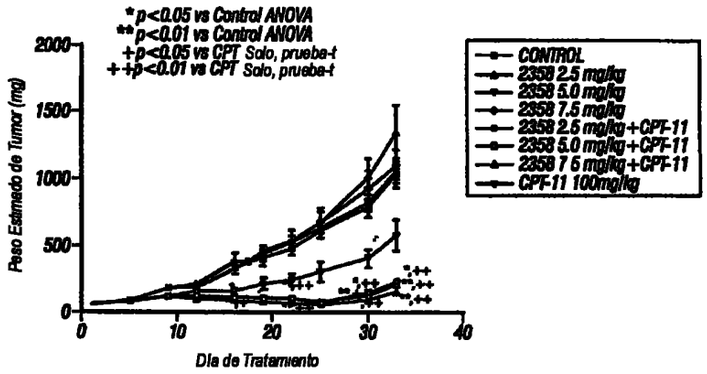

*p<0.05 vs Control ANOVA
**p<0.01 vs Control ANOVA
+p<0.05 vs CPT Solo, prueba-t
++p<0.01 vs CPT Solo, prueba-t
Peso Estimado de Tumor (mg)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Dia de Tratamiento
CONTROL
2358 2.5 mg/kg
2358 5.0 mg/kg
2358 7.5 mg/kg
2358 2.5 mg/kg+CPT-11
2358 5.0 mg/kg+CPT-11
2358 7.5 mg/kg+CPT-11
CPT-11 100mg/kg

FIG 31

26/57

Promedio (mg)	738.9	164.3	151.9	101.6	452.3
SEM	76.7	33.2	23.7	12.9	78.7
ANOVA vs Control		<0.01	<0.01	<0.001	NS
TGI (%)		85.3	85.7	2.5 mg/kg	42.3
Prueba-t				<0.05 vs 2.5 mg/kg	

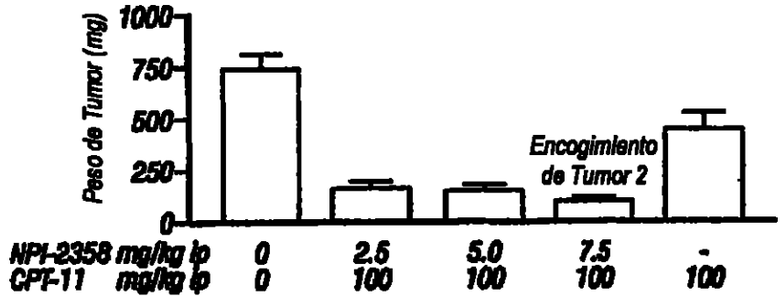


FIG. 32A

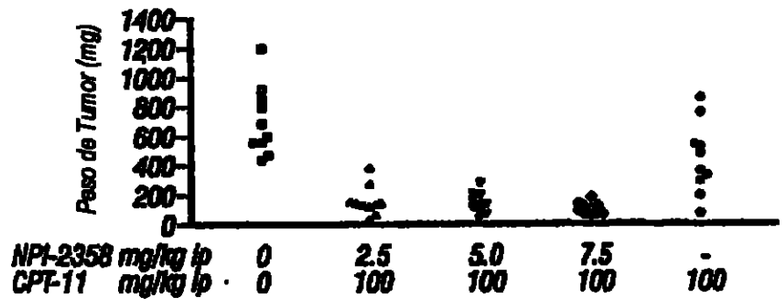


FIG. 32B

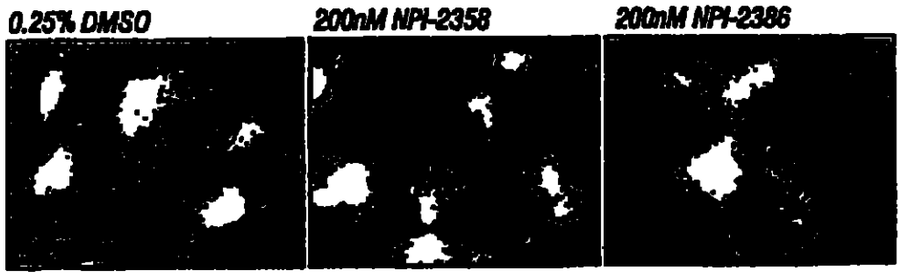


FIG. 33

377

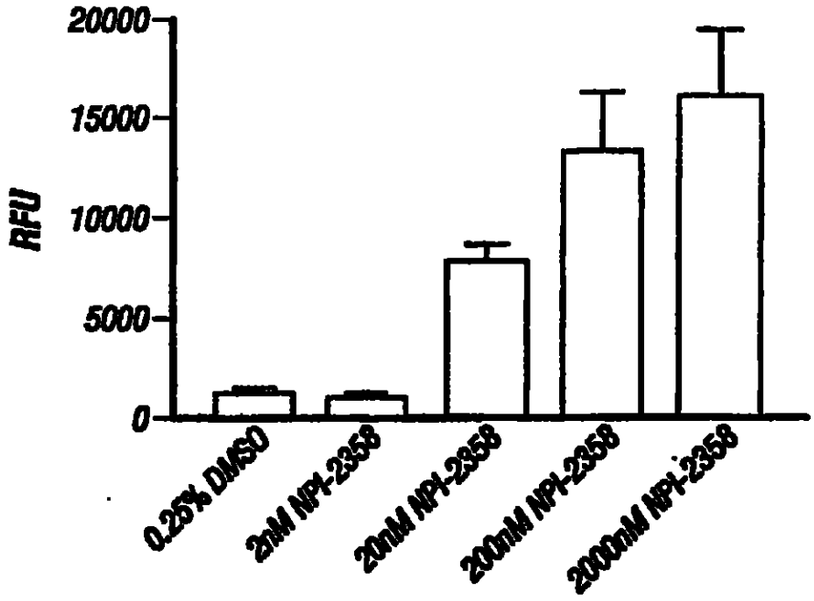


FIG. 34

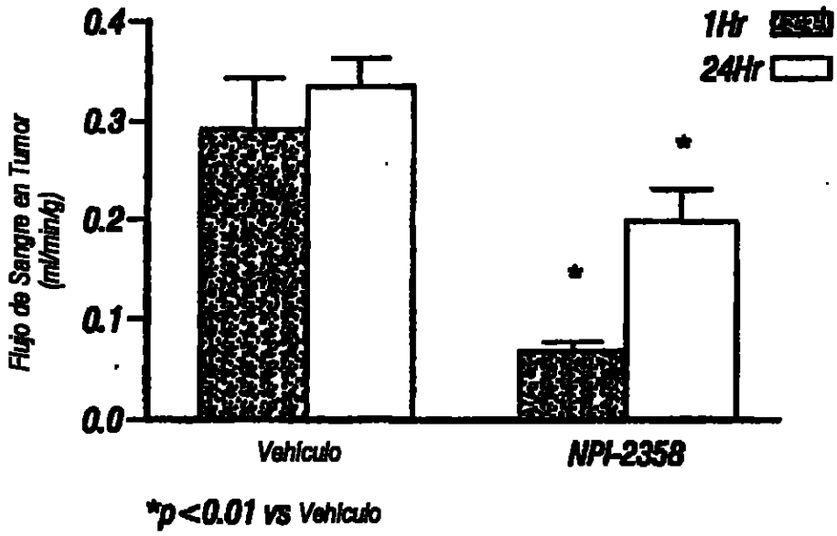
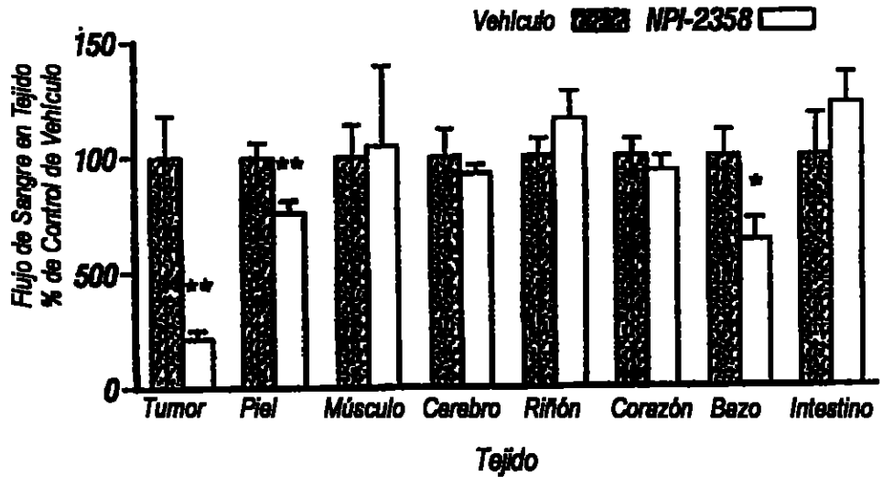
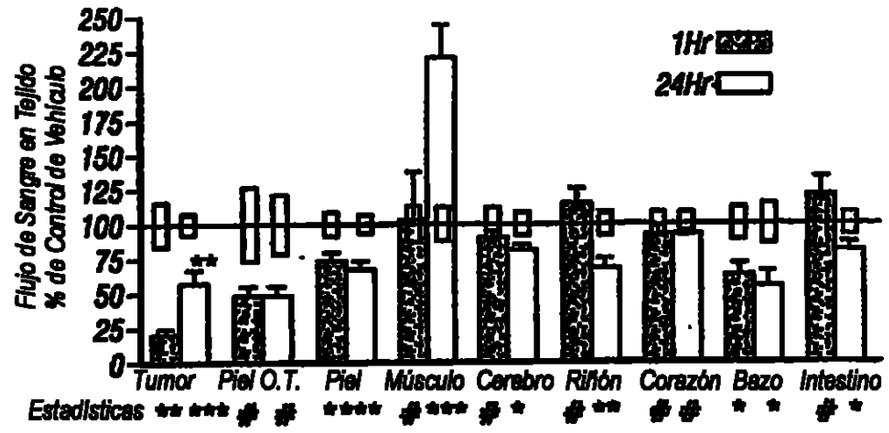


FIG. 35A



*p<0.05;**p<0.01 vs Control de Vehículo

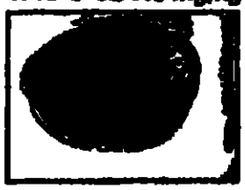
FIG. 35B



*p<0.05;**p<0.01;***=p<0.001;#=NS vs Vehículo
Rectángulos Abiertos = 1 SEM de Vehículo

FIG. 36

1. KPU-02 7.5 mg/kg



2. KPU-02 15.0 mg/kg

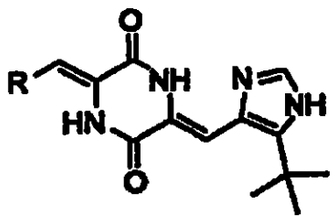


3. Control de Vehiculo



FIG. 37

380



R=Ph: IC_{50}=16.8nM (KPU-2)

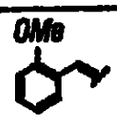
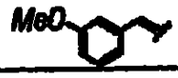
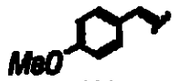
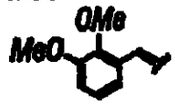
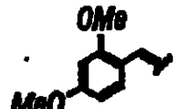
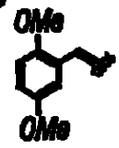
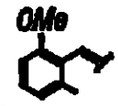
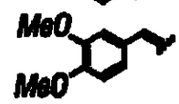
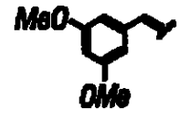
Compuesto	R	IC_{50}/células HT-29 (nM)
1		75.5±24.7
2		26.1±8.54
3		657
4		86
5		508
6		97
7		517
8		202
9		45.4±12.1

FIG. 38
(Continúe)

382

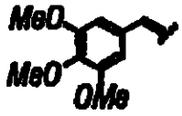
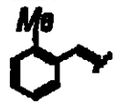
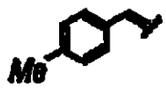
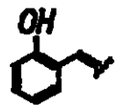
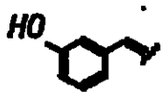
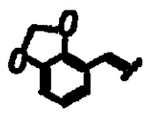
Compuesto	R	IC_{50}/células HT-29 (nM)
1		819
1		45.8±11.5
1		46.7±9.64
1		483±61.5
1		45.9±10.2
1		17.0±1.52
1		6160±1230
1		364±187
1		52

FIG. 38
(Continúa)

382

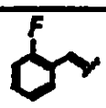
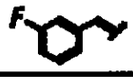
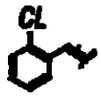
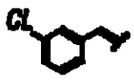
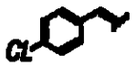
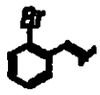
Compuesto	R	IC_{50}/células HT-29 (nM)
1		30±16.5
2		13.1±5.32
2		501±84.8
2		46.3±13.5
2		24.5±8.73
2		70
2		40.5±10.9
2		31.1±7.29
2		71

FIG. 38
(Continúa)

38

383

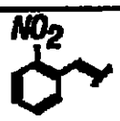
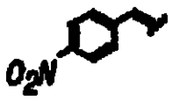
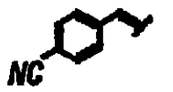
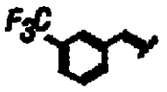
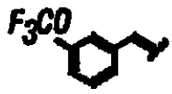
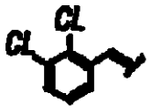
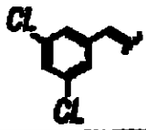
Compuesto	R	IC_{50}/células HT-29 (nM)
2		50.3±12.4
2		44.7±11.9
3		>20000
3		35.8±14.0
3		>20000
3		44.0±7.4
3		14.3±4.93
3		29.9±4.46
3		94.9±5.05

FIG. 38
(Continúa)

384

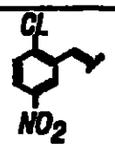
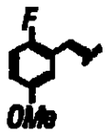
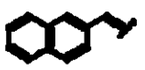
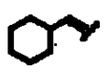
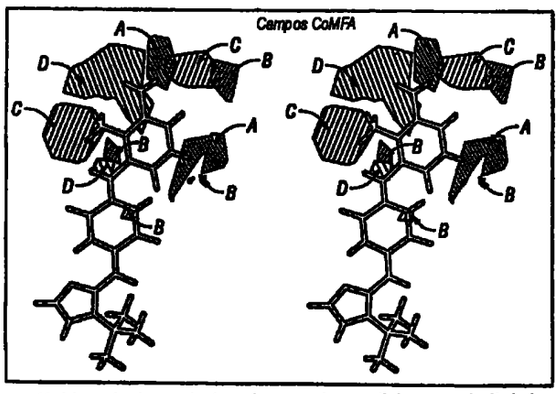
Compuesto	R	IC_{50}/células HT-29 (nM)
3		53.4±4.65
3		20.3± 2.12
3		>20000
4		103±11.6
4		54
4		14.9± 2.12
4		173
4		78.9±14.1
paclitaxel		16.2±3.04

FIG. 3B
(Continúa)

387

3D-QSAR (CoMFA)



A: Estéricamente favorable
B: Estéricamente desfavorable
C: Potenciales electrostáticos positivos son favorables
D: Potenciales electrostáticos negativos son favorables

pI_{50}=5.62+

[Campos estéricos y electrostáticos CoMFA]

Componente Número = 9

n=64 s=0.21 r^2=0.93
s_{CV}=0.62 q^2=0.37

Contribución relativa: St = 58%

El=42%

Modelos moleculares: estructuras de compuestos se optimizaron por el método de orbital molecular, PM3. Cargas atómicas: calculado por MNDO-ESP

CoMFA: llevado a cabo con el módulo CoMFA avanzado de SYBYL 6.8. Sonda: C(sp3) para el cálculo del potencial de interacción estérica. carga +1.0 para el cálculo de potencial electrostático

FIG. 39

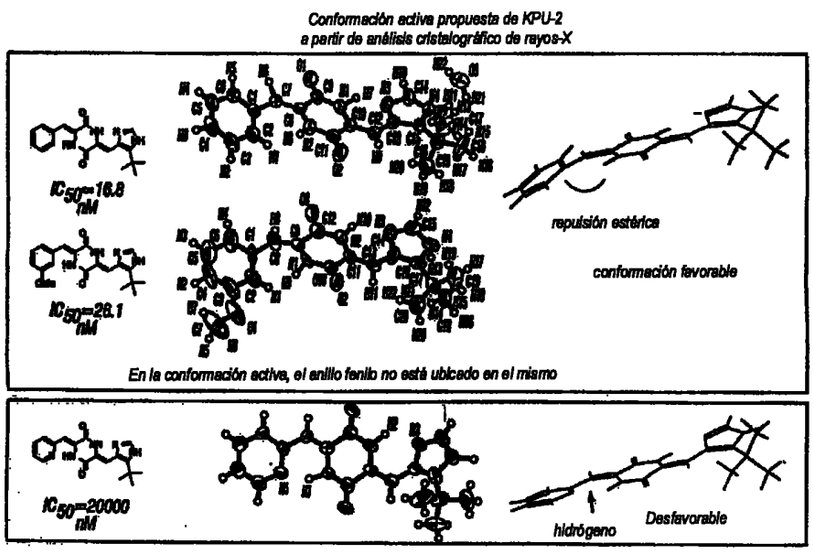
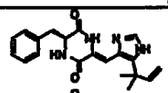
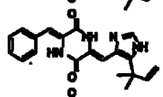
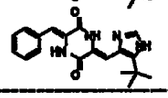

Conformación activa propuesta de KPU-2
a partir de análisis cristalográfico de rayos-X
IC50=16.8 nM
IC50=26.1 nM
repulsión estérica
conformación favorable
En la conformación activa, el anillo fenilo no está ubicado en el mismo
IC50=20000 nM
hidrógeno
Desfavorable

FIG. 40

compuesto	estructura	IC_{50} (μM) polimerización de tubulina	IC_{50} (nM, citotoxicidad) HT-29	PC-3	P-
(-)-PLH		31.3	394	n.t.	388 180
ΔPLH		20.9	43	4.7	36
KPU-2 (NPI-2358)		16.8	14.9	1.0	2.8
colchicina		96.7	n.t.	n.t.	210

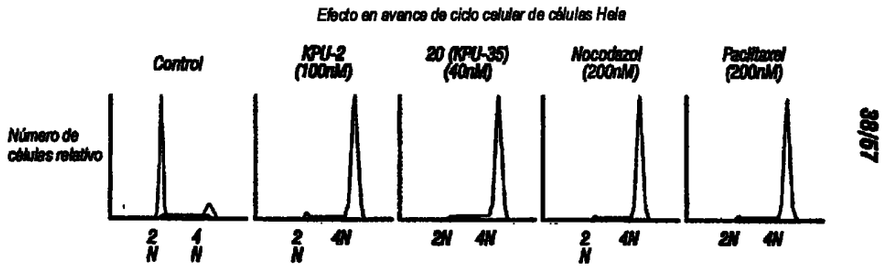
Tinción de inmunofluorescencia de citoesqueleto de células PC-3



Sin tratar | KPU-2 (1μM) | colchicina (1μM)

FIG. 41

KPU-2 mostró actividad más potente que Δ PLH


Efecto en avance de ciclo celular de células Hela
Control
KPU-2 (100nM)
20 (KPU-35) (40nM)
Nocodazol (200nM)
Paclitaxel (200nM)
Número de células relativo
2 N
4 N
2N
4N

38/67

FIG. 42

389

Efecto de derivados PLH en líneas celulares de tumor sensibles y resistentes a drogas

	Pre-tratamiento de ciclosporina de sarcoma uterino MES-SA		Pre-tratamiento de ciclosporina MES-SA/DX-5 (resistente)	
compuesto	(-)	(+)	(-)	(+)
ΔPLH	116±15	114±32	98±24	86±16
KLU-2	34±10	31±5	23±7	38±2
paclitaxel	13±4	18±1	>100	27±2

FIG. 43

390

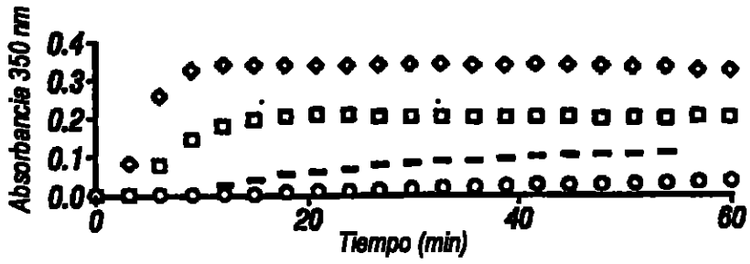


FIG. 44A

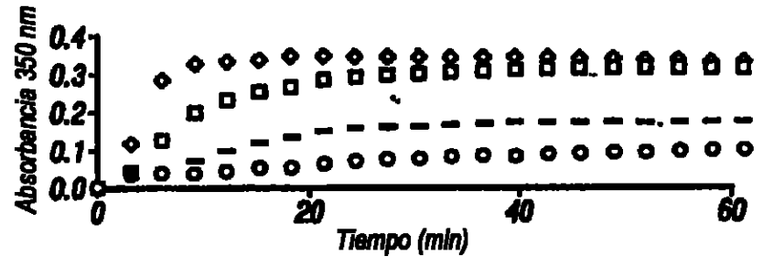


FIG. 44B

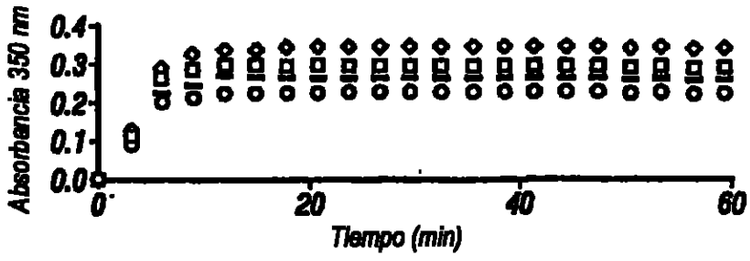


FIG. 44C

393

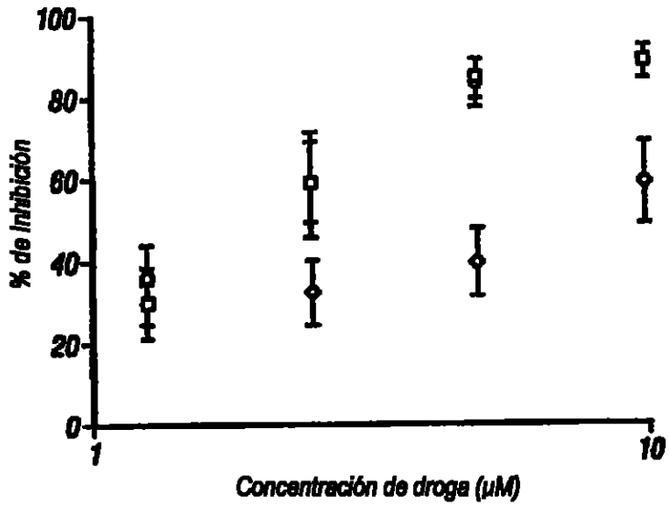


FIG. 45

392

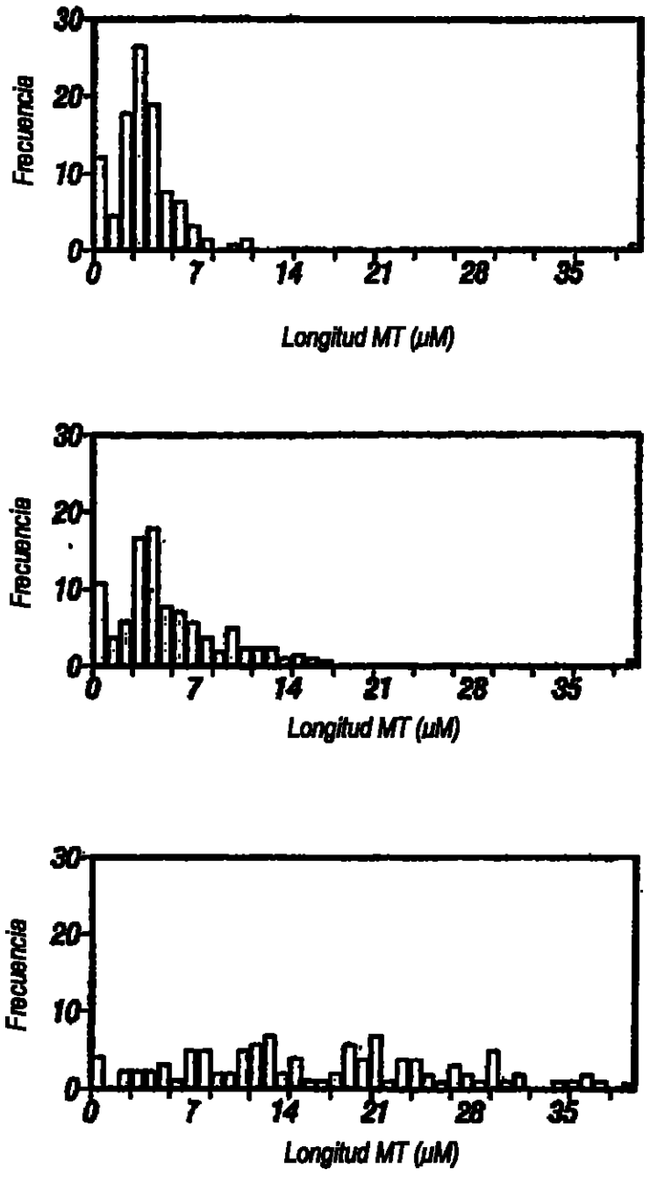

Frecuencia
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
Longitud MT (µM)
Frecuencia
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
Longitud MT (µM)
Frecuencia
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
Longitud MT (µM)

FIG. 48A

393

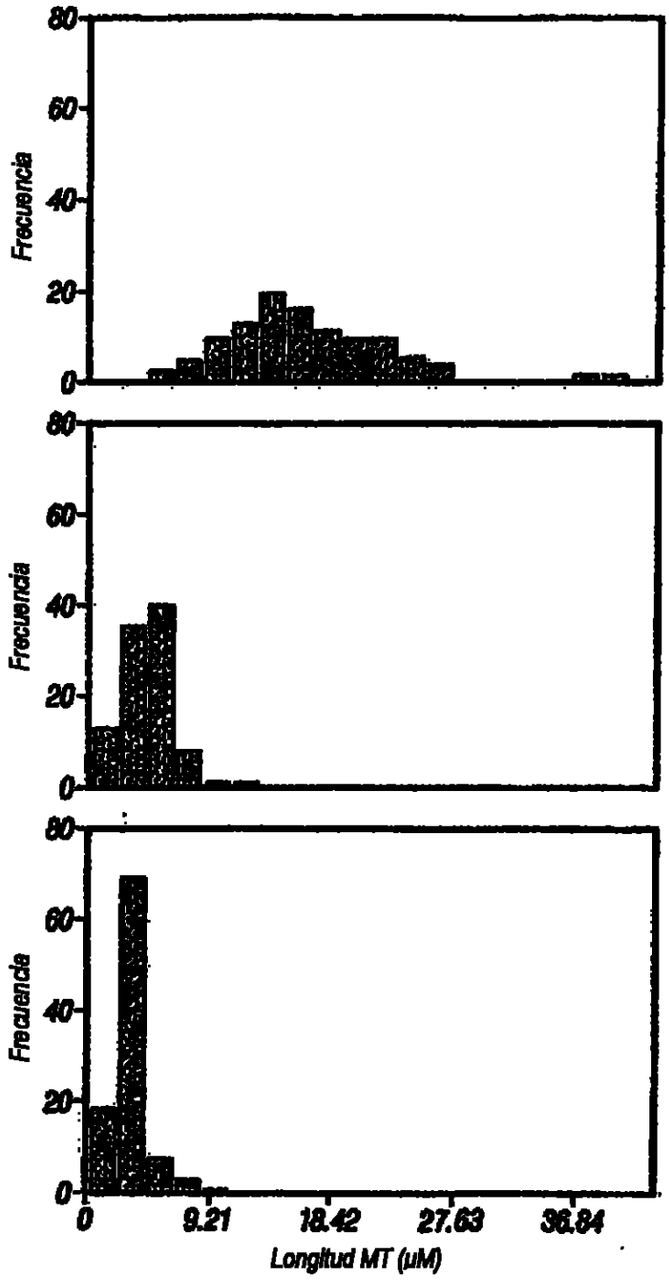

80
60
40
20
0
Frecuencia
80
60
40
20
0
Frecuencia
80
60
40
20
0
Frecuencia
0
9.21
18.42
27.63
36.84
Longitud MT (µM)

FIG. 46B

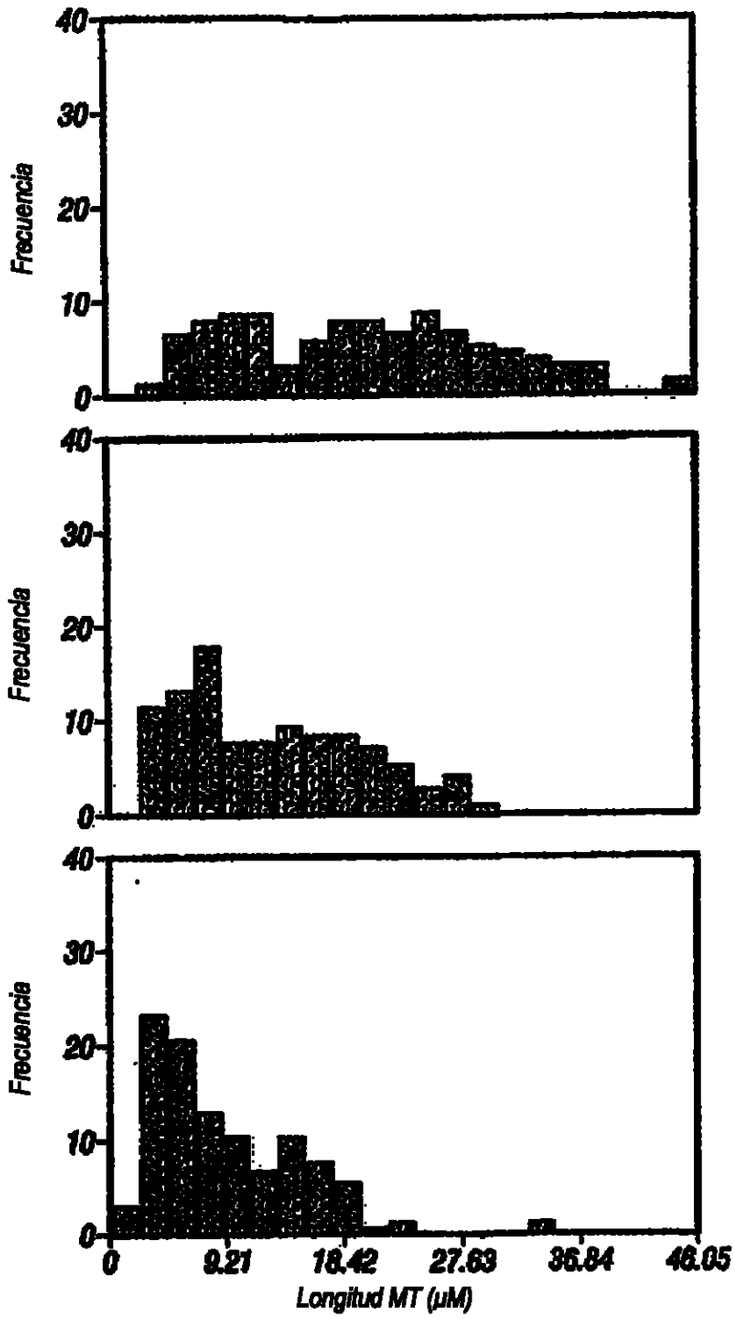

40
30
20
10
0
Frecuencia
40
30
20
10
0
Frecuencia
40
30
20
10
0
Frecuencia
0
9.21
18.42
27.63
36.84
46.05
Longitud MT (µM)

Fig. 46C

395

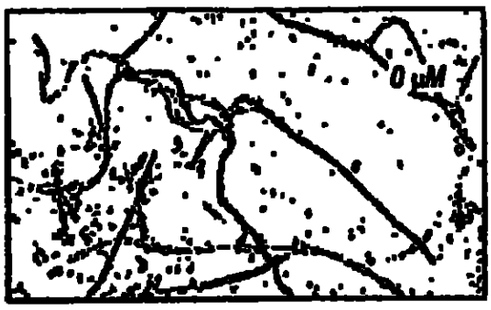






FIG. 47A

396





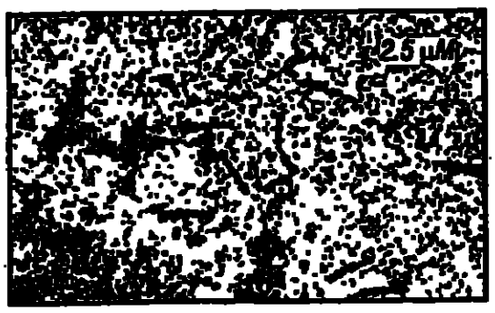


FIG. 47B

397

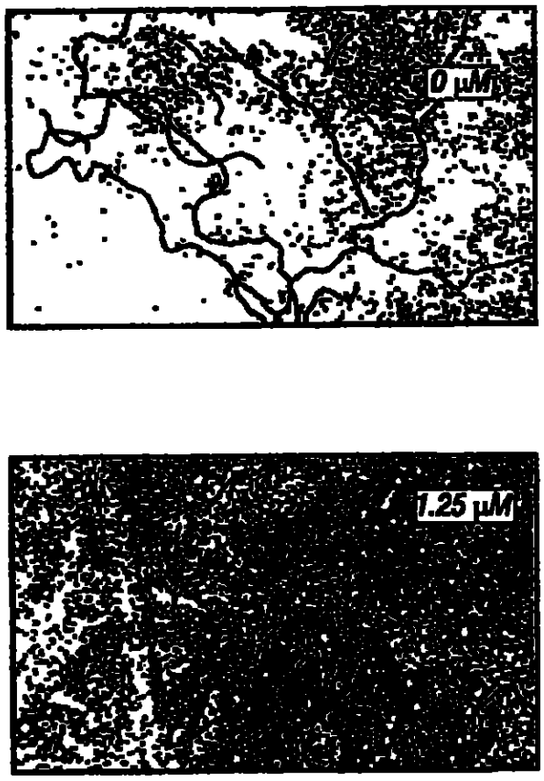


FIG. 47C

398

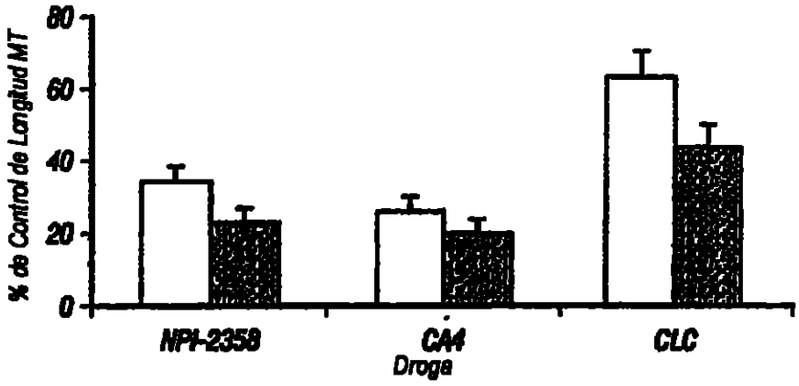


FIG. 48

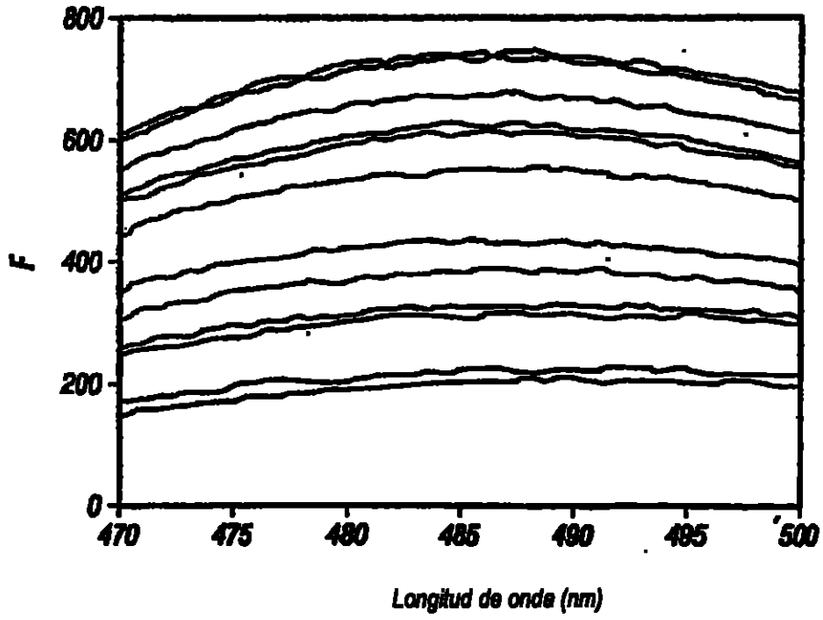


FIG. 49A

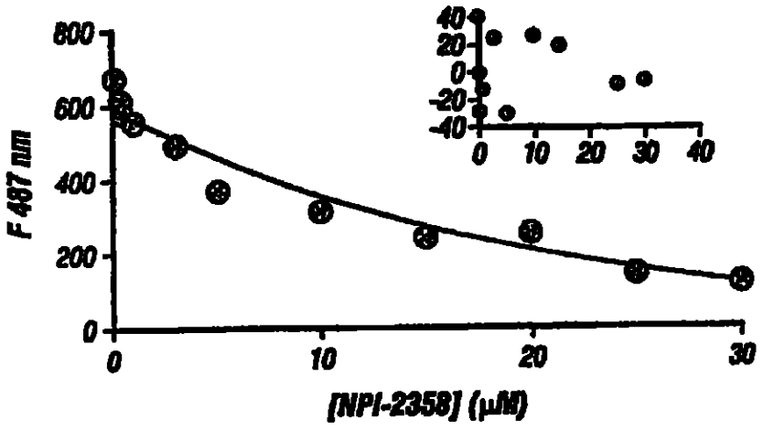


FIG. 49B

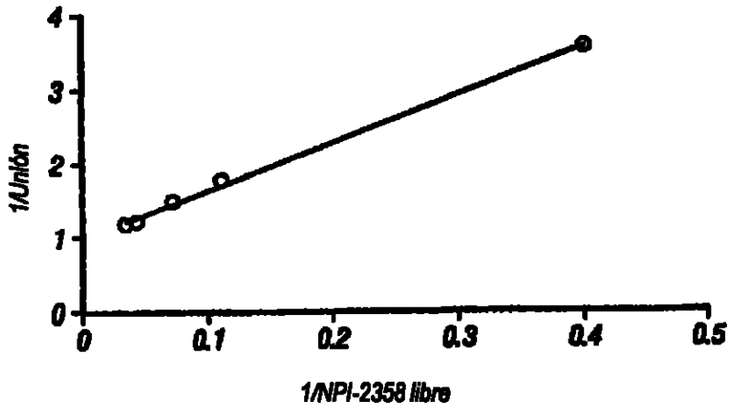


FIG. 49C

400

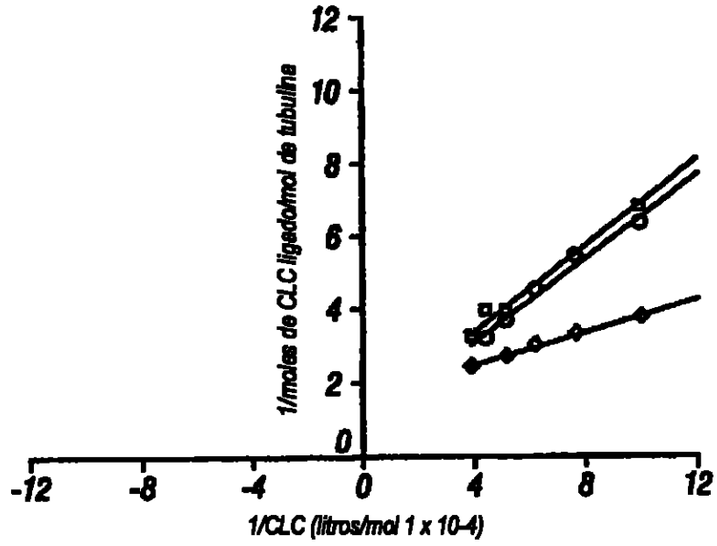


FIG. 50

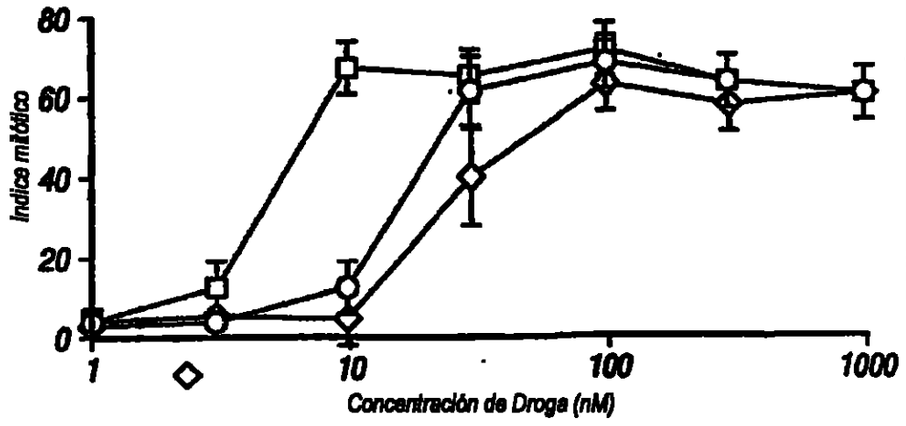


FIG. 51

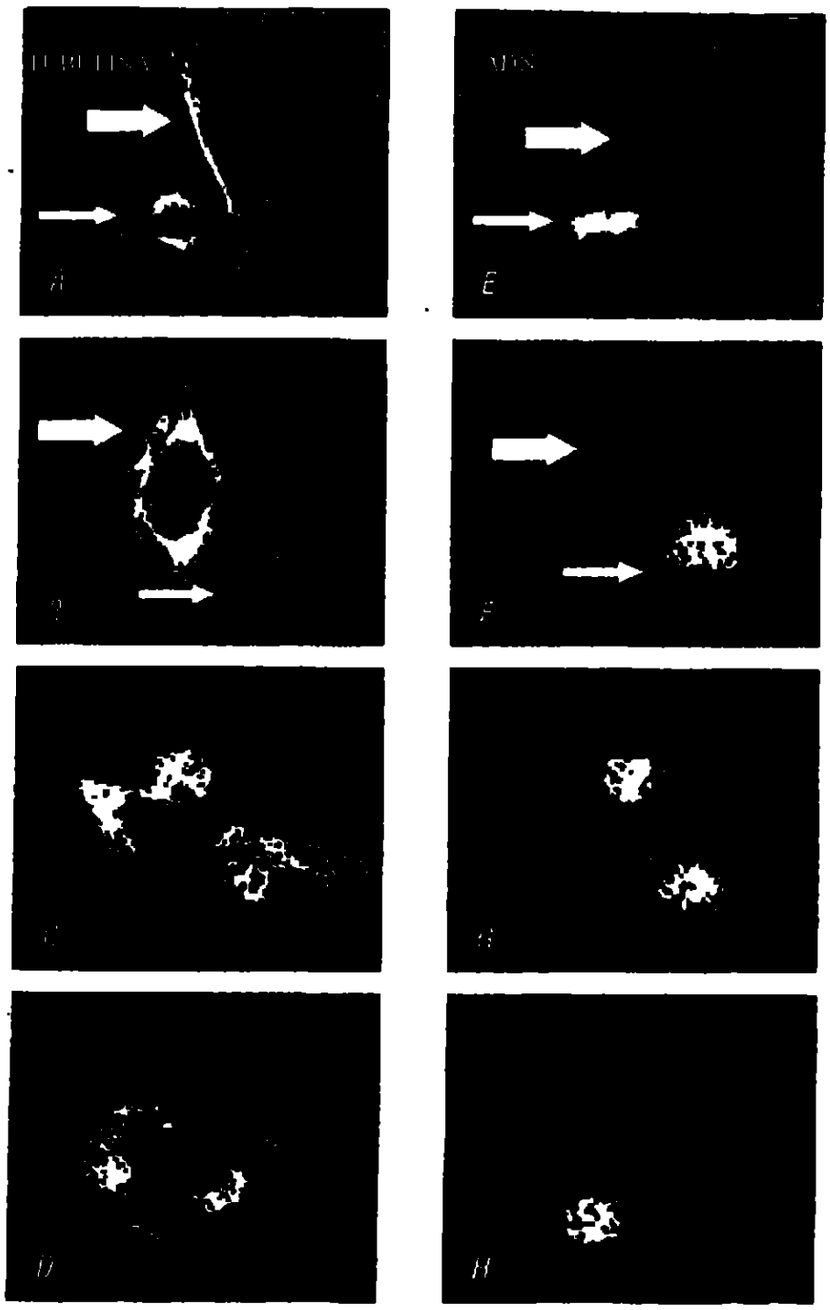


FIG. 52

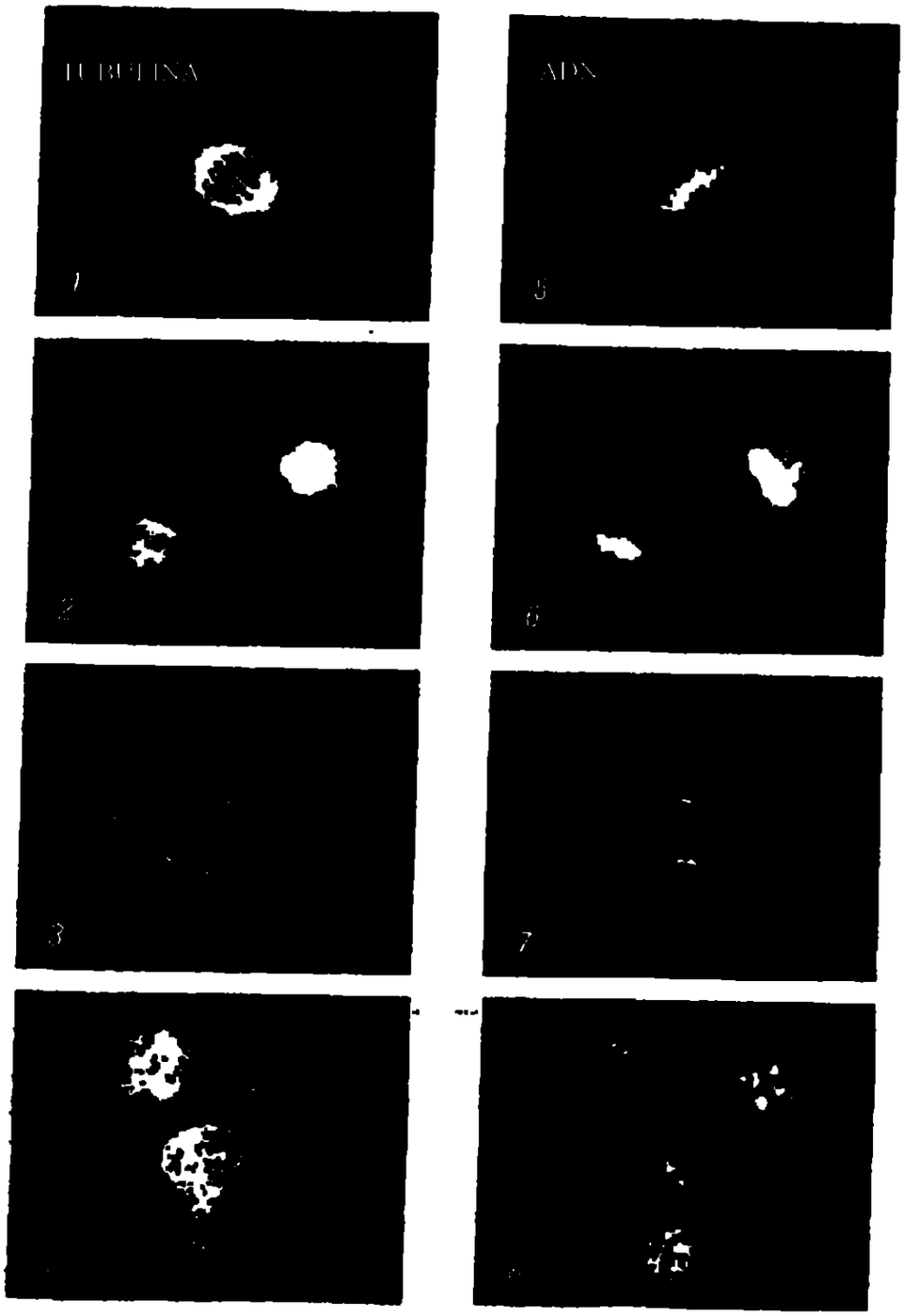


FIG. 53A

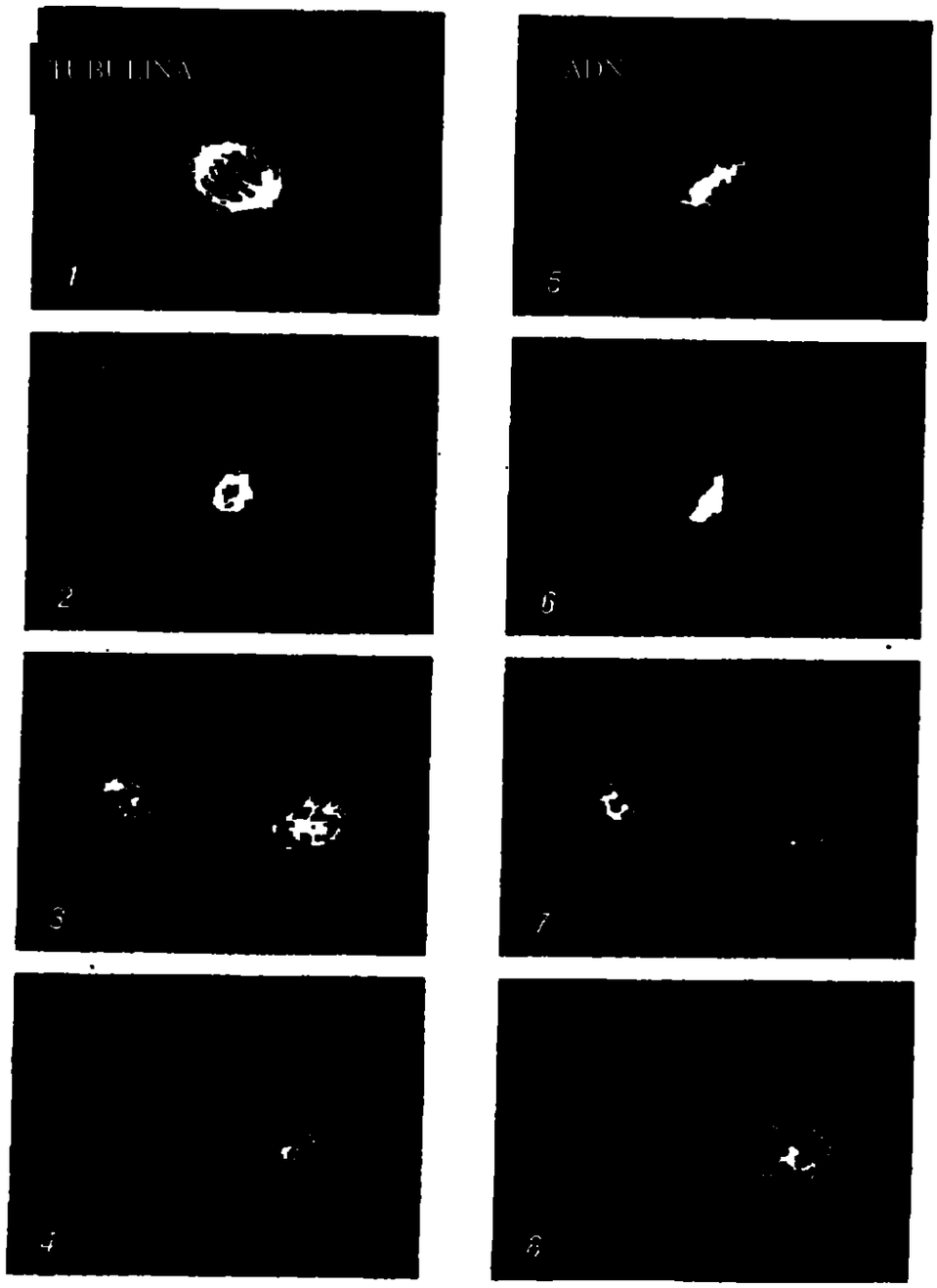


FIG. 53B

54/57

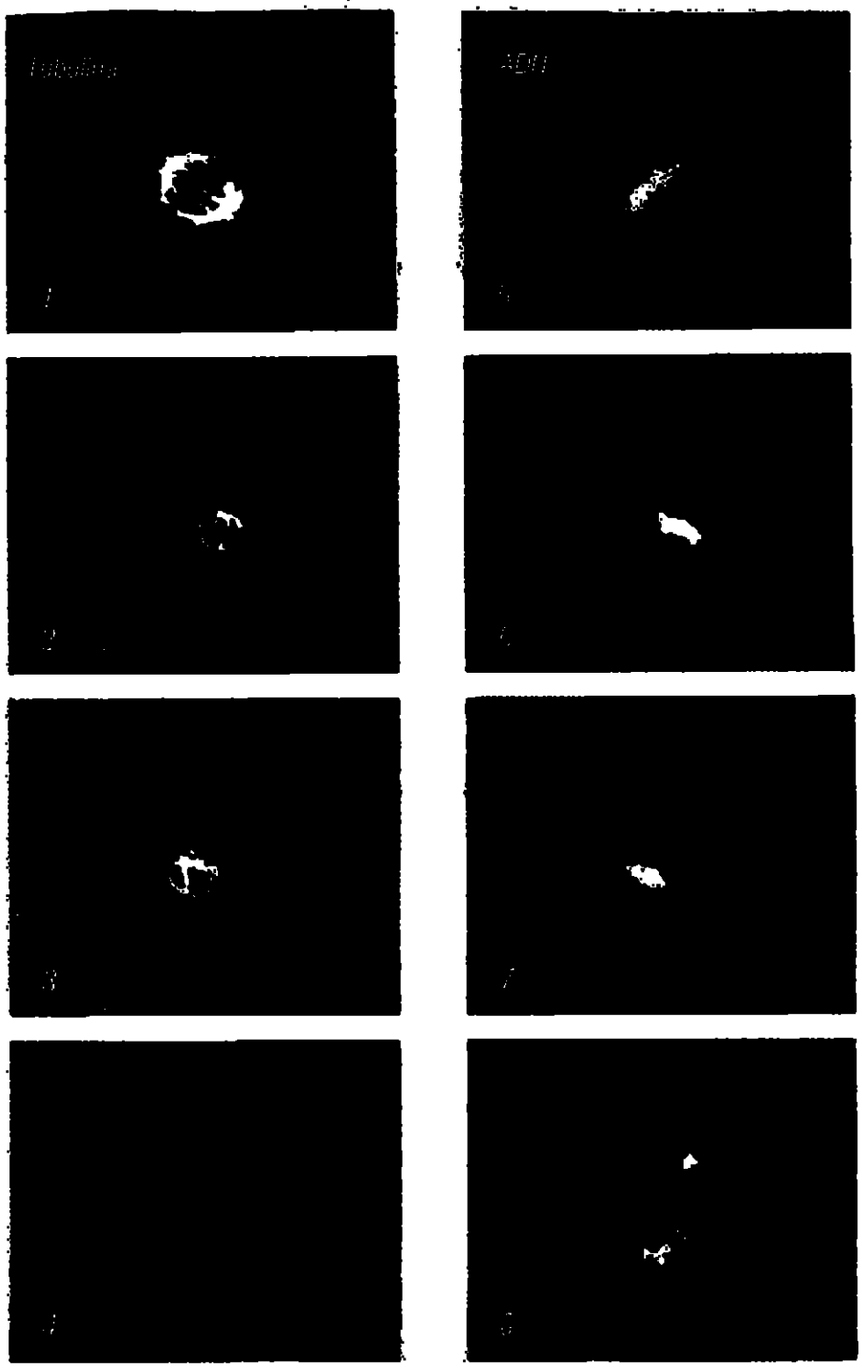


FIG. 69C

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-083386- -00000-0000
Fec: 2006-08-23 17:15:31 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Eva: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 407
SUPERINTENDENCIA

408

405

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- Descripción de la invención [X] 65
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [X] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado I [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia