

# PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-067129- -00000-0000

Fecha: 2007-07-03 16:35:15 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

## FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

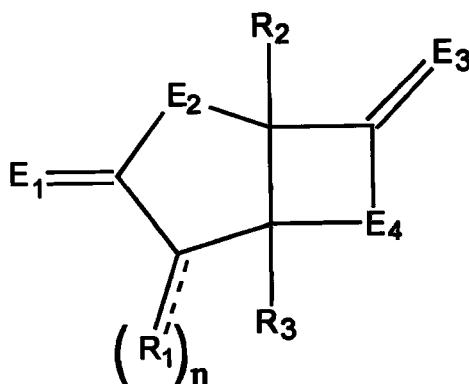
|                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1 SOLICITUD DE:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I. <input type="checkbox"/> Capítulo II.                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
| <b>2 SOLICITANTE</b><br><br><b>(71)</b>                                                                                                                                          | Nombre: NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.<br><br>Dirección: 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121, Estados Unidos de América.<br><br>Nacionalidad o Domicilio: San Diego, Estado de California, Estados Unidos de América.<br>Lugar de Constitución: Estado de California, Estados Unidos de América.<br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: illcco@lloredacamacho.com                                   |                                                            | <b>IDENTIFICACIÓN</b><br><br>C.C. <input type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br><br>Cual _____<br><br>Número _____ |
|                                                                                                                                                                                  | Nombre: ALICIA LLOREDICA RICAURTE<br>Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá- Colombia<br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: jllcco@lloredacamacho.com                                                                                                                                                                                                                                              |                                                            | C.C. <input checked="" type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br>Cual _____<br>Número 39.690.713 TP 53.215            |
| <b>3 REPRESENTANTE O APODERADO</b>                                                                                                                                               | Nombre: PALLADINO, Michael; POTTS, Barbara Christine; MACHERLA, Venkata, Rami, Reddy y NEUTEBOOM, Saskia, Theodora, Cornelia.<br><br>Dirección: 3357 Fortuna Ranch Road, Olivenhain, California 92024; 2029 Oro Verde Road, Escondido, CA 92027; 10868 Caminito Arcada, San Diego, CA 92131 y 7665 Palmilla Drive, Apt. #5402, San Diego, CA 92122.<br><br>Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América. |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
| <b>4 INVENTOR(ES)</b><br><b>(72)</b>                                                                                                                                             | Nombre: PALLADINO, Michael; POTTS, Barbara Christine; MACHERLA, Venkata, Rami, Reddy y NEUTEBOOM, Saskia, Theodora, Cornelia.<br><br>Dirección: 3357 Fortuna Ranch Road, Olivenhain, California 92024; 2029 Oro Verde Road, Escondido, CA 92027; 10868 Caminito Arcada, San Diego, CA 92131 y 7665 Palmilla Drive, Apt. #5402, San Diego, CA 92122.<br><br>Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América. |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
| <b>5 PCT (86)</b><br>Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/044091</u> Fecha: <u>02/12/05</u><br>Publicación Internacional No. <u>WO2006/060809 A3</u> Fecha: <u>08/06/06</u> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
| <b>6 Título (54) MÉTODOS PARA UTILIZAR COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS [3.2.0] Y SUS ANÁLOGOS</b>                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
| <b>7 Clasificación Internacional (51) A61K 31/407</b>                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |                                                                                                                                                                                              |
| <b>8 Prioridad</b><br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                         | (33) País de Origen<br>US<br>US<br>US<br>US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | (32) Fecha<br>03-12-04<br>13-01-05<br>04-03-05<br>29-04-05 | (31) Número de Solicitud<br>60/633,379<br>60/643,922<br>60/658,884<br>60/676,533                                                                                                             |
| <b>9 Comprobante de Pago No. <u>07-45,769</u> Fecha: <u>6 de Junio de 2007</u></b>                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |                                                                                                                                                                                              |

10

# ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ 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)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del examen 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.
- ☒ 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.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción y Opinión escrita de la autoridad de la búsqueda internacional con su traducción..

## 11 FIGURA CARACTERISTICA:



Formula 1

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén

T.P. 53.215

# State of California

## SECRETARY OF STATE

### APOSTILLE

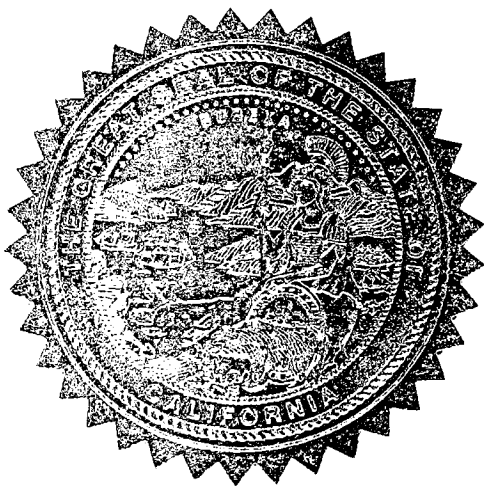
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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*

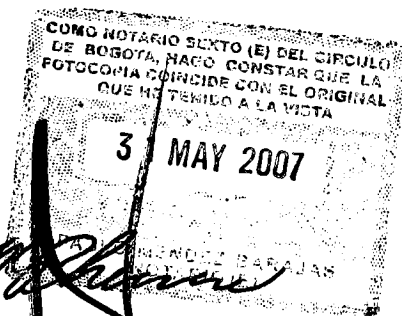
### CERTIFIED

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



*[Signature]*  
Secretary of State



Los abajo firmados,

The undersigned,

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

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

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 verdaderos 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.

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth 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.

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 creyeran 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.

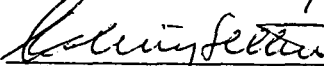
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, 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.

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.

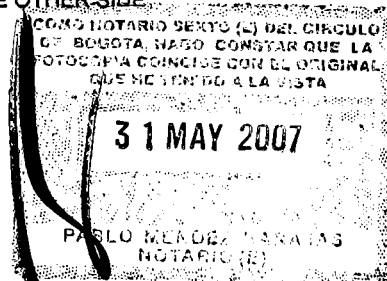
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Dado y firmado 23 de Mayo de 2005.

Given and signed this May 23, 2005

  
Kobi M. Sethna, President & CEO

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



# State of California

## SECRETARY OF STATE

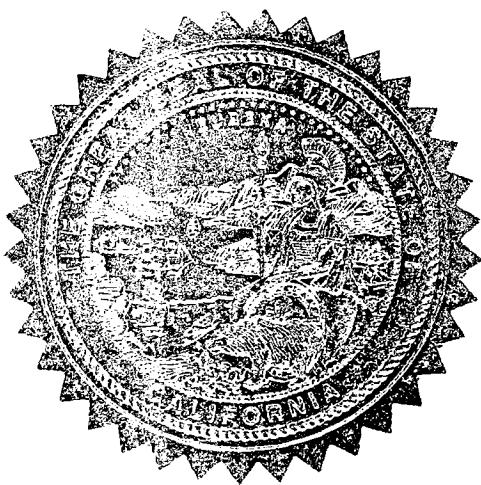
### APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

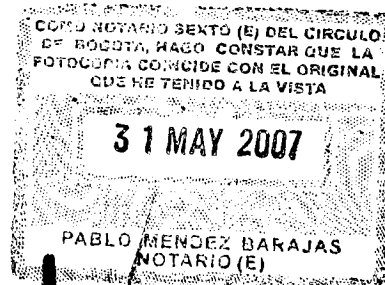
1. Country: *United States of America*  
*This public document*
2. *has been signed by Linda D. Rodriguez*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Linda D. Rodriguez, Notary Public, State of California*

### 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



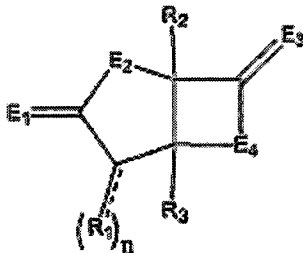
*Pablo Menendez Barajas*

Secretary of State

|                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                                             |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA |  | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b> |  |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                |  | (51) Int Cl: <b>A61K 31/407</b>                                                                                                                                             |  |
| 22) Fecha de solicitud: <b>03-07-07</b>                                                                                              |  | (71) Solicitante(s) <b>NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.</b>                                                                                                                     |  |
| (30) Prioridad (31) <b>No. Prioridad</b> (32) <b>Fecha</b> (33) <b>País</b>                                                          |  | (72) Inventor(es) <b>PALLADINO, Michael; POTTS, Barbara, Christine; MACHERLA, Venkata, Rami, Reddy y NEUTEBOOM, Saskia, Theodora, Cornelia.</b>                             |  |
|                                                                                                                                      |  | (74) Apoderado: <b>ALICIA LLOREDA RICAURTE</b>                                                                                                                              |  |
| 60/633,379 03-12-04 US                                                                                                               |  |                                                                                                                                                                             |  |
| 60/643,922 13-01-05 US                                                                                                               |  |                                                                                                                                                                             |  |
| 60/658,884 04-03-05 US                                                                                                               |  |                                                                                                                                                                             |  |
| 60/676,533 29-04-05 US                                                                                                               |  |                                                                                                                                                                             |  |
| (85) Fecha limite inicio fase nacional: <b>03-07-07</b>                                                                              |  | (87) Publicación internacional                                                                                                                                              |  |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT                                                                           |  | Fecha: <b>08-06-06</b>                                                                                                                                                      |  |
| Fecha de presentación de la solicitud: <b>02-12-05</b>                                                                               |  | N° publicación: <b>WO2006/060809 A3</b>                                                                                                                                     |  |
| No. de solicitud <b>PCT/ US2005/044091</b>                                                                                           |  |                                                                                                                                                                             |  |
| (54) Título: <b>MÉTODOS PARA UTILIZAR COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS [3.2.0] Y SUS ANÁLOGOS</b>                                           |  |                                                                                                                                                                             |  |

Resumen - Reivindicación(es):  
**Reivindicación número 1.-**

El uso de un compuesto en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una célula resistente a la droga, en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula I, y sales y ésteres de profármaco farmacéuticamente aceptables de los mismos:



Formula 1

en donde las líneas punteadas representan un enlace sencillo o doble, en donde R<sub>1</sub> se selecciona por separado del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxil, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano y alquilo halogenado, incluyendo alquilo polihalogenado, en donde n es igual a 1 o 2, y si n es igual a 2, entonces R<sub>1</sub> puede ser el mismo o diferente;

en donde R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxil, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado;

en donde R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste de un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxil, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado;

en donde cada uno de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> y E<sub>4</sub> es un heteroátomo sustituido o no sustituido; y

en donde la célula resistente a la droga es una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste de leucemia, cáncer ovárico, cáncer uretral, cáncer de vejiga, cáncer prostático, cáncer rectal, cáncer de estómago, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer endócrino, un sarcoma, cáncer de piel, angioma, y cáncer cerebral.

8  
12

**TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES**  
**PCT**  
**REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**  
(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                          |                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Registro de referencia del solicitante o agente<br><b>NEREUS.079VP</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>PARA FUTURAS ACCIONES</b> ver Forma PCT/ISA/220<br>así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación. |                                                                 |
| Solicitud internacional No.<br><b>PCT/US2005/044091</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Fecha de registro internacional (día/mes/año)<br><b>02/12/2005</b>                                       | Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año)<br><b>03/12/2004</b> |
| Solicitante<br><b>NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                          |                                                                 |
| <p>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.</p> <p>Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de <u>4</u> hojas.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                          |                                                                 |
| <p><b>1. Bases del reporte</b></p> <p>a. Respecto al <b>lenguaje</b>, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó,</p> <p><input type="checkbox"/> la traducción de la solicitud internacional en _____, el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para el propósito de la búsqueda internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).</p> <p>b. <input type="checkbox"/> Respecto a una secuencia de <b>ácido nucleótido y/o amino</b> revelado en la solicitud internacional, ver casilla I.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Recuadro II).</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Falta unidad de invención (ver Recuadro III).</p> <p>4. Respecto al <b>título</b>,</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.</p> <p><input type="checkbox"/> Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:</p> <p>5. Respecto al <b>resumen</b>,</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.</p> <p><input type="checkbox"/> Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.</p> <p>6. Respecto a los <b>dibujos</b>,</p> <p>a. la figura de los <b>dibujos</b> que se publicará con el resumen es la Figura No. _____</p> <p><input type="checkbox"/> como lo sugirió el solicitante.</p> <p><input type="checkbox"/> como lo sugirió la Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.</p> <p><input type="checkbox"/> como lo sugirió la autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-</p> <p>b. <input type="checkbox"/> Ninguna de las figuras se publicara en el resumen.</p> |                                                                                                          |                                                                 |

# 78 10 **REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.  
PCT/US2005/044091

A. CLASIFICACION DE MATERIA  
INV. A61K 31/407 A61P 35/00

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)  
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, Dato BEILSTEIN, EMBASE, BIOSIS, Dato CHEM ABS

## **C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

| Categoría ° | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                      | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| X, Y        | WO 2004/071382 A (BAYER HEALTHCARE AG; STADLER, MARC, SEIP, STEPHAN; MUELLER, HARTWIG; M) 26 de agosto de 2004 (2004-08-26)<br>reivindicación 1<br>páginas 19-20<br>----- | 1-85                              |
| Y           | WO 2004/043374 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC; ANDERSON, KENNETH, C; HIDESHIMA, TE) 27 de mayo de 2004 (2004-05-27)<br>reivindicación 1<br>-----                    | 1-85                              |
| Y           | WO 96/32105 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE; SCHREIBER, STUART, L; STANDA) 17 de Octubre 1996 (1996-10-17)<br>página 2<br>-----<br>-----/-----                | 6, 17,28,<br>46, 64,<br>72-85     |

☒ 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

'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

13 de Junio de 2006

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

12/07/2006

Nombre y dirección de correo de ISA/  
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

Funcionario autorizado  
  
Steendijk, M

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                                |                                                                                                  |                                                                |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>NEREUS . 079VP</b> | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, Item 5 below. |                                                                |
| International application No.<br><b>PCT/US2005/044091</b>      | International filing date (day/month/year)<br><b>02/12/2005</b>                                  | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br><b>03/12/2004</b> |
| Applicant<br><b>NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.</b>               |                                                                                                  |                                                                |

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 4 sheets.

☒ 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  
☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ 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,

- ☒ 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. \_\_\_\_\_  
☐ 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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2005/044091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K31/407 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)  
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, BEILSTEIN Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                              | Relevant to claim No.       |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| X,Y       | WO 2004/071382 A (BAYER HEALTHCARE AG; STADLER, MARC; SEIP, STEPHAN; MUELLER, HARTWIG; M) 26 August 2004 (2004-08-26)<br>claim 1<br>pages 19-20 | 1-85                        |
| Y         | WO 2004/043374 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC; ANDERSON, KENNETH, C; HIDESHIMA, TE) 27 May 2004 (2004-05-27)<br>claim 1                   | 1-85                        |
| Y         | WO 96/32105 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE; SCHREIBER, STUART, L; STANDA) 17 October 1996 (1996-10-17)<br>page 2                   | 6,17,28,<br>46,64,<br>72-85 |
|           | -----<br>-/-                                                                                                                                    |                             |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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

13 June 2006

Date of mailing of the international search report

12/07/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Steendijk, M

25  
23

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual  
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional  
8 de junio de 2006 (08.06.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2006/060809 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>:  
A61K 31/407 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(74) Agente: MALLON, Joseph, J.; KNOBBE, MARTENS OLSON & BEAR, LLP, 2040 Main Street, 14th Floor, Irvine, California 92614 (US).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2005/044091

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección nacional requerida): 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional: 2 de Diciembre de 2005  
(02.12.2005)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:  
60/633,379 3 de diciembre de 2004 (03.12.2004) US  
60/643,922 13 de enero de 2005 (13.01.2005) US  
60/658,884 4 de marzo de 2005 (04.03.2005) US  
60/676,533 29 de abril de 2005 (29.04.2005) US

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección regional requerida): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiatica (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, LV, 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).

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

Publicado:  
- Con reporte de Búsqueda Internacional.

(72) Inventor; e

(88) Fecha de la publicación del Reporte de Búsqueda Internacional  
5 de octubre de 2006

(75) Inventor/solicitante: (para US solamente): PALLADINO, Michael [US/US]; 3357 Fortuna Ranch Road, Olivenhain, California 92024 (US). POTTS, Barbara, Christine [US/US]; 2029 Oro Verde Road, Escondido, California 92027 (US). MACHERLA, Venkata, Rami, Reddy [IN/US]; 10868 Caminito Arcada, San Diego, California 92131 (US) NEUTEBOOM, Saskia, Theodora, Cornelia [NL/US]; 7665 Palmilla Drive, Apt. #5402, San Diego, California 92122 (US).

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

(54)Título: MÉTODOS PARA UTILIZAR COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS [3.2.0] Y SUS ANÁLOGOS

(57) Resumen: Se describen métodos para el tratamiento de cáncer, condiciones inflamatorias y/o enfermedades infecciosas en un animal, que comprenden: la administración al animal de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto heterocíclico. El animal es un mamífero, preferentemente un humano o un roedor.

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
8 June 2006 (08.06.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2006/060809 A3

(51) International Patent Classification:  
A61K 31/407 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(74) Agent: MALLON, Joseph J.; KNOBBE MARTENS OL-  
SON & BEAR LLP, 2040 Main Street, 14th Floor, Irvine,  
California 92614 (US).

(21) International Application Number:  
PCT/US2005/044091

(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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:  
2 December 2005 (02.12.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/633,379 3 December 2004 (03.12.2004) US  
60/643,922 13 January 2005 (13.01.2005) US  
60/658,884 4 March 2005 (04.03.2005) US  
60/676,533 29 April 2005 (29.04.2005) US

(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,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

(71) Applicant (for all designated States except US): NEREUS  
PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 10480 Wa-  
teridge Circle, San Diego, California 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PALLADINO,  
Michael [US/US]; 3357 Fortuna Ranch Road, Olivenhain,  
California 92024 (US). POTTS, Barbara Christine  
[US/US]; 2029 Oro Verde Road, Escondido, California  
92027 (US). MACHERLA, Venkata Rami Reddy  
[IN/US]; 10868 Caminito Arcada, San Diego, California  
92131 (US). NEUTEBOOM, Saskia Theodora Cornelia  
[NL/US]; 7665 Palmilla Drive, Apt. #5402, San Diego,  
California 92122 (US).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:  
5 October 2006

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

(54) Title: METHODS OF USING [3.2.0] HETEROCYCLIC COMPOUNDS AND ANALOGS THEREOF

(57) Abstract: Disclosed are methods of treating cancer, inflammatory conditions, and/or infectious disease in an animal compris-  
ing: administering to the animal, a therapeutically effective amount of a heterocyclic compound. The animal is a mammal, preferably  
a human or a rodent.

WO 2006/060809 A3

# TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la  
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

|                       |
|-----------------------|
| Para:                 |
| ver forma PCT/ISA/220 |

**PCT**  
**OPINION ESCRITA DE LA**  
**AUTORIDAD DE BUSQUEDA**  
**INTERNACIONAL**  
(PCT Regla 43bis.1)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                |                                                                                                                                                                                             |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------------|-------------------------------------|----------------|-----------|-------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                | Fecha de correo<br>(día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)                                                                                                                       |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| Registro de referencia del solicitante o agente<br>ver forma PCT/ISA/220                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                | PARA FUTURAS ACCIONES<br>Ver párrafo 2 a continuación                                                                                                                                       |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| Solicitud Internacional No.<br>PCT/US2005/044091                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Fecha de registro internacional<br>(día/mes/año)<br>02.12.2005 | Fecha de prioridad<br>(día/mes/año)<br>03.12.2004                                                                                                                                           |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC<br>INV. A61K31/407 A61P35/00                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                |                                                                                                                                                                                             |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| Solicitante<br>NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                |                                                                                                                                                                                             |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <p>1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:</p> <table border="0"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. I</td> <td>Bases de la opinión</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table> <p>2. ACCIONES FUTURAS<br/>Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional.<br/><br/>Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.<br/><br/>Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220.</p> <p>3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.</p> |                                                                |                                                                                                                                                                                             |                                                                                | <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. I | Bases de la opinión | <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. II | Prioridad | <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. III | No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial | <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. IV | Falta de unidad de invención | <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. V | Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación | <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. VI | Ciertos documentos citados | <input type="checkbox"/> | Casilla No. VII | Ciertos defectos en la solicitud internacional | <input checked="" type="checkbox"/> | Casilla No. VIII | Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Casilla No. I                                                  | Bases de la opinión                                                                                                                                                                         |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Casilla No. II                                                 | Prioridad                                                                                                                                                                                   |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Casilla No. III                                                | No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial                                                                                                |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Casilla No. IV                                                 | Falta de unidad de invención                                                                                                                                                                |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Casilla No. V                                                  | Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Casilla No. VI                                                 | Ciertos documentos citados                                                                                                                                                                  |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Casilla No. VII                                                | Ciertos defectos en la solicitud internacional                                                                                                                                              |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Casilla No. VIII                                               | Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional                                                                                                                                      |                                                                                |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |
| Nombre y dirección de correo de la ISA<br>European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399-4465                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                | Fecha de finalización de esta opinión<br><br>ver forma<br>PCT/ISA/210                                                                                                                       | Funcionario Autorizado<br><br>Steendijk, M<br><br>Teléfono No.+49 89 2399-8460 |                                     |               |                     |                                     |                |           |                                     |                 |                                                                                              |                                     |                |                              |                                     |               |                                                                                                                                                                                             |                                     |                |                            |                          |                 |                                                |                                     |                  |                                                        |

Forma (PCT/ISA/237) (carátula) (Abril 2005)

27  
27

28

OPINION ESCRITA DE LA  
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/US2005/044091

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido con base en:  
☒ La solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó  
☐ Una traducción de la solicitud internacional al, que es el lenguaje de una traducción entregada para propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
  - a. tipo de material:  
☐ un listado de secuencia  
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
  - b. formato de material:  
☐ en formato escrito  
☐ en formato legible por computador
  - c. tiempo de presentación/ suministro:  
☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.  
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.  
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ La validez de la prioridad reivindicada no se ha considerado porque la Autoridad de la Búsqueda Internacional no tiene en su poder una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reivindicada o, donde se requerida, una traducción de la solicitud anterior. Esta opinión sin embargo se ha establecido sobre el supuesto de que la fecha relevante (Reglas 43bis.1 y 64.1) es la fecha de la prioridad reivindicada.
2. ☐ Se ha establecido esta opinión como si no se hubiese reivindicado ninguna prioridad debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de prioridad es inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). Por consiguiente, para los fines de esta opinión, se considera que la fecha de registro internacional indicada anteriormente es la fecha relevante.
3. Observaciones adicionales, si es necesario:

OPINION ESCRITA DE LA  
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/US2005/044091

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
  - ☒ reivindicaciones Nos. 12-22, 41-85
- porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 12-22, 41-85 se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):
- ☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*).
- ☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para la solicitud completa o para dichas reivindicaciones Nos. 1-61
- ☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:
  - ☐ presentó una lista de secuencias en papel cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.
  - ☐ presentó una lista de secuencias en formato electrónico cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.
  - ☐ pagó los derechos de presentación tardía requeridos para la presentación de una lista de secuencias en respuesta a una invitación bajo las Reglas 13ter.1(a) o (b).
- ☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no presentó dichas tablas en formato electrónico cumpliendo con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estaban disponibles a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.
- ☐ las tablas relacionadas con la lista de secuencias nucleótidas y/o amino ácidas, si están en formato electrónico únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver la Casilla Suplementaria para más detalles

- 1) La presente solicitud se relaciona con el uso de salinosporamidas en el tratamiento de fármacos resistentes al cáncer (reivindicaciones 1-22), de la enfermedad caracterizada por angiogénesis excesiva/inapropiada (reivindicaciones 23-58), cáncer resistente al Gleevec (reivindicaciones 59-72), así como de salinosporamidas específicas, fusionadas alternativamente para tratamiento contra el cáncer (reivindicaciones 72-85, ver también las reivindicaciones 6, 17, 28, 46 y 64).
- 2) Documentos citados  
D1: WO 2004/071382 A  
D2: WO 2004/043374 A)  
D3: WO 96/32105  
D4: LEUKEMIA RESEARCH; vol. 28, (2004-05), páginas 39-45  
D5: AM. J. CLIN. PATH., vol. 116, no. 5, (2001-11), páginas 637-646  
D6: WO 2005/002572 A (2005-01-13)  
D7: J. ORG. CHEM., no. 16, (2005-07-01), páginas 6196-6203  
D8: WO 2006/028525 A (2006-03-16)

Los documentos D6-D8 fueron publicados después de la prioridad reivindicada y por lo tanto no son considerados como técnica anterior.

- 3) Novedad  
El documento D1 describe varias salinosporamidas (no los compuestos fusionados alternativamente de las reivindicaciones 6, 17, 28, 46, 64 y 72-85) como inhibidores de proteasoma útiles en el tratamiento de una variedad de trastornos, incluyendo cáncer y la enfermedad angiogénica (ver las páginas 19-20). Este documento no revela el tratamiento de resistencia contra el cáncer.  
En vista de D1 las reivindicaciones 23-27, 29-45, 47-58 no son consideradas nuevas.

El documento D2 describe el uso de inhibidores de proteasoma para el tratamiento de las células resistentes al cáncer, sin embargo no específicamente de las salinosporamidas definidas.

El documento D3 describe análogos de lactacistina útiles como inhibidores de proteasoma; a los compuestos de D3 les falta la sustitución "R3" en los compuestos actualmente definidos.

El documento D4 describe el uso propuesto de los inhibidores de proteasoma para el tratamiento de Gleevec (imatinib) resistente al cáncer, no específicamente de las salinosporamidas definidas.

El documento D5 describe una variedad de aplicaciones de los inhibidores de proteasoma, incluyendo el tratamiento contra el cáncer y como agente de antiangiogénesis, sin embargo, no específicamente de

las salinosporamidas definidas.

4) Paso inventivo

En cuanto a que la materia objeto reivindicada fuese nueva, aplican las siguientes observaciones en cuanto al paso inventivo.

El uso de las salinosporamidas definidas para tratamiento de células resistentes al cáncer parecería obvio a la luz de D2/D4 en combinación con el documento D1:

Como agente alternativo para el tratamiento de las células resistentes al cáncer (comparar D2/D4) la persona versada en la técnica consideraría otros agentes que son igualmente inhibidores de proteasoma; el documento D1 describe los agentes definidos como inhibidores de proteasoma y por lo tanto sugeriría obviamente estos agentes como alternativas de los agentes de D2/D4.

Los agentes fusionados alterativamente de las reivindicaciones 6, 17, 28, 46, 64 y 72-85 no habían sido descritos en D1-D5. Estos derivados sin embargo parecerían obvios, derivados activos de las salinosporamidas conocidas de D1 a la luz de D3, como lo describe este documento D3 para las lactacistinas estructural y funcionalmente estrechamente relacionadas la posibilidad de una fusión semejante, alterativa (ver el significado de Z2/R1/R2 en i.a. página 2).

5) Observaciones adicionales

5.1 No es evidente ningún aspecto unificador, que distinga en común respecto a D1 para ningún tratamiento particular resistente al cáncer de agentes contra el cáncer conocidos y cualquier uso antiangiogénico particular de dichos agentes conocidos. Además, no es evidente ningún aspecto unificador, que distinga en común adicional de dichos usos de agentes conocidos con el uso de salinosporamidas fusionadas alternativamente.

5.2 No parecería que las salinosporamidas fusionadas alternativamente de las reivindicaciones dependientes 6, 17, 28, 46 y 64 caen bajo las reivindicaciones independientes respectivas.

5.3 Las reivindicaciones 23 y 41 se relacionan con el uso de las salinosporamidas definidas en el tratamiento de la enfermedad relacionada con la angiogénesis pero continúan especificando que el cáncer es leucemia, etc. De esta definición no es evidente a qué clase de tratamiento pertenecen las

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

## PCT

To:

see form PCT/ISA/220

### WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

International application No.  
PCT/US2005/044091

International filing date (day/month/year)  
02.12.2005

Priority date (day/month/year)  
03.12.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. A61K31/407 A61P35/00

Applicant  
NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.

#### 1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

#### 2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

#### 3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of  
this opinion

see form  
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Steendijk, M

Telephone No. +49 89 2399-8460



**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/US2005/044091

---

**Box No. I Basis of the opinion**

---

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
  - ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
  - a. type of material:
    - ☐ a sequence listing
    - ☐ table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material:
    - ☐ on paper
    - ☐ in electronic form
  - c. time of filing/furnishing:
    - ☐ contained in the international application as filed.
    - ☐ filed together with the international application in electronic form.
    - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

---

**Box No. II Priority**

---

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/US2005/044091

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 12-22,41-85

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 12-22,41-85 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

**see separate sheet**

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13<sup>ter</sup>.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

- 1) The present application relates to the use of salinosporamides in treatment of drug resistant cancer (claims 1-22), of disease characterized by excessive / inappropriate angiogenesis (claims 23-58), Gleevec resistant cancer (claims 59-72), as well as of specific, alternatively fused salinosporamides for treatment of cancer (claims 72-85, see also claims 6, 17, 28, 46 and 64).
- 2) Cited documents  
D1: WO 2004/071382 A  
D2: WO 2004/043374 A)  
D3: WO 96/32105  
D4: LEUKEMIA RESEARCH, vol. 28, (2004-05), pages 39-45  
D5: AM. J. CLIN. PATH., .vol. 116, no. 5, (2001-11), pages 637-646  
D6: WO 2005/002572 A (2005-01-13)  
D7: J.ORG.CHEM., no. 16,(2005-07-01), pages 6196-6203,  
D8: WO 2006/028525 A (2006-03-16)

Documents D6-D8 were published after the claimed priority and are herein not considered as prior art.

- 3) Novelty  
Document D1 describes various salinosporamides (not the alternatively fused compounds of claims 6, 17, 28, 46, 64 and 72-85) as proteasome inhibitors useful in the treatment of a variety of disorders, including cancer and angiogenic disease (see pages 19-20). This document does not disclose treatment of resistant cancer. In view of D1 claims 23-27, 29-45, 47-58 are not considered new.

Document D2 describes the use of proteasome inhibitors for treatment of resistant cancer cells, not however specifically of the defined salinosporamides.

Document D3 describes lactacystin analogues useful as proteasome inhibitors; the compounds of D3 lack the substitution "R3" in the compounds presently defined.

Document D4 describes the proposed use of proteasome inhibitors for treatment of Gleevec (imatinib) resistant cancer, not specifically of the defined salinosporamides.

Document D5 describes a variety of applications of proteasome inhibitors, including cancer treatment and as antiangiogenesis agent, however, not specifically of the

defined salinosporamides.

**4) Inventive step**

In as far as the claimed matter would be new, the following observations as to inventive step apply.

The use of the defined salinosporamides for treatment of resistant cancer cells would seem obvious in the light of D2/D4 in combination with document D1:

As alternative agent for treatment of resistant cancer cells (compare D2/D4) the person skilled in the art would consider other agents which are equally proteasome inhibitors; document D1 describes the defined agents as proteasome inhibitors and would therefore obviously suggest these agents as alternatives to the agents of D2/D4.

The alternatively fused agents of claims 6, 17, 28, 46, 64 and 72-85 had not been described in D1-D5. These derivatives would however seem obvious, active derivatives from the known salinosporamides of D1 in the light of D3, as this document D3 describes for the structurally and functionally closely related lactacystins the possibility of similar, alternative fusion (see meaning of Z2/R1/R2 on i.a. page 2).

**5) Further observations**

- 5.1** No unifying, common distinguishing aspect with respect to D1 is evident for any particular resistant cancer treatment of known anti-cancer agents and any particular antiangiogenic use of such known agents. Furthermore, no further unifying, common distinguishing aspect of such uses of known agents with the use of the alternatively fused salinosporamides is evident.
- 5.2** The alternatively fused salinosporamides of dependent claims 6, 17, 28, 46 and 64 would not appear to fall under the respective independent claims.
- 5.3** Claims 23 and 41 relate to the use of defined salinosporamides in the treatment of angiogenesis-related disease but continue by specifying that the cancer is leukemia etc. From this definition it is not evident to what type of treatment the claims pertain

43  
44

**MÉTODOS PARA UTILIZAR COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS [3.2.0] Y SUS  
ANÁLOGOS**

Información de Patentes Relacionadas

5                   Esta solicitud reivindica la prioridad bajo 35  
U.S.C. 119(e) para las Solicitudes Provisionales de E.U. Nos.  
60/633,379, presentada en Diciembre 3 de 2004; 60/643,922,  
presentada en Enero 13 de 2005, 60/658,884, presentada en  
Marzo 4 de 2005; y 60/676,533, presentada en Abril 29 de  
10 2005, tituladas METHODS OF USING [3.2.0] HETEROCYCLIC  
COMPOUNDS AND ANALOGS THEREOF, y cada una de las cuales se  
incorpora en la presente mediante la referencia en su  
totalidad.

Campo de la Invención

15                   La presente invención se refiere a ciertos  
compuestos y a métodos para la preparación y el uso de  
ciertos compuestos en los campos de la química y la medicina.  
Las modalidades de la invención descritas en la presente se  
refieren a métodos para utilizar compuestos heterocíclicos.  
20 En algunas modalidades, los compuestos se utilizan como  
inhibidores de proteasoma. En otras modalidades, los  
compuestos se utilizan para el tratamiento de inflamación,  
cáncer y enfermedades infecciosas.

Descripción de la Técnica Relacionada

25                   El cáncer es la principal causa de muerte en los  
Estados Unidos. A pesar de los significativos esfuerzos por  
encontrar nuevos procedimientos para el tratamiento del  
cáncer, las opciones primarias de tratamiento siguen siendo  
la cirugía, quimioterapia y terapia de radiación, ya sea  
30 solas o en combinación. Sin embargo, la cirugía y la terapia  
de radiación son generalmente útiles solo para tipos de  
cáncer claramente definidos y son de uso limitado para el

tratamiento de pacientes con enfermedad diseminada. La quimioterapia es el método generalmente útil para el tratamiento de pacientes con cáncer metastático o cánceres difusos tales como leucemias. Aunque la quimioterapia puede  
5 proporcionar un beneficio terapéutico, frecuentemente falla en dar como resultado la cura de la enfermedad debido a que las células cancerosas del paciente se vuelven resistentes al agente quimioterapéutico. Debido, en parte, a la probabilidad de que las células cancerosas se vuelvan  
10 resistentes a un agente quimioterapéutico, tales agentes se utilizan comúnmente en combinación para tratar a los pacientes.

De manera similar, las enfermedades infecciosas ocasionadas, por ejemplo, por bacterias, hongos y  
15 protozoarios, se han vuelto incrementadamente difíciles de tratar y curar. Por ejemplo, más y más bacterias, hongos y protozoarios desarrollan resistencia a los antibióticos y agentes quimioterapéuticos actuales. Ejemplos de tales microbios incluyen Bacillus, Leishmania, Plasmodium y  
20 Trypanosoma.

Además, un creciente número de enfermedades y condiciones médicas se clasifican como enfermedades inflamatorias. Tales enfermedades incluyen condiciones tales como asma hasta enfermedades cardiovasculares. Estas  
25 enfermedades continúan afectando a más y más personas en todo el mundo, a pesar de las nuevas terapias y avances médicos.

En consecuencia, existe la necesidad de quimioterapéuticos, agentes antimicrobiales, y agentes antiinflamatorios adicionales para el tratamiento del cáncer,  
30 enfermedades inflamatorias y enfermedades infecciosas. Se realiza un esfuerzo continuo por investigadores individuales, la academia y compañías para identificar nuevos agentes

45  
46

quimioterapéuticos y antimicrobiales potencialmente útiles.

Los productos naturales derivados del mar son una rica fuente de nuevos agentes anti-cáncer y agentes antimicrobiales potenciales. Los océanos son masivamente complejos y alojan un conjunto diverso de microbios que se presentan en ambientes de variaciones extremas en presión, salinidad y temperatura. Los microorganismos marinos han desarrollado, en consecuencia, capacidades metabólicas y fisiológicas únicas que no solo aseguran la supervivencia en hábitats extremos y variados, sino también ofrecen el potencial para producir metabolitos que no se observarían de microorganismos terrestres (Okami, Y. 1993, J. Mar. Biotechnol., 1:59). Las clases estructurales representativas de tales metabolitos incluyen terpenos, péptidos, policétidos y compuestos con orígenes biosintéticos mezclados. Muchas de estas moléculas tienen actividades anti-tumorales, antibacteriales, anti-fungales, antiinflamatorias o inmunosupresoras demostrables (Bull, A. T. et al., 2000 Microbiol Mol Biol Rev, 64:573; Cragg, G. M. & D. J. Newman 2002, Trends Pharmacol Sci, 23:404; Kerr, R. G., & S. S. Kerr 1999, Exp Opin Ther Patents, 9:1207; Moore, B. S. 1999 Nat Prod Rep 16:653; Faulkner, D. J. 2001 Nat Prod Rep, 18:1; Mayer, A. M. & V. K. Lehman 2001, Anticancer Res, 21:2489), que validan la utilidad de esta fuente para el aislamiento de invaluables agentes terapéuticos. Además, el aislamiento de nuevos agentes anti-cáncer y antimicrobiales que representan clases de mecánicas alternativas a aquellos actualmente en el mercado, ayudarán a tratar los problemas de resistencia, incluyendo cualquier resistencia en base al mecanismo que pueda haberse diseñado en patógenos para propósitos de bioterrorismo.

### SUMARIO DE LA INVENCION

Las modalidades tratadas en la presente se refieren en general a compuestos químicos, incluyendo compuestos heterocíclicos y sus análogos. Algunas modalidades se dirigen al uso de compuestos como inhibidores de proteasoma.

En otras modalidades, los compuestos se utilizan para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de tumores, cánceres y otros tejidos neoplásicos. Los métodos de tratamiento descritos en la presente pueden emplearse con cualquier paciente sospechoso de tener crecimientos tumorales, cánceres u otros crecimientos neoplásicos, ya sea benignos o malignos ("tumor" o "tumores" como se utiliza en la presente, abarca tumores, cánceres, células neoplásicas diseminadas y crecimientos neoplásicos localizados). Ejemplos de tales crecimientos incluyen, pero no se limitan a, cánceres de mama; osteosarcomas, angiosarcomas, fibrosarcomas y otros sarcomas; leucemias; tumores sinusales; cánceres ováricos, uretrales, de vejiga, prostáticos y otros genitourinarios; cánceres de colon, esófago y estómago y otros cánceres gastrointestinales; cánceres pulmonares; linfomas; mielomas; cánceres pancreáticos; cánceres hepáticos; cánceres renales; cánceres endócrinos; cánceres de piel; melanomas; angiomas; y cánceres cerebrales o del sistema nervioso central (CNS; glioma). En general, el tumor o crecimiento que va a tratarse puede ser cualquier tumor o cáncer primario o secundario. Ciertas modalidades se refieren a métodos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas en animales. El método puede incluir, por ejemplo, la administración de una cantidad efectiva de un compuesto a un paciente que lo necesita. Otras modalidades se refieren al uso de compuestos en la elaboración de un fármaco o medicamento para el

tratamiento de una enfermedad neoplásica.

Los compuestos pueden administrarse o utilizarse en combinación con tratamientos tales como quimioterapia, radiación y terapias biológicas. En algunas modalidades, los

5 compuestos pueden administrarse o utilizarse con un agente quimioterapéutico. Ejemplos de tales quimioterapéuticos incluyen alcaloides, agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, enzimas, hormonas, compuestos de platino, inmunoterapéuticos (anticuerpos, células T, epítopes), BRMs y

10 lo similar. Los ejemplos incluyen, vincristina, vinblastina, vindesina, paclitaxel (Taxol), docetaxel, epipodofilotoxinas inhibidoras de topoisomerasa (Etoposido (VP-16), Teniposido (VM-26)), camptotecina, mostazas de nitrógeno (ciclofosfamida), nitrosoureas, carmustina, lomustina,

15 dacarbazina, hidroximetilmelamina, tiotepa y mitocicina C, dactinomicina (Actinomycin D), antibióticos de antraciclina (Daunorubicin, Daunomycin, Cerubidina), doxorubicina (Adriamycin), idarrubicina (Idamycin), antracenodionas (Mitoxantrone), bleomicina (Blenoxane), plicamicina

20 (Mithramycin), antifolatos (Methotrexate (Folex, Mexate)), antimetabolitos de purina (6-mercaptopurina (6-MP, Purinethol), y 6-tioguanina (6-TG)). Las dos principales drogas anti-cáncer en esta categoría son 6-mercaptopurina y 6-tioguanina, clorodeoxiadenosina y pentostatina, Pentostatin

25 (2'-desoxicoformicina), antagonistas de pirimidina, fluoropirimidinas (5-fluorouracilo (Adrucil), 5-fluorodesoxiuridina (FdUrd) (Floxuridine)), citosina arabinosida (Cytosar, ara-C), fludarabina, L-ASPARAGINASE, hidroxiurea, glucocorticoides, antiestrógenos, tamoxifen,

30 antiandrógenos no esteroideos, flutamida, inhibidores de aromatasa Anastrozol (Arimidex), cisplatina, 6-mercaptopurina y tioguanina, metotrexato, citoxan, citarabina, L-

asparaginasa, esteroides: prednisona y dexametasona. También pueden utilizarse, por ejemplo, inhibidores de proteasoma tales como bortezomib en combinación con los presentes compuestos. Ejemplos de biológicos pueden incluir agentes  
5 tales como anticuerpos TRAIL para TRAIL, integrinas tales como alfa-V-beta-3 ( $\alpha V\beta 3$ ) y/o otros factores de citosina/crecimiento que se encuentran implicados en la angiogénesis, VEGF, EGF, FGF y PDGF. En algunos aspectos, los compuestos pueden conjugarse o derivarse con un  
10 anticuerpo. Los métodos de combinación antes descritos pueden utilizarse para el tratamiento de una variedad de condiciones, incluyendo cáncer y enfermedades neoplásicas, inflamación e infecciones microbianas.

Aún en otras modalidades, los compuestos se  
15 utilizan para el tratamiento de condiciones inflamatorias. Ciertas modalidades se refieren a métodos para el tratamiento de condiciones inflamatorias en animales. El método puede incluir, por ejemplo, la administración de una cantidad efectiva de un compuesto a un paciente que lo necesita.  
20 Otras modalidades se refieren al uso de compuestos en la elaboración de un fármaco o medicamento para el tratamiento de inflamación.

En ciertas modalidades, los compuestos se utilizan para tratar enfermedades infecciosas. El agente infeccioso  
25 puede ser un microbio, por ejemplo, bacterias, hongos, protozoarios y algas microscópicas o virus. Además, el agente infeccioso puede ser B. anthracis (ántrax). En algunas modalidades, el agente infeccioso es un parásito. Por ejemplo, el agente infeccioso puede ser Plasmodium,  
30 Leishmania y Trypanosoma. Ciertas modalidades se refieren a métodos para el tratamiento de agentes infecciosos en animales. El método puede incluir, por ejemplo, la

siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquinilo  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, (incluyendo, por ejemplo, 5 ciclohexilcarbinol), alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo 10 polihalogenado;

en donde  $R_3$  puede seleccionarse del grupo que consiste de un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado o 15 alquinilo  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, 20 oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado; y en donde cada uno de  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$  y  $E_4$  es un heteroátomo sustituido o no sustituido; en el tratamiento del cáncer, inflamación y enfermedad infecciosa.

En algunas modalidades, preferentemente  $R_1$  es un 25 alquilo  $C_1$  a  $C_5$  sustituido o no sustituido. Por ejemplo, se prefieren, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, ter-butilo, y pentilo. En algunas modalidades,  $R_1$  no es un alquilo  $C_6$  no ramificado sustituido o no sustituido.

Otras modalidades se refieren a métodos para el 30 tratamiento de una enfermedad neoplásica en un animal. Los métodos pueden incluir, por ejemplo, la administración al animal de una cantidad terapéuticamente efectiva de un

51  
52

compuesto de una fórmula seleccionada de las Fórmulas I-VI, y sales y ésteres de prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo.

Modalidades adicionales se refieren a composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de una fórmula seleccionada de las Fórmulas I-VI. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además un agente antimicrobial.

Aún modalidades adicionales se refieren a métodos para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa. Los métodos pueden incluir, por ejemplo, poner en contacto una célula cancerosa con un compuesto de una fórmula seleccionada de las Fórmulas I-VI, y sales y ésteres de prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo.

Otras modalidades se refieren a métodos para inhibir la actividad de proteasoma, que incluyen la etapa de poner en contacto una célula con un compuesto de una fórmula seleccionada de las Fórmulas I-VI, y sales y ésteres de prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo.

Otras modalidades se refieren a métodos para inhibir la activación del factor nuclear kappa B (NF-kB), que incluyen la etapa de poner en contacto una célula con un compuesto de una fórmula seleccionada de las Fórmulas I-VI, y sales y ésteres de prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo.

Algunas modalidades se refieren a métodos para el tratamiento de una condición inflamatoria, que incluyen la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de una fórmula seleccionada de las Fórmulas I-VI a un paciente que lo necesita.

Modalidades adicionales se refieren a métodos para el tratamiento de una enfermedad microbial, que incluyen la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de

54

compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-19.

La Figura 10 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-2.

La Figura 11 representa el espectro de masa de un  
5 compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-2.

La Figura 12 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-3.

La Figura 13 representa el espectro de masa de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-3.

10 La Figura 14 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-4.

La Figura 15 representa el espectro de masa de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-4.

La Figura 16 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un  
15 compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-5A.

La Figura 17 representa el espectro de masa de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-5A.

La Figura 18 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-5B.

20 La Figura 19 representa el espectro de masa de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-5B.

La Figura 20 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula IV-3C en DMSO- $d_6$ .

25 La Figura 21 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula IV-3C en  $\text{C}_6\text{D}_6$ /DMSO- $d_6$ .

La Figura 22 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-13C.

30 La Figura 23 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-8C.

La Figura 24 representa el espectro  $^1\text{H}$  NMR de un

se limitan a, proporcionar un método para la preparación de compuestos, incluyendo los compuestos, por ejemplo, descritos en la presente y sus análogos, y a proporcionar un método para la producción de composiciones antimicrobianas, anti-  
5 cáncer y antiinflamatorias farmacéuticamente aceptables. Los métodos pueden incluir las composiciones relativamente en alto rendimiento, en donde los compuestos y/o sus derivados se encuentran entre los ingredientes activos en estas composiciones. Otras modalidades se refieren a proporcionar  
10 nuevos compuestos que no pueden obtenerse mediante los métodos actualmente disponibles. Además, las modalidades se refieren a métodos para el tratamiento del cáncer, inflamación y enfermedades infecciosas, particularmente aquellas que afectan a humanos. En algunas modalidades, una  
15 o más fórmulas o uno o más compuestos o grupos de compuestos, pueden excluirse específicamente del uso en cualquiera o más de los métodos para el tratamiento de las condiciones descritas en la presente. Como un ejemplo ilustrativo, los compuestos de la Fórmula II-16 pueden excluirse en algunas  
20 modalidades de los métodos generalmente para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, o de un tipo de cáncer específico. Los métodos pueden incluir, por ejemplo, la etapa de administrar una cantidad efectiva de un miembro de una clase de los nuevos compuestos. Las modalidades preferidas se  
25 refieren a los compuestos y métodos para elaborar y utilizar tales compuestos descritos en la presente, pero no necesariamente se cumplen estos objetivos en todas las modalidades de la presente invención.

Para los compuestos descritos en la presente, cada  
30 carbono estereogénico puede ser de configuración R o S. Aunque los compuestos específicos ejemplificados en esta solicitud pueden representarse en una configuración

halógeno, una variante monosustituida, polisustituida o no  
sustituida de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$   
saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquinilo  $C_2-C_{24}$ ,  
acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi,  
5 cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo,  
heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo,  
amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo,  
cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo,  
carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona, sulfonato ésteres,  
10 tiociano, ácidos y ésteres borónicos y alquilo halogenado  
incluyendo alquilo polihalogenado. Además, en ciertas  
modalidades, cada uno de  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$  y  $E_4$  puede ser un  
heteroátomo sustituido o no sustituido, por ejemplo, un  
heteroátomo o heteroátomo sustituido seleccionado del grupo  
15 que consiste de nitrógeno, sulfuro y oxígeno.

En algunas modalidades  $n$  puede ser igual a 1,  
mientras que en otras puede ser igual a 2. Cuando  $n$  es igual  
a 2 los sustituyentes pueden ser los mismos o pueden ser  
diferentes. Además, en algunas modalidades  $R_3$  no es un  
20 hidrógeno.  $m$  puede ser igual a 1 o 2, y cuando  $m$  es igual a  
2,  $R_4$  puede ser igual o diferente.

$E_5$  puede ser, por ejemplo, OH, O,  $OR_{10}$ , S,  $SR_{11}$ , NH,  
NH<sub>2</sub>, NOH, NHOH,  $NR_{12}$ , y  $NHOR_{13}$ , en donde  $R_{10-13}$  pueden incluir  
por separado, por ejemplo, un hidrógeno sustituido o no  
25 sustituido de cualquiera de los siguientes: alquilo, un  
arilo, un heteroarilo, y similares. También,  $R_1$  puede ser  
 $CH_2CH_2X$ , en donde X puede ser, por ejemplo, H, F, Cl, Br, y I.  
 $R_3$  puede ser metilo. Además,  $R_4$  puede incluir un ciclohexilo.  
También, cada uno de  $E_1$ ,  $E_3$  y  $E_4$  puede ser O y  $E_2$  puede ser  
30 NH. Preferentemente,  $R_1$  puede ser  $CH_2CH_2X$ , en donde X se  
selecciona del grupo que consiste de H, F, Cl, Br, y I; en  
donde  $R_4$  puede incluir un ciclohexilo; en donde  $R_3$  puede ser

pueden incluir por separado, por ejemplo, un hidrógeno, un halógeno, una variante monosustituida, una polisustituida o una no sustituida de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquinilo  $C_2-C_{24}$ ,  
5 acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo,  
10 carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona, sulfonato ésteres, tiociano, ácidos y ésteres borónicos y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado. Por ejemplo n puede ser igual a 1 o 2.

En ciertas modalidades,  $R_4$  puede ser, por ejemplo  
15 un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquinilo  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo,  
20 heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado. En algunas modalidades m puede ser igual a 1  
25 o 2, y en donde m es igual a 2, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes. También, cada uno de  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$  y  $E_5$  puede ser, por ejemplo, un heteroátomo sustituido o no sustituido. Por ejemplo, el heteroátomo puede ser nitrógeno, sulfuro u oxígeno.

30 En algunas modalidades,  $R_2$  no es ciclohex-2-enilo carbinol cuando uno de los sustituyentes  $R_1$  es etilo o cloroetilo.

alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquino  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxycarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, fenilo, cicloalquilacilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, tio, sulfóxido, ésteres de ácido sulfonaborónico y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado. n es igual a 1 o 2, y si n es igual a 2, entonces  $R_1$  puede ser igual o diferente;

en donde  $R_2$ , pueden seleccionarse de un grupo que consiste de hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquino  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxycarboniloxi, cicloalquilo (que incluye, por ejemplo, ciclohexilcarbinol), cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona, sulfonato ésteres, tiociano, ácidos y ésteres borónicos y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado;

en donde  $R_3$ , pueden seleccionarse de un grupo que comprende un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquino  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxycarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro,

azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona, sulfonato ésteres, tiociano, ácidos y ésteres borónicos y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado; en  
5 donde cada uno de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> y E<sub>4</sub> pueden ser un átomo sustituido o no sustituido.

En algunas modalidades, R<sub>2</sub> no es ciclohex-2-enilo carbinol cuando uno de los sustituyentes R<sub>1</sub> es etilo o cloroetilo y R<sub>3</sub> es metilo.

10 En algunas modalidades, R<sub>1</sub> es preferentemente un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub> sustituido o no sustituido. Por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, tert-butilo, y pentilo son preferidos.

en donde R<sub>14</sub>, pueden seleccionarse de un grupo que  
15 consiste de un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado o alquino C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi,  
20 cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona, sulfonato ésteres, tiociano, ácidos y ésteres borónicos y  
25 alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado.

En algunas modalidades, R<sub>14</sub> es preferentemente un alquiltiol o alquiltiol sustituido, y E<sub>3</sub> es un oxígeno.

Por ejemplo, en algunas modalidades algunos de los compuestos de la Fórmula VI pueden tener la siguiente  
30 estructura referida como Fórmula VI-1:

sustituido o no sustituido.

en donde  $R_5$  puede seleccionarse por separado de un grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquino  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxycarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, oxi, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona, sulfonato ésteres, tiociano, ácidos y ésteres borónicos y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, en donde  $m$  es, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11, y si  $m$  es mayor que 1,  $R_5$  puede ser igual o diferente; y en donde los sustituyentes  $R_5$  pueden formar un anillo; y en donde cada uno de  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$  y  $E_5$  es un heteroátomo sustituido o no sustituido.

En algunas modalidades,  $R_1$  es preferentemente un alquilo  $C_1$  a  $C_5$  sustituido o no sustituido. Por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, tert-butilo, y pentilo son preferidos.

en donde  $R_{14}$ , pueden seleccionarse de un grupo que consiste de un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado o alquino  $C_2-C_{24}$ , acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxycarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona,

Fórmula VI-1C

Ciertas modalidades proporcionan también sales y ésteres de prodroga farmacéuticamente aceptables del compuesto de las Fórmulas I-VI, y proporcionan métodos para  
5 obtener y purificar tales compuestos mediante los métodos descritos en la presente.

El término "éster de prodroga", especialmente al referirse a un éster de prodroga del compuesto de la Fórmula I sintetizado mediante los métodos descritos en la presente,  
10 se refiere a un derivado químico del compuesto que se transforma rápidamente in vivo para producir el compuesto, por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre o tejidos internos. El término "éster de prodroga" se refiere a derivados de los compuestos descritos en la presente,  
15 formados mediante la adición de cualquiera de varios grupos de formación de éster o tioéster que se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos de éster de prodroga incluyen pivoiloximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo y metoximetilo, así como otros de esos grupos  
20 conocidos en la técnica, incluyendo un grupo (5-R-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metil. Otras prodrogas pueden prepararse mediante la preparación de un tioéster correspondiente del compuesto, por ejemplo, reactivando con un tiol apropiado, tal como tiofenol, cisteína o sus derivados, o propanotiol,  
25 por ejemplo. Otros ejemplos de grupos de éster de prodroga 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  
30 Application", editado por E. B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (que proporcionan ejemplos de ésteres útiles como prodrogas para compuestos que contienen grupos

107  
108

carboxilo). Cada una de las referencias antes mencionadas se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad.

El término "éster de prodroga", como se utiliza en la presente, se refiere también a un derivado químico del compuesto que se transforma rápidamente in vivo para producir el compuesto, por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre.

El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en la presente, y particularmente al referirse a una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto, incluyendo Fórmulas I-VI, y las Fórmulas I-VI producidas y sintetizadas mediante los métodos descritos en la presente, se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto, y preferentemente, se refiere a una sal de adición de ácido de un compuesto. Los ejemplos preferidos de sal farmacéuticamente aceptable son las sales de metal alcali (sodio o potasio), las sales de metal de tierra alcalina (calcio o magnesio), o sales de amonio derivadas de amoniaco o de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, alquilamina C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, ciclohexilamina, trietanolamina, etilenodiamina o tris-(hidroximetil)aminometano. Con respecto a los compuestos sintetizados mediante el método de esta modalidad, que son aminas básicas, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido de ácidos inorgánicos u orgánicos 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, metanosulfónico, p-toluenosulfónico o naftalenosulfónico.

Las composiciones farmacéuticas preferidas descritas en la presente incluyen sales farmacéuticamente

110

aceptables y ésteres de prodroga del compuesto de las Fórmulas I-VI, obtenidos y purificados mediante los métodos descritos en la presente. En consecuencia, si la elaboración de las formulaciones farmacéuticas implica un íntimo mezclado  
5 de los excipientes farmacéuticos y del ingrediente activo en su forma de sal, entonces se prefiere el uso de excipientes farmacéuticos que sean no básicos, es decir, excipientes ya sea acídicos o neutrales.

También se apreciará que la frase "compuestos y  
10 composiciones que comprenden el compuesto", o cualquier frase similar, pretende abarcar compuestos en cualquier forma adecuada para el suministro farmacéutico, como se trata en mayor detalle en la presente. Por ejemplo, en ciertas modalidades, los compuestos y composiciones que comprenden el  
15 mismo pueden incluir una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.

En una modalidad, los compuestos pueden utilizarse para tratar enfermedades microbianas, cáncer e inflamación. Enfermedad pretende interpretarse ampliamente para cubrir  
20 enfermedades infecciosas y también enfermedades autoinmunes, enfermedades no infecciosas y condiciones crónicas. En una modalidad preferida, la enfermedad es ocasionada por un microbio, tal como una bacteria, un hongo y protozoarios, por ejemplo. Los métodos de uso también pueden incluir las  
25 etapas de administración de un compuesto o composición que comprende el compuesto, a un individuo con una enfermedad infecciosa o cáncer. El compuesto o composición puede administrarse en una cantidad efectiva para el tratamiento de la enfermedad infecciosa particular, cáncer o condición  
30 inflamatoria.

La enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, una ocasionada por Bacillus, tales como B. anthracis y B.

11,

cereus. La enfermedad infecciosa puede ser una ocasionada por un protozooario, por ejemplo, un Leishmania, un Plasmodium o un Trypanosoma. El compuesto o composición puede administrarse con un vehículo, diluyente, excipiente  
5 farmacéuticamente aceptable, y lo similar.

El cáncer puede ser, por ejemplo, un mieloma múltiple, un carcinoma colorrectal, un carcinoma prostático, un adenocarcinoma de mama, un carcinoma pulmonar de célula no pequeña, un carcinoma ovárico, un melanoma y lo similar.

10 La condición inflamatoria puede ser, por ejemplo, artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, psoriasis, choque, infarto al miocardio, daño de reperfusión, y lo similar.

El término "átomo de halógeno" como se utiliza en  
15 la presente, significa cualquiera de los átomos radio estables de la columna 7 de la Tabla Periódica de Elementos, i.e., flúor, cloro, bromo, o yodo, siendo preferidos bromo y cloro.

El término "alquilo" como se utiliza en la  
20 presente, significa cualquier hidrocarburo saturado no ramificado o ramificado, sustituido o no sustituido, siendo preferidos los hidrocarburos  $C_1-C_{24}$  y  $C_1-C_6$ , siendo más preferidos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, y ter-butilo, y pentilo. Entre los hidrocarburos  
25 saturados sustituidos, se prefieren los hidrocarburos  $C_1-C_{24}$ , siendo más preferidos los hidrocarburos mono y di y per-halógeno sustituidos saturados y los hidrocarburos amino sustituidos.

El término "sustituido" tiene su significado  
30 ordinario, como se encuentra en numerosas patentes de la técnica relacionada. Ver, por ejemplo, Patentes de E.U. Nos. 6,509,331; 6,506,787; 6,500,825; 5,922,683; 5,886,210;

5,874,443; y 6,350,759; todas las cuales se incorporan en la presente en su totalidad por la referencia. Específicamente, la definición de sustituido es tan amplia como la proporcionada en la Patente de E.U. No. 6,509,331, que define el término "alquilo sustituido" de tal manera que se refiere a un grupo alquilo, preferentemente de desde 1 hasta 10 átomos de carbono, que tiene de 1 a 5 sustituyentes, y preferentemente de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiacilamino, ciano, halógeno, hidroxilo, carboxilo, carboxilalquilo, ceto, tioceto, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterocíclico, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, --SO-alquilo, --SO-alquilo sustituido, --SO-arilo, --SO-heteroarilo, --SO<sub>2</sub>-alquilo, --SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, --SO<sub>2</sub>arilo y -SO<sub>2</sub>-heteroarilo. Las otras patentes antes listadas también proporcionan definiciones estándar para el término "sustituido" que entienden bien los expertos en la técnica.

El término "cicloalquilo" se refiere a cualquier anillo de hidrocarburo no aromático, preferentemente, que tiene de cinco a doce átomos que comprenden el anillo. El término "acilo" se refiere a grupos alquilo o arilo derivados de un oxoácido, siendo preferido un grupo acetilo.

El término "alquenilo", como se utiliza en la presente, significa cualquier hidrocarburo insaturado no ramificado o ramificado, sustituido o no sustituido, incluyendo hidrocarburos poliinsaturados, siendo preferidos los hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituidos no ramificados, mono-

11  
112

insaturados y di-insaturados, y siendo más preferidos los hidrocarburos mono-insaturados di-halógeno sustituidos. El término "cicloalquenilo" se refiere a cualquier anillo de hidrocarburo no aromático, preferentemente, que tiene de  
5 cinco a doce átomos que comprenden el anillo.

Los términos "arilo", "arilo sustituido", "heteroarilo" y "heteroarilo sustituido", como se utilizan en la presente, se refieren a anillos de hidrocarburo aromático, preferentemente que tienen cinco, seis o siete átomos, y de  
10 mayor preferencia que tienen seis átomos que comprenden el anillo. "Heteroarilo" y "heteroarilo sustituido" se refieren a anillos de hidrocarburo aromático en los cuales al menos un heteroátomo, e.g., átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno, se encuentra en el anillo conjuntamente con al menos un átomo de  
15 carbono. El término "heterociclo" o "heterocíclico" se refieren a cualquier compuesto cíclico que contiene uno o más heteroátomos. Los arilos sustituidos, heterociclos y heteroarilos pueden sustituirse con cualquier sustituyente, incluyendo aquellos antes descritos y aquellos conocidos en  
20 la técnica.

El término "alcoxi" se refiere a cualquier éter no ramificado o ramificado, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado, siendo preferidos los éteres  $C_1-C_6$  no ramificados, saturados, no sustituidos, siendo preferido  
25 metoxi,, y también siendo preferidos los éteres dimetilo, dietilo, metil-isobutilo y metil-ter-butilo. El término "cicloalcoxi" se refiere a cualquier anillo de hidrocarburo no aromático, que tiene preferentemente de cinco a doce átomos que comprenden el anillo. El término "alcoxi  
30 carbonilo" se refiere a cualquier alcoxi lineal, ramificado, cíclico, saturado, insaturado, alifático o aromático unido a un grupo carbonilo. Los ejemplos incluyen un grupo

114

118  
113

metoxycarbonilo, grupo etoxycarbonilo, grupo  
propiloxycarbonilo, grupo isopropiloxycarbonilo, grupo  
butoxycarbonilo, grupo sec-butoxycarbonilo, grupo ter-  
butoxycarbonilo, grupo ciclopentiloxycarbonilo, grupo  
5 ciclohexiloxycarbonilo, grupo benciloxycarbonilo, grupo  
aliloxycarbonilo, grupo feniloxycarbonilo, grupo  
piridiloxycarbonilo y lo similar.

Los términos "puro", "purificado", "sustancialmente  
purificado" y "aislado", como se utilizan en la presente, se  
10 refieren al compuesto de la modalidad encontrándose libre de  
otros compuestos disímiles con los cuales el compuesto, si se  
encuentra en su estado natural, se asociaría en su estado  
natural. En ciertas modalidades, descrito en la presente  
como "puro", "purificado", "sustancialmente purificado" o  
15 "aislado", el compuesto puede comprender al menos 0.5%, 1%,  
5%, 10% o 20% y de mayor preferencia al menos 50% o 75% de la  
masa por peso, de una muestra dada.

Los términos "derivado", "variante", u otro término  
similar se refieren a un compuesto que es un análogo del otro  
20 compuesto.

Ciertos de los compuestos de las Fórmulas I-VI  
pueden obtenerse y purificarse o pueden obtenerse a través de  
semi-síntesis a partir de compuestos purificados como se  
establece en la presente. En general, sin limitarse a los  
25 mismos, los compuestos de la Fórmula II-15, preferentemente  
las Fórmulas II-16, II-17, II-18 y II-19, pueden obtenerse  
sintéticamente o mediante fermentación. Los procedimientos  
de fermentación ejemplares se proporcionan abajo. Además,  
los compuestos de la Fórmula II-15, preferentemente las  
30 Fórmulas II-16, II-17, II-18 y II-19, pueden utilizarse como  
compuestos de inicio a fin de obtener/sintetizar varios de  
los otros compuestos descritos en la presente. Se

114  
115

incorporan en la presente por la referencia en su totalidad).

La exposición del cultivo de producción a análogos de ácido acético, fenilalanina, valina, ácido butírico, ácido shiquímico y halógenos, preferentemente diferentes al cloro, puede conducir a la formación de nuevos análogos. Los nuevos análogos producidos pueden detectarse fácilmente en extractos crudos mediante HPLC y LC-MS. Por ejemplo, después de manipular el medio con diferentes concentraciones de bromuro de sodio, se produjo con éxito un bromo-análogo, Fórmula II-18, en cultivo en matraz de agitación a una titulación de 14 mg/l.

Un segundo procedimiento para la generación de nuevos análogos es a través de biotransformación. Las reacciones de biotransformación son reacciones químicas catalizadas por enzimas o células completas que contienen estas enzimas. Zaks, A. Curr Opin Chem Biol 5:130 (2001). Los productos microbianas naturales son sustratos ideales para reacciones de biotransformación dado que se sintetizan mediante una serie de reacciones enzimáticas dentro de células microbianas. Riva S., Curr Opin Chem Biol 5:106 (2001).

Dada la estructura de los compuestos descritos, incluyendo los de la Fórmula II-15, por ejemplo, los posibles orígenes biosintéticos son acetil-CoA, etilmalonil-CoA, fenilalanina y cloro. Etilmalonil-CoA se deriva de butiril-CoA, que puede derivarse ya sea de valina o crotonil-CoA. Liu et al., Metab Eng 3:40 (2001). Fenilalanina se deriva de ácido shiquímico.

Producción de Compuestos de las Fórmulas I-7, II-16, II-17, II-18, II-20, II-24C, II-26, II-27 y II-28

La producción de compuestos de las fórmulas I-7, II-16, II-17, II-18, II-20, II-24C, II-26, II-27 y II-28,

114

puede llevarse a cabo cultivando la cepa CNB476 y la cepa NPS21184, una variante natural de la cepa CNB476, en un medio nutritivo adecuado bajo las condiciones descritas en la presente, preferentemente bajo condiciones aeróbicas sumergidas, hasta detectar una cantidad sustancial de compuestos en la fermentación; cosechando mediante la extracción de los componentes activos del caldo de fermentación con un solvente adecuado; concentrando el solvente que contiene los componentes deseados; sometiendo después el material concentrado a separación cromatográfica para aislar los compuestos de otros metabolitos presentes también en el medio de cultivo.

La Figura 2 muestra algunos sitios de recolección en todo el mundo para el cultivo (CNB476) que también se refiere como Salinospora. La Figura 3 muestra colonias de Salinospora. La Figura 4 muestra la típica secuencia 16S ADN<sub>r</sub> de la Salinospora. Las barras representan los nucleótidos de signatura característicos de la Salinospora que la separan de sus parientes más cercanos.

El cultivo (CNB476) se depositó en Junio 20 de 2003, con el American Type Culture Collection (ATCC) en Rockville, MD y se asignó al número de depósito de patente de ATCC PTA-5275. La cepa NPS21184, una variante natural de la cepa CNB476, se derivó de la cepa CNB476 como un aislado de colonia única. La cepa NPS21184 se ha depositado en el ATCC en Abril 27 de 2005. El depósito ATCC cumple con todos los requerimientos del tratado de Budapest. El cultivo también se mantiene en y se encuentra disponible de Nereus Pharmaceutical Culture Collection en 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121. Además del microorganismo específico descrito en la presente, debe entenderse que también pueden cultivarse mutantes, tales como los producidos mediante el

uso de mutágenos químicos o físicos incluyendo rayos X, etc., y organismos cuya formación genética se ha modificado mediante técnicas de biología molecular, para producir los compuestos de inicio de las Fórmulas II-16, II-17 y II-18.

5 Fermentación de la cepa CNB476 y la cepa NPS21184

La producción de compuestos puede lograrse a una temperatura conductiva al crecimiento satisfactorio del organismo de producción, e.g., de 16 grados C a 40 grados C, pero es preferible conducir la fermentación a 22 grados C a 10 32 grados C. El medio acuoso puede incubarse durante un período de tiempo necesario para completar la producción de los compuestos monitoreada mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC), preferentemente durante un período de aproximadamente 2 a 10 días, en un agitador giratorio 15 operando a aproximadamente 50 rpm a 400 rpm, preferentemente a 150 rpm a 250 rpm, por ejemplo. La producción de los compuestos también puede lograrse cultivando la cepa de producción en un biorreactor, tal como un sistema de fermentador que sea adecuado para el crecimiento de la cepa 20 de producción.

El crecimiento de los microorganismos puede lograrse por el de experiencia ordinaria en la técnica mediante el uso del medio apropiado. Ampliamente, las fuentes de carbono incluyen glucosa, fructosa, manosa, 25 maltosa, galactosa, manitol y glicerol, otros azúcares y alcoholes azucarados, almidones y otros carbohidratos, o derivados de carbohidratos tales como dextrano, cerelesa, así como nutrientes complejos como harina de avena, harina de maíz, mijo, maíz y lo similar. La cantidad exacta de la 30 fuente de carbono utilizada en el medio dependerá en parte, de los otros ingredientes en el medio, pero puede utilizarse satisfactoriamente, por ejemplo, una cantidad de carbohidrato

entre 0.5 a 25 por ciento por peso del medio. Estas fuentes de carbono pueden utilizarse individualmente o pueden combinarse varias fuentes de carbono en el mismo medio, por ejemplo. Ciertas fuentes de carbono se prefieren como se  
5 detalla a continuación.

Las fuentes de nitrógeno incluyen aminoácidos tales como glicina, arginina, treonina, metionina y lo similar, sal de amonio, así como fuentes complejas tales como extractos de levadura, licores de raíz de maíz, solubles de destilado,  
10 harina de soja, harina de semilla de algodón, harina de pescado, peptona y lo similar. Por ejemplo, varias fuentes de nitrógeno pueden utilizarse solas o en combinación en cantidades que varían de 0.5 a 25 por ciento por peso del medio.

Entre las sales inorgánicas nutritivas que pueden incorporarse en el medio de cultivo, se encuentran las sales  
15 usuales capaces de producir iones de sodio, potasio, magnesio, calcio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato y lo similar. También se incluyen metales de rastro tales como  
20 cobalto, manganeso, hierro, molibdeno, zinc, cadmio y lo similar.

#### Actividad Biológica y Usos de Compuestos

Algunas modalidades se refieren a métodos para el tratamiento de cáncer, inflamación, y enfermedades  
25 infecciosas, particularmente aquellas que afectan a humanos. Los métodos pueden incluir, por ejemplo, la etapa de administración de una cantidad efectiva de un miembro de una clase de nuevos compuestos. Por consiguiente, los compuestos descritos en la presente pueden utilizarse para tratar  
30 cáncer, inflamación y enfermedad infecciosa.

Los compuestos tienen varias actividades biológicas. Por ejemplo, los compuestos tienen actividad

quimiosensibilizadora, anti-microbial, antiinflamatoria, radiosensibilizadora y anti-cáncer.

Los compuestos tienen actividad inhibidora de proteasoma. La actividad inhibidora de proteasoma, completamente o en parte, puede contribuir a la capacidad de los compuestos para actuar como agentes anti-cáncer, antiinflamatorios y antimicrobianas.

El proteasoma es una proteasa de multi subunidad que degrada las proteínas intracelulares a través de sus actividades tipo quimiotripsina, tipo tripsina y de hidrolización peptidilglutamil-péptido (PGPH; y también conocida como actividad tipo caspasa). El proteasoma 26S contiene un núcleo proteolítico llamado el proteasoma 20S y una o dos subunidades reguladoras 19S. El proteasoma 20S es responsable de la actividad proteolítica contra muchos sustratos incluyendo proteínas dañadas, el factor de transcripción NF-kB y su inhibidor IκB, moléculas de señalización, supresores de tumor y reguladores del ciclo celular. Existen tres distintas actividades de proteasa dentro del proteasoma: 1) tipo quimiotripsina; 2) tipo tripsina; y 3) la actividad de hidrolización de peptidilo glutamilo péptido (PGPH).

Como un ejemplo, los compuestos de la Fórmula II-16 fueron más potentes ( $EC_{50}$  2nM) en la inhibición de la actividad tipo quimiotripsina de proteasomas musculares de conejo que Omuralide ( $EC_{50}$  52 nM) e inhibieron también la actividad tipo quimiotripsina de proteasomas derivados de eritrocito humano ( $EC_{50}$  ~250 pM). La Figura 5 muestra omuralide, que es un producto de degradación de Lactacystin, y muestra un compuesto de la Fórmula II-16. Los compuestos de la Fórmula II-16 exhibe una preferencia significativa por la inhibición de la actividad tipo quimiotripsina del

proteasoma sobre la inhibición de la actividad catalítica de quimiotripsina. Los compuestos de la Fórmula II-16 exhiben también baja actividad nM de inhibición tipo tripsina (-10 nM), pero son menos potentes en la inhibición de la actividad  
5 PGPH del proteasoma ( $EC_{50}$  -350 nM).

Estudios adicionales han caracterizado los efectos de los compuestos descritos en la presente, incluyendo los estudios de la Fórmula II-16 en la trayectoria de señalización NF-kB/IkB. El tratamiento de células HEK293  
10 (riñón embriónico humano) con factor alfa de necrosis de tumor (TNF- $\alpha$ ) induce la fosforilación y la degradación mediada por proteasoma de IkB $\alpha$  seguida por la activación de NF-kB. Para confirmar la inhibición de proteasoma, las células HEK293 se pre-trataron durante 1 hora con compuestos  
15 de la fórmula II-16 seguido por una estimulación del TNF- $\alpha$ . El tratamiento con compuestos de la Fórmula II-16 promovió la acumulación del IkB $\alpha$  fosforilado sugiriendo que se inhibió la degradación de IkB $\alpha$  mediado por proteasoma.

Además, se generó un clon de HEK293 estable (NF-kB/Luc 293) portador de un gen informante de luciferasa bajo la regulación de sitios de unión 5x NF-kB. La estimulación de las células NF-kB/Luc 293 con TNF- $\alpha$  incrementa la actividad luciferasa como resultado de la activación del NF-kB mientras que el pre-tratamiento con los compuestos de la  
25 Fórmula II-16 disminuye la actividad. Inmunoanálisis Western demostraron que los compuestos de la Fórmula II-16 promovieron la acumulación de IkB $\alpha$  fosforilado y disminuyeron la degradación del IkB $\alpha$  total en las células NF-kB/Luc 293). Los compuestos de la Fórmula II-16 también mostraron  
30 incrementar los niveles de las proteínas reguladoras del ciclo celular p21 y p27.

Las células tumorales pueden ser más sensibles a

inhibidores de proteasoma que las células normales. Además, la inhibición de proteasoma incrementa la sensibilidad de las células cancerosas a agentes anticáncer. La actividad citotóxica de los compuestos descritos en la presente, 5 incluyendo la Fórmula II-16, se examinó por la actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer. La Fórmula II-16 se examinó, por ejemplo, en la visualización del National Cancer Institute de 60 líneas celulares de tumor humano. La Fórmula II-16 exhibió una actividad citotóxica 10 selectiva con un valor  $GI_{50}$  medio (la concentración para lograr 50% de inhibición del crecimiento) menor que 10 nM. La potencia mayor se observó contra melanoma SK-MEL-28 y células de cáncer de mama MDA-MB-235 [ambos con  $LC_{50}$  (la concentración con 50% de mortalidad celular) <10 nM].

15 Un panel de líneas celulares incluyendo colorrectal humana (HT-28 y LoVo), próstata (PC3), mama (MDA-MB-231), pulmonar (NCI-H292), ovárica (OVCAR3), leucemia de célula T aguda (Jurkat), melanoma murino (B16-F10) y fibroblastos humanos normales (CCD-27 sk) se trató con Salinosporamida A 20 durante 48 horas para establecer la actividad citotóxica. Las células HT-29, LoVo, PC3, MDA-MB-231, NCI-H292, OVCAR3, Jurkat, y B16-F10 fueron sensibles con valores  $EC_{50}$  de 47, 69, 78, 67, 97, 69, 10 y 33 nM, respectivamente. En contraste, los valores  $EC_{50}$  para las células CCD-27 sk fueron de 196 nM. 25 El tratamiento de células Jurkat con Salinosporamida A en el  $EC_{50}$  aproximado dieron como resultado la activación de caspasa 3 y la separación de PARP, confirmando la inducción de apoptosis.

La actividad anti-antrax de los compuestos 30 descritos se evaluó utilizando un análisis in vitro de citotoxicidad inducida por LeTx. Como un ejemplo, los resultados indican que la Fórmula II-16 es un potente

inhibidor de citotoxicidad inducida por LetX de células murinas RAW264.7 tipo macrófago. El tratamiento de las células RAW264.7 con la Fórmula II-16 dio como resultado un incremento de 10 veces en la viabilidad de células tratadas con Letx en comparación con el tratamiento con Letx solo (promedio EC<sub>50</sub> de < 4 nM).

#### Efectos Potenciales de Quimiosensibilización de la Fórmula II-16

Estudios adicionales han caracterizado los efectos de los compuestos descritos en la presente en la trayectoria de señalización NF-kB/IkB (ver los Ejemplos). En células no estimuladas, el factor-kappa B nuclear del factor de transcripción (NF-kB) reside en el citoplasma en un complejo inactivo con la proteína inhibidora IkB (inhibidora de NF-kB). Varios estímulos pueden ocasionar la fosforilación de IkB mediante IkB cinasa, seguida por la ubiquitinación y degradación mediante el proteasoma. Después de la degradación de IkB, el NF-kB se traslada al núcleo y regula la expresión del gen, afectando muchos procesos celulares incluyendo la inhibición de apoptosis. Los agentes quimioterapéuticos tales como CPT-11 (Irinotecan) pueden activar el NF-kB en líneas celulares de cáncer de colon humano incluyendo células LoVo, dando como resultado una disminución en la capacidad de estas células a experimentar apoptosis. Painter, R. B., Cancer Res 38:4445 (1978). Velcade<sup>TM</sup> es un ácido borónico dipeptidilo que inhibe la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma (Lightcap, et al., Clin Chem 46:673 (2000), Adams et al., Cancer Res 59:2615 (1999), Adams, Curr Opin Oncol 14:628 (2002)) mientras aumenta las actividades de tripsina y PGPH. Recientemente aprobado como inhibidor de proteasoma, Velcade<sup>TM</sup>, (PS-341; Millennium Pharmaceuticals, Inc.) ha

mostrado ser directamente tóxico a las células cancerosas y también aumentar la actividad citotóxica de CPT-11 en células LoVo in vitro, y en un modelo de xenoinjerto LoVo, inhibiendo la degradación de IκB por el proteasoma. Blum et al., Ann Intern Med, 80:249 (1974). Adicionalmente, se encontró que Velcade™ inhibe la expresión del oncógeno alfa proangiogénico relacionado con el crecimiento de quimiosinas/citosinas (GRO-α) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en carcinoma de célula escamosa, presumiblemente a través de la inhibición de la trayectoria NF-κB. Dick et al., J Biol Chem 271:7273 (1996). Estos datos sugieren que la inhibición de proteasoma puede no solo disminuir la supervivencia y crecimiento de la célula de tumor, sino también la angiogénesis.

#### 15 Actividad Anti-Ántrax

Otra aplicación potencial para los inhibidores de proteasoma proviene de estudios recientes en el agente de biodefensa de categoría A, B. anthracis (ántrax). Las esporas de ántrax se inhalan y se alojan en los pulmones en donde son ingeridas por macrófagos. Dentro del macrófago, las esporas germinan, el organismo las replica, dando como resultado final la muerte de la célula. Antes de que ocurra la muerte, sin embargo, los macrófagos infectados migran a los nodos linfáticos en donde, al morir, liberan su contenido permitiendo que el organismo entre a la corriente sanguínea, se replican adicionalmente, y secretan toxinas letales. Hanna et al., Proc. Natl. Acad. Sci EUA 90:10198 (1993). Las toxinas de ántrax son responsables de los síntomas asociados con el ántrax. Dos proteínas que juegan un papel clave en la patogénesis del ántrax son los antígenos protectores (PA 83 kDa) y el factor letal (LF 90 kDa) que se conocen colectivamente como toxina letal (LeTx). LF tiene una

función enzimática, pero requiere el PA para lograr su efecto biológico. Ni PA ni LF ocasionan la muerte de manera individual; sin embargo, al combinarse ocasionan la muerte al inyectarse de manera intravenosa en animales. Kalns et al.,  
5 Biochem Biophys Res Commun 297:506 (2002), Kalns et al., Biochem Biophys Res Commun 292:41 (2002).

El antígeno protector (PA), el componente de unión de receptor de la toxina de ántrax, es responsable del transporte del factor letal en la célula huésped. el PA  
10 oligomeriza en un heptámero en forma de anillo (ver Figura 6). Cada heptámero, unido a su receptor en la superficie de una célula, tiene la capacidad para unir hasta tres moléculas de LF. El complejo formado entre el heptámero de PA y LF se introduce a la célula mediante endocitosis mediada por el  
15 receptor. Después de la endocitosis, el LF se libera en el citosol en donde ataca varios objetivos celulares. Mogridge et al., Biochemistry 41:1079 (2002), Lacy et al., J. Biol Chem 277:3006 (2002), Bradley et al., Nature 414:225 (2001).

El factor letal (LF) es una metaloproteasa  
20 dependiente del zinc, que en el citosol, puede separar e inactivar las proteínas de señalización de la familia cinasa de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPKK), Duesbery et al., Science 280:734 (1998), Bodart et al., Cell Cycle 1:10 (2002), Vitale et al., J. Appl. Microbiol 87:288 (1999),  
25 Vitale et al., Biochem J 352 Pt 3:739 (2000). De las siete diferentes MAPK cinasas conocidas, seis han mostrado separarse mediante el LF. Dentro de la célula, las trayectorias de MAPK cinasa traducen varias señales implicadas en la muerte, proliferación y diferenciación  
30 celular haciendo estas proteínas objetivos altamente significativos. Sin embargo, ciertos inhibidores que previenen la muerte celular inducida por LeTx, no previenen

124  
125

la separación de MAPKK mediante el LF, sugiriendo que esta actividad no es suficiente para la inducción de la muerte celular. Kim et al., J. Biol Chem 278:7413 (2003), Lin et al., Curr Microbiol 33:224 (1996).

5                Estudios han sugerido que la inhibición del proteasoma puede prevenir la muerte celular inducida por LeTx. Tang et al., Infect Immun 67:3055 (1999). Los datos han mostrado que la actividad de proteasoma se requiere para la muerte mediada por LeTx de células RAW264.7 tipo macrófago  
10 y que los inhibidores de proteasoma protegen a las células RAW264.7 de LeTx. La inhibición del proteasoma no bloqueó la separación MEK1, sugiriendo que la trayectoria de LeTx no se bloquea aguas arriba de la separación MEK1 en estos estudios. Adicionalmente, no existe incremento en la actividad de  
15 proteasoma en células tratadas con LeTx. Estos datos sugirieron que un inhibidor de proteasoma nuevo, potente como los compuestos descritos en la presente, también puede prevenir la muerte celular inducida por LeTx como se ilustra en la Figura 6.

20                Se ha identificado el receptor para PA y se expresa por muchos tipos celulares. Escuyer et al., Infect Immun 59:3381 (1991). La toxina letal es activa en algunas líneas de cultivo celular de macrófagos ocasionando la muerte celular en pocas horas. Hanna et al., Proc. Natl. Acad. Sci.  
25 EUA 90:10198 (1993), Kim et al., J. Biol. Chem 278:7413 (2003), Lin, et al., Curr Microbiol 33:224 (1996). LeTx puede inducir tanto necrosis como apoptosis en células RAW264.7 tipo macrófago y J774A.1 de ratón al tratamiento in vitro.

30                Los resultados indican que los compuestos descritos en la presente actúan como un potente inhibidor de la citotoxicidad inducida por LeTx de células RAW264.7 tipo

127

macrófago murinas. El tratamiento de células RAW264.7 con, por ejemplo, los compuestos de la Fórmula II-16 dio como resultado un incremento de 10 veces en la viabilidad de las células tratadas con LeTx en comparación con el tratamiento con LeTx solo (promedio  $EC_{50}$  de  $< 4$  nM) y en consecuencia proporciona una valiosa terapia para las infecciones por ántrax. La Fórmula II-16, por ejemplo, promovió la supervivencia de células RAW264.7 tipo macrófago en presencia de LeTx indicando que este compuesto y sus derivados proporcionan un terapéutico clínico valioso para la infección por ántrax.

#### Composiciones Farmacéuticas

En una modalidad, los compuestos descritos en la presente se utilizan en composiciones farmacéuticas. Los compuestos preferentemente pueden producirse mediante los métodos descritos en la presente. Los compuestos pueden utilizarse, por ejemplo, en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable preparado para almacenamiento y administración subsecuente. También, las modalidades se refieren a una cantidad farmacéuticamente efectiva de los productos y compuestos antes descritos en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A. R. Gennaro edit., 1985), que se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad. Pueden proporcionarse preservativos, estabilizadores, colorantes e incluso agentes saborizantes en la composición farmacéutica. Por ejemplo, pueden agregarse como preservativos benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, pueden utilizarse

antioxidantes y agentes de suspensión.

Las composiciones, particularmente las de las Fórmulas I-VI, pueden formularse y utilizarse como tabletas, cápsulas o elíxires para administración oral; supositorios  
5 para administración rectal; soluciones estériles, suspensiones para administración inyectable; parches para administración transdérmica y depósitos sub-dérmicos y lo similar. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones  
10 líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido previo a la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, cisteína hidrocloreto y lo similar. Además, si se  
15 desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes amortiguadores de pH y lo similar. Si se desea, pueden utilizarse preparaciones de mejoramiento de absorción (por  
20 ejemplo, liposomas).

Las formulaciones farmacéuticas para administración farmacéutica incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como  
25 suspensiones oleaginosas para inyección apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos apropiados incluyen aceites grasos tales como aceite de ajonjolí, u otros aceites orgánicos tales como aceites de soja, uva o almendra o ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como etil oleato o  
30 triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como sodio carboximetil

129

127  
128

celulosa, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la solución puede contener también estabilizadores o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

5 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, opcionalmente pulverizando una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar los auxiliares adecuados, si se desea, para obtener  
10 tabletas o núcleos de pastillas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sucrosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata,  
15 gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes de desintegración, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del  
20 mismo tal como alginato de sodio. Los núcleos de pastillas se proveen con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden utilizarse soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente, pueden contener goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol,  
25 polietileno glicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laqueado y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Pueden agregarse a las tabletas o recubrimientos de pastillas colorantes o pigmentos para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis del  
30 compuesto activo. Para este propósito, pueden utilizarse soluciones de azúcar concentradas que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel

130

carbopol, polietileno glicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laqueado y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Pueden agregarse a las tabletas o recubrimientos de pastillas colorantes o pigmentos para su  
5 identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo. Tales formulaciones pueden elaborarse utilizando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Patentes de E.U. Nos. 5,733,888 (composiciones inyectables), 5,726,181 (compuestos de baja solubilidad en  
10 agua); 5,707,641 (proteínas o péptidos terapéuticamente activos); 5,667,809 (agentes lipofílicos); 5,576,012 (agentes poliméricos de solubilidad); 5,707,615 (formulaciones anti-virales); 5,683,676 (medicamentos en partículas); 5,654,286 (formulaciones tópicas); 5,688,529 (suspensiones orales);  
15 5,445,829 (formulaciones de liberación extendida); 5,653,987 (formulaciones líquidas); 5,641,515 (formulaciones de liberación controlada) y 5,601,845 (formulaciones esferoides); todas las cuales se incorporan en la presente por la referencia en su totalidad.

20 Se describen adicionalmente en la presente varias composiciones farmacéuticas muy conocidas en la técnica farmacéutica, para usos que incluyen suministro tópico, intraocular, intranasal, e intraauricular. Las formulaciones farmacéuticas incluyen soluciones acuosas oftálmicas de los  
25 compuestos activos en forma soluble en agua, tales como gotas oftálmicas, o en goma gelan (Shedden et al., Clin Ther 23(3):440-50 (2001)) o hidrogeles (Mayer et al., Ophthalmologica, 210(2):101-3 (1996)); ungüentos oftálmicos; suspensiones oftálmicas tales como microparticulados,  
30 pequeñas partículas poliméricas que contienen la droga suspendidas en un medio de vehículo líquido (Joshi, A. 1994 J Ocul Pharmacol 10:29-45), formulaciones solubles en lípidos

(Alm et al., Prog Clin Biol Res, 312:447-58 (1989)), y microesferas (Mordenti, Toxicol Sci, 52(1):101-6 (1999)); e insertos oculares. Todas las referencias antes mencionadas se incorporan en la presente por la referencia en su  
5 totalidad. Tales formulaciones farmacéuticas adecuadas se formulan frecuente y preferentemente para ser estériles, isotónicas y amortiguadas para estabilidad y comodidad. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también gotas y rocíos frecuentemente preparados para estimular en muchos  
10 aspectos las secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de la acción ciliar normal. Como se describen en Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing, 18ª Edición), que se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad, y muy conocidas por los expertos  
15 en la técnica, las formulaciones adecuadas se preparan más frecuente y preferentemente isotónicas, ligeramente amortiguadas para mantener un pH de 5.5 a 6.5, y más frecuente y preferentemente incluyen preservativos antimicrobianos y estabilizadores de droga apropiados. Las  
20 formulaciones farmacéuticas para suministro intraauricular incluyen suspensiones y ungüentos para aplicación tópica en el oído. Los solventes comunes para tales formulaciones óticas incluyen glicerina y agua.

Al utilizarse como compuesto anti-cáncer,  
25 antiinflamatorio o antimicrobial, por ejemplo, los compuestos de las Fórmulas I-VI o las composiciones que incluyen las Fórmulas I-VI, pueden administrarse mediante vías ya sea orales o no orales. Al administrarse oralmente, pueden administrarse en forma de cápsula, tableta, gránulos, rocío,  
30 jarabe, u otra forma tal. Al administrarse no oralmente, pueden administrarse como una suspensión acuosa, una preparación oleaginosa o lo similar o como gotas,

supositorios, salve, ungüento o lo similar, al administrarse a través de inyección, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o lo similar.

En una modalidad, el anti-cáncer, antiinflamatorio  
5 o antimicrobial puede mezclarse con sustancias adicionales para mejorar su efectividad. En una modalidad, el antimicrobial se combina con un antimicrobial adicional. En otra modalidad, el antimicrobial se combina con una droga o medicamento que ayuda a un paciente que toma antimicrobianas.

10 Métodos de Administración

En una modalidad alternativa, los compuestos químicos descritos y las composiciones farmacéuticas descritas se administran mediante un método particular como un antimicrobial. Tales métodos incluyen, entre otros, (a)  
15 administración a través de vías orales, cuya administración incluye la administración en cápsula, tableta, gránulos, rocío, jarabe u otras de tales formas; (b) administración a través de vías no orales, cuya administración incluye la administración como una suspensión acuosa, una preparación  
20 oleaginosa o lo similar, o como gotas, supositorios, salve, ungüentos o lo similar; administración a través de inyección, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o lo similar; así como (c) administración de manera tópica, (d) administración de manera  
25 rectal, o (e) administración de manera vaginal, como se considere apropiado por los expertos en la técnica para poner en contacto el compuesto de la presente modalidad con el tejido vivo; y (f) administración a través de formulaciones de liberación controlada, formulaciones en depósito, y  
30 suministro por bomba de infusión. Como ejemplos adicionales de tales modos de administración y como una descripción adicional de los modos de administración, se describen en la

131  
132

presente varios métodos para la administración de los compuestos químicos y composiciones farmacéuticas descritos, incluyendo modos de administración a través de vías intraoculares, intranasales e intraauriculares.

5                   La cantidad farmacéuticamente efectiva de las composiciones que incluyen los compuestos descritos, incluyendo los de las Fórmulas I-VI, requerida como una dosis, dependerá de la vía de administración, el tipo de animal, incluyendo humano, que se trata, y las  
10 características físicas del animal específico bajo consideración. La dosis puede diseñarse para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como el peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica médica.

15                   Al practicar los métodos de la modalidad, los productos o composiciones pueden utilizarse solos o en combinación entre sí, o en combinación con otros agentes terapéuticos o diagnósticos. Estos productos pueden utilizarse in vivo, ordinariamente en un mamífero,  
20 preferentemente en un humano, o in vitro. Al emplearlos in vivo, los productos o composiciones pueden administrarse al mamífero en una variedad de formas, incluyendo de manera parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, colónica, rectal, vaginal, nasal o intraperitoneal, empleando una  
25 variedad de formas de dosis. Tales métodos también pueden aplicarse a la prueba de la actividad química in vivo.

                  Como será fácilmente aparente para el experto en la técnica, la dosis útil in vivo que va a administrarse y el modo particular de administración variarán dependiendo de la  
30 edad, peso y la especie de mamífero tratada, los compuestos particulares empleados, y el uso específico para el cual se emplean estos compuestos. La determinación de los niveles de

134

dosis efectivos, es decir, los niveles de dosis necesarios para lograr el resultado deseado, puede lograrse por el experto en la técnica utilizando métodos farmacológicos de rutina. Típicamente, las aplicaciones clínicas a humanos de  
5 los productos se inician en niveles de dosis menores, incrementando el nivel de dosis hasta lograr el efecto deseado. Alternativamente, pueden utilizarse estudios in vitro aceptables para establecer las dosis útiles y las vías de administración de las composiciones identificadas por los  
10 presentes métodos utilizando métodos farmacológicos establecidos.

En estudios en animales no humanos, las aplicaciones de los productos potenciales se inician a niveles de dosis mayores, disminuyendo la dosis hasta que el  
15 efecto deseado ya no se logra o hasta que desaparecen los efectos secundarios adversos. La dosis puede variar ampliamente, dependiendo de los efectos deseados y de la indicación terapéutica. Típicamente, las dosis pueden encontrarse entre aproximadamente 10 microgramos/kg y 100  
20 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 100 microgramos/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Alternativamente, las dosis pueden basarse y calcularse en el área de superficie del paciente, como lo entiende el experto en la técnica. La administración es preferentemente oral en  
25 una base diaria o dos veces al día.

La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden seleccionarse por el médico en vista de la condición del paciente. Ver, por ejemplo, . Fingl et al., en The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975, que se  
30 incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad. Debe notarse que el médico que atiende sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración

debido a la toxicidad, o a las disfunciones del órgano. Por el contrario, el médico que atiende también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (propenso a toxicidad). La magnitud de una  
5 dosis administrada en el manejo del trastorno de interés variará con la severidad de la condición que va a tratarse y con la vía de administración. La severidad de la condición, por ejemplo, puede evaluarse en parte por métodos estándar de evaluación pronóstico. Además, la dosis y tal vez la  
10 frecuencia de la dosis, variarán también de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. Un programa comparable con el tratado anteriormente puede utilizarse en medicina veterinaria.

Dependiendo de las condiciones específicas que se  
15 tratan, tales agentes pueden formularse y administrarse sistémicamente o localmente. Una variedad de técnicas para formulación y administración puede encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing, Co., Easton, PA (1990), que se incorpora en la presente mediante  
20 la referencia en su totalidad. Las vías de administración adecuadas pueden incluir administración oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa o intestinal; suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones  
25 intratecales, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Para inyección, los agentes de la modalidad pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como  
30 solución de Hank, solución de Ringer, o amortiguador de salina fisiológica. Para tal administración transmucosa, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para

134  
135

permea la barrera. Tales penetrantes se conocen en la técnica en general. El uso de vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos descritos en la presente descritos para la práctica de la modalidad, en dosis  
5 adecuadas para la administración sistémica, se encuentra dentro del alcance de la modalidad. Con la selección apropiada del vehículo y una práctica de elaboración adecuada, los componentes descritos en la presente, en particular los formulados como soluciones, pueden  
10 administrarse parenteralmente, tal como mediante inyección intravenosa. Los compuestos pueden formularse fácilmente utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica en dosis adecuadas para administración oral. Tales vehículos permiten formular los  
15 compuestos de la presente invención como tabletas, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas, suspensiones y lo similar, para ingestión oral por un paciente tratado.

Los agentes para administración de manera intracelular pueden administrarse utilizando técnicas muy  
20 conocidas por los de experiencia ordinaria en la técnica. por ejemplo, tales agentes pueden encapsularse en liposomas, después administrarse como se describió anteriormente. todas las moléculas presentes en una solución acuosa al momento de la formación de liposomas se incorporan en el interior  
25 acuoso. El contenido de liposomas se encuentra tanto protegido desde el micro-entorno externo como, debido a que los liposomas se fusionan con membranas celulares, se suministran eficientemente en el citoplasma celular. Adicionalmente, debido a su hidrofobicidad, pueden  
30 administrarse de manera intracelular directamente pequeñas moléculas orgánicas.

La determinación de las cantidades efectivas se

137

135  
136

encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener

5 vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden encontrarse en

10 forma de tabletas, pastillas, cápsulas o soluciones. Las composiciones farmacéuticas pueden manufacturarse de una manera en sí conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado convencional, disolución, granulado, formación de pastillas, levigación, emulsificación, encapsulado,

15 atrapamiento, o liofilización.

Los compuestos descritos en la presente pueden evaluarse por la eficacia y la toxicidad utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular, o de un sub-conjunto de los compuestos que

20 comparten ciertos residuos químicos, puede establecerse determinando la toxicidad in vitro hacia una línea celular, tal como la línea celular de mamífero y preferentemente humano. Los resultados de tales estudios son frecuentemente predictivos de toxicidad en animales, tales como mamíferos, o

25 más específicamente humanos. Alternativamente, la toxicidad de compuestos particulares en un modelo animal, tal como ratones, ratas, conejos, perros o monos, puede determinarse utilizando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede establecerse utilizando varios métodos

30 reconocidos en la técnica, tales como métodos in vitro, en modelos animales, o pruebas clínicas en humanos. Los modelos in vitro reconocidos en la técnica existen para casi toda

138

clase de condición, incluyendo las condiciones abatidas por los compuestos descritos en la presente, incluyendo cáncer, enfermedad cardiovascular, y varias disfunciones inmunes y enfermedades infecciosas. De manera similar, pueden  
5 utilizarse modelos animales aceptables para establecer la eficacia de químicos para tratar tales condiciones. Al seleccionar un modelo para determinar la eficacia, el técnico experto puede guiarse por el estado de la técnica para seleccionar un modelo apropiado, dosis y vía de  
10 administración, y régimen. Por supuesto, las pruebas clínicas en humanos también pueden utilizarse para determinar la eficacia de un compuesto en humanos.

Al utilizarse como agente antimicrobial, anti-cáncer, o antiinflamatorio, los compuestos descritos en la  
15 presente pueden administrarse ya sea por vías orales o no orales. Al administrarse oralmente, pueden administrarse en forma de cápsula, tableta, gránulos, rocío, jarabe, u otra forma tal. Al administrarse no oralmente, pueden administrarse como una suspensión acuosa, una preparación  
20 oleaginosa o lo similar o como gotas, supositorios, salve, ungüento o lo similar, al administrarse a través de inyección, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o lo similar. De manera similar, se contemplan formulaciones de liberación  
25 controlada, formulaciones de depósito y suministro por bomba de infusión.

Las composiciones descritas en la presente en composiciones farmacéuticas pueden comprender también un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones  
30 pueden prepararse para almacenamiento y para administración subsecuente. Los vehículos o diluyentes aceptable para uso terapéutico son muy 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, tales composiciones pueden formularse y utilizarse como tabletas, cápsulas o soluciones para 5 administración oral; supositorios para administración rectal o vaginal; soluciones estériles o suspensiones para administración inyectable. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución 10 o suspensión en líquido previo a la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, cisteína hidrocloreto y lo similar. Además, si se desea, las composiciones 15 farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes amortiguadores de pH y lo similar. Si se desea, pueden utilizarse preparaciones de mejoramiento de absorción (por ejemplo, liposomas).

20 La cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición requerida como dosis, dependerá de la vía de administración, el tipo de animal que se trata, y las características físicas del animal específico bajo consideración. La dosis puede diseñarse para lograr un 25 efecto deseado, pero dependerá de factores tales como el peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica médica.

Los productos o composiciones de la modalidad, como se describió anteriormente, pueden utilizarse solos o en 30 combinación entre sí, o en combinación con otros agentes terapéuticos o diagnósticos. Estos productos pueden utilizarse in vivo o in vitro. Las dosis útiles y los modos

de administración más útiles variarán dependiendo de la edad, peso y animal tratado, los compuestos particulares empleados, y del uso específico para el cual se emplea esta composición o composiciones. La magnitud de una dosis en el manejo o tratamiento de un trastorno en particular, variará con la severidad de la condición que va a tratarse y con la vía de administración, y dependiendo de las condiciones de la enfermedad y de su severidad, las composiciones pueden formularse y administrarse ya sea sistémica o localmente.

5

10 Puede encontrarse una variedad de técnicas para formulación y administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

Para formular los compuestos de las Fórmulas I-VI como un agente antimicrobial, anti-cáncer o antiinflamatorio,

15 pueden utilizarse agentes activos de superficie conocidos, excipientes, agentes suavizantes, agentes de suspensión y sustancias formadoras de película farmacéuticamente aceptables y asistentes de revestimiento, y lo similar. Preferentemente, pueden utilizarse alcoholes, ésteres,

20 alcoholes alifáticos sulfatados y lo similar, como agentes activos de superficie; sucrosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidroso ligero, aluminato de magnesio, aluminato de magnesio metasilicato, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio,

25 carbonato de ácido de sodio, fosfato de calcio hidrógeno, carboximetil celulosa de calcio y lo similar, como excipientes, pueden utilizarse como agentes suavizantes estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y lo similar; pueden utilizarse como agentes de suspensión o lubricantes

30 aceite de coco, aceite de olivo, aceite de ajonjolí, aceite de maní, aceite de soja; ftalato de celulosa acetato como un derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar, o

copolímero de metacetato-metacrilato como derivado de polivinilo pueden utilizarse como agentes de suspensión; y plastificadores tales como éster ftalatos y lo similar pueden utilizarse como agentes de suspensión. Además de los

5 anteriores ingredientes preferidos, pueden agregarse edulcorantes, fragancias, colorantes, preservativos y lo similar a la formulación administrada del compuesto producido mediante el método de la modalidad, particularmente cuando el compuesto va a administrarse de manera oral.

10 Los compuestos y composiciones pueden administrarse oralmente o no oralmente a un paciente humano en la cantidad de aproximadamente 0.001 mg/kg/día a aproximadamente 10,000 mg/kg/día del ingrediente activo, y más preferentemente de aproximadamente 0.1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día

15 del ingrediente activo, preferentemente, una vez al día o, menos preferentemente, de aproximadamente dos a aproximadamente diez veces al día. Alternativamente y también preferentemente, el compuesto producido mediante el método de la modalidad, puede administrarse preferentemente

20 en las cantidades establecidas continuamente, por ejemplo mediante goteo intravenoso. Por consiguiente, para el ejemplo de un paciente que pesa 70 kilogramos, la dosis diaria preferida del ingrediente activo o anti-infeccioso será de aproximadamente 0.07 mg/día a aproximadamente 700

25 gm/día, y más preferentemente, de 7 mg/día a aproximadamente 7 gramos/día. No obstante, como lo entenderán los expertos en la técnica, en ciertas situaciones puede ser necesario administrar el compuesto anti-cáncer, antiinflamatorio o anti-infeccioso de la modalidad, en cantidades que exceden, o

30 incluso exceden por mucho, el rango de dosis preferido antes establecido, para tratar efectiva y agresivamente cánceres i infecciones particularmente avanzadas.

En el caso de utilizar el antimicrobial producido mediante los métodos de la modalidad como un reactivo de prueba bioquímica, el compuesto producido mediante los métodos de la modalidad, inhibe el progreso de la enfermedad cuando se disuelve en un solvente orgánico o un solvente orgánico hidroso y se aplica directamente a cualquiera de varios sistemas celulares cultivados. Los solventes orgánicos útiles incluyen, por ejemplo, metanol, metilsulfóxido y lo similar. La formulación, por ejemplo, puede ser un polvo, gránulos u otro inhibidor sólido, o un inhibidor líquido preparado utilizando un solvente orgánico o un solvente orgánico hidroso. Aunque la concentración preferida del compuesto producido mediante el método de la modalidad para su uso como compuesto antimicrobial, anti-cáncer o anti-tumor, se encuentra generalmente en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ug/ml, la cantidad útil más apropiada varía dependiendo del tipo de sistema celular cultivado y del propósito de uso, como lo apreciarán las personas de experiencia ordinaria en la técnica. también, en ciertas aplicaciones, puede ser necesario o preferido que las personas de experiencia ordinaria en la técnica utilicen una cantidad fuera del rango anterior.

En una modalidad, el método de utilizar un compuesto como un antimicrobial, anti-cáncer o antiinflamatorio implica la administración de una cantidad efectiva de cualquiera de los compuestos de las Fórmulas I-VI o composiciones de esos compuestos. En una modalidad preferida, el método implica la administración del compuesto representado por la Fórmula II, a un paciente que necesita un antimicrobial, hasta reducir efectivamente la necesidad o más preferentemente eliminarla.

Como lo entenderá el experto en la técnica,

"necesidad" no es un término absoluto e implica meramente que el paciente puede beneficiarse del tratamiento del antimicrobial, el anti-cáncer o antiinflamatorio en uso. Por "paciente" lo que se entiende es un organismo que puede

5 beneficiarse por el uso de un agente antimicrobial, anti-cáncer o antiinflamatorio. Por ejemplo, un organismo con B. anthracis, Plasmodium, Leishmania, Trypanosoma y lo similar, puede beneficiarse de la aplicación de un antimicrobial que puede a su vez, reducir la cantidad de microbios presentes en

10 el paciente. Como otro ejemplo, un organismo con cáncer, tal como un carcinoma colorrectal, un carcinoma de próstata, un adenocarcinoma de mama, un carcinoma pulmonar no de célula pequeña, un carcinoma ovárico, mielomas múltiples, un melanoma y lo similar, puede beneficiarse de la aplicación de

15 un agente anti-cáncer que puede a su vez, reducir la cantidad de cáncer presente en el paciente. Además, un organismo con condiciones inflamatorias tales como artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, psoriasis, choque, daño por reperusión, infarto al miocardio y lo similar, puede

20 beneficiarse de la aplicación de un antiinflamatorio que puede a su vez, reducir la cantidad de células asociadas con la respuesta inflamatoria presente en el paciente. En una modalidad, la salud del paciente puede no requerir la administración de un antimicrobial, anti-cáncer o

25 antiinflamatorio, sin embargo, el paciente puede obtener aún algún beneficio por la reducción del nivel de microbios, células cancerosas o células inflamatorias presentes en el paciente, y por tanto necesitarlo. En una modalidad, el agente antimicrobial o anti-cáncer es efectivo contra un tipo

30 de microbio o cáncer, pero no contra otros tipos; permitiendo así un mayor grado de selectividad en el tratamiento del paciente. En otras modalidades, el antiinflamatorio puede

ser efectivo contra condiciones inflamatorias caracterizadas por diferentes células asociadas con la inflamación. Al seleccionar tal agente antimicrobial, anti-cáncer o antiinflamatorio, los métodos y resultados descritos en los

5 Ejemplos pueden ser útiles. En una modalidad alternativa, el antimicrobial puede ser efectivo contra un amplio espectro de microbios, preferentemente un amplio espectro de bacterias externas y, más preferentemente, dañinas al organismo huésped. En modalidades, el agente anti-cáncer y/o

10 antiinflamatorio puede ser efectivo contra un amplio espectro de cánceres y condiciones/células/sustancias inflamatorias. Aún en otra modalidad, el antimicrobial es efectivo contra todos los microbios, incluso aquellos naturales al huésped. ejemplos de microbios que pueden ser objetivos de

15 antimicrobianas incluyen, pero no se limitan a, B. anthracis, Plasmodium, Leishmania, Trypanosoma y lo similar. Aún en modalidades adicionales, el agente anti-cáncer es efectivo contra un amplio espectro de cánceres o todos los cánceres. Ejemplos de cánceres, contra los cuales pueden ser efectivos

20 los compuestos, incluyen un carcinoma colorrectal, un carcinoma de próstata, un adenocarcinoma de mama, un carcinoma pulmonar de célula no pequeña, un carcinoma ovárico, mielomas múltiples, un melanoma y lo similar. Las condiciones inflamatorias ejemplares contras las cuales son

25 efectivos los agentes incluyen artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, psoriasis, choque, infarto al miocardio, y lo similar.

"Cantidad terapéuticamente efectiva", "cantidad farmacéuticamente efectiva" o un término similar, significa

30 esa cantidad de droga o agente farmacéutico que dará como resultado una respuesta biológica o médica de una célula, tejido, sistema, animal o humano que se busca. En una

modalidad preferida, la respuesta médica es una búsqueda por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico.

"Antimicrobial" se refiere a un compuesto que  
5 reduce la probabilidad de supervivencia de microbios, o  
bloquea o alivia los efectos dañinos de un microbio. En una  
modalidad, la probabilidad de supervivencia se determina como  
una función de un microbio individual; por consiguiente, el  
antimicrobial incrementará la oportunidad de que un microbio  
10 individual muera. En una modalidad, la probabilidad de  
supervivencia se determina como una función de una población  
de microbios; por consiguiente, el antimicrobial incrementará  
la oportunidad de que exista una disminución en la población  
de microbios. En una modalidad, antimicrobial significa  
15 antibiótico u otro término similar. Tales antimicrobianas  
son capaces de bloquear los efectos dañinos, de destruir o  
suprimir el crecimiento o reproducción de microorganismos  
tales como bacterias. Por ejemplo, tales antimicrobianas y  
otros antimicrobianas se describen en Antibiotics,  
20 Chemotherapeutics and Antibacterial Agents for Disease  
Control (M. Grayson, editor, 1982), y E. Gale et al., The  
Molecular Basis of Antibiotic Action 2ª edición (1981). En  
otra modalidad, un antimicrobial no cambiará la probabilidad  
de supervivencia, pero cambiará las oportunidades de que los  
25 microbios sean dañinos al huésped de alguna forma. Por  
ejemplo, si el microbio secreta una sustancia dañina al  
huésped, el antimicrobial puede actuar sobre el microbio para  
detener la secreción o puede contra actuar o bloquear el  
efecto dañino. En una modalidad, un antimicrobial, mientras  
30 que incrementa la probabilidad de que muera(n) el(los)  
microbio(s), es mínimamente dañino a las células  
circundantes, no microbianas. En una modalidad alternativa,

no es importante cuán dañino sea el antimicrobial a las células circundantes no microbianas, mientras que reduzca la probabilidad de supervivencia del microbio.

"Agente anti-cáncer" se refiere a un compuesto o  
5 composición que incluye el compuesto, que reduce la probabilidad de supervivencia de una célula cancerosa. En una modalidad, la probabilidad de supervivencia se determina como una función de una célula cancerosa individual; por tanto el agente anti-cáncer incrementará la oportunidad de  
10 que muera la célula cancerosa individual. En una modalidad, la probabilidad de supervivencia se determina como una función de una población de células cancerosas; por tanto el agente anti-cáncer incrementará las oportunidades de que exista una disminución en la población de células cancerosas.  
15 En una modalidad, agente anti-cáncer significa un agente quimioterapéutico u otro término similar.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, tal como cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos  
20 incluyen agentes alquilantes, tales como mostaza de nitrógeno, una etilenoimina y una metilmelamina, un alquil sulfonato, una nitrosourea, y un triazeno, antagonistas de ácido fólico, antimetabolitos del metabolismo del ácido nucleico, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-  
25 fluoroacilo, cisplatina, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazolo, corticoesteroides, un producto natural tal como vinca alcaloide, una epipodofilotoxina, un antibiótico, una enzima, un taxano, y un modificador de la respuesta inmune o anticuerpos para  
30 modificadores de la respuesta inmune u otros agentes; agentes misceláneos tales como un complejo de coordinación de platino, una antracenodiona, una antraciclina, una urea

sustituida, un derivado de metil hidrazina, o un supresor adenocirtical; o una hormona o un antagonista tal como un adrenocorticoesteroide, una progestina, un estrógeno, un antiestrógeno, un andrógeno, un antiandrógeno, o un análogo  
5 de hormona de liberación de gonadotropina. Ejemplos específicos incluyen, adriamicina, doxorrubicina, 5-fluoroacilo, citosina arabinosida ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfan, citoxina, taxol, toxotere, metotrexato, cisplatina, melfalan, vinblastina, bleomicina, etoposida,  
10 ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorreblina, carboplatina, teniposida, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas, melfalan, y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes  
15 hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como tamoxifén y onapristona.

El agente anti-cáncer puede actuar directamente sobre una célula cancerosa para matar la célula, inducir la muerte de la célula, para prevenir la división de la célula  
20 y lo similar. Alternativamente, el agente anti-cáncer puede actuar indirectamente sobre la célula cancerosa, por ejemplo, limitando el nutriente o suministro de sangre a la célula. Tales agentes anti-cáncer son capaces de destruir o suprimir el crecimiento o reproducción de las células cancerosas,  
25 tales como un carcinoma colorrectal, un carcinoma prostático, un adenocarcinoma de mama, un carcinoma pulmonar de célula no pequeña, un carcinoma ovárico, mielomas múltiples, un melanoma y lo similar.

Una "enfermedad neoplásica" o un "neoplasma" se  
30 refiere a una célula o población de células, que incluyen un tumor o tejido (incluyendo suspensiones celulares tales como médula espinal y fluidos tales como sangre o suero), que

exhibe un crecimiento anormal mediante una proliferación celular mayor que el tejido normal. Los neoplasmas pueden ser benignos o malignos.

Una "condición inflamatoria" incluye, por ejemplo, condiciones tales como isquemia, choque séptico, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, asma, osteoartritis, osteoporosis, enfermedades fibróticas, dermatosis, incluyendo psoriasis, dermatitis atópica, y daño a la piel inducido por radiación ultravioleta (UV), artritis psoriática, espondilitis alquilosante, rechazo de tejido u órgano, enfermedad de Alzheimer, choque, arteriosclerosis, restenosis, diabetes, glomerulonefritis, cáncer, enfermedad de Hodgkins, cachexia, inflamación asociada con infección y ciertas infecciones virales incluyendo, síndrome de deficiencia inmune adquirida (SIDA), síndrome de trastorno respiratorio adulto y ataxia telangiectasia.

En una modalidad, un compuesto descrito, preferentemente un compuesto que tiene las Fórmulas I-VI, incluyendo los descritos en la presente, se considera un antimicrobial, anti-cáncer o antiinflamatorio efectivo si el compuesto puede influir en el 10% de los microbios, células cancerosas, o células inflamatorias, por ejemplo. En una modalidad más preferida, el compuesto es efectivo si puede influir en un 10 a 50% de los microbios, células cancerosas o células inflamatorias. En una modalidad aún más preferida, el compuesto es efectivo si puede influir en un 50.80% de los microbios, células cancerosas o células inflamatorias. En una modalidad aún más preferida, el compuesto es efectivo si puede influir en un 80-95% de los microbios, células cancerosas o células inflamatorias. En una modalidad aún más

preferida, el compuesto es efectivo si puede influir en un 95-99% de los microbios, células cancerosas o células inflamatorias. "Influencia" se define por el mecanismo de acción de cada compuesto. Por consiguiente, por ejemplo, si un compuesto previene la reproducción de microbios, entonces la influencia es una medición de prevención de la reproducción. De manera similar, si un compuesto destruye los microbios, entonces la influencia es una medición de muerte microbiana. También, por ejemplo, si un compuesto previene la división de las células cancerosas, entonces la influencia es una medición de prevención de la división de células cancerosas. Además, por ejemplo, si un compuesto previene la proliferación de las células inflamatorias, entonces la influencia es una medición de prevención de la proliferación de células inflamatorias. No todos los mecanismos de acción se encuentran necesariamente en el mismo porcentaje de efectividad. En una modalidad alternativa, puede ser deseable un bajo porcentaje de efectividad si el grado más bajo de efectividad se desplaza por otros factores, tales como, por ejemplo, la especificidad del compuesto. Por consiguiente, un compuesto que es solo 10% efectivo, por ejemplo, pero tiene un despliegue bajo en forma de efectos secundarios dañinos al huésped, o a microbios o células no dañinos, puede aún considerarse efectivo.

En una modalidad, los compuestos descritos en la presente se administran simplemente para retirar microbios, células cancerosas o células inflamatorias, y no es necesario administrarlos a un paciente. Por ejemplo, en situaciones en las que los microbios pueden presentar un problema, tal como en productos alimenticios, los compuestos descritos en la presente pueden administrarse directamente a los productos para reducir el riesgo de microbios en los productos.

Alternativamente, los compuestos pueden utilizarse para reducir el nivel de microbios presente en el ambiente circundante, tal como las superficies de trabajo. Como otro ejemplo, los compuestos pueden administrarse ex vivo a una muestra celular, tal como un transplante de médula espinal o célula progenitora para asegurar que solo se introduzcan células no cancerosas en el receptor. Después de administrar los compuestos pueden removerse opcionalmente. Esto puede ser particularmente deseable en situaciones en las cuales las superficies de trabajo o productos alimenticios pueden entrar en contacto con otras superficies u organismos que podrían arriesgarse a ser dañados por los compuestos. En una modalidad alternativa, los compuestos pueden dejarse en los productos alimenticios o sobre las superficies de trabajo para permitir una mayor protección. Si esto es una opción o no, dependerá de las necesidades relativas de la situación y de los riesgos asociados con el compuesto, lo que en parte puede determinarse como se describe en los Ejemplos siguientes.

Los siguientes ejemplos no limitantes pretenden describir las modalidades preferidas de los métodos. Las variaciones en los detalles de los métodos particulares empleados y en las composiciones químicas precisas obtenidas, serán apreciadas indudablemente por los expertos en la técnica.

#### Ejemplos

##### EJEMPLO 1

FERMENTACIÓN DEL COMPUESTO DE LAS FÓRMULAS I-7, II-16, II-17, II-20, II-24C, II-26 y II-28 UTILIZANDO LA CEPA CNB476

La cepa CNB476 se cultivó en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml de medio vegetativo consistiendo de lo siguiente por litro de agua desionizada: glucosa, 4 g; Bacto

tryptona, 3 g; Bacto casitona, 5 g; y sal de mar sintética (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30 g. El primer cultivo semilla se incubó a 28 grados C durante 3 días en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Cinco ml de cada primer  
5 cultivo semilla se inocularon en tres matraces de 500 ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo. Los segundos cultivos semilla se incubaron a 28 grados C y a 250 rpm en un agitador giratorio durante 2 días. Cinco ml de cada uno de los segundos cultivos semilla se inocularon en treinta y  
10 cinco matraces de 500 ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo. Los terceros cultivos semilla se incubaron a 28 grados C y a 250 rpm en un agitador giratorio durante 2 días. Cinco ml de cada uno de los terceros cultivos semilla se inocularon en cuatrocientos matraces de 500 ml conteniendo  
15 100 ml del Medio de Producción A consistiendo de lo siguiente por litro de agua desionizada: almidón, 10 g; extracto de levadura, 4 g; Hy-Soy, 4 g; sulfato férrico, 40 mg; bromuro de potasio, 100 mg; carbonato de calcio, 1 g; y sal de mar sintética (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30 g. Los  
20 cultivos de producción se incubaron a 28 grados C y a 250 rpm en agitadores giratorios durante 1 día. Se agregaron aproximadamente de 2 a 3 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril a los cultivos de producción. Los cultivos de producción se incubaron adicionalmente a 28 grados C y a 250  
25 rpm en agitadores giratorios durante 5 días y se logró una titulación del Compuesto II-16 de aproximadamente 200 mg/l. el caldo de cultivo se filtró a través de tela filtro para recuperar la resina Amberlite XAD-7. La resina se extrajo con 2 veces 6 litros de etil acetato seguido por 1 vez 1.5  
30 litros de etil acetato. Los extractos combinados se secaron in vacuo. El extracto seco, conteniendo 3.8 gramos del compuesto de la Fórmula II-16 y cantidades menores de los

compuestos de las Fórmulas II-20 y II-24C, se procesó entonces para la recuperación de los compuestos de las Fórmulas I-7, II-16, II-20, II-24C, II-26 y II-28.

#### EJEMPLO 2

5 FERMENTACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LAS FÓRMULAS I-7, II-16, II-17, II-20, II-24C, II-26 y II-28 UTILIZANDO LA CEPA NPS21184

La cepa NPS21184 se cultivó en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml de medio vegetativo consistiendo de lo  
10 siguiente por litro de agua desionizada: glucosa, 8 g; extracto de levadura, 6 g; Hy-Soy, 6 g; y sal de mar sintética (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30 g. El primer cultivo semilla se incubó a 28 grados C durante 3 días en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Cinco ml de cada  
15 primer cultivo semilla se inocularon en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo. Los segundos cultivos semilla se incubaron a 28 grados C y a 250 rpm en un agitador giratorio durante 2 días. Cinco ml de cada uno de los segundos cultivos semilla se inocularon en un matraz de  
20 500 ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo. Los terceros cultivos semilla se incubaron a 28 grados C y a 250 rpm en un agitador giratorio durante 2 días. Cinco ml de cada uno de los terceros cultivos semilla se inocularon en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml del Medio de Producción B  
25 consistiendo de lo siguiente por litro de agua desionizada: extracto de levadura, 20 g; Hy-Soy, 8 g; sulfato férrico, 40 mg; bromuro de potasio, 100 mg; carbonato de calcio, 1 g; y sal de mar sintética (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30 g. Los cultivos de producción se incubaron a 28 grados C y a 250  
30 rpm en agitadores giratorios durante 1 día. Se agregaron aproximadamente de 2 a 3 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril al cultivo de producción. El cultivo de producción

5

se incubó adicionalmente a 28 grados C y a 250 rpm en un agitador giratorio durante 4 días y se logró una titulación de 350-400 mg/l para el Compuesto II-16.

Alternativamente, la producción de los compuestos  
5 puede lograrse en un sistema de fermentador de 42 l  
utilizando la cepa NPS21184. La cepa NPS21184 se cultivó en  
un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo  
consistiendo de los siguiente por litro de agua desionizada:  
glucosa, 8 g; extracto de levadura, 6 g; Hy-Soy, 6 g; y sal  
10 de mar sintética (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30 g. El  
primer cultivo semilla se incubó a 28 grados C durante 3 días  
en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Cinco ml de  
cada primer cultivo semilla se inocularon en un matraz de 500  
ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo. Los segundos  
15 cultivos semilla se incubaron a 28 grados C y a 250 rpm en un  
agitador giratorio durante 2 días. Veinte ml de cada uno de  
los segundos cultivos semilla se inocularon en un matraz  
Fernbach de 2.8 l conteniendo 400 ml del medio vegetativo.  
Los terceros cultivos semilla se incubaron a 28 grados C y a  
20 250 rpm en un agitador giratorio durante 2 días. 1.3 l del  
tercer cultivo semilla se inocularon en un fermentador de 42  
l conteniendo 26 l del Medio de Producción A. También puede  
utilizarse el Medio de Producción B y el Medio de Producción  
C con la siguiente composición. Medio de Producción C  
25 consistiendo de los siguiente por litro de agua desionizada:  
almidón, 15 g; extracto de levadura, 6 g; Hy-Soy, 6 g;  
sulfato férrico, 40 mg; bromuro de potasio, 100 mg; carbonato  
de calcio, 1 g; y sal de mar sintética (Instant Ocean,  
Aquarium Systems), 30 g. Los cultivos del fermentador se  
30 operaron en los siguientes parámetros: temperatura, 28 grados  
C; agitación, 200 rpm; aireación, 13l/min y contra presión,  
4.5 psi. A las 36 a 55 horas del ciclo de producción, se

agregaron aproximadamente 600 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril al cultivo del fermentador. El cultivo de producción se incubó adicionalmente a los parámetros de operación anteriores hasta el día 4 del ciclo de producción.

5 La tasa de aireación se bajó a 8l/min. en el día 5 del ciclo de producción, el cultivo del fermentador logró una titulación de aproximadamente 300 mg/l para el Compuesto II-16. El caldo de cultivo se filtró a través de tela filtro para recuperar la resina Amberlite XAD-7. La resina se

10 extrajo con dos veces 4.5 litros de etil acetato seguido por 1 vez 1.5 litros de etil acetato. Los extractos combinados se secaron in vacuo. El extracto seco se procesó entonces para la recuperación de los compuestos de las Fórmulas I-7, II-16, II-20, II-24C, II-26 y II-28.

15

### EJEMPLO 3

PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO DE LAS FÓRMULAS I-7, II-16, II-20, II-24C, II-26 y II-28

3A: Purificación del Compuesto de las Fórmulas II-16, II-20, II-24C, II-26 y II-28

20

Los compuestos puros de las Fórmulas II-16, II-20, II-24C, II-26 y II-28 se obtuvieron mediante cromatografía seguida por HPLC. Ocho gramos de extracto crudo conteniendo 3.8 gramos del compuesto de la Fórmula II-16 y menores cantidades de II-20, II-24C, II-26 y II-28 se procesaron

25 mediante cromatografía instantánea utilizando un sistema Biotage Flash40i y un cartucho Flash 40M (KP-Sil Silica, 32-63 um, 90 gramos). La cromatografía instantánea se desarrolló por medio del siguiente gradiente de etapa:

1. Hexano (1 l)
- 30 2. Etil acetato al 10% en hexano (1 l)
3. Etil acetato al 20% en hexano, primera elusión (1 l)

etil acetato al 100%. Las fracciones conteniendo el compuesto II-16 y análogos menores se depositaron en base a la composición de los compuestos presentes, y se evaporaron bajo presión reducida en un evaporador giratorio. Este  
5 proceso produjo el Compuesto A puro, así como las fracciones separadas conteniendo los compuestos menores II-20, II-24C, II-26 y II-28, que se purificaron adicionalmente como se describe abajo.

Las muestras conteniendo II-24C y II-26 generadas a  
10 partir del proceso descrito anteriormente, se separaron posteriormente utilizando HPLC de preparación en fase inversa como sigue. La muestra conteniendo II-24C (70 mg) se disolvió en acetonitrilo a una concentración de 10 mg/ml, y se cargaron 500 ul en una columna HPLC de dimensiones de 21  
15 mm i.d. por 15 cm de longitud conteniendo el soporte Eclipse XDB-C18. El gradiente de solvente se incrementó linealmente de 15% acetonitrilo/85% agua a 100% acetonitrilo durante 23 minutos a una tasa de flujo de 14.5 ml/min. La composición de solvente se mantuvo a 100% acetonitrilo durante 3 minutos  
20 antes de regresar a la mezcla de solvente inicial. El compuesto II-26 eluyó a 17.5 minutos mientras que el compuesto II-24C eluyó a 19 minutos bajo estas condiciones.

Se obtuvo II-26 cristalino utilizando un método de difusión de vapor. El compuesto II-16 (15 mg) se disolvió en  
25 100 ul de acetona en un vial de HPLC de 1.5 ml de fondo en v. este vial se colocó entonces dentro de un envase sellado más grande conteniendo 1 ml de pentano. Se observaron cristales adecuados para experimentos de cristalografía de rayos X a lo largo de los lados y el fondo del vial interior después de 48  
30 horas de incubación a 4°C. Los datos de la cristalografía se colectaron en un difractómetro Bruker SMART APEX CCD de rayos X ( $F(000) = 2656$ , radiación  $\text{Mo}_{K\alpha}$ ,  $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ,  $\mu = 0.264 \text{ mm}^{-1}$ ,

157

155  
156

T=100K) en el UCSD Crystallography Lab y el método de refinación utilizado fue al menor cuadrado de matriz completa en F<sup>2</sup>. Datos del cristal NPI-2065: C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>CINO<sub>4</sub>, MW=313.77, tetragonal, grupo espacial P4(1)2(1)2, a=b=11.490(3) Å, c=46.444(2) Å, α=β=γ=90°, vol=6131.6(3) Å<sup>3</sup>, Z=16, ρ<sub>calc</sub>=1.360 g cm<sup>3</sup>, tamaño del cristal, 0.30 x 0.15 x 0.07 mm<sup>3</sup>, rango θ, 1.75-26.00°, 35367 reflexiones colectadas, 6025 reflexiones independientes (R<sub>int</sub>=0.0480), índices R finales (I>2σ(I)): R<sub>1</sub>=0.0369, wR<sub>2</sub>=0.0794, GOF=1.060.

10 A fin de separar el II-28 del II-20, se empleó un método isocrático en fase inversa. La muestra (69.2 mg) conteniendo ambos compuestos se disolvió en acetonitrilo hasta una concentración de 10 mg/ml, y se cargaron 500 ul en una columna HPLC en fase inversa (ACE 5 C18-HL, 15 cm X 21 mm ID) por inyección. Se utilizó un sistema de solvente isocrático de 27% acetonitrilo/63% agua a una tasa de flujo de 14.5 ml/min para separar los compuestos II-28 y II-20, que eluyeron después de 14 y 16 minutos, respectivamente. Las fracciones conteniendo los compuestos de interés se evaporaron inmediatamente bajo presión reducida a temperatura ambiente en un evaporador giratorio. Las muestras se cargaron entonces sobre una pequeña columna de sílice y eluyeron con 10 ml de 70% hexano/30% acetona para retirar las impurezas adicionales.

25 Las muestras generadas del método HPLC preparativo de fase normal antes descrito, que contenían II-20,. Pero que se encontraron libres de II-28, también podrían triturarse con EtOAc al 100% para retirar impurezas lipofílicas menores.

30 Compuesto de la Fórmula II-16: UV (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O) λ<sub>max</sub> 225(sh) nm. Masa de baja resolución: m/z 314 (M+H), 336 (M+Na).

Compuesto de la Fórmula II-20: UV

158

158  
151

(Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. Masa de baja resolución: m/z 266 (M+H); HRMS (ESI), m/z 266.1396 (M+H),  $\Delta_{\text{calc}}$  = 1.2 ppm. La Figura 7 representa el espectro 1H NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-20.

5                    Compuesto            de            la            Fórmula            II-24C:            UV  
(Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. Masa de baja resolución: m/z 328 (M+H); 350 (M+Na); HRMS (ESI), m/z 328.1309 (M+H),  $\Delta_{\text{calc}}$  = 2.0 ppm, C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>Cl. La Figura 8 representa el espectro 1H NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula  
10    II-24C.

                  Compuesto            de            la            Fórmula            II-26:            UV  
(Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. HRMS (ESI), m/z 314.1158 (M+H),  $\Delta_{\text{calc}}$  = 0.4 ppm, C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>Cl; la Figura 51 representa el espectro 1H NMR de un compuesto que tiene la estructura de la  
15    Fórmula II-26 en DMSO-d<sub>6</sub>. La Figura 52 representa el diagrama ORTEP generado por computadora del compuesto de la Fórmula II-26.

                  Compuesto            de            la            Fórmula            II-28:            UV  
(Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. HRMS (ESI), m/z 266.1388  
20    (M+H),  $\Delta_{\text{calc}}$  = 1.8 ppm, C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>. La Figura 54 representa el espectro 1H NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-28 en DMSO-d<sub>6</sub>.

### 3B: Purificación del Compuesto de la Fórmula I-7

                  Se utilizó un sistema Biotage Flash 75Li con un  
25    cartucho Flash 75L KP-Sil para procesar el extracto crudo filtrado (10.0 g), enriquecido en el Compuesto II-16 y conteniendo el Compuesto de la Fórmula I-7. El extracto crudo se disolvió hasta una concentración de 107 mg/ml en acetona y se cargó directamente sobre el cartucho. Se  
30    efectuó entonces el siguiente gradiente de etapa de solvente a través del cartucho a una tasa de flujo de entre 235 ml/min y 250 ml/min.

159

157  
158

1. EtOAc al 10% en n-heptano (3.2 l)
2. EtOAc al 25% en n-heptano (16 l)
3. EtOAc al 30% en n-heptano (5.4 l)

Las fracciones enriquecidas en el Compuesto II-16  
5 se depositaron y se concentraron mediante rotavapor hasta  
quedar el -5% del volumen total depositado del solvente. El  
solvente se retiró, dejando atrás el sólido blanco.

Se llevó a cabo entonces una cristalización en el  
sólido disolviendo la muestra (4.56 g) en 1:1 acetona-heptano  
10 (910 ml). El solvente se evaporó lentamente utilizando un  
evaporador giratorio hasta reducir el solvente a  
aproximadamente 43% de su volumen original. La solución  
(sobrenadante) se retiró y se concentró (598 mg).

El sobrenadante se disolvió en acetona (80 mg/ml).  
15 Los alícuotas (500 ul) de esta solución se inyectaron sobre  
una columna de HPLC de fase normal utilizando las condiciones  
antes descritas para la purificación de fase normal de los  
Compuestos II-16, II-24C, II-26 y II-28. El Compuesto de la  
Fórmula I-7 eluyó a 7.5 minutos como un compuesto puro.

20 Compuesto de la Fórmula I-7: UV (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  
 $\lambda_{\text{max}}$  225(sh) nm. Masa de baja resolución: m/z 298 (M+H), 320  
(M+Na).

#### EJEMPLO 4

FERMENTACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LAS FÓRMULAS II-17, II-18 y  
25 II-27

La cepa CNB476 se cultivó en un matraz de 500 ml  
conteniendo 100 ml de medio vegetativo consistiendo de lo  
siguiente por litro de agua desionizada: glucosa, 4 g; Bacto  
tryptona, 3 g; Bacto casitona, 5 g; y sal de mar sintética  
30 (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30 g. El primer cultivo  
semilla se incubó a 28 grados C durante 3 días en un agitador  
giratorio operando a 250 rpm. Cinco ml del primer cultivo

160

158  
159

semilla se inocularon en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo consistiendo de lo siguiente por litro de agua desionizada: almidón, 10 g; extracto de levadura, 4 g; peptona, 2 g; sulfato férrico, 40 mg; bromuro de potasio, 100 mg; carbonato de calcio, 1 g; y bromuro de sodio, 30 g. Los segundos cultivos semilla se incubaron a 28°C durante 7 días en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Se agregaron aproximadamente de 2 a 3 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril al segundo cultivo semilla. El segundo cultivo semilla se incubó a 28°C durante 7 días en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Cinco ml del segundo cultivo semilla se inocularon en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml del medio vegetativo. El tercer cultivo semilla se incubó a 28 grados C durante 1 día en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Se agregaron aproximadamente de 2 a 3 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril al tercer cultivo semilla. El tercer cultivo semilla se incubó posteriormente a 28°C durante 2 días en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Cinco ml del tercer cultivo semilla se inocularon en un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml del segundo medio vegetativo. El cuarto cultivo semilla se incubó a 28 grados C durante 1 día en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Se agregaron aproximadamente de 2 a 3 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril al cuarto cultivo semilla. El cuarto cultivo semilla se incubó posteriormente a 28°C durante 1 día en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Cinco ml del cuarto cultivo semilla se inocularon en diez matraces de 500 ml conteniendo 100 ml del segundo medio vegetativo. Los quintos cultivos semilla se incubaron a 28°C durante 1 día en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Se agregaron aproximadamente de 2 a 3 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril a los quintos cultivos semilla. Los

157  
160

quintos cultivos semilla se incubaron posteriormente a 28°C durante 3 días en un agitador giratorio operando a 250 rpm. Cuatro ml de cada uno de los quintos cultivos semilla se inocularon en ciento cincuenta matraces de 500 ml conteniendo 5 100 ml del medio de producción teniendo la misma composición que el segundo medio vegetativo. Se agregaron también al cultivo de producción aproximadamente de 2 a 3 gramos de resina Amberlite XAD-7 estéril. Los cultivos de producción se incubaron a 28°C durante 6 días en un agitador giratorio 10 operando a 250 rpm. El caldo de cultivo se filtró a través de tela filtro para recuperar la resina Amberlite XAD-7. La resina se extrajo con 2 veces 3 litros de etil acetato seguido por 1 vez 1 litro de etil acetato. Los extractos combinados se secaron in vacuo. El extracto seco conteniendo 15 0.42 g del compuesto de la Fórmula II-17 y 0.16 gramos del compuesto de la Fórmula II-18, se procesaron entonces para la recuperación de los compuestos.

EJEMPLO 5

PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE LA FÓRMULA II-17, II-18 y II-27

20 Los compuestos puros de la Fórmula II-17 y II-18 se obtuvieron mediante HPLC en fase inversa como se describe abajo:

|               |                                                                                                            |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna       | ACE 5 C18-HL                                                                                               |
| Dimensiones   | 15 cm X 21 mm ID                                                                                           |
| Tasa de flujo | 14.5 ml/min                                                                                                |
| Detección     | 214 nm                                                                                                     |
| Solvente      | Gradiente de 35% Acetonitrilo/65% H <sub>2</sub> O a 90% acetonitrilo/10% H <sub>2</sub> O durante 15 min. |

El extracto crudo (100 mg) se disolvió en 15 ml de acetonitrilo. Los alícuotas (900 ul) de esta solución se

160  
161

inyectaron sobre una columna HPLC en fase inversa utilizando las condiciones antes descritas. los compuestos de las Fórmulas II-17 y II-18 eluyeron a 7.5 y 9 minutos, respectivamente. Las fracciones conteniendo los compuestos puros se concentraron primeramente utilizando nitrógeno para retirar el solvente orgánico. La solución restante se congeló entonces y se liofilizó hasta secarse.

Se desarrolló un método alternativo de purificación para el Compuesto II-17 y II-18 para purificación a mayor escala, e implicó el fraccionamiento del extracto crudo en una columna VLC de fase normal. Bajo estas condiciones, se identificaron cantidades suficientes de varios metabolitos menores, incluyendo el compuesto II-27. El extracto crudo (2.4 g) se disolvió en acetona (10 ml) y esta solución se absorbió en gel de sílice (10 cc) secando in vacuo. El extracto crudo absorbido se cargó en una columna VLC de sílice de fase normal (250 cc gel de sílice, dimensiones de columna 2.5 cm de diámetro por 15 cm de longitud) y se lavó con un gradiente de etapa de hexano/EtOAc, incrementando el porcentaje de hexano en etapas de 5% (100 ml de solvente por etapa). La mayor parte del compuesto II-16 eluyó en el lavado de 60% hexano/40% EtOAc mientras que la mayor parte del compuesto II-17 eluyó en el lavado de 50% hexano/50% etil acetato. La separación final de los compuestos se logró utilizando cromatografía HPLC C18 (ACE 5 u, C18-HL, 150 mm X 21 mm ID) utilizando un sistema de solvente isocrático consistiendo de 35% ACN/65% H2O. Bajo estas condiciones, el compuesto II-27 eluyó a 11 minutos, el compuesto II-17 eluyó a 12.00 minutos, los rastros del compuesto A eluyeron a 23.5 minutos y el compuesto II-18 eluyó a 25.5 minutos. Las muestras resultantes se secaron in vacuo sin utilizar calor para retirar la mezcla de solvente acuoso. Se encontró que

163

161  
162

datos espectroscópicos para estas muestras del compuesto II-16 y el compuesto II-18 fueron idénticos a los de las muestras preparadas de métodos de purificación anteriores. Se encontró que la muestra del compuesto II-18 contenía 8%  
5 del producto de hidrólisis de lactona y se purificó posteriormente lavando a través de un obturador de sílice en fase normal (1 cm de diámetro por 2 cm de altura) y eluyó utilizando una mezcla de solvente de 20% EtOAc/80% hexanos (25 ml). Se encontró que la mezcla resultante contenía el  
10 compuesto II-18 puro.

Las fracciones conteniendo el compuesto II-27 antes descrito se purificaron posteriormente utilizando HPLC semipreparativa en fase normal (Phenomenex Luna Si 10 u, 100 A; 250 x 10 mm id) utilizando un gradiente de solvente  
15 incrementado de 100% hexano a 100% EtOAc durante 20 minutos con una tasa de flujo de 4 ml/min. El compuesto II-27 eluyó como un compuesto puro después de 11.5 minutos (0.8 mg, 0.03% rendimiento aislado del peso del extracto seco).

Compuesto de la Fórmula II-17: UV  
20 (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. Alta Res. Masa (APCI): m/z 280.156 (M+H);  $\Delta_{\text{calc}}$  = 2.2 ppm, C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>. La Figura 49 representa el espectro <sup>1</sup>H NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-17.

Compuesto de la Fórmula II-18: UV  
25 (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. Alta Res. Masa (APCI): m/z 358.065 (M+H);  $\Delta_{\text{calc}}$  = 1.9 ppm, C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>Br. La Figura 50 representa el espectro <sup>1</sup>H NMR de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula II-18.

Compuesto II-27: UV (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh)  
30 nm. MS (HR-ESI), m/z 280.1556 (M+H);  $\Delta_{\text{calc}}$  = 2.7 ppm, C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) ver Figura 53.

164

164  
165

El compuesto de la Fórmula II-17 (5 mg) se disolvió en acetona (3 ml) en un vial de escintilación (20 ml) al cual se agregó el 10% (peso/peso) Pd/C (aproximadamente 1 mg) y una barra de agitador magnético. La mezcla de reacción se  
5 agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un Gelman Acrodisc de 0.2 um para retirar el catalizador. El solvente se evaporó del filtrado para producir el compuesto de la Fórmula II-3 como un polvo blanco  
10 que se purificó mediante HPLC en fase normal utilizando las siguientes condiciones:

Columna: Phenomenex Luna 10u Silica  
Dimensiones: 25 cm x 21.2 mm ID  
Tasa de Flujo: 14.5 ml/min  
15 Detección: ELSD  
Solvente: 5% a 60% de EtOAc/Hex durante 19 minutos, de 60 a 100% de EtOAc en 1 minuto, después 4 minutos a 100% de EtOAc.

El compuesto de la Fórmula II-3 eluyó a 22.5  
20 minutos como un compuesto puro: UV (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. La Figura 12 representa el espectro NMR del compuesto de la Fórmula II-3 en DMSO-d<sub>6</sub>. La Figura 13 representa el espectro de masa de baja resolución del compuesto de la Fórmula II-3: m/z 282 (M+H), 304 (M+Na).

25 Ejemplo 7C: Hidrogenación Catalítica del Compuesto de la Fórmula II-18

3.2 mg del compuesto de la Fórmula II-18 se disolvieron en acetona (3 ml) en un vial de escintilación (20 ml) al cual se agregó el 10% (peso/peso) Pd/C  
30 (aproximadamente 1 mg) y una barra de agitador magnético. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 horas. La

167

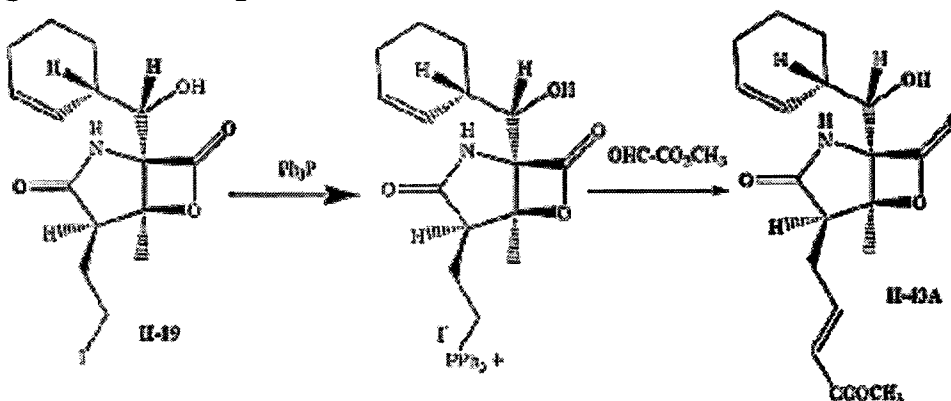
171  
173

minuto, manteniendo a 100% de EtOAc durante 5 minutos a una  
tasa de flujo de 14.5 ml/min. Se utilizó un ELSD para  
monitorear el proceso de purificación. El compuesto de la  
Fórmula II-13C eluyó a 13.0 y 13.2 minutos como una mezcla de  
5 rotámeros con una relación de 1.5:8.5 (7 mg). Fórmula II-  
13C: UV (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  226(sh) & 300 (sh) nm. ESMS:  
m/z 312 (M+H), 334 (M+Na)+; HRMS (ESI), m/z 312.1017 [M+H]+,  
 $\Delta_{\text{calc}} = -4.5$  ppm, C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>Cl; <sup>1</sup>H NMR en DMSO-d<sub>6</sub> (Figura 22).

La mezcla de rotámeros de la Fórmula II-13C (4 mg)  
10 se disolvió en acetona (1 ml) en un vial de escintilación (20  
ml) al cual se agregó una cantidad catalítica (0.5 mg) de 10%  
(peso/peso) Pd/C y una barra de agitación magnética. La  
mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno a  
temperatura ambiente durante aproximadamente 15 horas. La  
15 mezcla de reacción se filtró a través de un Gelman Acrodisc  
de 0.2  $\mu$ m para retirar el catalizador. El solvente se  
evaporó del filtrado para producir el compuesto de la Fórmula  
II-8C como una goma incolora que se purificó posteriormente  
mediante HPLC de fase normal utilizando una columna  
20 Phenomenex Luna 10 u Silica (25 cm x 21.2 mm ID) con un  
gradiente de solvente de 25% a 80% EtOAc/Hex durante 19  
minutos, de 80 a 100% de EtOAc en 1 minuto, manteniendo a  
100% de EtOAc durante 5 minutos a una tasa de flujo de 14.5  
ml/min. Se utilizó un ELSD para monitorear el proceso de  
25 purificación. El compuesto de la Fórmula II-8C (1 mg) eluyó  
a 13.5 minutos como un compuesto puro. Fórmula II-8C: UV  
(Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  225(sh) nm. ESMS: m/z 314 (M+H), 336  
(M+Na)+; HRMS (ESI), m/z 314.1149 [M+H]+,  $\Delta_{\text{calc}} = 3.3$  ppm,  
C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>Cl; <sup>1</sup>H NMR en DMSO-d<sub>6</sub> (ver Figura 23).

175

mediante el tratamiento del compuesto de la Fórmula II-19 con trifenil fosfina para elaborar un ilido fosforoso, que puede tratarse con varios aldehídos, por ejemplo, metil éster de ácido glioxílico, para elaborar la Fórmula II-43A.



5

### EJEMPLO 23

#### SÍNTESIS DEL COMPUESTO DE LA FÓRMULA II-30 A PARTIR DE II-19

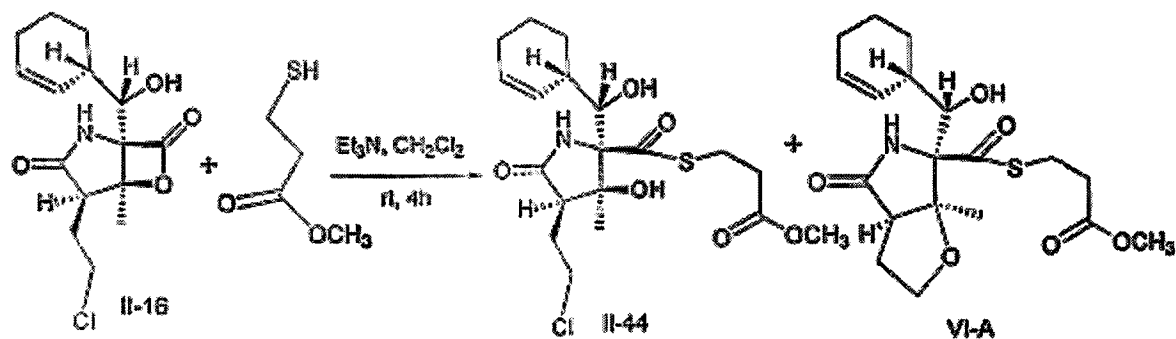
Una porción de CuI (100 mg) se colocó en un matraz de fondo de pera de 25 ml y se lavó con gas Ar durante 30 minutos. El flujo de gas Ar se mantuvo a través del matraz durante todo el curso de la reacción. El envase se enfrió a -78°C previo a la adición de THF seco (5 ml) seguido por la adición inmediata por goteo de una solución de metillitio en THF seco ( 5.0 ml, 1.6 M) con agitación vigorosa. Una solución del Compuesto II-19 en THF seco (12 mg Compuesto II-19, 1 ml THF) se agregó lentamente a la solución clara de dialquilmcuprato y la mezcla resultante se agitó a -78°C durante 1 hora. La reacción se sació mediante el lavado de la solución de THF a través de un obturador de gel de sílice (1 cm de diámetro por 2 cm de longitud) conjuntamente con un lavado adicional utilizando una solución de 50% EtOAc/50% hexanos (50 ml). Los lavados combinados del obturador de sílice se secaron in vacuo y se sometieron a purificación adicional de HPLC C18 en 2 inyecciones (ACE 5u C18-HL, 150 mm X 21 mm ID) utilizando un gradiente de solvente isocrático consistiendo de 35% acetonitrilo/65% H<sub>2</sub>O. El Compuesto II-30

15

20

25

columna ACE 5u C18 (150 mm x 22 mm ID) con un gradiente de solvente de 35% a 90% H<sub>2</sub>O/acetonitrilo durante 17 minutos, de 90 a 100% de acetonitrilo durante 1 minuto, manteniendo a 100% de acetonitrilo durante 1 minuto, a una tasa de flujo de 5 14.5 ml/min. Se utilizó un detector de disposición de diodo para monitorear el proceso de purificación. Los Compuestos II-44 (20 mg) y VI-1A (1 mg) eluyeron a 11.68 y 10.88 minutos, respectivamente, como compuestos puros. Compuesto II-44: UV (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  240 (sh) nm, ESMS: m/z 434.0 (M+H)<sup>+</sup> & 456.0 (M+Na)<sup>+</sup>. Compuesto VI-1A: UV (Acetonitrilo/H<sub>2</sub>O)  $\lambda_{\max}$  220 (sh) nm, ESMS: m/z 398.0 (M+H)<sup>+</sup> & 420.0 (M+Na)<sup>+</sup>.



#### EJEMPLO 25

15 OXIDACIÓN DEL GRUPO HIDROXILO SECUNDARIO EN COMPUESTOS DE LAS FÓRMULAS II-16, II-17 y II-18 Y REACCIÓN CON HIDROXI O METOXI AMINAS:

Cualquiera de los compuestos de las Fórmulas II-16, II-17 y II-18 pueden utilizarse como el compuesto de inicio.

20 El grupo hidroxilo secundario en el compuesto de inicio se oxida utilizando cualquiera de los siguientes reactivos: piridinio dicromato (PDC), piridinio clorocromato (PCC), periodinano Dess-Martin u oxalil cloruro (oxidación Swern) (Ref: Organic Syntheses, volúmenes colectivos I-VIII).  
25 Preferentemente puede utilizarse periodinano Dess-Martin como reactivo para esta reacción. (Ref: Fenteany G., et al., Science, 1995, 268, 726-73). El compuesto ceto resultante se



sembraron en  $1.25 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $7.5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^4$  células/cavidad respectivamente en 90  $\mu$ l de medio completo en placas de cultivo de tejido de fondo claro, de paredes negras

5 Corning 3904. Soluciones de reserva de 20mM de la Fórmula II-16 se prepararon en 100% DMSO, en alícuotas y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . La fórmula II-16 se diluyó serialmente y se agregó por triplicado a las cavidades de prueba dando como resultado concentraciones finales que varían de 20  $\mu$ M a

10 0.2pM. Las placas se regresaron a la incubadora por 48 horas. La concentración final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

Después de 48 horas de exposición a la droga, 10  $\mu$ l de 0.2 mg/ml de resazurina (obtenida de Sigma-Aldrich

15 Chemical Co.) en salina regulada de fosfato libre de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  se agregó a cada cavidad y las placas se regresaron a la incubadora por 3-6 horas. Ya que las células vivas metabolizan Resazurina, la fluorescencia del producto de reducción de Resazurina se midió utilizando un fluorómetro de

20 microplaca Fusión (Packard Bioscience) con filtros de  $\lambda_{\text{ex}}=535$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=590$  nm. El tinte de resazurina en un medio sin células se utilizó para determinar el antecedente, que se substrajo de los datos para todas las cavidades experimentales. Los datos se normalizaron a la fluorescencia

25 promedio de las células tratadas con medios + 0.25% DMSO (100% de crecimiento celular) y valores  $\text{EC}_{50}$  (la concentración de droga a la cual se establece 50% de la inhibición del crecimiento observada máxima) se determinaron utilizando un

30 algoritmo de ajuste de curva de respuesta a dosis sigmoidal estándar (generado por XLfit 3.0, ID Business Solutions Ltd o Prism 3.0, GraphPad Software Inc).

Los datos en la Tabla 2 resumen los efectos

199  
20

|  |          |  |  |
|--|----------|--|--|
|  | múltiple |  |  |
|--|----------|--|--|

\* En donde n (número de experimentos independientes) = 2, se presenta el valor promedio.

Los valores EC<sub>50</sub> indican que la Fórmula II-16 fue citotóxica contra células B16-F10, DU 145, HEK293, HT-29, LoVo, MDA-MB-231, MIA PaCa-2, NCI-H292, OVCAR-3, PANC-1, PC-3, RPMI 8226 y U266.

EJEMPLO 36

INHIBICIÓN *IN VITRO* DE ACTIVIDAD DE PROTEASOMA POR LAS FÓRMULAS I-7, II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, II-31, II-32, II-38, IV-3c, II-44, VI-1A Y II-47

Todos los compuestos se prepararon como solución de reserva de 20 mM en DMSO y se almacenaron en alícuotas pequeñas a -80°C. El proteasoma 20S de músculo de conejo purificado se obtuvo de CalBiochem o Boston Biochem. Para mejorar la actividad similar a quimotripsina del proteasoma, el regulador de ensayo (20 mM HEPES, pH7.3, 0.5 mM EDTA, y 0.05% TritonX100) se complementó con SDS dando como resultado una concentración SDS final de 0.035%. El substrato utilizado fue suc-LLVY-AMC, un substrato de péptido fluorogénico específicamente desdoblado por la actividad similar a quimotripsina del proteasoma. Los ensayos se realizan a una concentración de proteasoma de 1 µg/ml en un volumen final de 200µl en placas de microtitulación Costar de 96 cavidades. Las Fórmulas II-2, II-4, II-16, II-17, II-18, II-19, II-21, II-22 y II-44 se probaron como curvas de respuesta a dosis de ocho puntos con concentraciones finales que varían de 500 nM a 158 pM. Las Fórmulas I-7, II-5A, II-5B, II-20, II-29, II-30 y II-38 se probaron en concentraciones que varían de 1 µM a 0.32 nM. Las Fórmulas

200  
202

II-3 y VI-1A se probaron como una curva de respuesta a dosis de ocho con concentraciones finales que varían de 10  $\mu\text{M}$  a 3.2 nM. La fórmula II-47 se probó a concentraciones que varían de 5  $\mu\text{M}$  a 1.6 nM, mientras las Fórmulas II-8C, II-13C, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-31, II-32 y IV-3C se probaron con concentraciones finales que varían de 20  $\mu\text{M}$  a 6.3nM. Las muestras se incubaron a 37°C por cinco minutos en un lector de microplaca de 96 cavidades Fluoroskan Ascent de temperatura controlada (Thermo Electron, Waltham, MA).

10 Durante la etapa de preincubación, el substrato se diluyó 25 veces en regulador de ensayo que contiene SDS. Después del periodo de preincubación, las reacciones se iniciaron por la adición de 10  $\mu\text{l}$  del substrato diluido y las placas se regresaron al lector de placa. La concentración final de

15 substrato en las reacciones fue 20  $\mu\text{M}$ . La fluorescencia del substrato de péptido desdoblado se midió a  $\lambda_{\text{ex}}=390$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm. Todos los datos se recolectan cada cinco minutos por más de 1.5 hora y se graficaron como el promedio de puntos de datos triplicados. Los valores  $\text{EC}_{50}$  (la

20 concentración de droga a la cual 50% de la fluorescencia relativa máxima se inhibe) se calculó por Prism (GraphPad Software) utilizando una respuesta a dosis sigmoidal, modelo de inclinación variable. Para evaluar la actividad de los compuestos contra la actividad similar a caspasa de los

25 proteasomas 20S, las reacciones se realizaron como se describe arriba excepto que Z-LLE-AMC se utilizó como el substrato de péptido. Las fórmulas II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-17, II-18, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, IV-3C, II-44 y VI-1A

30 se probaron en concentraciones que varían de 20 $\mu\text{M}$  a 6.3nM. La fórmula II-2 se probó en concentraciones que varían de 10 $\mu\text{M}$  a 3.2nM, aunque la Fórmula II-16 y Fórmula II-19 se

204

probaron en concentraciones que varían de 5µM a 1.58nM. Para la evaluación de los compuestos contra la actividad similar a tripsina del proteasoma, SDS se omitió del regulador de ensayo y Boc-LRR-AMC se utilizó como el sustrato de péptido.

5 La fórmula II-20 se probó en concentraciones que varían de 5 µM a 1.6 nM. Las fórmulas II-3, II-8C, II-13C, II-17, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, IV-3C y VI-IA se probaron en concentraciones que varían de 20µM a 6.3nM. Para Fórmulas II-2 y II-5B las concentraciones  
10 probadas variaron de 10µM a 3.2nM, aunque las Fórmulas II-4, II-5A, II-16, II-18 y II-19 se probaron en concentraciones que varían de 1µM a 0.32nM. II-44 se probó en concentraciones que varían de 2µM a 632pM.

Los resultados (valores EC<sub>50</sub>) se muestran en la  
15 Tabla 3 e ilustran que entre los compuestos probados, las Fórmulas II-5A, II-16, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-29, II-38 y II-44 se encuentran los inhibidores más potentes de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S con valores EC<sub>50</sub> que varían de 2 nM a 11nM. Fórmulas I-7, II-  
20 2, II-4, II-5B, II-17, II-30 y II-47 inhiben la actividad similar a quimotripsina proteasomal con valores EC<sub>50</sub> que varían de 13 nM a 88 nM, mientras que los valores EC<sub>50</sub> de las Fórmulas II-3, II-26 y VI-IA variaron de 207 nM a 964 nM. Las fórmulas II-13C, II-24C, II-27, II-28 y IV-3C inhibieron  
25 la actividad similar a quimotripsina con valores EC<sub>50</sub> que varían de 1.4 µM a 10.6 µM. Los valores EC<sub>50</sub> para las Fórmulas II-8C, II-25, II-31 y II-32 fueron mayores que 20 µM. Bajo las condiciones probadas, las Fórmulas II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-  
30 20, II-21, II-22, II-24C, II-26, II-29, II-30, II-44 y VI-IA fueron capaces de inhibir la actividad similar a tripsina del proteasoma 20S. Las Fórmulas II-4, II-5A, II-16, II-18, II-

204  
206

|               |            |    |    |
|---------------|------------|----|----|
| Fórmula II-47 | 50 ± 10 nM | ND | ND |
|---------------|------------|----|----|

\* Valores EC<sub>50</sub> de uno o dos experimentos independientes se muestran. Donde n<sub>≥</sub>3, el valor EC<sub>50</sub> promedio ± desviación estándar se presenta, \*\* n=3, desviación estándar no aplicable.

5 ND=no determinado

Los resultados de un experimento representativo que evalúa la Fórmula II-2, Fórmula II-3 y Fórmula II-4 se muestran en la FIG. 46 e ilustran que la Fórmula II-2 y Fórmula II-4 inhiben la actividad similar a quimotripsina del proteasoma con valores EC<sub>50</sub> de 18.5 nM y 15nM respectivamente. Fórmula II-3 está active en este ensayo con un valor EC<sub>50</sub> de 890 nM. Resultados similares se obtienen de un experimento independiente.

Los resultados de un experimento representativo que evalúa la Fórmula II-5A y Fórmula II-5B se muestran en la FIG. 47 e ilustran que la Fórmula II-5A y Fórmula II-5B inhiben la actividad similar a quimotripsina del proteasoma con valores EC<sub>50</sub> de 6 nM y 88 nM respectivamente. Los resultados similares se obtienen en un experimento independiente.

EJEMPLO 37

SALINOSPORAMIDA A (II-16) INHIBE LA ACTIVIDAD SIMILAR A QUIMOTRIPSINA DE PROTEASOMAS 20S DE MÚSCULO DE CONEJO

El efecto de Salinosporamida A (II-16) en proteasomas se examina utilizando un equipo comercialmente disponible de Calbiochem (no. de catálogo 539158), que utiliza un substrato de péptido fluorogénico para medir la actividad de los proteasomas 20S de músculo de conejo (Equipo de Proteasoma 20S Calbiochem). Este substrato de péptido es específico para la actividad de la enzima similar a quimotripsina del proteasoma.

205  
207

Omuralida se prepara como una reserva de 10 mM en DMSO y almacena en alícuotas de 5  $\mu$ L a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Salinosporamida A se prepara como una solución de 25.5 mM en DMSO y almacena en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El ensayo mide la

5 hidrólisis de Suc-LLVY-AMC en Suc-LLVY y AMC. La cumarina liberada (AMC) se midió de manera fluorométrica al utilizar  $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ . Los ensayos se realizaron en una placa de microtitulación (Corning 3904), y se siguen

10 cinéticamente con mediciones cada cinco minutos. El instrumento utilizado fue un Thermo Lab Systems Fluoroskan, con la cámara de incubación establecida a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los ensayos se realizaron de acuerdo al procedimiento del fabricante, con los siguientes cambios. La proteasoma se activa como se describe con SDS, y mantiene en hielo antes del ensayo.

15 Salinosporamida A y Omuralida se diluyen serialmente en regulador de ensayo para hacer una curva de respuesta a dosis de 8 puntos. Diez microlitros de cada dosis se agregan por triplicado a la placa de ensayo, y 190  $\mu$ L del proteasoma activada se agregó y mezcla. Las muestras se pre-incuban en

20 el Fluoroskan por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . El substrato se agregó y las cinéticas de AMC se siguen por una hora. Todos los datos se recolectan y diagraman como el promedio de los puntos de datos triplicados. Los datos se normalizaron a reacciones realizadas en la ausencia de Salinosporamida A y modelan en

25 Prism como una inclinación variable, respuesta a dosis sigmoidal.

Similar a los resultados obtenidos para la citotoxicidad *in vitro* (Tabla 2), Feling, et al, *Angew Chem Int Ed Engl* 42:355 (2003), los valores  $\text{EC}_{50}$  en el ensayo de

30 proteasoma 20S mostraron que Salinosporamida A fue aproximadamente 40 veces más potente que Omuralida, con un valor promedio de 1.3 nM contra 49 nM, respectivamente (FIG.

209

206  
208

27). Este experimento se repite y  $EC_{50}$  promedio en los dos ensayos se determina que es 2 nM para Salinosporamida A y 52 nM para Omuralida.

Salinosporamida A es un inhibidor potente de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma. Los valores  $EC_{50}$  para citotoxicidad estuvieron en el rango de 10-200 nM lo que sugiere que la habilidad de la Salinosporamida A para inducir la muerte celular se debe, al menos en gran parte, a la inhibición de proteasoma. Los datos sugieren que la Salinosporamida A es un inhibidor de molécula pequeña potente del proteasoma.

#### EJEMPLO 38

##### INHIBICIÓN DE SALINOSPORAMIDA A (II-16) DE ACTIVIDAD PGPH DE PROTEASOMAS 20S DE MÚSCULO DE CONEJO

Omuralida puede inhibir la actividad PGPH (también conocida como similar a caspasa) del proteasoma; por lo tanto, se valora la habilidad de la Salinosporamida A para inhibir la Actividad PGPH de proteasomas 20S de músculo de conejo purificadas. Un substrato fluorogénico comercialmente disponible específico para la actividad PGPH fue utilizado en lugar del substrato de quimotripsina suministrado en el equipo de ensayo de proteasoma descrito arriba.

Salinosporamida A (II-16) se prepara como una solución de 20 mM en DMSO y almacena en alícuotas pequeñas a -80°C. El substrato Z-LLE-AMC se prepara como una solución de reserva de 20 mM en DMSO, almacena a -20°C. La fuente de los proteasomas fue el equipo comercialmente disponible de Calbiochem (# Cat. 539158). Como con el substrato de quimotripsina, la proteasoma puede desdoblar Z-LLE-AMC en Z-LLE y liberar AMC. La actividad puede determinarse entonces al medir la fluorescencia de AMC liberada ( $\lambda_{ex} = 390$  nm y  $\lambda_{em} = 460$  nm). Los proteasomas se activan con SDS y mantienen en

hielo como por la recomendación del fabricante. Salinosporamida A se diluyó en DMSO para generar una serie de dilución de 8 puntos 400 veces concentrada. La serie se diluyó 20 veces con regulador de ensayo y preincuba con los proteasomas como se describe para la actividad similar a quimotripsina. Después de la adición de sustrato, las muestras se incubaron a 37°C, y la liberación de AMC fluorescente se monitorea en un fluorímetro. Todos los datos se recolectan y diagraman como el promedio de puntos triplicados. En estos experimentos, EC<sub>50</sub> se modela en Prism como actividad normalizada, donde la cantidad de AMC liberada en la ausencia de Salinosporamida A representa 100% de actividad. Como antes, el modelo elegido fue una respuesta a dosis sigmoïdal, con una inclinación variable.

Los datos revelaron que Salinosporamida A inhibió la actividad PGPH en proteasomas 20S de músculo de conejo con un EC<sub>50</sub> de 350 nM (FIG. 28). Un experimento duplicado se realiza, el cual dio un EC<sub>50</sub> predicho de 610 nM. Estos resultados indican que Salinosporamida A no bloquea la actividad PGPH *in vitro* de proteasomas 20S de músculo de conejo purificadas, aunque con potencia inferior que la observada hacia la actividad similar a quimotripsina.

#### EJEMPLO 39

##### INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD SIMILAR A QUIMOTRIPSINA DE

##### PROTEASOMAS 20S DE ERITROCITO HUMANO

La habilidad de Salinosporamida A (II-16) para inhibir la actividad similar a quimotripsina del proteasomas 20S de eritrocito humano se valora *in vitro*. El valor EC<sub>50</sub> calculado es aproximadamente 3 nM (FIG. 29). Estos datos indican que el efecto inhibidor de Salinosporamida A no se limita a proteasomas del músculo esquelético de conejo.

Salinosporamida A se prepara como una solución de 20 mM en DMSO y almacena en alícuotas pequeñas a -80°C. El sustrato, suc-LLVY-AMC, se prepara como una solución de 20 mM en DMSO y almacena a -20°C. Proteasomas 20S de eritrocito humano se obtienen de BIOMOL (# Cat. SE-221). La proteasoma puede desdoblar suc-LLVY-AMC en suc-LLVY y liberar AMC y la actividad puede entonces determinarse al medir la fluorescencia de AMC liberada ( $\lambda_{ex} = 390 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ ). Los proteasomas se activan por SDS y se almacenaron en hielo como con los experimentos que utilizan proteasomas de músculo de conejo. Salinosporamida A se diluyó en DMSO para generar una serie de dilución de 8 puntos 400 veces concentrada. La serie se diluyó entonces 20 veces con regulador de ensayo y pre-incuba con proteasomas a 37°C. La reacción se inicia con sustrato, y la liberación de AMC se sigue en un fluorímetro de microplaca Fluoroskan. Los datos se recolectan y diagraman como el promedio de puntos triplicados. Los datos se capturan cinéticamente por 3 horas, e indican que estas reacciones mostraron cinéticas lineales en este régimen de tiempo. Los datos se normalizaron a reacciones realizadas en la ausencia de Salinosporamida A y modelan en Prism como una pendiente variable, respuesta a dosis sigmoidal.

Experimentos de réplica realizados utilizando proteasomas de eritrocito humano de lotes separados resultaron en un rango de valores  $EC_{50}$  de aproximadamente 4nM. Estos resultados indican que la actividad similar a quimotripsina *in vitro* de proteasomas 20S de eritrocito humano es sensible a Salinosporamida A.

Fórmula II-16 también mostró inhibición de la actividad similar a Caspasa y similar a Tripsina de proteasomas de eritrocito humano. Para similar a Tripsina los estudios mostraron un valor  $EC_{50}$  de aproximadamente 9 nM,

208  
211

y para similar a Caspasa un  $EC_{50}$  de aproximadamente 390 nM. Estudios adicionales de actividad similar a Quimotripsina en eritrocitos humanos resultaron en un  $EC_{50}$  de aproximadamente 250 pM. Además, los estudios mostraron que la Fórmula II-16 es específica para la proteasoma, que muestra poco o nada de efecto en otras enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la Fórmula II-16 cuando se probó para inhibición de Quimotripsina, Catepsina B y Trombina, respectivamente, tuvo valores  $EC_{50}$  de 18,000 nM, >200,000 nm, y > 200,000 nM, respectivamente.

#### EJEMPLO 40

##### ESPECIFICIDAD DE SALINOSPORAMIDA A (II-16)

Un mecanismo posible por el cual Salinosporamida A inhibe la proteasoma es por la reacción de la funcionalidad de  $\beta$ -lactona de Salinosporamida A con la treonina de sitio activo del proteasoma. Esta modificación covalente del proteasoma bloquearía el sitio activo, ya que este residuo es esencial para la actividad catalítica del proteasoma. Fenteany, et al, *J Biol Chem* 273:8545 (1998). Se ha mostrado que un compuesto estructuralmente relacionado, Lactacistina, también inhibe catepsina A (Ostrowska, et al, *Int J Biochem Cell Biol* 32:747 (2000), Kozlowski, et al, *Tumour Biol* 22:211 (2001), Ostrowska, et al, *Biochem Biophys Res Commun* 234:729 (1997)) y TPPII (Geier, et al, *Science* 283:978 (1999)) pero no tripsina, quimotripsina, papaina, calpaina (Fenteany, et al, *Science* 268:726 (1995)), trombina, o activador de plasminógeno (Omura, et al, *J Antibiot (Tokyo)* 44:113 (1991)). Estudios similares se iniciaron para explorar la especificidad de Salinosporamida A para la proteasoma al evaluar su habilidad para inhibir la actividad catalítica de una proteasa de serina prototípica, quimotripsina.

213

209  
213

Salinosporamida A se prepara como una solución de 20 mM en DMSO y almacena en alícuotas pequeñas a -80°C. El sustrato, suc-LLVY-AMC, se prepara como una solución de 20 mM en DMSO y almacena a -20°C. Desdoblamiento proteolítico de este sustrato por ya sea proteasomas o quimotripsina libera AMC producto fluorescente, que puede monitorearse en un fluorímetro ( $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ). Quimotripsina pancreática de bovino se obtuvo de Sigma (# Cat. C-4129), y se prepara como una solución de 5 mg/ml en regulador de ensayo (10 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, pH 7.5) diariamente. Inmediatamente antes del ensayo, la quimotripsina se diluyó en 1  $\mu\text{g/ml}$  (0.2  $\mu\text{g/cavidad}$ ) en regulador de ensayo y se mantiene en hielo. Salinosporamida A se diluyó en DMSO para generar una curva de respuesta a dosis de 8 puntos. Las altas concentraciones finales de Salinosporamida A necesarias para obtener inhibición completa de quimotripsina requerida que la enzima diluida se agregan directamente a las series de dilución del compuesto. La inclusión de 1% DMSO (la concentración final de solvente en las cavidades de prueba) en la reacción no tuvo efecto significativo en la actividad de quimotripsina hacia este sustrato. Las reacciones se pre-incubaban por 5 minutos a 37°C y las reacciones se iniciaron por la adición de sustrato. Los datos se recolectan cinéticamente por una hora a 37°C en Fluoroskan y diagraman como el promedio de puntos de datos triplicados. Los datos se normalizaron a reacciones realizadas en la ausencia de Salinosporamida A, y modelan en Prism como una pendiente variable, respuesta a dosis sigmoideal. La normalización de datos de la inhibición de Salinosporamida A de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20Ss de conejo se ha incluido en la misma gráfica.

212

20  
24

La inhibición promedio observada en dos experimentos que utilizan pretratamiento con Salinosporamida A de quimotripsina fue 17.5  $\mu$ M (FIG. 30 muestra un experimento representativo). Los datos indican que existe una preferencia por inhibición mediada por Salinosporamida A de la actividad similar a quimotripsina *in vitro* de proteasomas sobre la inhibición de la actividad catalítica de quimotripsina.

De esta manera, Salinosporamida A inhibe la actividad similar a quimotripsina y PGPH del proteasoma. Los estudios preliminares indican que Salinosporamida A también inhibe la actividad similar a tripsina del proteasoma con un valor  $EC_{50}$  de  $\sim 10$  nM (datos no mostrados).

#### EJEMPLO 41

INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD DE LUCIFERASA MEDIADA POR NF- $\kappa$ B POR LAS FÓRMULAS II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, II-44, VI-IA Y IV-3C; LÍNEA CELULAR REPORTERA DE LUCIFERASA/HEK293 NF- $\kappa$ B

La línea celular reportera de luciferasa/HEK293 NF- $\kappa$ B es un derivado de la línea celular de riñón embriónico de humano (ATCC; CRL-1573) y lleva un gen reportero de luciferasa bajo la regulación de 5X sitios de unión NF- $\kappa$ B. La línea celular reportera se mantiene de manera rutinaria en medio DMEM completo (DMEM más 10% (v/v) de suero de bovino fetal, 2mM de L-glutamina, 10 mM HEPES y Penicilina/Estreptomicina a 100 IU/ml y 100 $\mu$ g/ml, respectivamente) complementada con 250  $\mu$ g/ml G418. Cuando se realiza el ensayo de luciferasa, el medio básico DMEM se reemplaza con medio básico DMEM libre de fenol rojo y G418 se omite. Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire humectado.

25

24  
213

Para los ensayos de luciferasa mediados por NF- $\kappa$ B, células de luciferasa/HEK293 NF- $\kappa$ B se sembraron en  $1.5 \times 10^4$  células/cavidad en 90  $\mu$ l de medio completo DMEM libre de fenol rojo en placas de cultivo de tejido de fondo opaco blanco

5 Corning 3917. Para las Fórmulas II-2, II-4, II-5A y II-18, una dilución inicial de 400  $\mu$ M se hace en 100% DMSO y esta dilución se utilizó para generar una serie de dilución de log medio de 8 puntos. Esta serie de dilución se diluyó además 40X en medio de cultivo apropiado y alícuotas de diez  $\mu$ l se

10 agregan a las cavidades de prueba por triplicado dando como resultado concentraciones de prueba finales que varían de 1  $\mu$ M a 320 pM. Para las Fórmulas II-3, II-5B, II-8C, II-13C, II-17, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, VI-1A y IV-3C, una dilución inicial de 8mM se hace

15 en 100% DMSO y el mismo procedimiento se sigue como se describe arriba dando como resultado concentraciones de prueba finales que varían de 20  $\mu$ M a 6.3nM. Para las Fórmulas II-16, II-19 y II-44, una dilución inicial de 127  $\mu$ M se hace en 100% DMSO y las concentraciones de prueba finales que

20 varían de 317 nM a 0.1 nM. Para la Fórmula II-20, una dilución inicial de 2.5mM o 8mM se hace en 100% DMSO y las concentraciones de prueba finales que variaron de 6.3  $\mu$ M a 2.0nM o 20  $\mu$ M a 6.3nM respectivamente. Las placas se regresaron a la incubadora por 1 hora. Después de 1 hr de

25 pretratamiento, 10  $\mu$ l de una solución TNF- $\alpha$  de 50 ng/ml, preparada en el medio DMEM libre de fenol rojo se agrega, y las placas se incubaron por un adicional de 6 horas. La concentración final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

Al final de la estimulación de TNF- $\alpha$ , 100  $\mu$ l de

30 reactivo de luciferasa Steady Lite HTS (Packard Bioscience) se agregó a cada cavidad y las placas se dejan sin perturbar por 10 min a temperatura ambiente antes de medir la actividad

212

216

de luciferasa. Las unidades de luciferasa relativas (RLU) se miden al utilizar un fluorómetro de microplaca Fusión (Packard Bioscience). Los valores  $EC_{50}$  (la concentración de droga a la cual 50% de la actividad de luciferasa relativa  
5 máxima se inhibe) se calculó en Prism (GraphPad Software) utilizando un modelo de inclinación variable, respuesta a dosis sigmoidal.

Inhibición de Activación de NF- $\kappa$ B por las Fórmulas II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, II-44, VI-IA y IV-3C  
10

NF- $\kappa$ B regula la expresión de un gran número de genes importantes en inflamación, apoptosis, tumorigénesis, y enfermedades autoinmunes. De esta manera, los compuestos  
15 capaces de modular o afectar la actividad de NF- $\kappa$ B son útiles para tratar enfermedades relacionadas con inflamación, cáncer, y enfermedades autoinmunes, por ejemplo. En su forma inactiva, los complejos de NF- $\kappa$ B con I $\kappa$ B en el citosol y en estimulación, I $\kappa$ B se fosforila, ubiquitina y  
20 subsiguientemente se degrada por la proteasoma. La degradación de I $\kappa$ B conduce a la activación de NF- $\kappa$ B y su transubicación al núcleo. Los efectos de las Fórmulas II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26, II-27, II-28, II-29, II-30, II-44, VI-IA y IV-3C en la activación de  
25 NF- $\kappa$ B se evalúan al valorar la actividad de luciferasa mediada por NF- $\kappa$ B en células HEK293 NF- $\kappa$ B/Luc en la estimulación de TNF- $\alpha$ .

Pretratamiento de las células NF- $\kappa$ B/Luc 293 con las  
30 Fórmulas II-2, II-4, II-5A, II-5B, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-26, II-29, II-30 y II-44 resultó en una disminución dependiente de dosis de la

217

218  
219

que el pretratamiento con la Fórmula II-2 y Fórmula II-4 resultó en una disminución dependiente de dosis de actividad de luciferasa en células NF- $\kappa$ B/Luc 293 en la estimulación de TNF- $\alpha$ . EC<sub>50</sub> calculado para inhibir la actividad de luciferasa inducible por NF- $\kappa$ B en este experimento fue 73 nM para la Fórmula II-2, mientras que el valor EC<sub>50</sub> para la Fórmula II-4 fue 67 nM. Datos similares se observan en un experimento de réplica.

Los resultados de un experimento que evalúa la Fórmula II-5A y Fórmula II-5B se muestran en la FIG. 45 e ilustran que la Fórmula II-5A y Fórmula II-5B inhiben actividad de luciferasa inducible por NF- $\kappa$ B con valores EC<sub>50</sub> de 30 nM y 261 nM respectivamente. Datos similares se observan en un experimento de réplica.

15

#### EJEMPLO 42

#### EFECTO DE SALINOSPORAMIDA A EN LA TRAYECTORIA DE SEÑALIZACIÓN DE NF- $\kappa$ B

Los experimentos se llevan a cabo para estudiar el papel de Salinosporamida A en la trayectoria de señalización NF- $\kappa$ B. Un clon HEK293 estable (NF- $\kappa$ B/Luc 293) se genera llevando un gen reportero de luciferasa bajo la regulación de 5X sitios de unión NF- $\kappa$ B. La estimulación de esta línea celular con TNF- $\alpha$  conduce a actividad de luciferasa incrementada como un resultado de la activación de NF- $\kappa$ B.

25

Las células NF- $\kappa$ B/Luc 293 se pre-tratan con diluciones en serie de log medio de 8 puntos de Salinosporamida A (que varían de 1  $\mu$ M a 317 pM) por 1 hora seguido por una estimulación de 6 horas con TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). Actividad de luciferasa inducible por NF- $\kappa$ B se midió en 6 horas. La viabilidad de las células NF- $\kappa$ B/Luc 293, después del tratamiento con Salinosporamida A por 24 hrs, se valora

30

220

por la adición de tinte de resazurina, como se describe previamente.

Pretratamiento de células NF- $\kappa$ B/Luc 293 con Salinosporamida A resultó en una disminución dependiente de 5 dosis de actividad de luciferasa en la estimulación de TNF- $\alpha$  (FIG. 31, eje y derecho). EC<sub>50</sub> calculado para inhibición de actividad de NF- $\kappa$ B/luciferasa fue ~7 nM. Un ensayo de citotoxicidad se realiza de manera simultánea, y mostró que esta concentración de Salinosporamida A no afectó la 10 viabilidad celular (FIG. 31, eje y izquierdo). Estos datos representativos sugieren que la disminución observada en actividad de luciferasa por tratamiento de Salinosporamida A se debe principalmente a un evento de señalización mediado por NF- $\kappa$ B en lugar de muerte celular.

15 EJEMPLO 40

Además del ensayo de gen reportero de luciferasa NF- $\kappa$ B, el efecto de Salinosporamida A en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada e I $\kappa$ B $\alpha$  total se evalúa por western blot. Los niveles de proteína endógenos se valoran tanto en células 20 HEK293 como el clon reportero NF- $\kappa$ B/Luc 293.

Las células se pre-tratan por 1 hora con Salinosporamida A a las concentraciones indicadas seguidas por estimulación con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  por 30 minutos. Los anticuerpos contra formas fosforiladas y totales de I $\kappa$ B $\alpha$  se 25 utilizan para determinar el nivel endógeno de cada proteína y anticuerpo anti-Tubulina se valora para conformar la carga igual de proteína.

Como se muestra en la FIG. 32, el tratamiento de ambas líneas celulares con Salinosporamida A en 50 y 500 nM 30 no solamente reduce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  total sino que también mantiene el nivel de fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$  cuando se estimula con TNF- $\alpha$ . Estos resultados soportan fuertemente el

225

mecanismo de acción de Salinosporamida A como un inhibidor de proteasoma, que evita la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada en la estimulación de TNF- $\alpha$ .

#### EJEMPLO 41

#### 5 EFECTO DE SALINOSPORAMIDA A EN PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR

La trayectoria de ubiquitina-proteasoma es un sistema proteolítico esencial incluido en el control del ciclo celular al regular la degradación de ciclinas e  
10 inhibidores de quinasa (Cdk) dependientes de ciclina tales como p21 y p27. Pagano, et al, *Science* 269:682 (1995), Kisselev, et al, *Chem Biol* 8:739 (2001), King, et al, *Science* 274:1652 (1996). Además, los niveles de proteína p21 y p27 se incrementan en la presencia de inhibidores de proteasoma.  
15 Fukuchi, et al, *Biochim Biophys Acta* 1451:206 (1999), Takeuchi, et al, *Jpn J Cancer Res* 93:11 A (2002). Por lo tanto, el análisis de western blot se realiza para evaluar el efecto del tratamiento con Salinosporamida A en niveles endógenos de p21 y p27 utilizando las células HEK293 células  
20 y el clon reportero HEK293 NF- $\kappa$ B/Luciferasa.

Las transferencias Western presentadas en la FIG. 33 se vuelven a sondear utilizando anticuerpos contra p21 y p27 para determinar el nivel endógeno de cada proteína y anticuerpo anti-Tubulina se utilizó para conformar carga  
25 igual de proteína.

Como se muestra en la FIG. 33A y 33B, los resultados preliminares indicaron que los niveles de proteína p21 y p27 se elevan cuando ambas líneas celulares se tratan con Salinosporamida A en diversas concentraciones. Los datos  
30 mostraron que Salinosporamida A actúa al inhibir la actividad de proteasoma previniendo así la activación inducida por TNF- $\alpha$  de NF- $\kappa$ B. Además, esta inhibición proteasomal resulta en

222

H8  
222

la acumulación de los inhibidores Cdk, p21 y p27, que se han reportado que sensibilizan las células a apoptosis. Pagano, et al, *supra* (1995), King, et al, *supra* (1996).

#### EJEMPLO 42

##### 5 ACTIVACIÓN DE CASPASA-3 POR SALINOSPORAMIDA A (II-16)

Para dirigir si Salinosporamida A induce apoptosis, su efecto en la inducción de la actividad de Caspasa-3 se evalúa utilizando células Jurkat (Colección de Cultivo del Tipo Americana (ATCC) TIB-152, leucemia de célula T aguda de humano).

Las células Jurkat se colocan en placas a  $2 \times 10^6$  células/3 mL por cavidad en una placa de 6 cavidades e incuban a 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> y 95% (v/v) humedad. Salinosporamida A y Mitoxantrona (Sigma, St. Louis, MO. Cat # M6545), se prepararon en DMSO en concentraciones de reserva de 20 mM y 40 mM, respectivamente. Mitoxantrona es una droga quimioterapéutico que induce apoptosis en células divisoras y no divisoras a través de la inhibición de síntesis de ADN y reparación y se incluye como un control positivo. Bhalla, et al, *Blood* 82:3133 (1993). Las células se tratan con concentraciones de EC<sub>50</sub> (Tabla 5) e incuban 19 horas antes de valorar la actividad de Caspasa-3. Las células tratadas con 0.25% DMSO sirvieron como el control negativo. Las células recolectadas por centrifugación y el medio se removieron. Los sedimentos de célula se procesan para el ensayo de actividad de Caspasa-3 como se describe en el procedimiento del fabricante (Equipo de Ensayo de Caspasa-3 EnzChek de Sondas Moleculares (E-13183; ver Apéndice G, que forma una parte de esta solicitud y también está disponible en el protocolo de transferencia de hipertexto en la red mundial (www) en "probes.com/media/pis/mp13183.pdf.". En resumen, los sedimentos de célula se lisan en hielo, mezclan con los

223

119  
223

componentes de Caspasa-3 EnzChek en una placa de 96 cavidades, y después se incubaron en la oscuridad por 30 minutos antes de leer la fluorescencia de benciloxycarbonil-DEVD-AMC desdoblado utilizando una Fusión Packard con filtros de  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ . Las concentraciones de proteína para lisatos se determinaron utilizando el Equipo de Ensayo de Proteína BCA (Pierce) y estos valores se utilizan para normalización.

Los datos de experimentos representativos indican que el tratamiento con Salinosporamida A de células Jurkat resulta en citotoxicidad y activación de Caspasa-3 (Tabla 5, FIG. 34).

TABLA 5: VALORES EC50 DE CITOTOXICIDAD DE SALINOSPORAMIDA A Y MITOXANTRONA CONTRA CÉLULAS JURKAT

| Compuesto         | Células Jurkat        |                      |
|-------------------|-----------------------|----------------------|
|                   | EC <sub>50</sub> (nM) | % muerte celular max |
| Salinosporamida A | 10                    | 97                   |
| Mitoxantrona      | 50                    | 99                   |

15

EJEMPLO 43

DESDOBLAMIENTO PARP POR SALINOSPORAMIDA A EN CÉLULAS JURKAT

Para valorar la habilidad de Salinosporamida A para inducir apoptosis en células Jurkat, se monitorea el desdoblamiento de poli(ADP-ribose)polimerasa (PARP). PARP es una proteína nuclear de 116 kDa que es uno de los objetivos intracelulares principales de Caspasa-3. Decker, et al, *J Biol Chem* 275:9043 (2000), Nicholson, D.W, *Nat Biotechnol* 14:297 (1996). El desdoblamiento de PARP genera un producto de 89 kDa estable, y este proceso puede monitorearse por western blot. Desdoblamiento de PARP por caspasas es una marca de apoptosis, y como tal sirve como un marcador excelente para este proceso.

224

220  
221

Células Jurkat se mantuvieron en RPMI complementado con 10% Suero de Bovino Fetal (FBS) a baja densidad ( $2 \times 10^5$  células per mL) antes del experimento. Las células se recolectan por centrifugación, y vuelven a suspender en el medio a  $1 \times 10^6$  células por 3 mL. Veinte mL de la suspensión celular se tratan con 100 nM Salinosporamida A (20 mM de DMSO de reserva almacenados a  $-80^\circ\text{C}$ ), y una alícuota de 3 mL se remueve y coloca en hielo para la muestra  $T_0$ . Alícuotas de tres mL de la suspensión celular más Salinosporamida A se colocan en placas de 6 cavidades y se regresaron a la incubadora. Como un control positivo para desdoblamiento de PARP, una suspensión de célula idéntica se trata con 350 nM de Estaurosporina, un inductor de apoptosis conocido (Sigma S5921, 700  $\mu\text{M}$  de DMSO de reserva almacenados a  $-20^\circ\text{C}$ ). Las muestras se remueven en 2, 4, 6, 8, y 24 hrs en el caso de células tratadas con Salinosporamida A, y en 4 hrs para el control de Estaurosporina. Para cada punto en el tiempo, las células se recuperan por centrifugación breve, las células se enjuagan con 400  $\mu\text{L}$  de PBS, y las células se sedimentan de nuevo. Después del retiro de PBS, los sedimentos se se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  antes de SDS PAGE. Cada sedimento de célula se resuspende en 100  $\mu\text{L}$  de regulador de muestra NuPAGE (Invitrogen 46-5030) y 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra se separan en 10% de geles NuPAGE BIS-Tris (Invitrogen NB302). Después de la electrotransferencia a nitrocelulosa, la membrana se sondea con un anticuerpo policlonal de conejo a PARP (Señalización de Célula 9542), seguido por anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina anti-conejo de cabra (Jackson II-055-045). Los anticuerpos unidos se detectan de manera colorimétrica utilizando BCIP/NBT (Roche 1681451).

225

La western blot presentada en la FIG. 35 muestra el desdoblamiento de PARP dentro de las células Jurkat en una manera dependiente del tiempo. La forma desdoblada (denotada por el asterisco, \*) aparece en las células tratadas entre 2 y 4 hrs después de la exposición a Salinosporamida A mientras que la mayoría de PARP restante se desdobla por 24 hrs. Las células tratadas con Estaurosporina (St) muestran rápido desdoblado de PARP con la mayoría de esta proteína desdoblándose dentro de 4 horas. Estos datos sugieren fuertemente que la Salinosporamida A puede inducir apoptosis en células Jurkat.

#### EJEMPLO 44

##### ACTIVIDAD ANTI-ANTRAX

Para analizar la habilidad de Salinosporamida A u otros compuestos para prevenir la muerte celular resultante de exposición LeTx, las células similares a macrófago RAW264.7 y componentes de toxina letal LF y PA recombinantes se utilizan como un sistema de modelo *in vitro* que se analiza para citotoxicidad, como se describe abajo.

Las células RAW264.7 (ATCC # TB-71) se adaptan a y mantienen en Medio Eagle Modificado de Dulbecco Avanzado (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 5% suero de bovino fetal (ADMEM, Mediatech, Herndon, VA) a 37°C en una incubadora humectada al 5% CO<sub>2</sub>. Las células se colocan en placas durante la noche en ADMEM complementado con 5% FBS a 37°C en una incubadora humectada al 5% CO<sub>2</sub> en una concentración de 50,000 células/cavidad en una placa de 96 cavidades. Alternativamente, las células cultivadas en DMEM complementado con 10% suero de bovino fetal también se utilizan y se encuentra que son aptas para este ensayo. Los medios se remueven la siguiente mañana y reemplazan con ADMEM libre de suero con o sin Salinosporamida A o Omuralida a

dosis que varían de 1  $\mu$ M a 0.5 nM para una respuesta a dosis de 8 puntos. Los compuestos se prepararon de una solución de reserva de DMSO de 1 mg/mL y diluyen a la concentración final en ADMEM. Después de una pre-incubación de 15 minutos, 200  
5 ng/mL LF o 400 ng/mL PA solo o en combinación (LeTx) se agregan a las células. LF y PA recombinantes se obtienen de List Biological Laboratories y se almacenaron como soluciones de reserva de 1 mg/mL en agua estéril que contiene 1mg/ml BSA a -80°C como se describe por el fabricante. Las células se  
10 incubaron por 6 horas a 37°C, seguido por la adición de Resazurina como se describe previamente. Las placas se incubaron un adicional de 6 horas antes de valorar la viabilidad celular al medir fluorescencia. Los datos son un resumen de tres experimentos con tres a seis réplicas por  
15 experimento y se expresan como la viabilidad porcentual utilizando DMSO (negativa) y los controles LeTx (positiva) para normalizar los datos utilizando la siguiente ecuación: %  
viabilidad =  $100 * (OD_{\text{observada}} - control_{\text{positivo}}) / (control_{\text{negativo}} - control_{\text{positivo}})$ .

20 Los datos representados en la FIG. 36 indican que el tratamiento con Salinosporamida A puede prevenir la muerte celular inducida por LeTx de células RAW264.7 similares a macrófago *in vitro*. El tratamiento de células RAW con ya sea LF o PA solo o Salinosporamida A sola resultó en poca  
25 reducción en viabilidad celular, mientras que el tratamiento con LeTx resultó en aproximadamente 0.27% viabilidad celular en comparación con los controles. Salinosporamida A puede mejorar la supervivencia del macrófago al inhibir la degradación de proteínas específicas y disminuir la síntesis  
30 de citoquinas, que por último conducirá a la inhibición de los efectos letales de toxinas de ántrax *in vivo*.

227

223  
227

Aunque el tratamiento con Salinosporamida A produjo citotoxicidad muy modesta a concentraciones de 100 nM y arriba, el tratamiento con niveles inferiores, relativamente no tóxicos reveló un incremento marcado en viabilidad celular de RAW 264.7 en células tratadas con LeTx (FIG. 36). Por ejemplo, el grupo tratado con Salinosporamida A + LeTx mostró 82% de viabilidad celular cuando se precalienta con 12 nM de Salinosporamida A, que fue una concentración que mostró 96% de viabilidad con Salinosporamida A sola.  $EC_{50}$  promedio para Salinosporamida A en estos estudios fue 3.6 nM. En contraste, Omuralida mostró relativamente poco efecto en viabilidad celular hasta que las concentraciones de 1  $\mu$ M se alcanzaron. Aún a esta alta concentración de Omuralida, solamente 37% de viabilidad se observa, que indica que la Salinosporamida A es un inhibidor más potente de muerte de célula RAW264.7 inducida por LeTx. Consistente con estos datos, Tang et. al, *Infect Immun* 67:3055 (1999), encontró que las concentraciones  $EC_{50}$  para MG132 y Lactacistina (el precursor para Omuralida) en el ensayo LeTx fueron de 3  $\mu$ M. Tomados juntos, estos datos ilustran además que Salinosporamida A es un inhibidor más potente de citotoxicidad inducida por LeTx que cualquier otro compuesto descrito a la fecha.

Salinosporamida A promovió la supervivencia de células RAW264.7 en la presencia de LeTx que indica que este compuesto o sus derivados pueden ser un terapéutico clínico valuable para ántrax. Además, se observa que Salinosporamida A es mucho menos citotóxica en células RAW 264.7 que para muchas células de tumor.

30

#### EJEMPLO 45

#### ACTIVIDAD DE SALINOSPORAMIDA A CONTRA MIELOMA MÚLTIPLE Y LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA

222

224  
VB

NF-κB puede ser crítico para el crecimiento y resistencia a apoptosis en Mieloma Múltiple y también se ha reportado que es constitutivamente activo en varias líneas celulares de cáncer de próstata (Hideshima T et al. 2002, Shimada K et al. 2002 y Palayoor ST et al. 1999). La actividad de NF-κB se regula por la degradación proteasomal de su inhibidor IκBα. Ya que se ha mostrado que Salinosporamida A inhibe la proteasoma *in vitro* e interfiere con la trayectoria de señalización NF-κB, la actividad de Salinosporamida A contra la línea celular de mieloma múltiple RPMI 8226 y las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y DU 145 se evalúa.

Valores EC<sub>50</sub> se determinaron en ensayos de inhibición del crecimiento estándar utilizando tinte de Resazurina y 48 horas de exposición a la droga. Los resultados de 2-5 experimentos independientes (Tabla 6) muestran que los valores EC<sub>50</sub> para Salinosporamida A contra RPMI 8226 y las líneas de línea celular de próstata varían de 10-37nM.

TABLA 6: VALORES EC<sub>50</sub> DE SALINOSPORAMIDA A (II-16) CONTRA MIELOMA MÚLTIPLE Y LÍNEAS CELULARES DE TUMOR DE PRÓSTATA

| Compuesto            | RPMI 8226 (n=5)                               |                                      | DU 145 (n=3)                                  |                                      | PC-3 (n=2)               |                    |
|----------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------|
|                      | EC <sub>50</sub><br>(nM),<br>promedio<br>± SD | %<br>citotoxicidad,<br>promedio ± SD | EC <sub>50</sub><br>(nM),<br>promedio<br>± SD | %<br>citotoxicidad,<br>promedio ± SD | EC <sub>50</sub><br>(nM) | %<br>Citotoxicidad |
| Salinosporamida<br>A | 10 ± 3                                        | 94 ± 1                               | 37 ± 10                                       | 75 ± 4                               | 31,<br>25                | 88, 89             |

La habilidad de Salinosporamida A para inducir apoptosis en células RPMI 8226 y PC-3 se evalúa al monitorear el desdoblamiento de PARP y Pro-Caspasa 3 utilizando análisis de western blot. Brevemente, las células PC-3 y RPMI 8226 se

285  
229

tratan con 100nM de Salinosporamida A (2345R01) por 0, 8 o 24 horas. Los lisatos de proteína totales se hacen y 20µg de los lisatos se resuelven entonces bajo condiciones de reducción/desnaturalización y transfieren sobre 5 nitrocelulosa. Las transferencias se sondean entonces con anticuerpos anti-PARP o anti-caspasa 3 seguido por separación y resondeo con un anticuerpo anti-actina.

Los resultados de estos experimentos ilustran que el tratamiento con Salinosporamida A de las células RPMI 8226 10 conduce al desdoblamiento de PARP y Pro-caspasa 3 en una manera dependiente de tiempo (FIG. 37). Células RPMI 8226 parecen ser más sensibles a Salinosporamida A que las células PC-3 ya que la inducción de desdoblamiento de PARP ya se nota a las 8 horas y se completa por 24 horas. En contraste, en 15 células PC-3 el desdoblamiento de PARP se nota a las 24 horas, mientras que el desdoblamiento de Pro-Caspasa 3 no se detecta en este experimento (FIG. 37).

Las células RPMI 8226 se utilizan para evaluar el efecto para tratar las células por 8 horas con varias 20 concentraciones de Salinosporamida A. Brevemente, las células RPMI 8226 se tratan con concentraciones variables de Salinosporamida A (2345R01) por 8 horas y se hacen lisatos de proteína. 25 µg de los lisatos se resuelven entonces bajo condiciones de reducción/desnaturalización y transfieren 25 sobre nitrocelulosa. Las transferencias se sondean entonces con anticuerpos anti-PARP o anti-caspasa 3 seguido por separación y resondeo con un anticuerpo anti-actina. FIG. 38 demuestra que Salinosporamida A induce un desdoblamiento dependiente de dosis de tanto PARP como Pro-Caspasa 3.

30

#### EJEMPLO 46

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE MIELOMA MÚLTIPLE DE HUMANO POR LAS FÓRMULAS I-7, II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-

230

13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C,  
II-25, II-26, II-28, II-29, II-30, II-31, II-32, II-38, IV-  
3C, II-44, VI-IA, II-47 Y II-50; CÉLULAS RPMI 8226 Y U266

Las líneas celulares de mieloma múltiple de humano,  
5 RPMI 8226 (ATCC; CCL-155) y U266 (ATCC; TIB-196) se  
mantuvieron en medio de cultivo apropiado. Las células se  
cultivaron en una incubadora a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire  
humectado.

Para ensayos de inhibición del crecimiento celular,  
10 las células RPMI 8226 y U266 se sembraron en  $2 \times 10^4$  y  $2.5 \times 10^4$   
células/cavidad respectivamente en 90  $\mu$ l de medio completo en  
placas de cultivo de tejido de fondo claro, de paredes negras  
Corning 3904. Soluciones de reserva de 20mM de los  
compuestos se prepararon en 100% DMSO, en alícuotas y se  
15 almacenaron a -80°C. Los compuestos se diluyen serialmente y  
agregan por triplicado a las cavidades de prueba. El rango  
de concentración final de las Fórmulas I-7, II-3, II-8C, II-  
5B, II-13C, II-17, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25, II-26,  
II-28, II-29, II-30, II-31, II-32, II-38, IV-3C, VI-IA y II-  
20 47 fue de 20  $\mu$ M a 6.32nM. La concentración final de las  
Fórmulas II-16, II-18, II-19, II-44 y II-50 varió de 632nM a  
200pM. El rango de concentración final de las Fórmulas II-2,  
II-4 y II-5A fue de 2  $\mu$ M a 632pM. La concentración final de  
DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

25 Después de 48 horas de exposición a la droga, 10  $\mu$ l  
de 0.2mg/ml de resazurina (obtenida de Sigma-Aldrich Chemical  
Co.) en salina regulada por fosfato libre de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> se  
agregó a cada cavidad y las placas se regresaron a la  
incubadora por 3-6 horas. Ya que las células vivas  
30 metabolizan Resazurina, la fluorescencia del producto de  
reducción de Resazurina se midió utilizando un fluorómetro de  
microplaca Fusión (Packard Bioscience) con filtros de  $\lambda_{ex}$  =

227  
231

535 nm y  $\lambda_{em}$  = 590 nm. Tinte de resazurina en medio sin células se utilizó para determinar el antecedente, que se substrajo de los datos para todas las cavidades experimentales. Los datos se normalizaron a la fluorescencia promedio de las células tratadas con media + 0.25% DMSO (100% crecimiento celular) y valores  $EC_{50}$  (la concentración de droga a la cual se establece 50% de la inhibición del crecimiento observada máxima) se determinaron utilizando un algoritmo de ajuste de curva de respuesta a dosis sigmoideal estándar (generado por XLfit 3.0 o XLfit 4.0, ID Business Solutions Ltd). Los datos se resumen en las Tablas 12 y 13.

EJEMPLO 47

SALINOSPORAMIDA A (II-16) MANTIENE ACTIVIDAD CONTRA LÍNEAS CELULARES RESISTENTES a la droga

Los valores  $EC_{50}$  de Salinosporamida A contra la línea celular MES-SA de sarcoma uterino de humano y su derivado resistente a múltiples drogas MES-SA/Dx5 se determinaron para evaluar si Salinosporamida A mantiene actividad contra una línea celular que sobreexpresa la bomba de eflujo de glicoproteína P. Paclitaxel, un substrato conocido para la bomba de glicoproteína P se incluye como un control.

TABLA 7: VALORES  $EC_{50}$  DE SALINOSPORAMIDA A CONTRA MES-SA Y EL DERIVADO RESISTENTE a la droga MES-SA/DX5

|                   | MES-SA                   |                                    | MES-SA/Dx5                        |                                    | Cambio de vez |
|-------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------|
|                   | $EC_{50}$ (nM), promedio | % citotoxicidad, promedio $\pm$ SD | $EC_{50}$ (nM), promedio $\pm$ SD | % citotoxicidad, promedio $\pm$ SD |               |
| Salinosporamida A | 20 $\pm$ 5               | 94 $\pm$ 1                         | 23 $\pm$ 1                        | 92 $\pm$ 2                         | 1.2           |
| Paclitaxel        | 5 $\pm$ 2                | 63 $\pm$ 7                         | 2040 $\pm$ 150                    | 78 $\pm$ 1                         | 408           |

282  
23

Los resultados de estos ensayos de inhibición del crecimiento (Tabla 7) muestran que, como se espera, Paclitaxel no mantiene su actividad contra células MES-SA/Dx5 como se refleja por el incremento de 400 veces en los valores EC<sub>50</sub>. Valores EC<sub>50</sub> para Salinosporamida A contra MES-SA y MES-SA/Dx5 fueron similares. Esto ilustra que Salinosporamida A es capaz de inhibir el crecimiento de la línea celular resistente a múltiples drogas MES-SA/Dx5 lo que sugiere que Salinosporamida A no parece ser un substrato para la bomba de eflujo de glicoproteína P.

Además, Salinosporamida A se evalúa contra HL-60/MX2, el derivado resistente a la droga de la línea celular de leucemia de humano, HL-60, caracterizado por tener una actividad de Topoisomerasa II reducida y considerada por tener resistencia a múltiples drogas atípicas. Valores EC<sub>50</sub> para inhibición del crecimiento se determinaron para Salinosporamida A contra HL-60 y HL-60/MX2. El agente de unión a AND Mitoxantrona se incluye como un control, ya que se reporta que las células HL-60/MX2 son resistentes a este agente quimioterapéutico (Harker W. G. et al. 1989).

TABLA 8: VALORES EC<sub>50</sub> DE SALINOSPORAMIDA A CONTRA HL-60 Y EL DERIVADO RESISTENTE a la droga HL-60/MX2

|                   | HL-60                 |                 | HL-60/MX2             |                 | Cambio de vez |
|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|---------------|
|                   | EC <sub>50</sub> (nM) | % citotoxicidad | EC <sub>50</sub> (nM) | % citotoxicidad |               |
| Salinosporamida A | 27, 30                | 88, 91          | 28, 25                | 84, 89          | 1.0, 0.8      |
| Mitoxantrona      | 59, 25                | 98, 100         | 1410, 827             | 98, 99          | 24, 33        |

Los datos en la Tabla 8 revelan que Salinosporamida A fue capaz de mantener su actividad contra células HL-60/MX2 en relación a células HL-60, lo que indica que

30

829  
233

Salinosporamida A está activa en células que expresan actividad de Topoisomerasa II reducida. En contraste, Mitoxantrona fue aproximadamente 29 veces menos activa contra células HL-60/MX2.

5 También se mostró que Salinosporamida A tiene actividad contra líneas celulares de mieloma múltiple resistentes a la droga. Por ejemplo, se mostró que Salinosporamida A es activa contra MM.1R y líneas celulares Dox-40 resistentes a Doxorubicina. Además, se mostró que  
10 Salinosporamida A es activa contra estirpes de células obtenidas de pacientes humanos con mieloma múltiple que han recaído después de múltiples terapias anteriores con Dexametasona, Bortezomib, y talidomida. De esta manera, Salinosporamida A es activa contra mieloma múltiple  
15 resistente a la droga que incluye mieloma múltiple que muestra resistencia a doxorubicina, dexametasona, bortezomib, y talidomida. De manera similar, los otros compuestos descritos en la presente son activos contra mieloma múltiple resistente a la droga que incluye mieloma múltiple que  
20 muestra resistencia a doxorubicina, dexametasona, bortezomib, y talidomida.

#### EJEMPLO 48

#### SALINOSPORAMIDA A Y VARIOS ANÁLOGOS: RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ESTRUCTURA

25 Para establecer una relación de la actividad de estructura (SAR) inicial para Salinosporamida A, una serie de análogos de Salinosporamida A se evalúan contra la línea celular de mieloma múltiple RPMI 8226. Valores EC<sub>50</sub> se determinaron en ensayos de inhibición del crecimiento  
30 estándar utilizando tinte de resazurina y 48 horas de exposición a la droga.

234

232  
236

resultados de la selección de inhibición P450 preliminar mostraron que Salinosporamida A, cuando se probó a 10 $\mu$ M, mostró nada o baja inhibición de todas las isoformas P450: CYP1A2, CYP2C9 y CYP3A4 se inhiben por 3%, 6% y 6% respectivamente, mientras que CYP2D6 y CYP2C19 se inhiben por 19% y 22% respectivamente.

#### EJEMPLO 51

##### SALINOSPORAMIDA A Y SUS EFECTOS *IN VIVO* EN ACTIVIDAD DE PROTEASOMA DE SANGRE COMPLETA

10           Se demuestra previamente que Salinosporamida A es un inhibidor potente y específico del proteasoma *in vitro*, con IC<sub>50</sub> de 2 nM hacia la actividad similar a quimotripsina del proteasomas 20S purificadas. Para monitorear la actividad de Salinosporamida A *in vivo*, se desarrolla un  
15 ensayo rápido y reproducible (adaptado de Lightcap et al. 2000) para valorar la actividad de proteosoma en sangre completa.

          En resumen, muestras de sangre completa congeladas se descongelan en hielo por una hora, y se vuelven a  
20 suspender en 700  $\mu$ L de hielo frío, 5 mM EDTA, pH 8.0 para lisar las células por choque hipotónico. Esto representa aproximadamente 2-3 veces el volumen de las células sanguíneas completas empacadas. La lisis se deja proceder por una hora, y los residuos celulares se remueven por  
25 centrifugación a 14,000 X g por 10 minutos. El sobrenadante (Lisato de Sangre Completa Empacado, PWBL) se transfiere a un tubo fresco, y el sedimento se descarta. La concentración de proteína de PWBL se determina por ensayo BCA (Pierce) que utiliza BSA como un estándar. Aproximadamente 80% de las  
30 muestras tuvo una concentración de proteína total entre 800 y 1200  $\mu$ g/mL.

235

Actividad de proteasoma se determina al medir la hidrólisis de un substrato fluorogénico específico para la actividad similar a quimotripsina del proteasomas (suc-LLVY-AMC, Bachem Cat. 1-1395). Los experimentos de control  
5 indicaron que >98% de la hidrólisis de este péptido en estos extractos se media por la proteasoma. Los ensayos se fijan al mezclar 5  $\mu$ L de PWBL de un animal con 185  $\mu$ L de regulador de ensayo (20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 0.05% SDS, pH 7.3) en placas Costar 3904. Los experimentos  
10 de concentración revelaron que hay una relación lineal entre la concentración de proteína y velocidad de hidrólisis si la concentración de proteína en el ensayo es entre 200 y 1000  $\mu$ g. Las reacciones se iniciaron por la adición de 10  $\mu$ L de 0.4 mM suc-LLVY-AMC (preparada al diluir una solución de 10  
15 mM del péptido en DMSO 1:25 con regulador de ensayo), e incuban en un fluorómetro (Labsystems Fluoroskan) a 37°C. La hidrólisis del substrato resulta en la liberación de AMC libre, que se midió de manera fluorométrica al utilizar  $\lambda_{ex}$  = 390 nm y  $\lambda_{em}$  = 460 nm. La velocidad de hidrólisis en este  
20 sistema es lineal por al menos una hora. La velocidad de hidrólisis de cada muestra se normaliza entonces a unidades fluorescentes relativas por miligramo de proteína (RFU/mg).

Para explorar la actividad *in vivo* de Salinosporamida A, los ratones Webster Suizos macho (5 por  
25 grupo, 20-25g en peso) se tratan con varias concentraciones de Salinosporamida A. Salinosporamida A se administra de manera intravenosa y se da su valor  $\text{LogD}^{7.4}$  de 2.4, sugerente de disponibilidad oral, Salinosporamida A también se administra oralmente. Las soluciones de dosificación de  
30 Salinosporamida A se generan de manera inmediata antes de la administración por dilución de soluciones de reserva de Salinosporamida A (100% DMSO) utilizando 10% de solutol que

234  
238

produce una concentración final de 2% DMSO. El control de  
vehículo consistió de 2% DMSO en 10% solutol. Un grupo de  
animales no se dosifica con ya sea vehículo o Salinosporamida  
A para establecer una línea base para actividad de  
5 proteasoma. Salinosporamida A o vehículo se administra a 10  
mL/kg y noventa minutos después de la administración los  
animales se anestesian y se extrae la sangre por punción  
cardiaca. Las células de sangre completa empacada se  
recolectan por centrifugación, enjuagan con PBS, y re-  
10 centrifugan. Todas las muestras se se almacenaron a -80°C  
antes de la evaluación de la actividad de proteasoma.

Para que sea cierto que la hidrólisis del substrato  
observada en estos experimentos se debe solamente a la  
actividad del proteasoma, los experimentos de respuesta a  
15 dosis en los extractos se realizaron utilizando el inhibidor  
proteasomal altamente específico, Epoxomicina. Lisatos PWBL  
se diluyen 1:40 en regulador de ensayo, y 180  $\mu$ L se agregan a  
placas Costar 3904. Epoxomicina (Calbochem Cat. 324800) se  
diluyó serialmente en DMSO para generar una curva de  
20 respuesta a dosis de ocho puntos, diluye 1:50 en regulador de  
ensayo, y 10  $\mu$ L se agregan a PWBL diluido por triplicado.  
Las muestras se preincuban por 5 minutos a 37°C, y las  
reacciones se iniciaron con substrato como arriba. Las  
curvas de respuesta a dosis se analizan en Prism, utilizando  
25 una respuesta a dosis sigmoidal con inclinación variable como  
un modelo.

FIG. 40 es un diagrama dispensor que despliega la  
actividad de proteasoma normalizada en PWBL derivado de los  
ratones individuales (5 ratones por grupo). En cada grupo,  
30 la barra horizontal representa la actividad normalizada  
promedio. Estos datos muestran que Salinosporamida A causa  
una disminución profunda en actividad proteasomal en PWBL, y

239

235  
239

que esta inhibición es dependiente de dosis. Además, estos datos indican que la Salinosporamida A es activa en administración oral.

La especificidad del ensayo se muestra al examinar el efecto de un inhibidor de proteasoma conocido, Epoxomicina, en hidrólisis del sustrato de péptido. Epoxomicina es un epóxido de péptido que se ha mostrado altamente específico para la proteasoma, sin actividad inhibidora hacia cualquier otra proteasa conocida (Meng et al., 1999). Los lisatos de un control de vehículo y también de animales tratados intravenosamente (i.v.) con 0.1 mg/kg Salinosporamida A se incubaron con concentración variable de Epoxomicina, y se determinaron los valores  $IC_{50}$ . Palayoor et al., *Oncogene* 18:7389-94 (1999). Como se muestra en la FIG. 41, Epoxomicina causó una inhibición dependiente de dosis en la hidrólisis del sustrato de proteasoma.  $IC_{50}$  obtenido en estos experimentos se acopla bien con el valor de 10 nM observado utilizando proteasomas 20S purificadas *in vitro* (no mostradas). Estos datos también indican que la actividad restante hacia este sustrato en estos lisatos preparados de animales tratados con 0.1 mg/kg de Salinosporamida A se debe a la proteasoma, y no a alguna otra proteasa. La actividad residual observada en extractos tratados con altas dosis de Epoxomicina es menor que 2% de la señal total, indicando que arriba del 98% de la actividad observada con suc-LLVY-AMC como un sustrato se debe a la actividad de los proteasomas presentes en PWBL.

También se valora la comparación de variación intra-corrida en la actividad base y la habilidad de Salinosporamida A para inhibir la actividad proteasomal. En la FIG. 42, se muestran los resultados de ensayos que se corren separados por semanas. Qureshi, et al., *J. Immunol.*

240

171(3):1515-25 (2003). Para claridad, solamente el control de vehículo y resultados de dosis de acoplamiento se muestran. Mientras hubo alguna variación en la actividad proteasomal en PWBL derivado de animales individuales en los grupos de control, el promedio total fue muy similar entre los dos grupos. Los animales tratados con Salinosporamida A (0.1 mg/kg i.v.) también muestran actividad residual e inhibición promedio muy similares. Esto sugiere que los resultados entre ensayos pueden compararse con confianza.

10

#### EJEMPLO 52

#### INHIBICIÓN DE TNF INDUCIDA POR LPS *IN VIVO* POR SALINOSPORAMIDA A

Los estudios sugieren que la proteasoma juega un papel en la activación de muchas moléculas de señalización, que incluyen el factor de transcripción NF- $\kappa$ B a través de degradación proteolítica del inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). señalización LPS a través del receptor TLR4 activa NF- $\kappa$ B y otros reguladores transcripcionales que resultan en la expresión de un huésped de genes proinflamatorios como TNF, IL-6, e IL-1 $\beta$ . La expresión continua de citoquinas proinflamatorias se ha identificado como un factor principal en muchas enfermedades. Los inhibidores de TNF e IL-1 $\beta$  han mostrado eficacia en muchos modelos de inflamación que incluyen el modelo de murino LPS, así como también modelos animales de artritis reumatoide y enfermedad del intestino inflamatoria. Los estudios recientes han sugerido que la inhibición del proteasoma puede prevenir la secreción de TNF inducida por LPS (Qureshi et al., 2003). Estos datos sugieren que Salinosporamida A, un nuevo inhibidor de proteasoma potente, puede prevenir la secreción de TNF *in vivo* en el modelo de murino LPS de alta dosis.

30

237  
241

Para valorar la habilidad de Salinosporamida A para inhibir niveles de TNF en plasma inducidos por LPS *in vivo* en ratones, los estudios *in vivo* se iniciaron en BolderBioPATH, Inc. en Boulder, CO. Los siguientes métodos subrayan el  
5 diseño de procedimiento para estos estudios.

Ratones Webster Suizos Macho (12/grupo que pesa 20-25g) se inyectan con LPS (2mg/kg) por la vía i.p. Treinta minutos después, los ratones se inyectan i.v. (vena de la cola) con Salinosporamida A a 2.5 mg/kg después de  
10 aproximadamente 5 minutos bajo una lámpara de calor. Noventa minutos después de la inyección LPS, los ratones se anestesian con Isoflurano y sangran por punción cardiaca para obtener plasma. El sedimento de sangre restante se resuspenden entonces en 500 µL de PBS para enjuagar las  
15 proteínas de suero residuales y centrifugar de nuevo. El sobrenadante se remueve y el sedimento de sangre se congela para análisis de inhibición de proteasoma en lisato de sangre completa empacada.

20

TABLA 11

| ID Grupo                                      | Grupo | n= | Tiempo |              |
|-----------------------------------------------|-------|----|--------|--------------|
|                                               |       |    | 0 min  | +30 min      |
| Sin inyecciones/línea base                    | 1     | 5  |        |              |
| Salina + vehículo solutol                     | 2     | 5  | salina |              |
| Salina + vehículos solutol                    | 3     | 5  | salina | Solutol/DMSO |
| LPS i.p./Vehículo (-30 min)                   | 4     | 12 | LPS    |              |
| LPS i.p./Vehículo (+30 min)                   | 5     | 12 | LPS    | Solutol/DMSO |
| Salina/Salinosporamida A (-30 min) 0.25 mg/kg | 6     | 12 | salina |              |
| Salina/Salinosporamida A (+30 min) 0.25 mg/kg | 7     | 12 | Salina | 0.25 mg/kg   |

242

238  
242

|                                            |   |    |     |            |
|--------------------------------------------|---|----|-----|------------|
| LPS/Salinosporamida A (-30 min) 0.25 mg/kg | 8 | 12 | LPS |            |
| LPS/Salinosporamida A (+30 min) 0.25 mg/kg | 9 | 12 | LPS | 0.25 mg/kg |

Las soluciones de dosificación se prepararon utilizando una solución de reserva de Salinosporamida A de 10mg/mL en 100% DMSO. Un 10% de solución de solutol se prepara al diluir p/p con agua libre de endotoxina y una dilución 1:160 se hace de la reserva de Salinosporamida A de 10mg/ml. Los animales se dosifican i.v. con 4ml/kg. Una solución de control de vehículo también se prepara al hacer la misma dilución 1:160 con 100% DMSO en 10% de solución de soluto lo que da una concentración final de 9.375% solutol en agua y 0.625% DMSO. Las mediciones de TNF en plasma se realizaron utilizando el equipo Biosource mTNF Cytoset (Biosource Intl., Camarillo, CA; # catálogo CMC3014) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se diluyen 1:60 para el ensayo.

Los datos de dos experimentos independientes con al menos diez animales de réplica por grupo indicaron que el tratamiento con 0.125 o 0.25 mg/kg Salinosporamida A disminuye la secreción de TNF inducida por LPS *in vivo*. Un experimento representativo se muestra en la FIG. 43. Estos datos revelan que el tratamiento de animales con 0.25 mg/kg de Salinosporamida A treinta minutos después la inyección de LPS de 2 mg/kg resultó en reducción significativa en niveles de TNF en suero. Las muestras de sangre completa empacada también se analizan para inhibición de proteasoma *ex vivo* que revela 70±3% de inhibición en animales tratados con 0.125 mg/kg y 94±3% en animales tratados con 0.25 mg/kg. No se observan diferencias significativas en inhibición de

239  
243

proteasoma en animales tratados con o sin LPS. Salinosporamida A reduce los niveles de TNF en plasma inducidos por LPS por aproximadamente 65% cuando se administra a 0.125 o 0.25 mg/kg i.v. en ratones 30 minutos  
5 después de tratamiento LPS.

#### EJEMPLO 53

#### EFFECTOS DE QUIMIOSENSIBILIZACIÓN *IN VITRO* DE SALINOSPORAMIDA A

Los agentes de quimioterapia tal como CPT-11  
10 (Irinotecan) pueden activar el factor nuclear del factor de transcripción-kappa B (NF- $\kappa$ B) en líneas celulares de cáncer de colón humano que incluyen células LoVo, dando como resultado una habilidad disminuida de estas células para experimentar apoptosis. Cusack, et al, *Cancer Res* 61:3535  
15 (2001). En células no estimuladas, NF- $\kappa$ B reside en el citoplasma en un complejo inactivo con la proteína inhibidora I $\kappa$ B (inhibidor de NF- $\kappa$ B). Varios estímulos pueden causar la fosforilación de I $\kappa$ B por quinasa I $\kappa$ B, seguido por la ubiquitinación y degradación de I $\kappa$ B por la proteasoma.  
20 Después de la degradación de I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B se transubica al núcleo y regula la expresión genética, afectando muchos procesos celulares, que incluye suprarregulación de genes de supervivencia inhibiendo así apoptosis.

El inhibidor de proteasoma recientemente aprobado,  
25 Velcade™ (PS-341; Millennium Pharmaceuticals, Inc.), es directamente tóxico para células cancerígenas y también puede mejorar la actividad citotóxica de CPT-11 contra células LoVo *in vitro* y en un modelo de xenoinjerto LoVo al inhibir la degradación inducida por proteasoma de I $\kappa$ B. Adams, J., *Eur J*  
30 *Haematol* 70:265 (2003). Además, se encontró que Velcade™ inhibe la expresión de quimoquinas/citoquinas proangiogénicas GRO- $\alpha$  y VEGF en carcinoma de célula escamosa, presumiblemente

244

a través de inhibición de la trayectoria NF- $\kappa$ B. Sunwoo, et al, *Clin Cancer Res* 7:1419 (2001). Los datos indican que la inhibición de proteasoma puede no solamente disminuir el crecimiento y supervivencia de la célula de tumor, sino que también la angiogénesis.

#### EJEMPLO 54

##### INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE MIELOMA MÚLTIPLE DE COLÓN, PRÓSTATA, MAMA, PULMÓN, OVARIO Y MELANOMA

Las células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29; HTB-38), adenocarcinoma de próstata (PC-3; CRL-1435), adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231; HTB-26), carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NCI-H292; CRL-1848), adenocarcinoma de ovario (OVCAR-3; HTB-161), mieloma múltiple (RPMI 8226; CCL-155), mieloma múltiple (U266; TEB-196) y melanoma de ratón (B16-F10; CRL-6475) se compran todas de ATCC y mantienen en medio de cultivo apropiado. Las células se cultivaron en una incubadora 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire humectado.

Para ensayos de inhibición del crecimiento celular, las células HT-29, PC-3, MDA-MB-231, NCI-H292, OVCAR-3 y B16-F10 se sembraron en  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1.25 \times 10^3$  células/cavidad respectivamente en 90  $\mu$ l de medio completo en placas de cultivo de tejido de fondo claro, paredes negras de 96 cavidades (Corning; 3904) y las placas se incubaron durante la noche para permitir que las células se establezcan y entren al crecimiento de fase log. Las células RPMI 8226 y U266 se sembraron en  $2 \times 10^4$  y  $2.5 \times 10^4$  células/cavidad respectivamente en 90  $\mu$ l de medio completo en placas de 96 cavidades el día del ensayo. Soluciones de reserva de 20mM de los compuestos se prepararon en 100% DMSO y se almacenaron a -80°C. Los compuestos se diluyen serialmente y agregan por triplicado a las cavidades de

24  
295

prueba. Concentraciones que varían de  $6.32\mu\text{M}$  a  $632\text{pM}$  se probaron para II-2 y II-4. II-3 y II-17 se probaron en concentraciones que varían de  $20\mu\text{M}$  a  $6.32\text{nM}$ . Las Fórmulas II-18 y II-19 se probaron en concentraciones que varían de  $2\mu\text{M}$  a  $200\text{pM}$ . La Fórmula II-5A y Fórmula II-5B se probaron en concentraciones finales que varían de  $2\mu\text{M}$  a  $632\text{pM}$  y  $20\mu\text{M}$  a  $6.32\text{nM}$  respectivamente. Las placas se regresaron a la incubadora por 48 horas. La concentración final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

Después de 48 horas de exposición a la droga,  $10\mu\text{l}$  de  $0.2\text{mg/ml}$  resazurina (obtenida de Sigma-Aldrich Chemical Co.) en salina regulada por fosfato libre de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  se agregó a cada cavidad y las placas se regresaron a la incubadora por 3-6 horas. Ya que las células vivas metabolizan Resazurina, la fluorescencia del producto de reducción de Resazurina se midió utilizando un fluorómetro de microplaca Fusión (Packard Bioscience) con filtros de  $\lambda_{\text{ex}} = 535\text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 590\text{ nm}$ . Tinte de resazurina en medio sin células se utilizó para determinar el antecedente, que se substrajo de los datos para todas las cavidades experimentales. Los datos se normalizaron a la fluorescencia promedio de las células tratadas con media + 0.25% DMSO (100% crecimiento celular) y valores  $\text{EC}_{50}$  (la concentración de droga a la cual se establece 50% de la inhibición del crecimiento observada máxima) se determinaron utilizando un algoritmo de ajuste de curva de respuesta a dosis sigmoidal estándar (XLfit 3.0, ID Business Solutions Ltd). Donde la inhibición máxima de crecimiento celular fue menor a 50%, un valor  $\text{EC}_{50}$  no se determina.

Los datos en la Tabla 12 resumen los efectos inhibidores del crecimiento de las Fórmulas II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-17, II-18 y II-19 contra las líneas

202

242  
296

celulares de carcinoma colorectal de humano, HT-29, carcinoma de próstata de humano, PC-3, adenocarcinoma de mama de humano, MDA-MB-231, carcinoma de pulmón de célula no pequeña de humano, NCI-H292, carcinoma ovárico de humano, OVCAR-3, 5 mielomas múltiples de humano, RPMI 8226 y U266 y melanoma de murino B16-F10.

TABLA 12

VALORES EC<sub>50</sub> DE LAS FÓRMULAS II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-17, II-18 Y II-19 CONTRA VARIAS LÍNEAS CELULARES DE TUMOR

10

| Línea celular | EC <sub>50</sub> (nM) * |                  |                |          |              |                  |                |            |
|---------------|-------------------------|------------------|----------------|----------|--------------|------------------|----------------|------------|
|               | II-2                    | II-3             | II-4           | II-5A    | II-5B        | II-17            | II-18          | II-19      |
| HT-29         | 129±21                  | >20000           | 132±36         | 67±17    | 1070<br>1210 | >20000           | 18±7.8         | 11±1.0     |
| PC-3          | 284±110                 | >20000           | 204±49         | 109±15   | 1330<br>1790 | >20000           | 35±5.6         | 29±4.0     |
| MDA-MB-231    | 121±23                  | >20000           | 114±4          | 61±4.6   | 1040<br>957  | 5900±601         | 16±2.8         | 14±3.2     |
| NCI-H292      | 322<br>395              | >20000<br>>20000 | 192<br>213     | 102±19   | 992<br>1250  | >20000<br>>20000 | 29<br>41       | 27±3.2     |
| OVCAR-3       | 188<br>251              | >20000           | >6320<br>>6320 | 80<br>64 | 1320         | >20000<br>>20000 | >2000<br>>2000 | 24<br>20   |
| RPMI 8226     | 49<br>45                | >20000<br>>20000 | 57<br>51       | 36<br>29 | 326<br>328   | 6150<br>3460     | 6.3<br>6.3     | 5.9<br>7.1 |
| U266          | 39<br>32                | >20000<br>>20000 | 39<br>34       | 10<br>9  | 118<br>111   | 1620<br>1710     | 4.2<br>4.2     | 3.2<br>3.4 |
| B16-F10       | 194<br>180              | >20000<br>>20000 | 163<br>175     | 78±11    | 1270<br>1140 | 10500<br>10300   | 19<br>36       | 13±1.5     |

\* DONDE N=3, SE PRESENTA PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Los valores EC<sub>50</sub> indican que las Fórmulas II-2, II-4, II-5A, II-5B, II-18 y II-19 fueron citotóxicos contra las

242

Para ensayos de inhibición del crecimiento celular, células MES-SA y MES-SA/Dx5 se sembraron ambas en  $3 \times 10^3$  células/cavidad en  $90 \mu\text{l}$  de medio completo en placas de cultivo de tejido de fondo claro, paredes negras de 96 cavidades (Corning; 3904) y las placas se incubaron durante la noche para permitir que las células se establezcan y entren al crecimiento de fase log. Células HL-60 y HL-60/MX2 se sembraron ambas en  $5 \times 10^4$  células/cavidad en  $90 \mu\text{l}$  de medio completo en placas de 96 cavidades el día de la adición del compuesto. Soluciones de reserva de 20mM de los compuestos se prepararon en 100% DMSO y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . Los compuestos se diluyen serialmente y agregan por triplicado a las cavidades de prueba. Concentraciones que varían de  $6.32 \mu\text{M}$  a 2nM se probaron para II-2 y II-4. II-3 y II-17 se probaron en concentraciones que varían de  $20 \mu\text{M}$  a  $6.32 \text{nM}$ . El compuesto II-18 se probó en concentraciones que varían de  $2 \mu\text{M}$  a  $632 \text{pM}$ . Las placas se regresaron a la incubadora por 48 horas. La concentración final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

Después de 48 horas de exposición a la droga,  $10 \mu\text{l}$  de 0.2mg/ml Resazurina (obtenida de Sigma-Aldrich Chemical Co.) en salina regulada por fosfato libre de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  se agregó a cada cavidad y las placas se regresaron a la incubadora por 3-6 horas. Ya que las células vivas metabolizan Resazurina, la fluorescencia del producto de reducción de Resazurina se midió utilizando un fluorómetro de microplaca Fusión (Packard Bioscience) con filtros de  $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ . Tinte de resazurina en medio sin células se utilizó para determinar el antecedente, que se substrajo de los datos para todas las cavidades experimentales. Los datos se normalizaron a la fluorescencia promedio de las células tratadas con media + 0.25% DMSO (100%

249  
B

|              |    |      |      |
|--------------|----|------|------|
| Mitoxantrona | 42 | 1340 | 30.6 |
|              | 40 | 1170 |      |

\* Cambio de vez = la proporción de los valores EC<sub>50</sub> (HL-60/MX2 : HL-60)

Los valores EC<sub>50</sub> indican que II-2, II-4 y II-18 mantuvieron actividad citotóxica contra tanto líneas celulares de tumor HL-60 como HL-60/MX2. El fenotipo resistente a múltiples drogas se confirma por la observación que Mitoxantrona fue ~30 veces menos activa contra las células HL-60/MX2 resistentes.

#### EJEMPLO 56

10 LOS EFECTOS DE LA FÓRMULA II-16, FÓRMULA II-17, FÓRMULA II-20 Y OMURALIDA EN LA ACTIVIDAD SIMILAR A QUIMOTRIPSINA DE PROTEASOMAS 20S EN CÉLULAS RPMI 8226

RPMI 8226 (ATCC, CCL-155), la línea celular de mieloma múltiple de humano, se cultiva en medio RPMI 1640 complementado con 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 1 mM de piruvato de sodio y 10% suero de bovino fetal inactivado por calor a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire humectado. Para evaluar los efectos inhibidores en la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S, compuestos prueba preparados en DMSO se diluyen de manera apropiada en medio de cultivo y agregan a 2.5x10<sup>5</sup>/ml células RPMI 8226. Para la Fórmula II-16, las concentraciones de prueba finales variaron de 1 nM a 100 nM. Para la Fórmula II-17, Fórmula II-20 y Omuralida (Calbiochem, San Diego, CA), las concentraciones de prueba finales variaron de 1 nM a 10 µM. DMSO se utilizó como el control de vehículo en una concentración final de 0.1%. Después de 1 hr de incubación de células RPMI 8226 con los compuestos, las células se sedimentan por centrifugación a 2,000 rpm por 10 seg a temperatura ambiente y enjuaga 3X con Salina Regulada

254

por Fosfato de Dulbecco IX frío (DPBS, Mediatech, Herndon, VA). Las células enjuagadas con DPBS se lisan en hielo por 15 min en regulador de lisis (20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, pH 7.3) complementado con cocktail de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Los residuos celulares se sedimentan por centrifugación a 14,000 rpm por 10 min, 4°C y sobrenadantes (=lisatos celulares) se transfieren a un nuevo tubo. La concentración de proteína se determina por el equipo de ensayo de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S se midió al utilizar el substrato de péptido fluorogénico Suc-LLVY-AMC (Boston Biochem, Cambridge, MA) en el regulador de ensayo de proteasoma (20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 8.0) que contiene una concentración final de 0.035% SDS. Las reacciones se iniciaron por la adición de 10  $\mu$ L de 0.4 mM Suc-LLVY-AMC (preparadas al diluir una solución de 10 mM del péptido en DMSO 1:25 con regulador de ensayo) a 190  $\mu$ L de los lisatos celulares e incuban en el lector de placa Thermo Lab Systems Fluoroskan a 37°C. Cumarina liberada (AMC) se midió fluorométricamente al utilizar  $\lambda_{\text{ex}} = 390$  nm y  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (Corning 3904) y se sigue cinéticamente con mediciones cada cinco minutos por 2 hr. La cantidad total de proteína utilizada para cada ensayo fue 20  $\mu$ g. La concentración final de Suc-LLVY-AMC y DMSO fue 20  $\mu$ M y 0.2%, respectivamente. Los resultados se presentan como la inhibición porcentual de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S relativa al control DMSO.

Los resultados en la Tabla 16 muestran que la exposición de células RPMI 8226 células a la Fórmula II-16, Fórmula II-17, Fórmula II-20 y Omuralida resultó en

255

252  
256

por calor a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire humectado. Para evaluar los efectos inhibidores en la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S, compuestos de prueba preparados en DMSO se diluyen de manera apropiada en medio de cultivo y agregan a 1.25x10<sup>5</sup>/ml células PC-3. Para la Fórmula II-16, las concentraciones de prueba finales variaron de 1 nM a 50 nM. Para la Fórmula II-17, Fórmula II-20 y Omuralida (Calbiochem, San Diego, CA), las concentraciones de prueba finales variaron de 1 nM a 10 µM. DMSO se utilizó como el control de vehículo a una concentración final de 0.1%. Después de 1 hr de incubación de células PC-3 con los compuestos, las células se enjuagan 3X con Salina Regulada por Fosfato de Dulbecco 1X fría (DPBS, Mediatech, Hemdon, VA). Las células enjuagadas con DPBS se lisan en hielo por 15 min en regulador de lisis (20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, pH 7.3) complementado con cocktail de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Los residuos celulares se sedimentan por centrifugación a 14,000 rpm por 10 min, 4°C y sobrenadantes (=lisatos celulares) se transfieren a un nuevo tubo. La concentración de proteína se determina por el equipo de ensayo de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La actividad similar a quimotripsina del proteasoma 20S se midió al utilizar el sustrato de péptido fluorogénico Suc-LLVY-AMC (Boston Biochem, Cambridge, MA) en el regulador de ensayo de proteasoma (20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 8.0) que contiene una concentración final de 0.035% SDS. Las reacciones se iniciaron por la adición de 10 µL de 0.4 mM Suc-LLVY-AMC (preparada al diluir una solución de 10 mM del péptido en DMSO 1:25 con regulador de ensayo) a 190 µL de los lisatos celulares e incuban en el lector de placa Thermo Lab Systems Fluoroskan a 37°C. La cumarina liberada (AMC) se midió

257

|           |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|
| II-20     | 90 | 71 | 57 | ND | 38 | ND | ND |
| Omuralida | 90 | 80 | 36 | ND | 18 | ND | ND |

ND: sin determinar

EJEMPLO 58

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE MIELOMA MÚLTIPLE DE HUMANO,  
RPMI 8226, ADENOCARCINOMA DE COLÓN DE HUMANO, HT-29 Y  
5 MELANOMA DE MURINO, CÉLULAS B16-F10 EN MEDIOS QUE CONTIENEN  
1% O 10% DE SUERO

La actividad inhibidora del crecimiento de las  
Fórmulas II-16, II-17 y Fórmula II-18 contra células de  
mieloma múltiple de humano, RPMI 8226, adenocarcinoma de  
10 colón de humano, HT-29 y melanoma de ratón, B16-F10 en la  
presencia de 1% o 10% suero de bovino fetal (FBS) se  
determina.

Las células RPMI 8226 (CCL-155), HT-29 (HTB-38), y  
B16-F10 (CRL-6475) se compran de ATCC. Células RPMI 8226 se  
15 mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con 10%(v/v)  
FBS, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio y  
Penicilina/Estreptomicina a 100 IU/ml y 100µg/ml,  
respectivamente. Células HT-29 se mantuvieron en McCoys 5 A  
complementado con 10%(v/v) FBS, 2mM de L-glutamina, 1mM de  
20 piruvato de sodio, 1%(v/v) aminoácidos no esenciales, 10mM  
HEPES y Penicilina/Estreptomicina a 100 IU/ml y 100µg/ml,  
respectivamente. Células B16-F10 se mantuvieron en DMEM  
complementado con 10%(v/v) FBS, 2mM de L-glutamina, 10mM  
HEPES y Penicilina/Estreptomicina a 100 IU/ml y 100µg/ml,  
25 respectivamente. Las células se cultivaron en una incubadora  
a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire humectado.

Para ensayos de inhibición del crecimiento celular,  
células HT-29 y B16-F10 se sembraron en 5x10<sup>3</sup>, y 1.25x10<sup>3</sup>  
células/cavidad respectivamente en 90µl de medio que contiene  
30 10%(v/v) FBS o 1%(v/v) FBS en placas de cultivo de tejido de

255  
259

fondo claro, paredes negras de 96 cavidades (Corning; 3904). Las placas se incubaron durante la noche para permitir que las células se establezcan y entren al crecimiento de fase log. Células RPMI 8226 se sembraron en  $2 \times 10^4$  células/cavidad en 90  $\mu$ l de medio RPMI que contiene 10% (v/v) FBS o 1% (v/v) FBS en placas de cultivo de tejido de fondo claro, de paredes negras de 96 cavidades. Soluciones de reserva de 20mM de las Fórmulas II-16, II-17 y Fórmula II-18 se prepararon en 100% DMSO, en alícuotas y se almacenaron a - 80°C. Fórmulas II-16, II-17 y Fórmula II-18 se diluyen serialmente en medio que contiene 1% o 10% FBS y agregan por triplicado a las cavidades de prueba. La concentración final de la Fórmula II-16 varió de 2  $\mu$ M a 200pM. El rango de concentración final de la Fórmula II-17 fue de 20  $\mu$ M a 6.3nM. La concentración final de la Fórmula II-18 varió de 2  $\mu$ M a 630pM. Las placas se regresaron a la incubadora por 48 horas. La concentración final de DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

Después de 48 horas de exposición a la droga, 10  $\mu$ l de 0.2mg/ml de resazurina (obtenida de Sigma-Aldrich Chemical Co.) en salina regulada por fosfato libre de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  se agregó a cada cavidad y las placas se regresaron a la incubadora por 3-6 horas. Ya que las células vivas metabolizan Resazurina, la fluorescencia del producto de reducción de Resazurina se midió utilizando un fluorómetro de microplaca Fusión (Packard Bioscience) con filtros de  $\lambda_{ex} = 535$  nm y  $\lambda_{em} = 590$  nm. Tinte de resazurina en medio sin células se utilizó para determinar el antecedente, que se substrajo de los datos para todas las cavidades experimentales. Los datos se normalizaron a la fluorescencia promedio de las células tratadas con media + 0.25% DMSO (100% crecimiento celular) y valores  $EC_{50}$  (la concentración de droga

260

patogénesis de ántrax. Estas proteínas se conocen colectivamente como la toxina letal (LeTx). Cuando se combinan, PA y LF causan la muerte cuando se inyectan de manera intravenosa en animales. La toxina letal también está activa en unas pocas estirpes de cultivo de célula de macrófagos lo que causa la muerte celular dentro de unos pocas horas. LeTx puede inducir tanto necrosis como apoptosis en células RAW264.7 similares a macrófago en tratamiento *in vitro*.

10 Ensayo en Base a Célula In Vitro para Inhibidores de Citotoxicidad Mediada por Toxina Letal

Células RAW264.7 (obtenidas de la Colección de Cultivo del Tipo Americana) se adaptan y mantienen en medio RPMI-1640 complementado con 10% suero de bovino fetal, 2mM de L-glutamina y 1% Penicilina/Estreptomicina (medio completo) a 37°C en una incubadora al 5% CO<sub>2</sub> humectada. Para el ensayo, las células se colocan en placas durante la noche en medio completo a una concentración de de 50,000 células/cavidad en una placa de 96 cavidades. Los medios se remueven al siguiente día y reemplazan con medio completo libre de suero con o sin concentraciones variables de las Fórmulas II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-13C, II-17, II-18 y IV-3C que inician en 330nM y diluyen en intervalos ½ log para una respuesta a dosis de 8 puntos. Después de una preincubación de 45 minutos, 1µg/ml LF y 1µg/ml PA solo o en combinación (LF:PA, también denominada toxina letal (LeTx)) se agregan a las células. LF y PA recombinantes se obtienen de List Biological Laboratories. Las placas adicionales sin LeTx agregado se incluyen como un control. Las células se incubaron entonces por seis horas seguido por la adición de 0.02 mg/ml de tinte de resazurina (Sondas Moleculares, Eugene, OR) preparado en PBS libre de Mg++, Ca++ (Mediatech,

263

259  
263

Herndon, VA). Las placas se incubaron entonces un adicional de 1.5 hora antes de la valoración de la viabilidad celular. Ya que resazurina se metaboliza por células vivas, la citotoxicidad o viabilidad celular pueden valorarse al medir fluorescencia utilizando filtros de excitación 530 y emisión 590. Los datos se expresan como la viabilidad porcentual en comparación con un control solo DMSO (alto) y el control solo LeTx (bajo) que utilizan la siguiente ecuación: Viabilidad porcentual =  $100 * ((OD \text{ Medida-control bajo}) / (\text{control alto-control bajo}))$ .

Inhibición de Citotoxicidad mediada por Toxina Letal de Ántrax en Células RAW 264.7

Los datos en la FIG. 48 resumen los efectos de la Fórmula II-2, Fórmula II-3 y Fórmula II-4 contra citotoxicidad mediada por LeTx de la línea celular similar a macrófago de murino RAW 264.7. El tratamiento de células RAW 264.7 con la Fórmula II-2 y Fórmula II-4 resultó en un incremento en la viabilidad de células tratadas con LeTx con valores  $EC_{50}$  de 14nM (FIG. 48). Los valores  $EC_{50}$  para la Fórmula II-3 para protección contra LeTx no se determinaron a las concentraciones probadas ( $EC_{50} > 330nM$ , la concentración máxima evaluada). Los datos en la Tabla 19 muestran los efectos de las Fórmulas II-5A, II-5B, II-13C, II-17, II-18 y FV-3C contra citotoxicidad mediada por LeTx de la línea celular similar a macrófago de murino RAW 264.7. El tratamiento de células RAW 264.7 con la Fórmula II-5A y II-18 mostró un incremento en la viabilidad de células RAW 264.7 tratadas con LeTx con valores  $EC_{50}$  de 3nM y 4nM respectivamente. El tratamiento con la Fórmula II-17 y Fórmula II-5B resultó en un incremento en la viabilidad de células tratadas con LeTx con valores  $EC_{50}$  de 42nM y 45nM respectivamente. Los valores  $EC_{50}$  para las Fórmulas II-13C y

264

261  
265

| Compuesto | R <sub>1</sub>                     | Citotoxicidad<br>EC <sub>50</sub> RPMI<br>(nM) | NF-κB<br>EC <sub>50</sub><br>(nM) | EC <sub>50</sub> (nM)<br>similar a<br>quimotripsina<br>de proteasoma | EC <sub>50</sub> (nM)<br>similar a<br>tripsina<br>de<br>proteasoma | EC <sub>50</sub> (nM)<br>similar a<br>caspasa de<br>proteasoma |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| II-16     | CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl | 8.6 ± 1.9                                      | 11 ± 3                            | 2.6 ± 0.2                                                            | 21±2.6                                                             | 427 ± 61                                                       |
| II-18     | CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Br | 6.3, 6.3                                       | 11, 9                             | 2.3, 2                                                               | 14, 14                                                             | 286, 213                                                       |
| II-19     | CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> I  | 6, 7                                           | 10, 7                             | 3, 3                                                                 | 13, 15                                                             | 573, 739                                                       |
| II-17     | CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>    | 6150, 3460                                     | 960 ±<br>210                      | 26±6.7                                                               | 573, 602                                                           | 1247, 1206                                                     |
| II-20     | CH <sub>3</sub>                    | 8510 ± 3260                                    | 849 ±<br>225                      | 7.7±3.0                                                              | 318, 321                                                           | 1425, 1420                                                     |
| II-21     | CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH | >20000,<br>>20000                              | 3172,<br>2707                     | 7, 8                                                                 | 720, 879                                                           | 2585, 2328                                                     |

Los resultados de los ensayos anteriores pueden interpretarse para sugerir que los compuestos que tienen grupos R<sub>1</sub> de cloroetilo, bromoetilo, o yodoetilo son  
5 inhibidores potentes de proteasoma y muestran citotoxicidad muy potente. En contraste, los compuestos que tienen grupos R<sub>1</sub> de metilo, etilo, o hidroxietilo mostraron citotoxicidad relativamente inferior (disminución 3-log en potencia), inhibición de NF-κB inferior (disminución 3-log en potencia),  
10 y una inhibición inferior de proteasoma similar a caspasa (2 a 10 veces menos potente) y similar a tripsina (20 a 50 veces menos potente).

Sin limitarse a ninguna teoría particular, los Solicitantes observan que los resultados anteriores soportan  
15 la hipótesis de que la actividad incrementada de los compuestos que contienen Cl, Br, o I en el grupo R<sub>1</sub> puede deberse a la propiedad del halógeno de ser un buen grupo saliente. Esta hipótesis se soporta por el hecho de que la

268

267  
268

(2000), páginas 398 y 408; todas de las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad.

#### EJEMPLO 61

##### RELACIONES DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

5            Los datos establecidos en las Tablas enlistadas arriba ilustran un número de modalidades preferidas. Con respecto a la Fórmula II, los compuestos que tienen un sustituyente halogenado en  $R_1$  se prefieren y tales compuestos son generalmente equipotentes a través de los  
10    ensayos descritos arriba. Es más preferido etilo n-halogenado en  $R_1$ .

          También, son más preferidos los compuestos con un grupo hidroxilo en  $E_5$  y el carbono unido está en una conformación S (compuestos que tienen la estereoquímica del  
15    compuesto II-18, por ejemplo). La oxidación de un grupo hidroxilo a una acetona se prefiere menos.

          En una modalidad preferida, el sustituyente preferido en  $R_4$  es ciclohexeno. En otra modalidad preferida, el ciclohexeno se oxida en un epóxido. Los menos preferidos  
20    son compuestos con hidrogenación del enlace doble del sustituyente de ciclohexeno.

          Además, en algunas modalidades, preferentemente,  $R_3$  es metilo, con etilo siendo menos preferido.

#### EJEMPLO 62

##### INHIBICIÓN DE ANGIOGÉNESIS

25            La angiogénesis es un proceso fisiológico importante, sin el cual el desarrollo embrionario y curación no herida no ocurrirían. Sin embargo, la angiogénesis inapropiada o excesiva se asocia con un número de  
30    enfermedades, condiciones y resultados de tratamiento adversos. Ejemplos de tipos de enfermedad y condiciones asociadas con angiogénesis excesiva incluyen desordenes

262

inflamatorios tales como inflamación inmune y no inmune, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico y psoriasis; desordenes asociados con invasión inapropiada o inoportuna de vasos tales como retinopatía diabética, 5 glaucoma neovascular, retinopatía de premadurez, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, fibroplasia retrolental, rubeosis, proliferación capilar en placas ateroescleróticas y osteoporosis; y desordenes asociados a cáncer, que incluyen por ejemplo, tumores sólidos, metástasis de tumor, tumores 10 originados en la sangre tales como leucemias, angiofibromas, sarcoma de Kaposi, tumores benignos tales como hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas, y granulomas biogénicos, así como también otros cánceres que requieren neovascularización para soportar el crecimiento del tumor.

15 Ejemplos adicionales de enfermedades dependientes de angiogénesis incluyen, por ejemplo, Síndrome Osler-Webber; angiogénesis miocardial, neovascularización de placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas y granulación de herida. Además, la angiogénesis excesiva también se asocia 20 con problemas clínicos como parte de implantes biológicos y mecánicos (implantes de tejido/órgano, microprótesis, etc.). Las presentes composiciones pueden utilizarse para inhibir angiogénesis, y de esta manera en el tratamiento de tales condiciones. Otras enfermedades en las cuales la 25 angiogénesis juega un papel, y para las cuales los presentes compuestos y composiciones pueden utilizarse, se conocen por aquellos de experiencia en la materia.

La discusión particular de angiogénesis en un número de condiciones patofisiológicas tales como cáncer, 30 artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, endometriosis y obesidad se encuentra en Folkman J. (1985) Tumor angiogenesis. Adv Cancer

Res. 1985;43: 175-203.; Folkman, J. (2001). Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol*, 28, 536-42.; Grosios, K., Wood, J., Esser, R., Raychaudhuri, A. & Dawson, J. (2004). La inhibición de angiogenesis por el nuevo inhibidor de quinasa de tirosina de receptor VEGF, PTK787/ZK222584, causa efectos anti-artríticos significativos en modelos de artritis reumatoide. *Inflamm Res*, 53, 133-42; Hull, M.L., Charnock-Jones, D.S., Chan, C.L., Bruner-Tran, K.L., Osteen, K.G., Tom, B.D., Fan, T.P. & Smith, S.K. (2003). Los agentes antiangiogénicos son inhibidores efectivos de endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2889-99; Liu, L. & Meydani, M. (2003). Los inhibidores de angiogénesis pueden regular adiposidad. *Nutr Rev*, 61, 384-7; Mousa, S.A. & Mousa, A.S. (2004). Angiogenesis inhibitors: current & future directions. *Curr Pharm Des*, 10, 1-9. Cada una de las referencias descritas arriba se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

Los compuestos descritos en la presente inhiben angiogénesis. Esto se evidencia, por ejemplo, por el compuesto de la Fórmula II-16 que bloquea la migración inducida por factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de células de mieloma múltiple en un ensayo de migración transcavidad. Los otros compuestos descritos en la presente se probaron en un ensayo de migración transcavidad e inhiben la migración.

Los compuestos descritos en la presente muestran actividad inhibidora de angiogénesis en cualquiera de otras varias pruebas y ensayos de angiogénesis, que incluyen uno o más de los siguientes.

Los compuestos descritos en la presente muestran actividad anti-angiogénica en varios otros ensayos *in vitro* o *in vivo*. Algunos ejemplos incluyen: ensayos *in vitro* para la

266  
270

162

267  
271

evaluación de compuestos anti-angiogénesis que incluyen 1) el ensayo de cámara Boyden modificado que valora la migración de las células endoteliales en respuesta a factores pro-angiogénicos (Alessandri G, Raju K, Gullino PM. (1983),  
5 "Mobilization of capillary endothelium *in vitro* induced by effectors of angiogenesis *in vivo*" Cancer Res. 43(4): 1790-7.), 2) ensayos de diferenciación tales como el ensayo Matrigel en el cual la unión, migración y diferenciación de células endoteliales en túbulos se analiza (Lawley TJ, Kubota  
10 Y. (1989), "Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture" J Invest Dermatol. Aug;93 (2 Suppl):59S-61S) y 3) ensayos de cultivo de órgano en los cuales el crecimiento de endoteliales (y otras células) se monitorea (Nicosia RF, Ottinetti A. (1990), "Growth of  
15 microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro*" Lab Invest. Jul;63(1): 115-22.). Algunos ensayos *in vivo* para la evaluación de inhibidores de angiogénesis son 1) ensayo de implantación de esponja, durante el cual las esponjas que  
20 contienen células y/o factores angiogénicos y la substancia de prueba se implantan de manera subcutánea en animales para estudio de angiogénesis *in vivo* (Plunkett ML, Hailey JA. (1990), "An *in vivo* quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate" Lab Invest. 1990  
25 Apr;62(4):510-7), 2) el ensayo de membrana corioalantóico de pollo en el cual los compuestos de prueba se insertan a través de un ventana, cortada en el cascarón. La falta de un sistema inmune, maduro en el embrión de pollo de 7-8 días permite el estudio de angiogénesis inducida por tumor  
30 (Folkman J.(1985) "Tumor angiogenesis" Adv Cancer Res. 1985;43:175-203.) y 3) varios modelos de tumor en los cuales los análisis histológicos específicos pueden utilizarse para

292

268  
272

examinar el efecto en vasos sanguíneos, tal como densidad vascular (coloración CD31/CD34), flujo sanguíneo y necrosis de tumor/apoptosis concomitante (coloración TUNEL). Los ejemplos de ensayo *in vitro* incluyen pruebas de célula  
5 endotelial (HUVEC (célula endotelial de vena umbilical de humano), aórtica, capilar); ensayos de proliferación de célula endotelial; conjuntos de síntesis de ADN de célula endotelial; ensayos de crecimiento de célula endotelial (anillo Aórtico); ensayos de migración de célula endotelial  
10 (mencionados arriba; quimoquinesis''(oro coloidal), quimotaxis (cámara Boyden)); ensayos de formación de tubo de célula endotelial; ensayos de apoptosis endotelial; ensayos de viabilidad de célula endotelial (azul tripan); líneas celulares endotelial transfectadas por factor de  
15 angiogénesis; y microperlas magnetizadas en células endoteliales. Cada una de las referencias en este párrafo se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

Ejemplos de ensayos *in vivo* incluyen pruebas de cámara transparente (por ejemplo, oreja de conejo, mejilla de  
20 hámster, ventana craneal, y piel dorsal); implantes de matriz (por ejemplo, inyección subcutánea utilizando alginato de sodio, disco subcutáneo (implante de espuma de polivinilo), saco de aire dorsal de rata, implante de esponja); ensayos de microcavidad de córnea, por ejemplo, en conejos y otros  
25 roedores; ensayos de implante de cámara del ojo/iris anterior, ensayos de bloqueo y ratones; constricción ameroidea (corazón) en puercos y perros; pruebas de isquemia del miembro trasero de conejo; vascularización en tejido (inoculación intradérmica, cavidad peritoneal/omento con  
30 implante; implantes de tumor, por ejemplo en conejos, ratones o ratas.

272

También, los ensayos ex vivo se realizaron utilizando los compuestos descritos. Ejemplos incluyen CAM (ensayo de membrana corioalantóica de pollo) y CAM vertical con gel de polímero. Los inmunoensayos tales como ensayos de  
5 suero, ensayos de orina, ensayos de fluido cerebroespinal y ensayos inmunohistoquímicos de tejido.

Algunos de los ensayos anteriores se describen en los siguientes documentos, cada uno de los cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.  
10 Grant et al., *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27A:327-336 (1991); Min et al., *Cancer Res.* 56:2428-2433 (1996); Schnaper et al., *J. Cell. Physiol.* 165: 107-118 (1995); Schnaper et al., *J. Cell. Physiol.* 165: 107-118 (1995); Oikawa et al., *Cancer Lett.* 59:57-66 (1991).

15 Las modalidades se relacionan con los métodos para utilizar los compuestos y composiciones descritas en la presente, solos o en combinación con otros agentes, para inhibir angiogénesis y para tratar o aliviar enfermedades y condiciones asociadas con angiogénesis inapropiada o  
20 excesiva. Preferentemente, la inhibición ocurre en conexión con vascularización en conexión con una enfermedad asociada con angiogénesis, tal como cáncer o cualquiera de las otras enfermedades descritas arriba, y aquellas que son conocidas por aquellos de experiencia en la materia. Los compuestos y  
25 composiciones pueden suministrarse en una cantidad inhibidora apropiada. La cantidad inhibidora se propone significar una cantidad de un compuesto o composición requerido para efectuar una disminución en el grado, cantidad o tasa de neovascularización cuando se administra a un tejido, animal o  
30 individuo. La dosificación del compuesto o composición requerida para ser terapéuticamente efectiva dependerá, por ejemplo, en la enfermedad dependiente de angiogénesis a

270  
275

tratarse, la vía y forma de administración, la potencia y vida media activa grande de la molécula que se administra, el peso y condición del tejido, animal o individuo, y terapias concurrentes o previas. La aplicación de la cantidad  
5 apropiada del método puede determinarse por aquellos expertos en la materia, utilizando la guía proporcionada en la misma. Por ejemplo, la cantidad puede extrapolarse de ensayos de angiogénesis *in vitro* o *in vivo* descritos arriba. Un experto en la materia reconocerá que la condición del paciente  
10 necesita monitorearse a través del curso de terapia y que la cantidad de la composición administrada puede ajustarse de acuerdo con lo anterior.

Los presentes compuestos y composiciones pueden ser y se utilizan también junto con otros inhibidores de  
15 angiogénesis. Los inhibidores angiogénicos se conocen en la materia y pueden prepararse por métodos conocidos. Por ejemplo, los inhibidores angiogénicos incluyen compuestos inhibidores de integrina tal como alfa-V-beta-3 ( $\alpha V\beta 3$ ), anticuerpos inhibidores de integrina, proteínas de adhesión  
20 celular o fragmentos funcionales de las mismas que contienen una secuencia de unión de adhesión celular. Los inhibidores angiogénicos adicionales incluyen, por ejemplo, angiostatina, fragmentos funcionales de angiostatina, endostatina, inhibidores del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF),  
25 inhibidores del receptor FGF, inhibidores VEGF, inhibidores del receptor VEGF, inhibidores del factor de permeabilidad vascular (VPF, trombospondina, factor de plaqueta 4, interferón-alfa, interferón-gamma, proteína inducible por interferón 10, interleuquina 12, gro-beta, y el fragmento de  
30 terminal N de 16 kDa de prolactina, talidomida, y otros mecanismos para la inhibición de angiogénesis.

275

771  
235

De esta manera, los métodos pueden incluir la etapa de administrar un compuesto o composición a un animal que sufre de una condición asociada con angiogénesis excesiva. Los métodos pueden incluir además administrar el presente  
5 compuesto o composición junto con otra droga anti-angiogénesis o junto con otras terapias para la condición a tratarse (por ejemplo, con un quimioterapéutico o inmunoterapéutico para tratar cáncer).

Los compuestos o composiciones pueden suministrarse  
10 en cualquier enfermedad y/o manera apropiada para el paciente. Ejemplos incluyen, intravenosa, oral, intramuscular, intraocular, intranasal, intraperitoneal y lo similar.

Las siguientes referencias proporcionan enseñanza  
15 adicional que considera métodos para utilizar, administrar y analizar la inhibición de angiogénesis. Angiogenesis Protocols (Methods in Molecular Medicine) por J. Clifford Murray, Humana Press (15 de Marzo de 2001) ISBN: 0896036987; Tumour Angiogenesis, por R. J. Bicknell, Claire E. Lewis,  
20 Napoleone Fe, Oxford University Press (1 de Septiembre de 1997) ISBN: 0198549377; y Angiogenesis in Health and Disease: Basic Mechanisms and Clinical Applications, por Gabor M. Rubanyi, Marcel Dekker (1 de Noviembre de 1999) ISBN: 0824781023. Cada libro se incorpora en la presente para  
25 referencia en su totalidad. En particular, los protocolos y métodos se incorporan en la presente.

#### EJEMPLO 63

##### FORMULACIÓN A ADMINISTRARSE ORALMENTE O LO SIMILAR

Una mezcla obtenida al mezclar completamente 1 g de  
30 un compuesto obtenido y purificado por el método de la modalidad, 98 g de lactosa y 1 g de celulosa de hidroxipropilo se forma en gránulos por cualquier método

262

272  
276

convencional. Los gránulos se secan completamente y tamizan para obtener una preparación de gránulo adecuada para empacar en botellas o por sellado por calor. Las preparaciones de gránulo resultantes se administran oralmente a entre  
5 aproximadamente 100 ml/día a aproximadamente 1000 ml/día, dependiendo de los síntomas, como parece apropiado por aquellos de experiencia ordinaria en la materia para tratar tumores cancerosos en humanos.

#### EJEMPLO 64

##### 10 TRATAMIENTO DE TUMORES RESISTENTES Y SENSIBLES A GLEEVEC

Las células de leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia linfoblástica aguda (ALL), en la mayoría de los casos, comparten una anormalidad cromosómica no encontrada en células normales. La anormalidad, designada como t(9;22), es  
15 una transubicación recíproca entre cromosomas 9 y 22. Esta transubicación resulta en cromosoma 9 siendo más grande que lo normal y cromosoma 22 siendo más corto que lo normal. La rotura en el cromosoma 22 ocurre en medio de un gen designado BCR. El cromosoma resultante 22, es decir, el cromosoma de  
20 Filadelfia (Ph<sup>1</sup>), tiene una sección de BCR fusionada con la mayoría del proto-oncógeno designado c-ABL. Este fragmento fusionado forma un oncógeno "bcr-abl" anormal que codifica una quinasa de tirosina anormal que se activa de manera constante, estimula la división celular y resistencia a  
25 apoptosis.

Gleevec® (STI-571, inhibidor de transducción de señal 571, o mesilato imatinib) es un inhibidor selectivo de la quinasa de tirosina BCR-ABL, la mutación causante en CML. Gleevec® también es un inhibidor de quinasas de tirosina de  
30 receptor para factor de célula germinal (SCF), c-KIT e inhibe el receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaqueta (PGDF) y eventos celulares mediados por SCF. En estudios

272

273  
277

clínicos, Gleevec® ha mostrado encoger los tumores estromales gastrointestinales (GIST) en 60 por ciento de aquellos tratados. Las respuestas dramáticas similares se han observado con CML. Sin embargo, la resistencia a Gleevec® se desarrolla en todos los pacientes por múltiples mecanismos propuestos. Sin limitarse a ninguna teoría particular, los mecanismos de resistencia posibles a Gleevec® pueden resultar de la sobreexpresión de bcr-abl, mutaciones en el dominio abl-quinasa donde Gleevec® se une, o la activación de otras trayectorias oncogénicas.

Los compuestos descritos en la presente se utilizan para tratar tumores resistentes y sensibles a Gleevec®. Esto se evidencia, por ejemplo, por el compuesto de la Fórmula II-16 que se ha demostrado que induce apoptosis en CML, leucemia linfoblástica aguda positiva de cromosoma Filadelfia (Ph<sup>+</sup>ALL; incluyendo células Ph<sup>+</sup>ALL recientemente aisladas de pacientes) y líneas celulares de leucemia de mieloide aguda (AML). El compuesto de la Fórmula II-16 puede utilizarse como un agente único o en combinación con Gleevec®. En particular, el compuesto de la Fórmula II-16 puede utilizarse como un agente único o en combinación con Gleevec® en el tratamiento de leucemia positiva de cromosoma Filadelfia resistente o sensible.

El compuesto de la Fórmula II-16 o cualquier otro compuesto que incluye compuestos de la Fórmula I, II, III, IV, V, y VI puede utilizarse para tratar tumores resistentes y sensibles a Gleevec®.

Los ejemplos descritos arriba se establecen solamente para ayudar en el entendimiento de las modalidades. De esta manera, aquellos expertos en la materia apreciarán que los métodos pueden proporcionar derivados de compuestos.

278

274  
278

Un experto en la materia fácilmente apreciaría que la presente invención se adapta bien para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionadas, así como también aquellos inherentes en la misma. Los métodos y procedimientos descritos en la presente actualmente son representativos de modalidades preferidas y son ejemplificativos y no se proponen como limitaciones en el alcance de la invención. Los cambios en las mismas y otros usos ocurrirán para aquellos expertos en la materia, que se comprenden dentro del espíritu de la invención.

Será fácilmente aparente para un experto en la materia que las substituciones variables y modificaciones pueden hacerse a las modalidades descritas en la presente sin apartarse del alcance y espíritu de la invención.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la especificación son indicativas de los niveles de aquellos expertos en la materia a la cual pertenece la invención. Todas las patentes y publicaciones se incorporan en la presente para referencia al mismo grado como si cada publicación individual se hubiera indicado específica e individualmente para incorporarse para referencia.

La invención descrita de manera ilustrativa en la presente de manera adecuada puede practicarse en la ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen de manera específica en la presente. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no existe intención de que en el uso de tales términos y expresiones se indique la exclusión de equivalentes de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas. De esta manera, debe entenderse que aunque la presente invención se ha descrito de manera específica por modalidades preferidas y

272

281  
283

grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquinilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, 5 alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxil, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, 10 carboxi, ciano y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, en donde  $n$  es igual a 1 o 2, y si  $n$  es igual a 2, entonces  $R_1$  puede ser el mismo o diferente;

en donde  $R_3$  se selecciona por separado del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes 15 monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquinilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, 20 arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxil, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado;

25 en donde  $R_5$  se selecciona por separado del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquinilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, 30 alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino,

282

287  
288

cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, fenilo, cicloalquilacilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, tio, sulfóxido, ésteres de ácido sulfonoborónico y  
5 alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado n es igual a 1 o 2, y si n es igual a 2, entonces R<sub>1</sub> puede ser el mismo o diferente;

en donde R<sub>2</sub> puede seleccionarse del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes  
10 monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, (incluyendo por ejemplo ciclohexilcarbinol) cicloalquenilo,  
15 alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfoxido, sulfona, ésteres sulfonato, tiociano, ácidos  
20 borónicos, ésteres borónicos y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado;

en donde R<sub>3</sub> puede seleccionarse del grupo que consiste de un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos:  
25 alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> saturado, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro,  
30 azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfoxida, sulfona, ésteres sulfonato, tiociano ácidos borónicos, ésteres

282

cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, en donde  $n$  es igual a 1 o 2, y si  $n$  es igual a 2, entonces  $R_1$  puede ser el mismo o diferente;

5                    en donde  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquino  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, 10 ariloxycarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo 15 alquilo polihalogenado;

                  en donde  $R_3$  se selecciona del grupo que consiste de un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquino  $C_2-C_{24}$  20 insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxycarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, 25 oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado;

                  en donde cada uno de  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$  y  $E_4$  es un heteroátomo sustituido o no sustituido; y

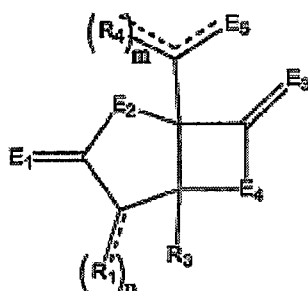
                  en donde el cáncer es una leucemia, cáncer ovárico, 30 cáncer uretral, cáncer de vejiga, cáncer prostático, cáncer rectal, cáncer de estómago, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer endócrino,

282  
292

un sarcoma, cáncer de piel, angioma, y cáncer cerebral.

13. El método de la Reivindicación 12, en donde el compuesto tiene la estructura de la Fórmula II y sales y ésteres de profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo;

5



en donde las líneas punteadas representan un enlace sencillo o doble, en donde  $R_1$  se selecciona por separado del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes  
10 monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenoilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquinilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenoilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo,  
15 arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, en donde  $n$  es igual a 1 o 2, y si  $n$  es igual  
20 a 2, entonces  $R_1$  puede ser el mismo o diferente;

en donde  $R_3$  se selecciona por separado del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alquenoilo  $C_2-C_{24}$   
25 insaturado, alquinilo  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, cicloalquilo, cicloalquenoilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo,

283

294  
298

grupo que consiste de variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquino  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxiacarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, fenilo, cicloalquilacilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, tio, sulfóxido, ésteres de ácido sulfonoborónico y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, en donde  $n$  es igual a 1 o 2, y si  $n$  es igual a 2, entonces  $R_1$  puede ser el mismo o diferente;

en donde  $R_2$  puede seleccionarse del grupo que consiste de un hidrógeno, un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquino  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxiacarboniloxi, cicloalquilo (incluyendo por ejemplo ciclohexilcarbinol), cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, heteroarilo, arilalcoxi carbonilo, alcoxi carbonilacilo, amino, aminocarbonilo, aminocarboiloxi, nitro, azido, fenilo, cicloalquilacilo, hidroxilo, alquiltio, ariltio, oxisulfonilo, carboxi, ciano, tio, sulfóxido, sulfona, ésteres sulfonato, tiociano, ácidos borónicos, ésteres borónicos y alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado;

en donde  $R_3$  puede seleccionarse del grupo que consiste de un halógeno, variantes monosustituidas, polisustituidas o no sustituidas de los siguientes residuos: alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueno  $C_2-C_{24}$  insaturado, alquino  $C_2-C_{24}$  insaturado, acilo, aciloxi, alquiloxicarboniloxi, ariloxiacarboniloxi, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi,

292