

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 395**

51 Int. Cl.:

**C07D 209/86** (2006.01)  
**C07D 209/88** (2006.01)  
**C07D 401/04** (2006.01)  
**C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/403** (2006.01)  
**A61P 33/00** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2009 E 09793304 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 2356093**

54 Título: **Compuestos de carbazol y usos terapéuticos de los compuestos**

30 Prioridad:

**06.10.2008 US 102913 P**

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

**03.05.2013**

73 Titular/es:

**INCURON, LLC (100.0%)  
6 Stolovyi Pereulok Bld 2  
Moscow 12069, RU**

72 Inventor/es:

**TUCKER, JOHN;  
SVIRIDOV, SERGEY;  
BRODSKY, LEONID;  
BURKHART, CATHERINE;  
PURMAL, ANDREI;  
GUROVA, KATERINA y  
GUDKOV, ANDREI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 402 395 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de carbazol y usos terapéuticos de los compuestos

**Referencia cruzada a una solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 61/102.913, presentada el 6 de octubre de 2008.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos de carbazol, a procedimientos de preparación de los compuestos, a composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos y a su uso como agentes terapéuticos. En particular, la invención se refiere a compuestos de carbazol y a su uso en una variedad de campos terapéuticos, incluyendo el tratamiento de cánceres.

**Antecedentes de la invención**

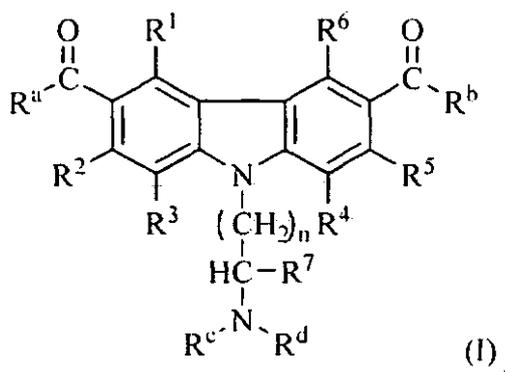
La frecuencia del cáncer en los seres humanos ha aumentado en el mundo desarrollado, ya que la población ha envejecido. Para algunos tipos de cáncer y la etapa de la enfermedad en el momento del diagnóstico, las tasas de morbilidad y mortalidad no han mejorado significativamente en los últimos años a pesar de la extensa investigación realizada. La inducción de la muerte celular es una de las estrategias de tratamiento del cáncer más interesantes. Hay una necesidad significativa de identificar agentes que sean capaces de inducir la muerte celular en las células tumorales y/o que potencien las terapias quimioterapéuticas y de radiación.

**Resumen de la invención**

La presente invención se dirige a compuestos y a composiciones que inducen la muerte celular, y a usos terapéuticos de los compuestos en el tratamiento de un cáncer y otras afecciones en individuos en necesidad de dicho tratamiento. La presente invención también se dirige a procedimientos de preparación de los compuestos terapéuticos.

Más particularmente, la presente invención se dirige a compuestos y a dichos compuestos para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones tales como cánceres, enfermedades inflamatorias, infecciones microbianas, infecciones virales e infecciones protozoarias. Los compuestos son útiles en un procedimiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula estructural (I) a un individuo en necesidad del mismo.

En particular, la presente invención se dirige a compuestos de carbazol que tienen una fórmula estructural (I):



en la que  $R^a$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $OR^e$ ,  $N(R^e)_2$  y  $SR^e$ ; alternativamente, cualquiera de  $R^a$  y  $R^1$ , o  $NR^e$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo heterocíclico o carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

$R^b$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $OR^e$ ,  $N(R^e)_2$  y  $SR^e$ ; alternativamente, cualquiera de  $R^b$  y  $R^6$ , o  $NR^e$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros o un anillo heterocíclico o carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

$R^c$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^e$ , o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

$R^d$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^e$ , o  $R^d$  y  $R^7$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

$R^e$  está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, o dos grupos  $R^e$  tomados junto con un nitrógeno al que están unidos forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

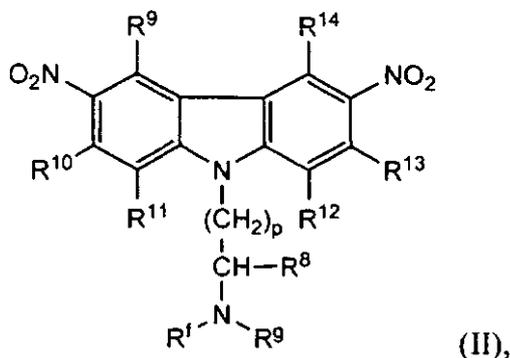
$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo,  $OR^e$ ,  $C(=O)R^e$ ,  $C(=O)OR^e$ ,  $OC(=O)R^e$ ,  $C(=O)N(R^e)_2$ ,  $C(=O)NR^eSO_2R^e$ ,  $N(R^e)_2$ ,  $NR^eC(=O)R^e$ ,  $NR^eC(=O)N(R^e)_2$ , CN,  $NO_2$ ,  $CF_3$ ,  $OCF_3$ ,  $SR^e$ ,  $SOR^e$ ,  $SO_2R^e$ ,  $SO_2N(R^e)_2$  y  $OSO_2CF_3$ ;

$R^7$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; y

$n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también se dirige a compuestos de carbazol que tienen una fórmula estructural (II):



en la que  $R^f$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^h$ , o  $R^f$  y  $R^g$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

$R^g$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^h$ , o  $R^g$  y  $R^8$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

$R^h$  está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, o dos grupos  $R^h$  tomados junto con un nitrógeno al que están unidos forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

$R^8$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo;

$R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  y  $R^{14}$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo,  $OR^h$ ,  $C(=O)R^h$ ,  $C(=O)OR^h$ ,  $OC(=O)R^h$ ,  $C(=O)N(R^h)_2$ ,  $C(=O)NR^hSO_2R^h$ ,  $N(R^h)_2$ ,  $NR^hC(=O)R^h$ ,  $NR^hC(=O)N(R^h)_2$ , CN,  $NO_2$ ,  $CF_3$ ,  $OCF_3$ ,  $SR^h$ ,  $SOR^h$ ,  $SO_2R^h$ ,  $SO_2N(R^h)_2$  y  $OSO_2CF_3$ ;

$p$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

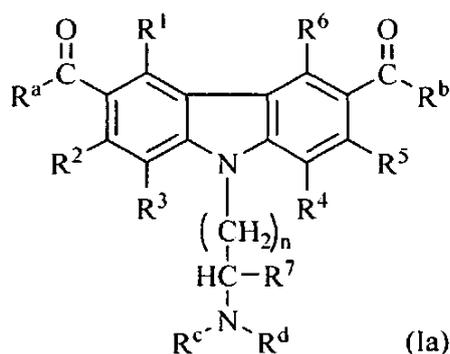
con la condición de que cuando  $p$  sea 2, uno de entre  $R^f$  y  $R^g$  es diferente de etilo,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

Una enfermedad o afección que se puede tratar de acuerdo con la presente invención incluye, por ejemplo, un cáncer, inflamación, enfermedad autoinmune, infección microbiana, infección protozoaria, infección viral, enfermedad del injerto contra el huésped, una afección asociada con la infección por VIH o células precancerosas.

Las formas de cáncer que se pueden tratar incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células renales, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, mieloma, leucemia mieloide y linfoblástica, neuroblastoma, glioblastoma o un cáncer provocado por una infección por VLTH.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene una fórmula estructural general (Ia):



en la que  $R^a$  es alquilo  $C_{1-3}$ , haloalquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$ ,  $N(R^e)_2$  o  $OR^e$ , o  $R^a$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

$R^b$  es alquilo  $C_{1-4}$ , haloalquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$ ,  $N(R^e)_2$  o  $OR^e$ , o  $R^b$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros o un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno;

$R^c$  es alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$  o hidroalquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^d$  es hidrógeno, alquilo  $C_{1-4}$  o cicloalquilo  $C_{3-5}$ , o  $R^d$  y  $R^7$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno, o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

$R^e$  es independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^2$  es hidrógeno, hidroxilo o alcoxilo  $C_{1-3}$ ;

$R^3$  y  $R^4$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^5$  es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo  $C_{1-3}$  o halo;

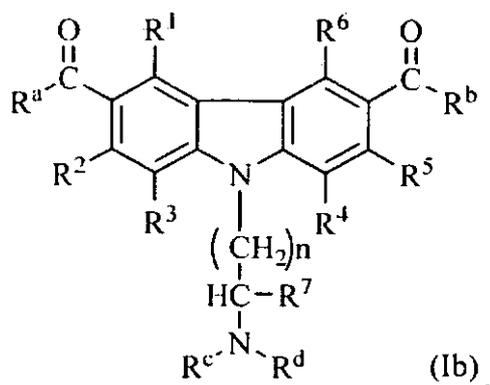
$R^6$  es hidrógeno, alquilo  $C_{1-3}$ , alcoxilo  $C_{1-3}$  o halo;

$R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ; y

$n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

En otras realizaciones, el compuesto tiene una fórmula estructural general (Ib):

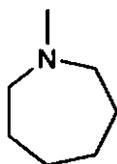


en la que  $R^a$  es metilo, etilo, *n*-propilo, ciclopropilo,  $NH(CH_3)$  o  $OCH_3$ , o  $R^a$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco miembros;

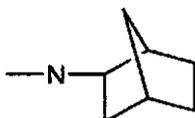
$R^b$  es metilo, etilo, *n*-propilo, ciclopropilo,  $NH(CH_3)$  o  $OCH_3$ , o  $R^b$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco miembros o un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno;

$R^c$  es metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, ciclobutilo o 2-hidroxi etilo;

$R^d$  es hidrógeno, metilo, etilo o ciclobutilo, o  $R^d$  y  $R^7$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno, o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un resto morfolino; un resto tetrahidrofurilo; un resto piperidinilo; un resto



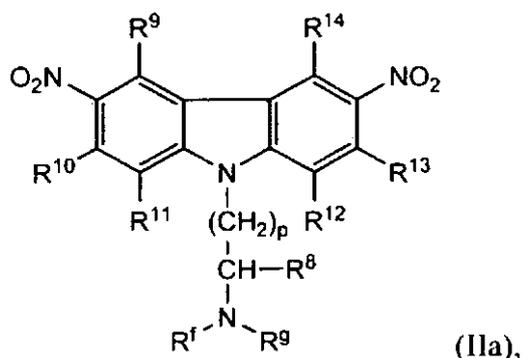
o un resto



- 5  
10
- R<sup>1</sup> es hidrógeno;
  - R<sup>2</sup> es hidrógeno, hidroxilo o metoxilo;
  - R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son hidrógeno;
  - R<sup>5</sup> es hidrógeno, hidroxilo, metoxilo o fluoro;
  - R<sup>6</sup> es hidrógeno, metilo, metoxilo o fluoro;
  - R<sup>7</sup> es hidrógeno; y
  - n es 1 o 2,

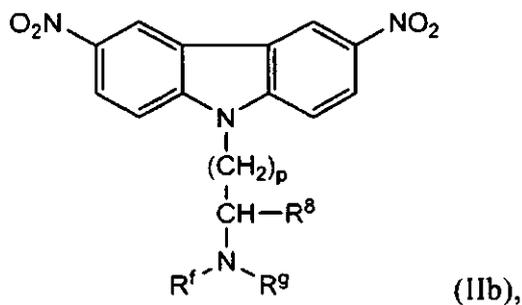
o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

En otras realizaciones, el compuesto tiene una fórmula estructural general (IIa):



- 15  
20  
25
- en la que R<sup>f</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>;
  - R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>, o R<sup>9</sup> y R<sup>8</sup>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno;
  - R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;
  - R<sup>10</sup> es hidrógeno, hidroxilo o alcoxilo C<sub>1-3</sub>;
  - R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> son independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;
  - R<sup>13</sup> es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo C<sub>1-3</sub> o halo;
  - R<sup>14</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub> o alcoxilo C<sub>1-3</sub>;
  - R<sup>8</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>; y
  - p es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,
  - con la condición de que cuando p sea 2, uno de entre R<sup>f</sup> y R<sup>9</sup> es diferente de etilo;
- o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

En otras realizaciones más, el compuesto tiene una fórmula estructural (IIb):



en la que R<sup>f</sup> es metilo o etilo;

R<sup>g</sup> es hidrógeno o metilo, o R<sup>g</sup> y R<sup>h</sup>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno;

R<sup>h</sup> es hidrógeno; y

5 p es 1 o 2,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

También se divulga un procedimiento de tratamiento de una afección o enfermedad mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de fórmula estructural (I), (Ia), (Ib), (II), (IIa) o (IIb), o una composición que comprende uno o más de un compuesto de fórmula estructural (I), (Ia), (Ib), (II), (IIa) o (IIb), a un individuo en necesidad de ello. La composición puede comprender además un activador de receptores de muerte de un polipéptido de la familia de los TNF. El activador puede ser un TNF polipeptídico tal como uno o más de NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, TNF- $\alpha$ , CD134L/OX40L, CD27L/CD70, FasL/CD95, CD30L, TNF- $\beta$ /LT- $\alpha$ , LT- $\beta$  y TRAIL.

10

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de fórmula estructural (I) o (II), y el uso de las composiciones en un tratamiento terapéutico de una enfermedad o afección.

15

También se divulga un procedimiento de tratamiento de un individuo sometido a un tratamiento quimioterapéutico o radioterapéutico por una afección médica que comprende la administración de un compuesto de fórmula estructural (I) y/o (II) en combinación con un agente quimioterapéutico, un agente radioterapéutico, o ambos, al individuo. Una indicación no restrictiva tratada mediante este procedimiento es un cáncer.

20

Los aspectos anteriores y adicionales de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción no restrictiva detallada de las realizaciones preferidas de la presente invención.

#### **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1a es una gráfica de la actividad de NF- $\kappa$ B con respecto al control de DMSO frente a la concentración de los carbazoles de la presente invención;

25

la Figura 1b es una gráfica de CE<sub>50</sub> ( $\mu$ M) para la activación de p53 y la inhibición de NF- $\kappa$ B para los carbazoles de la presente invención;

las figuras 2a a 2k son gráficas del % de viabilidad célula frente a la concentración ( $\mu$ M) para las diversas células tumorales tratadas con los carbazoles de la presente invención;

30

la Figura 3 contiene una gráfica del volumen tumoral frente a los días de tratamiento en un modelo de xenoinjerto HCT 116 sc usando el compuesto del Ejemplo 7;

la Figura 4 es un esquema que muestra el análisis tridimensional de los compuestos activos de carbazol;

la Figura 5 es un esquema que muestra el análisis tridimensional de los compuestos inactivos de carbazol;

la Figura 6 es un esquema que muestra la estructura tridimensional de un compuesto activo de carbazol, es decir, del Ejemplo 2;

35

la Figura 7 es un esquema que muestra la estructura tridimensional de un compuesto inactivo de carbazol, es decir, el Compuesto 200;

la Figura 8 contiene gráficas del volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) frente a los días de tratamiento para el crecimiento tumoral individual en ratones tratados con un vehículo de control (Fig. 8a) y en ratones tratados con el compuesto del Ejemplo 7 (Fig. 8b);

40

La Figura 9 contiene una gráfica del volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) frente a los días de tratamiento con un vehículo de control y con el compuesto del Ejemplo 7;

la figura 10 contiene gráficas del peso relativo de los ratones individuales frente a los días posteriores a la inoculación de células en los ratones tratados con el vehículo de control (Fig. 10a) y los ratones tratados con el compuesto del Ejemplo 7 (Fig. 10b); y

45

la Figura 11 contiene gráficas de concentración del Compuesto 100 ( $\mu$ M) frente a la supervivencia celular relativa de trece líneas de células cancerosas que muestran que un compuesto de carbazol presente es un agente eficaz contra numerosos tipos de cáncer;

la figura 12 contiene gráficas de barras que muestran la actividad antiparasitaria de diversos compuestos de carbazol contra *Plasmodium falciparum* (cepa D10); y

50

la Figura 13 contiene gráficas que muestran la actividad antibacteriana de diversos compuestos de carbazol contra bacterias Gram negativas (Fig. 13a) y Gram positivas (Fig. 13b).

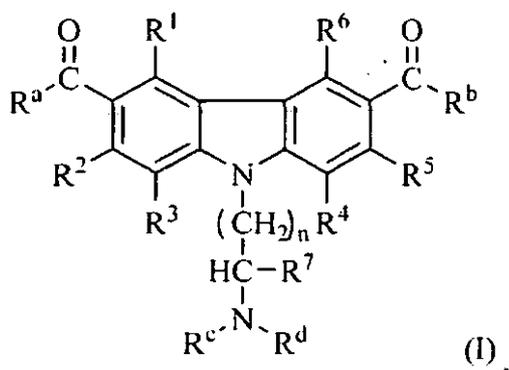
#### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

Con respecto a los compuestos, las composiciones y los procedimientos divulgados en la presente memoria, la terminología usada tiene el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende ser restrictiva. Como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "uno", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

55

La presente invención se dirige a compuestos que tienen una fórmula estructural general (I) y (II). Los compuestos de carbazol divulgados en la presente memoria son útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones tales

como cánceres, enfermedades inflamatorias, infecciones microbianas, infecciones virales, infecciones protozoarias o una enfermedad autoinmune.



5 en la que  $R^a$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $OR^e$ ,  $N(R^e)_2$  y  $SR^e$ , o cualquiera de  $R^a$  y  $R^1$  o  $NR^e$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo heterocíclico o carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

10  $R^b$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $OR^e$ ,  $N(R^e)_2$  y  $SR^e$ ; o cualquiera de  $R^b$  y  $R^6$  o  $NR^e$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros o un anillo heterocíclico o carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

$R^c$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^e$ , o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

15  $R^d$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^e$ , o  $R^d$  y  $R^7$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

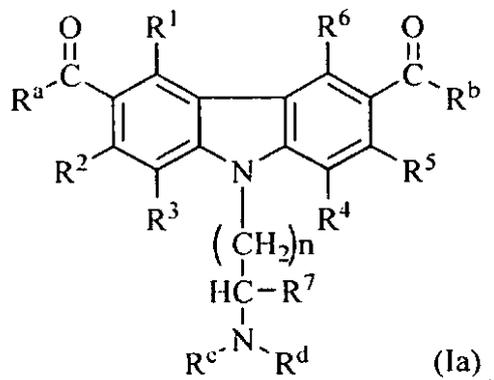
$R^e$  está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, o dos grupos  $R^e$  tomados junto con un nitrógeno al que están unidos forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

20  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo,  $OR^e$ ,  $C(=O)R^e$ ,  $C(=O)OR^e$ ,  $OC(=O)R^e$ ,  $C(=O)N(R^e)_2$ ,  $C(=O)NR^eSO_2R^e$ ,  $N(R^e)_2$ ,  $NR^eC(=O)R^e$ ,  $NR^eC(=O)N(R^e)_2$ , CN,  $NO_2$ ,  $CF_3$ ,  $OCF_3$ ,  $SR^e$ ,  $SOR^e$ ,  $SO_2R^e$ ,  $SO_2N(R^e)_2$  y  $OSO_2CF_3$ ;

25  $R^7$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; y  
n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

o una de sus sales o uno de sus hidrato farmacéuticamente aceptables.

En realizaciones preferidas, los compuestos tienen la fórmula estructural general (Ia):



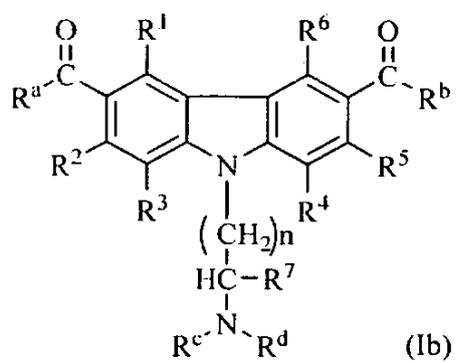
30 en la que  $R^a$  es alquilo  $C_{1-3}$ , haloalquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$ ,  $N(R^e)_2$  o  $OR^e$ , o  $R^a$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

35  $R^b$  es alquilo  $C_{1-6}$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$ ,  $N(R^e)_2$  o  $OR^e$ , o  $R^b$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros o un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno;

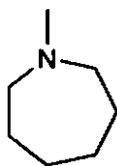
$R^c$  es alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$  o hidroxialquilo  $C_{1-3}$ ;  
 $R^d$  es hidrógeno, alquilo  $C_{1-4}$  o cicloalquilo  $C_{3-5}$ , o  $R^d$  y  $R^7$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno, o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;  
 $R^c$  es independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;  
 $R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;  
 $R^2$  es hidrógeno, hidroxilo o alcoxilo  $C_{1-3}$ ;  
 $R^3$  y  $R^4$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;  
 $R^5$  es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo  $C_{1-3}$  o halo;  
 $R^6$  es hidrógeno, alquilo  $C_{1-3}$ , alcoxilo  $C_{1-3}$  o halo;  
 $R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ; y  
 $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

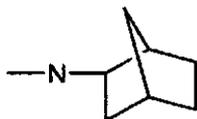
En realizaciones más preferidas, los compuestos tienen una fórmula estructural general (Ib):



en la que  $R^a$  es metilo, etilo,  $n$ -propilo, ciclopropilo,  $NH(CH_3)$  o  $OCH_3$ , o  $R^a$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco miembros;  
 $R^b$  es metilo, etilo,  $n$ -propilo, ciclopropilo,  $NH(CH_3)$  o  $OCH_3$ , o  $R^b$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco miembros o un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno;  
 $R^c$  es metilo, etilo,  $n$ -propilo, isopropilo, ciclobutilo o 2-hidroxi-etilo;  
 $R^d$  es hidrógeno, metilo, etilo o ciclobutilo, o  $R^d$  y  $R^7$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno, o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un resto morfolino; un resto tetrahydrofurilo; un resto piperidinilo; un resto



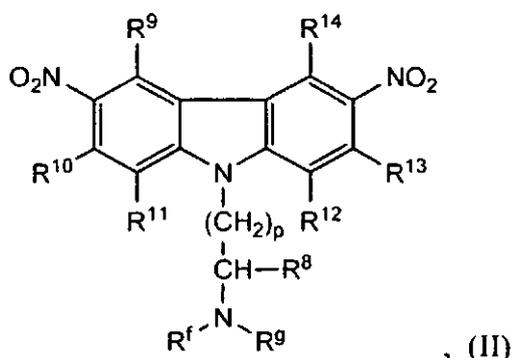
o un resto



$R^1$  es hidrógeno;  
 $R^2$  es hidrógeno, hidroxilo o metoxilo;  
 $R^3$  y  $R^4$  son hidrógeno;  
 $R^5$  es hidrógeno, hidroxilo, metoxilo o fluoro;  
 $R^6$  es hidrógeno, metilo, metoxilo o fluoro;  
 $R^7$  es hidrógeno; y  
 $n$  es 1 o 2,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, la presente invención también se dirige a compuestos de carbazol que tienen una fórmula estructural (II):



5 en la que  $R^f$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^h$ , o  $R^f$  y  $R^g$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

$R^g$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^h$ , o  $R^g$  y  $R^h$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros;

10  $R^h$  está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, o dos grupos  $R^h$  tomados junto con un nitrógeno al que están unidos forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

15  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  y  $R^{14}$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo,  $OR^h$ ,  $C(=O)R^h$ ,  $C(=O)OR^h$ ,  $OC(=O)R^h$ ,  $C(=O)N(R^h)_2$ ,  $C(=O)NR^hSO_2R^h$ ,  $N(R^h)_2$ ,  $NR^hC(=O)R^h$ ,  $NR^hC(=O)N(R^h)_2$ ,  $CN$ ,  $NO_2$ ,  $CF_3$ ,  $OCF_3$ ,  $SR^h$ ,  $SOR^h$ ,  $SO_2R^h$ ,  $SON(R^h)_2$  y  $OSO_2CF_3$ ;

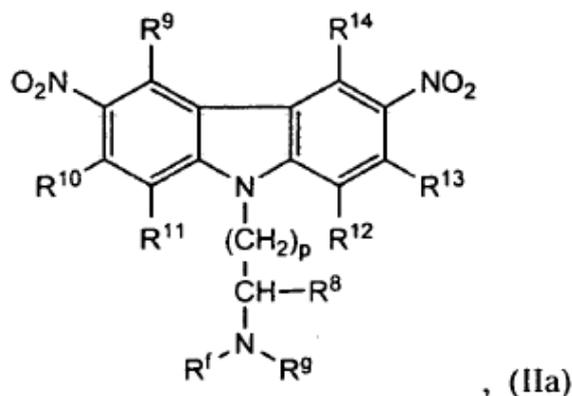
$R^8$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; y

$p$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

20 con la condición de que cuando  $p$  sea 2, uno de entre  $R^f$  y  $R^g$  es diferente de etilo,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptable.

En otras realizaciones, el compuesto tiene una fórmula estructural general (IIa):



25 en la que  $R^f$  es alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^g$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-4}$ , o  $R^g$  y  $R^8$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno;

$R^9$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^{10}$  es hidrógeno, hidroxilo o alcoxilo  $C_{1-3}$ ;

$R^{11}$  y  $R^{12}$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

30  $R^{13}$  es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo  $C_{1-3}$  o halo;

$R^{14}$  es hidrógeno, alquilo  $C_{1-3}$  o alcoxilo  $C_{1-3}$ ;

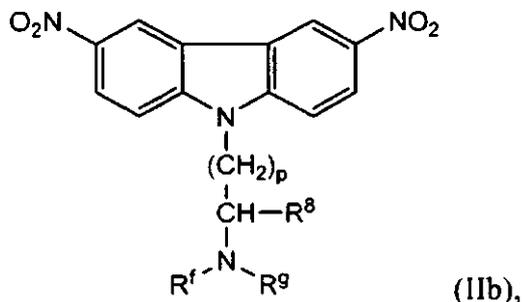
$R^8$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ; y

$p$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

con la condición de que cuando  $p$  sea 2, uno de entre  $R^f$  y  $R^g$  es diferente de etilo;

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

En otras realizaciones más, el compuesto tiene una fórmula estructural (IIb):



- 5 en la que  $R^f$  es metilo o etilo;  
 $R^g$  es hidrógeno o metilo, o  $R^g$  y  $R^8$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno;  
 $R^8$  es hidrógeno; y  
 $p$  es 1 o 2,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

- 10 Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" significa grupos hidrocarburo ramificados y de cadena lineal que contienen el número indicado de átomos de carbono, típicamente metilo, etilo, y grupos propilo y butilo ramificados y de cadena lineal. El término "cicloalquilo" se define como un grupo hidrocarburo cíclico que contiene el número indicado de átomos de carbono, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo y ciclopentilo.

- 15 El término "heterocicloalquilo" significa grupos cicloalquilo monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre en la estructura del anillo. Un grupo "heterocicloalquilo" también puede contener un grupo oxo (=O) unido al anillo. Los ejemplos no restrictivos de grupos heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitación, 1,3-dioxolano, 2-pirazolina, pirazolidina, pirrolidina, piperazina, pirrolina, 2*H*-pirano, 4*H*-pirano, morfolina, tiofolina, piperidina, 1,4-ditiano y 1,4-dioxano.

El término "halo" o "halógeno" significa flúor, bromo, cloro y yodo.

- 20 El término "haloalquilo" significa un grupo alquilo sustituido con uno o más, por ejemplo, de 1 a 3, sustituyentes halo, bien flúor, cloro, bromo, yodo o combinaciones de los mismos. De manera similar, "halocicloalquilo" se define como un grupo cicloalquilo que tiene uno o más sustituyentes halo.

- 25 El término "arilo", solo o en combinación, significa un grupo aromático monocíclico o policíclico, preferentemente un grupo aromático monocíclico o bicíclico, por ejemplo, fenilo o naftilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo "arilo" puede estar sin sustituir o sustituido, por ejemplo, con uno o más, y en particular, uno a tres halo, alquilo, hidroxialquilo, alcoxilo, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfonilo y alquilsulfonilo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, 2-clorofenilo, 3-clorofenilo, 4-clorofenilo, 2-metilfenilo, 4-metoxifenilo, 3-trifluorometilfenilo, 4-nitrofenilo y similares.

- 30 El término "heteroarilo" significa un sistema de anillo monocíclico o bicíclico que contiene uno o dos anillos aromáticos y que contiene al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre en un anillo aromático, y que puede estar sin sustituir o sustituido, por ejemplo, con uno o más, y en particular, uno a tres sustituyentes como halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxilo, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfonilo y alquilsulfonilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, tienilo, furilo, piridilo, oxazolilo, quinolilo, isoquinolilo, indolilo, triazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, imidazolilo, benzotiazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, tiazonilo y tiadiazolilo.

El término "alquilenilo" significa un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Por ejemplo, el término "alquilenarilo  $C_{1-3}$ " se refiere a un grupo alquilo que contiene de uno a tres átomos de carbono y está sustituido con un grupo arilo.

El término "hidroxilo" significa -OH.

El término "alcoxilo" significa -OR, en el que R es alquilo.

- 40 El término "amino" significa -NH<sub>2</sub>, y el término "alquilamino" significa -NR<sub>2</sub>, en el que al menos un R es alquilo y el segundo R es alquilo o hidrógeno.

El término "acilamino" significa R(=O)N-, en el que R es alquilo o arilo.

El término "alquiltio" significa -SR, en el que R es alquilo.

El término "nitro" significa  $-\text{NO}_2$ .

El término "trifluorometilo" significa  $-\text{CF}_3$ .

El término "trifluorometoxilo" significa  $-\text{OCF}_3$ .

El término "ciano" significa  $-\text{CN}$ .

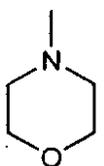
5 El término "alcoxialquilo" significa un grupo alquilo en el que se ha reemplazado un hidrógeno por un grupo alcoxilo.

El término "hidroxialquilo" significa un grupo alquilo en el que se ha reemplazado un hidrógeno por un grupo hidroxilo.

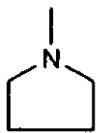
El término "alquilsulfinilo" significa  $\text{R-SO}_2-$ , en el que R es alquilo.

El término "alquilsulfonilo" significa  $\text{R-SO}_3-$ , en el que R es alquilo.

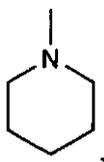
10 El término "resto morfolino" significa



El término "resto tetrahidrofurilo" significa



El término "resto piperidinilo" significa



15

opcionalmente sustituido con un grupo  $-\text{OH}$  o  $-\text{CH}_2\text{OH}$ .

Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz", cuando se usan en referencia a un compuesto o una composición, significan una cantidad suficiente del compuesto o de la composición para proporcionar el resultado deseado. La cantidad exacta deseada o requerida variará dependiendo del compuesto o de la composición que se use en particular, de su modo de administración y similares. Por lo tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" exacta. Sin embargo, el experto habitual en la técnica informado por la presente divulgación con el único uso de la experimentación rutinaria puede determinar la cantidad eficaz apropiada.

20

El término "adecuado" significa una entidad, por ejemplo, un resto, sustituyente o compuesto, que es compatible con los compuestos o las composiciones proporcionados en la presente memoria con el propósito indicado. La idoneidad para el propósito indicado puede ser determinada por un experto habitual en la técnica con el solo uso de la experimentación rutinaria.

25

El término "administrar", cuando se usa para describir la dosis de un compuesto o composición, significa una sola dosis o múltiples dosis del compuesto o de la composición.

30

"*In vivo*" significa dentro de un sujeto vivo, como dentro de un animal o de un ser humano. En el presente contexto, los agentes se pueden usar terapéuticamente en un sujeto para tratar una afección o enfermedad, o uno de sus síntomas. Los agentes también se pueden usar como un profiláctico para prevenir la aparición o la reaparición de una enfermedad o afección, o de los síntomas asociados con la misma.

35

"*Ex vivo*" significa fuera de un sujeto vivo. Los ejemplos de poblaciones de células *ex vivo* incluyen cultivos de células *in vitro* y muestras biológicas tales como muestras de fluido o de tejidos de seres humanos o animales. Dichas muestras se pueden obtener mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de

muestras de fluidos biológicos incluyen sangre, líquido cerebroespinal, orina, saliva. Los ejemplos de muestras de tejidos incluyen tumores y biopsias de los mismos. En el presente contexto, los presentes compuestos pueden estar en numerosas aplicaciones, tanto terapéuticas como experimentales.

5 El término "radiosensibilizador" significa un compuesto administrado a un ser humano o a otro animal en una cantidad terapéuticamente eficaz para aumentar la sensibilidad de las células a la radiación electromagnética y/o para potenciar el tratamiento de enfermedades que se pueden tratar con radiación electromagnética.

La expresión "radiación electromagnética" y el término "radiación" significan, pero sin limitación, radiación que tiene la longitud de onda de  $10^{-20}$  a 100 metros.

10 La expresión "muerte celular" significa un proceso en el que se detiene el funcionamiento, la proliferación y el metabolismo celular.

La expresión "tratamiento del cáncer" significa cualquier tratamiento contra el cáncer conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, quimioterapia y radioterapia.

15 La expresión "combinación con", cuando se usa para describir la administración de uno de los presentes compuestos de carbazol y cualquier tratamiento adicional, significa que el compuesto de carbazol se puede administrar antes de, simultáneamente con o después del tratamiento adicional, o una combinación de los mismos.

20 Como se usan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se refieren a la eliminación, reducción o mejora de una enfermedad o afección y/o los síntomas asociados con la misma. Aunque no se excluye, el tratamiento de una enfermedad o afección no implica que la enfermedad, la afección o los síntomas asociados con la misma se eliminen por completo. Como se usan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y similares, pueden incluir "tratamiento profiláctico", que se refiere a reducir la probabilidad de volver a desarrollar una enfermedad o afección, o de una recurrencia de una enfermedad o afección previamente controlada, en un sujeto que no tiene, pero que está en riesgo de o es susceptible a volver a desarrollar una enfermedad o afección o una recurrencia de la enfermedad o afección. El término "tratar" y los sinónimos contemplan la administración de un compuesto de la invención a un individuo en necesidad de dicho tratamiento.

25 En el sentido de la invención, "tratamiento" también incluye la profilaxis recurrente o la profilaxis en fases, así como el tratamiento de signos, síntomas y/o disfunciones agudos o crónicos. El tratamiento se puede orientar sintomáticamente, por ejemplo, para suprimir los síntomas. Se puede llevar a cabo en un corto período, orientarlo a medio plazo o puede ser un tratamiento a largo plazo, por ejemplo, en el contexto de una terapia de mantenimiento.

30 El término "mamífero" incluye seres humanos, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos y caballos), animales de zoológico (por ejemplo, cebras, elefantes y grandes felinos), animales del sector ganadero (por ejemplo, vacas, cerdos, cabras y ovejas) y animales de investigación (por ejemplo, ratas, ratones, cabras y cobayas).

35 La presente invención se dirige, en parte, al descubrimiento de que las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de carbazol de fórmulas estructurales generales (I) y (II) se pueden usar para modular la actividad de NF- $\kappa$ B, tal como las respuestas inmunes y las afecciones mediadas por NF- $\kappa$ B descritas en la solicitud de patente internacional PCT/US05/25884, designando los Estados Unidos, cuyo contenido se encuentra incorporado en la presente memoria por referencia.

40 En realizaciones preferidas de un compuesto de carbazol de fórmula estructural (I),  $R^a$  es metilo, etilo,  $NH(CH_3)$ ,  $OCH_3$  o forma un anillo alifático de cinco miembros con  $R^1$ . En otras realizaciones preferidas,  $R^b$  es metilo, etilo,  $NH(CH_3)$ ,  $OCH_3$ , forma un anillo alifático de cinco miembros con  $R^6$  o forma un anillo alifático que contiene nitrógeno de cinco miembros con  $R^6$ . En otra realización preferida,  $R^d$  es hidrógeno, metilo, etilo o forma un anillo alifático de cinco miembros con  $R^7$ .

45 En realizaciones preferidas,  $R^1$  es hidrógeno o forma un anillo alifático de cinco miembros con  $R^a$ . En otras realizaciones preferidas,  $R^2$  es hidrógeno o hidroxilo. En otras realizaciones preferidas,  $R^3$  es hidrógeno. En otras realizaciones preferidas,  $R^4$  es hidrógeno. En otras realizaciones preferidas más,  $R^5$  es hidrógeno o hidroxilo. En algunas realizaciones preferidas,  $R^6$  es hidrógeno, forma un anillo alifático de cinco miembros con  $R^b$  o forma anillo alifático que contiene nitrógeno de cinco miembros con  $R^b$ . En realizaciones preferidas,  $R^7$  es hidrógeno o forma un anillo de cinco miembros con  $R^d$ . En otras realizaciones preferidas más, n es 2 o 3.

50 En realizaciones preferidas de un compuesto de carbazol de fórmula estructural (II),  $R^f$  es metilo o etilo,  $R^g$  es hidrógeno, metilo, etilo o forma un anillo alifático que contiene nitrógeno de cinco miembros con  $R^f$  y  $R^8$ , o  $R^8$  es hidrógeno,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  y  $R^{14}$  son hidrógeno. En otras realizaciones más, p es 2 o 3.



aceptables de los mismos.

Los compuestos de fórmula estructural (I) y (II) también pueden estar conjugados o unidos a restos auxiliares que potencien una propiedad beneficiosa del compuesto en un procedimiento de uso terapéutico. Dichos conjugados pueden mejorar la administración de los compuestos en una determinada zona o región anatómica de interés (por ejemplo, un tumor), permitir concentraciones terapéuticas sostenidas de los compuestos en células diana, modificar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los compuestos y/o mejorar el índice terapéutico o perfil de seguridad de los compuestos. Los restos auxiliares adecuados incluyen, por ejemplo, aminoácidos, oligopéptidos o polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos diseñados mediante ingeniería genética; y ligandos naturales o sintéticos para los receptores en las células o tejidos diana. Otros adyuvantes adecuados incluyen ácidos grasos o restos de lípidos que potencian la biodistribución y/o la captación del compuesto por células diana (véase, por ejemplo, Bradley *et al.*, *Clin. Cancer Res.* (2001) 7:3229).

Los compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (I) y (II) son de interés para su uso en terapia, específicamente, para el tratamiento de una variedad de afecciones en las que la inhibición de NF- $\kappa$ B se considera beneficiosa. La inhibición de NF- $\kappa$ B es una diana especialmente interesante, ya que la inhibición proporciona efectos tales como apoptosis, efecto antimicrobiano, efecto antiprotzoario, efecto antiviral y efecto antiinflamatorio, todos ellos beneficiosos en el tratamiento de diversos estados patológicos. Así pues, los compuestos de fórmula (I) y (II) tienen utilidad en el tratamiento de una serie de trastornos, enfermedades y afecciones.

La potencia de uno de los presentes compuestos de carbazol se determina midiendo la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de NF- $\kappa$ B o para activar p53. La activación de p53 se mide típicamente usando un ensayo de dosis-respuesta en el que se pone en contacto un sistema de ensayo sensible con un compuesto de interés en un intervalo de concentraciones, incluyendo concentraciones a las cuales se observa un efecto mínimo o nulo, pasando por concentraciones más elevadas, en las que se observa un efecto parcial, hasta concentraciones de saturación en las que se observa un efecto máximo. Teóricamente, dichos ensayos del efecto de dosis-respuesta de los compuestos activadores se pueden describir como una curva sigmoide que expresa un grado de activación en función de la concentración. La curva también pasa teóricamente a través de un punto en el que la concentración es suficiente para aumentar la actividad hasta un nivel que es el 50% de la diferencia entre un valor de referencia y la actividad máxima del ensayo. Esta concentración se define como la concentración eficaz (50%) o el valor de CE<sub>50</sub>. La determinación de un valor de CE<sub>50</sub> se realiza mediante técnicas de ensayo bioquímicas convencionales (sin células) o técnicas de ensayo basadas en células.

A menudo, se proporcionan comparaciones de la eficacia de los activadores con referencia a valores de CE<sub>50</sub> comparativos, en las que una CE<sub>50</sub> superior indica que el compuesto de ensayo es menos potente, y una CE<sub>50</sub> inferior indica que el compuesto es más potente que un compuesto de referencia. Los compuestos de la presente invención muestran una potencia inesperadamente buena, es decir, la activación de p53, en un ensayo de línea celular con indicador de luciferasa. Los compuestos de la invención sometidos a un ensayo basado en células descrito a continuación mostraron valores de CE<sub>50</sub> para la activación de p53 de menos de aproximadamente 1,35  $\mu$ M. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención mostraron un valor de CE<sub>50</sub> de menos de aproximadamente 1,0  $\mu$ M. En otras realizaciones, los compuestos de la invención presentaron valores de CI<sub>50</sub> de menos de aproximadamente 0,75  $\mu$ M, aproximadamente 0,50  $\mu$ M, aproximadamente 0,30  $\mu$ M, menos de aproximadamente 0,20  $\mu$ M o menos de 0,05  $\mu$ M.

Un uso especialmente importante de los presentes compuestos de carbazol es el tratamiento de un cáncer, una inflamación, una enfermedad autoinmune, una infección microbiana, protozoaria o viral, una enfermedad de injerto contra huésped, una afección asociada con la infección por VIH o células precancerosas que han adquirido dependencia a NF- $\kappa$ B constitutivamente activo. Los diversos tipos de cáncer que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células renales, sarcoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas, mieloma, leucemia mieloide y linfoblástica, neuroblastoma, glioblastoma y un cáncer causado por una infección por VLTH.

Por lo tanto, se considera que los compuestos de fórmula (I) y (II) son útiles en el tratamiento de una variedad de afecciones y enfermedades. Así pues, la presente invención se refiere al uso de compuestos de fórmula (I) y (II), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o una composición farmacéutica que contiene cualquier entidad, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dichas afecciones y enfermedades.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar terapéuticamente como el producto químico puro, pero es preferible administrar los compuestos de fórmula estructural (I) o (II) en forma de una composición o formulación farmacéutica. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (I) o (II) junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar un compuesto de fórmula (I) o (II) con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, la presente invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula estructural (I) o (II), o una sal, un profármaco o un hidrato farmacéuticamente aceptable del

mismo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Los vehículos son "aceptables" en el sentido de que son compatibles con el resto de los ingredientes de la formulación y no son perjudiciales para el receptor de los mismos.

5 Las formulaciones de la presente invención se pueden administrar de una manera convencional para el tratamiento de las enfermedades indicadas tal como oralmente, parenteralmente, transmucosalmente (por ejemplo, administración sublingual o por vía bucal), tópicamente, transdérmicamente, rectalmente o mediante inhalación (por ejemplo, nasal o por inhalación pulmonar profunda). La administración parenteral incluye, pero sin limitación, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal e intraarticular. La administración parenteral también se puede realizar usando una técnica de alta presión, como POWDERJECT™ (Powderject Pharmaceuticals, Plc, Oxford, Inglaterra). La composición también se puede administrar en forma de un implante, que permite una liberación lenta de la composición, así como una infusión i.v. lenta controlada.

15 Para la administración oral, incluyendo la administración bucal, la composición puede estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y las cápsulas para una administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón o polivinilpirrolidona), cargas (por ejemplo, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato cálcico o sorbitol), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol o sílice), disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico) o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

20 Alternativamente, los compuestos de la presente invención se pueden incorporar en preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires. Además, las formulaciones que contienen estos compuestos se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, por ejemplo, agentes de suspensión tales como jarabe de sorbitol, metilcelulosa, glucosa/jarabe de azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes tales como lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) tales como aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleaginosos, propilenglicol y alcohol etílico; y conservantes tales como *p*-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

30 Dichas preparaciones también se pueden formular como supositorios, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Las composiciones para inhalación normalmente se pueden proporcionar en forma de una solución, suspensión o emulsión que se puede administrar en forma de un polvo seco o en forma de un aerosol usando un propulsor convencional tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano. Las formulaciones tópicas y transdérmicas típicas comprenden vehículos acuosos o no acuosos convencionales tales como gotas para los ojos, cremas, pomadas, lociones y pastas, o están en la forma de emplasto medicinal, parche o membrana.

40 Además, las composiciones de la presente invención se pueden formular para su administración parenteral mediante inyección o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de su uso.

45 Una composición de la presente invención también se puede formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por consiguiente, los compuestos de la invención se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable), resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, una sal poco soluble).

50 La composición también se puede formular como una preparación de liposomas. La preparación de liposomas puede comprender liposomas que penetran en las células de interés o el estrato córneo, y se fusionan con la membrana celular, produciendo la administración del contenido del liposoma en la célula. Los liposomas se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.077.211, la patente de EE.UU. N° 4.621.023 y la patente de EE.UU. N° 4.508.703, todas ellas incorporadas en la presente memoria por referencia.

55 Para un uso veterinario, se administra un compuesto de fórmula (I) o (II), o una sal o un profármaco farmacéuticamente aceptable, como una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente la pauta de dosificación y la vía de administración que sean más apropiadas para un animal en particular. Los animales que se pueden tratar con los presentes compuestos y procedimientos incluyen, pero sin limitación, animales domésticos, ganado, animales de espectáculos y animales de zoológico.

Procedimientos sintéticos

Los compuestos de fórmula (I) y (II) se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, o mediante los siguientes procedimientos que forman parte de la presente invención. En particular, los compuestos de fórmula estructural (I) y (II) se pueden preparar de acuerdo con los siguientes esquemas sintéticos.

- 5 En los procedimientos de síntesis, en los ejemplos y en toda la memoria descriptiva, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

DMF	dimetilformamida
NaH	hidruro de sodio
min	minutos
CCF	cromatografía de capa fina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	cloruro de metileno
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
MeOH	metanol
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sodio
AlCl <sub>3</sub>	cloruro de aluminio
AcCl	cloruro de acetilo
EM-CL	espectroscopia de masa mediante cromatografía en fase líquida
Et <sub>2</sub> O	dietiléter
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de sodio
CLAR	cromatografía en fase líquida de alta resolución
h	horas
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
NaCl	cloruro de sodio
HCl	ácido clorhídrico
g	gramo
eq.	equivalente
mol	mol
mmol	milimol
ml	mililitro
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de potasio
Pd(OAc) <sub>2</sub>	acetato de paladio
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	tetra(trifenilfosfil)paladio
P(OEt) <sub>3</sub>	trietoxifosfina

(Continuación)

NaH	hidruro de sodio
TfOH	ácido triflico
EtOH	etanol
RMN	resonancia magnética nuclear
EtOAc	acetato de etilo
THF	tetrahidrofurano
NaOH	hidróxido de sodio
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidinona
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
MsCl	cloruro de mesilo
TEA	trietanolamina
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sodio
(Boc) <sub>2</sub> O	carbonato de di- <i>terc</i> -butilo
Py	piridina
PdCl <sub>2</sub> (PPh) <sub>3</sub>	dicloro-trifenilfosfin-paladio (II)
PhNO <sub>2</sub>	nitrobenceno
KOAc	acetato de potasio
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	dicloro-((bis-difenilfosfil)ferrocenil)-paladio (II)
AcOK	acetato de potasio
PPh <sub>3</sub>	trifenilfosfina
PPh <sub>3</sub> O	óxido de trifenilfosfina
BBr <sub>3</sub>	tribromoboro
CH <sub>3</sub> CN	acetonitrilo
PhSH	tiofenoxilo
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de cesio
STAB	triacetoxiborohidruro de sodio
NEt <sub>3</sub>	trietanolamina
DMF	dimetilformamida

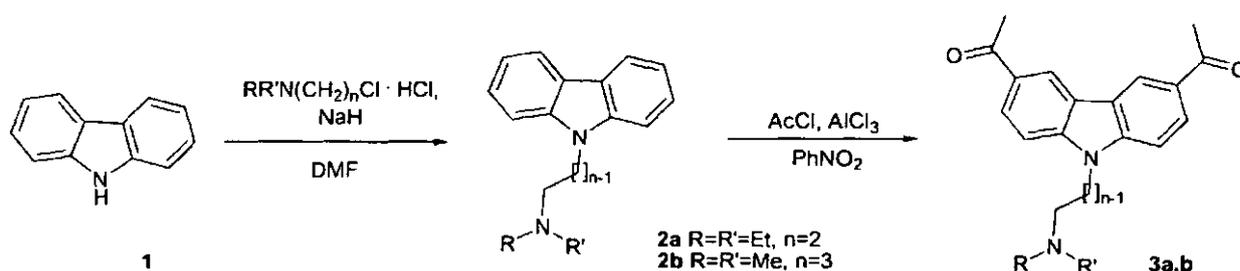
- 5 Se ha de entender que se pueden usar grupos protectores de acuerdo con los principios generales de la química orgánica sintética para proporcionar compuestos de fórmula estructural (I) y (II). Los reactivos formadores de grupos protectores son bien conocidos para los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, T. W. Greene *et al.*, "Protective Groups in Organic Synthesis, Tercera edición," John Wiley and Sons, Inc., NY, N.Y. (1999). Estos grupos protectores se retiran cuando es necesario mediante condiciones básicas, ácidas o hidrogenolíticas apropiadas conocidas por los expertos en la técnica. Por consiguiente, los expertos en la técnica pueden preparar compuestos de fórmula estructural (I) y (II) no ejemplificados específicamente en la presente memoria.
- 10 Además, los compuestos de fórmula (I) y (II) se pueden convertir en otros compuestos de fórmula (I) y (II). Así pues, por ejemplo, se puede interconvertir un determina sustituyente R para preparar otro compuesto adecuadamente

sustituido de fórmula (I) o (II). Los ejemplos de interconversiones adecuadas incluyen, pero sin limitación, OR<sup>a</sup> en hidroxilo mediante procedimientos adecuados (por ejemplo, usando un agente tal como SnCl<sub>2</sub> o un catalizador de paladio como paladio sobre carbono), o amino en amino sustituido tal como acilamino o sulfonilamino, usando condiciones de acilación o de sulfonilación estándar.

- 5 Los compuestos de fórmula (I) y (II) se pueden preparar en forma de estereoisómeros individuales como una mezcla racémica. Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de racematos por resolución mediante procedimientos conocidos en la técnica para la separación de mezclas racémicas en sus estereoisómeros constituyentes, por ejemplo, usando CLAR en una columna quiral tal como naftilurea Hypersil, o usando separación de sales de estereoisómeros. Los compuestos de la invención se pueden aislar en asociación con moléculas de disolvente mediante cristalización en o evaporación de un disolvente apropiado.

#### Procedimientos generales de síntesis

#### Esquema 1



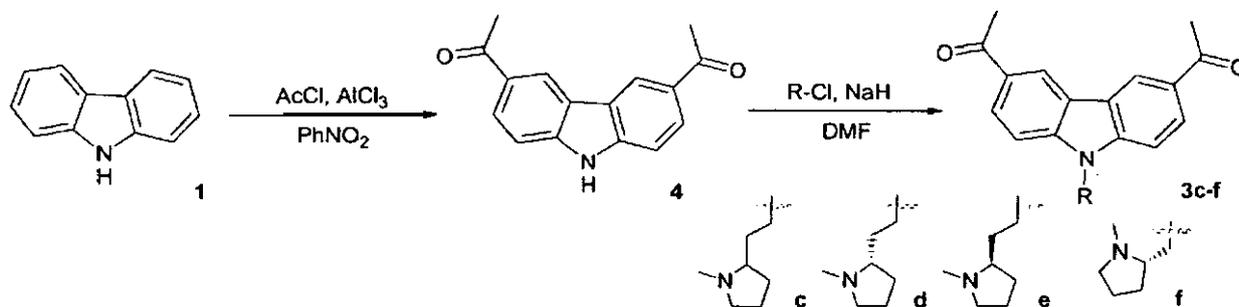
#### 15 Procedimiento general para la alquilación de carbazoles

- Se disolvió o suspendió carbazol 1 en DMF. A continuación, se añadió NaH (3 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante un período de 5-10 minutos hasta que cesó la formación de espuma. Se añadió un clorhidrato de cloruro (1,3 eq), y se mantuvo la mezcla de reacción a 50-60 °C durante un periodo de 2-16 h (seguimiento mediante CCF; eluyentes: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetato de etilo (1:1) para la presencia del carbazol de partida; CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) para la pureza del producto). Se diluyó la mezcla resultante con agua. Cuando se formó un precipitado, se filtró y se secó al aire. Cuando no se formó precipitado (Tabla 1), se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó y se purificó el residuo mediante cromatografía (gel de sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH). Los rendimientos de los productos 2a y 2b se muestran en la Tabla 1.

#### Procedimiento general para la acilación de carbazoles alquilados

- 25 Se disolvió un carbazol 2 en nitrobeneno. Se enfrió la solución en un baño de hielo y, a continuación, se añadieron AlCl<sub>3</sub> (5 eq) y AcCl (5 eq). Se mantuvo la mezcla de reacción durante un periodo de 2-16 h (seguimiento mediante EM-CL). Se diluyó una muestra de la mezcla de reacción con Et<sub>2</sub>O y se decantó este último del precipitado, y después se disolvió en MeOH. Se diluyó la mezcla resultante con agua, se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se extrajo con CHCl<sub>3</sub>. Se evaporó el extracto. Se purificó el residuo mediante cromatografía en una columna corta de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) para eliminar el nitrobeneno; luego, cuando fue necesario, en una columna de gel de sílice o mediante CLAR. Los rendimientos de los productos 3a y 3b se muestran en la Tabla 1.

#### Esquema 2



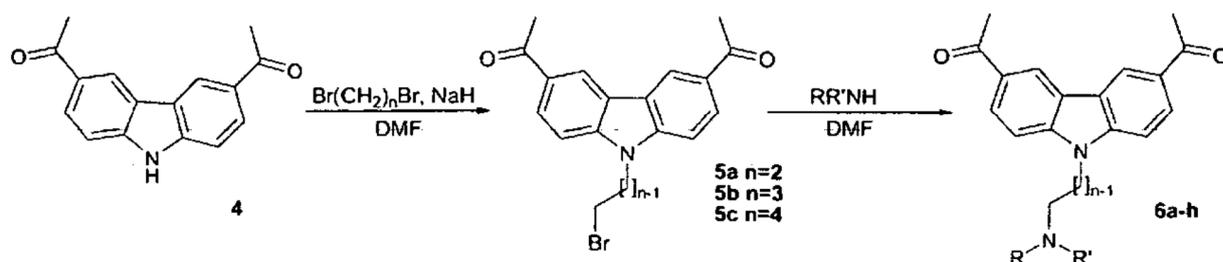
#### 3,6-Diacetilcarbazol (4)

- 35 Se disolvió el carbazol 1 (16,9 g, 0,1 mol) en nitrobeneno (300 ml). Se añadió AlCl<sub>3</sub> anhidro (54,0 g, 0,4 mol) bajo agitación y enfriamiento con un baño de hielo. A continuación, se añadió AcCl (55,5 g, 0,7 mol) lentamente gota a gota. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente con agitación y se mantuvo durante un período de 13 h. Se añadió agua (500 ml) en pequeñas porciones bajo enfriamiento con un baño de hielo. Se retiró

el baño de refrigeración, y se sometió la mezcla a reflujo durante un período de 2 h y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  (3 x 150 ml). Se lavaron los extractos combinados secuencialmente con soluciones saturadas de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{NaCl}$ , se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporaron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ), dando 12,5 g (50%) de 3,6-diacetilcarbazol (4).

- 5 Para la alquilación del compuesto 4, se usó el procedimiento general de alquilación de carbazoles. Los rendimientos de los productos 3c-f se muestran en la Tabla 1.

### Esquema 3



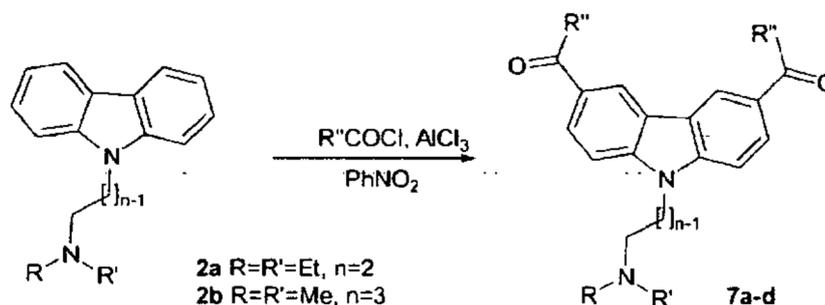
### Preparación de bromoalquil-diacetilcarbazoles 5a-c

- 10 Se disolvió diacetilbarbazol 4 en DMF y, a continuación, se añadió NaH (3 eq). Se agitó la mezcla durante un período de 10 min a temperatura ambiente. Se añadió un dibromoalcano (7 eq). Se mantuvo la mezcla de reacción durante un período de 1 h (5a a temperatura ambiente; 5b a 40 °C; 5c durante un período de 20 min a 70 °C; seguimiento mediante CCF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetato de etilo, acetato de etilo (4:1)). Luego se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con acetato de etilo. Se lavaron los extractos combinados con agua y salmuera, se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporaron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3$ ), dando 5a (21%), 5b (29%) y 5c (74%).
- 15

### Alquilación de aminas con bromoalquil-diacetilcarbazoles 5a-c

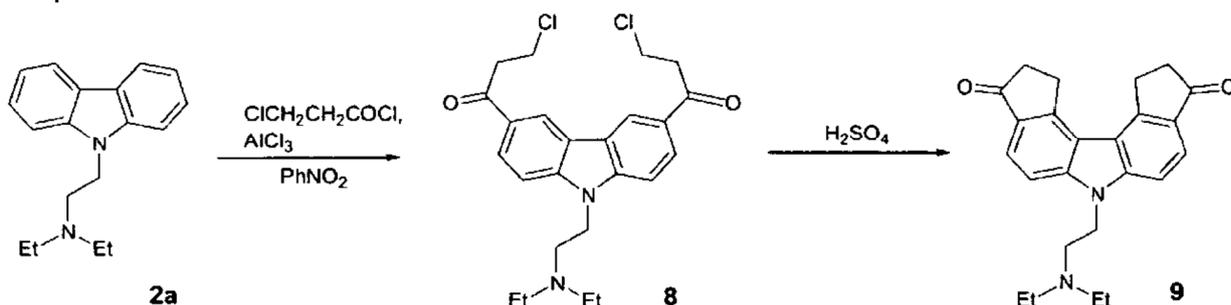
- 20 Se disolvió un bromuro 5 en DMF, a continuación, se añadió una amina (en exceso, véase la Tabla 3). Se mantuvo la mezcla a 60 °C durante una noche. (Seguimiento mediante CCF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetato de etilo, (1:1) para la presencia del carbazol de partida;  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , (9:1) para la pureza del producto). Se diluyó la mezcla de reacción con agua y se extrajo con acetato de etilo. Se secaron los extractos combinados con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ). Se disolvió el producto en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH. Se añadió HCl 4 M en dioxano y se evaporó la mezcla. Se trituró el residuo con  $\text{Et}_2\text{O}$  y, cuando fue necesario, con acetato de etilo o acetona. Los rendimientos de los productos 6a-h se muestran en la Tabla 3.

### Esquema 4



- 25 Para la acilación de 2, se usó un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1. Los rendimientos de los productos 7a-d se muestran en la Tabla 4.

## Esquema 5

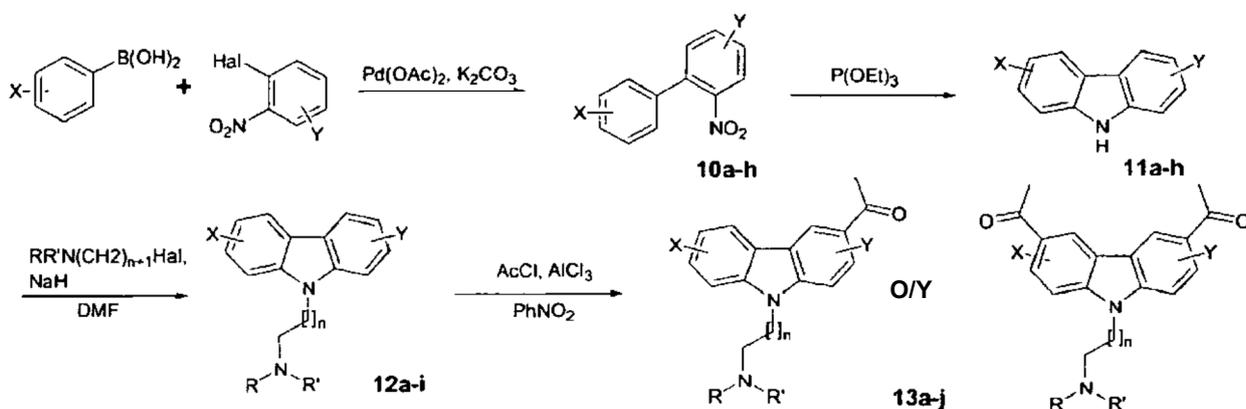
**3,6-Bis(cloropropionil)-9-*N,N*-dietilaminoetilcarbazol (8)**

Se enfrió una solución de 1-*N,N*-dietilaminoetilcarbazol (0,23 g, 0,86 mmol) en 2 ml de nitrobenzeno en un baño de hielo. Se añadieron AlCl<sub>3</sub> (0,57 g, 4,3 mmol) y cloruro de 3-cloropropionilo (0,4 ml, 4,2 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante una noche (seguimiento mediante EM-CL) y se diluyó con HCl acuoso. Se extrajo el producto con CHCl<sub>3</sub> y se evaporó el filtrado. Se purificó el residuo mediante cromatografía rápida en una columna de gel de sílice corta (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), dando 0,38 g (91%) del compuesto 8 como su clorhidrato.

**1,2,10,11-Tetrahidro-6-*N,N*-dimetilamioetil-6H-diclopenta[*c,g*]carbazol-3,9-diona (9)**

Se disolvió el compuesto 2 (0,38 g, 0,79 mmol) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% (3 ml). Se calentó la mezcla de reacción a 95 °C, se mantuvo a esta temperatura durante un período de 2,5 h (seguimiento mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/MeOH, (4:1)), y se vertió en hielo. Se neutralizó la mezcla resultante con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> seco y se extrajo con CHCl<sub>3</sub>. Se evaporó el extracto y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). Se disolvió el producto bruto obtenido (0,08 g) en MeOH. Se añadió HCl 4 M en dioxano y se evaporó la mezcla. Se suspendió el residuo en MeOH, y se calentó la suspensión a reflujo. (El sólido no se disolvió en el procedimiento). Se enfrió la suspensión y se separó el sólido mediante filtración, dando 0,007 g (2%) del compuesto 9 como su clorhidrato.

## Esquema 6

**2-Metil-2'-nitro-1,1'-bifenilo (10a)**

Se disolvieron ácido 2-metilfenilborónico (0,64 g, 4,7 mmol) y 2-nitroyodobenceno (1,0 g, 4,0 mmol) en una mezcla de MeOH (20 ml) y agua (4 ml). Se añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,1 g, 8,0 mmol) y Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,018 g, 0,08 mmol). Se purgó la mezcla de reacción con argón, se calentó hasta 50 °C, se mantuvo durante la noche a esta temperatura y se filtró a través de Celite. Se lavó esto último con MeOH. Se evaporó el filtrado y se usó el residuo sin purificación adicional.

**4,4'-Dimetoxi-2-nitro-1,1'-bifenilo (10h)**

Se disolvieron ácido 4-metoxifenilborónico (3,00 g, 19,7 mmol) y 4-cloro-3-nitroanisol (3,69 g, 11,6 mmol) en una mezcla de dioxano (40 ml) y agua (10 ml). Se añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,44 g, 23,2 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,14 g, 0,6 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en atmósfera de argón hasta 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche (seguimiento mediante CCF: hexano/acetato de etilo, (4:1)), se enfrió y se filtró a través de Celite. Se lavó esto último con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se evaporó la solución, dando 6,0 g de bifenilo bruto 10h que se sometieron a una ciclación sin purificación. Se usó un procedimiento análogo, obteniéndose bifenilos 10b-g.

**Procedimiento general para la síntesis de carbazoles**

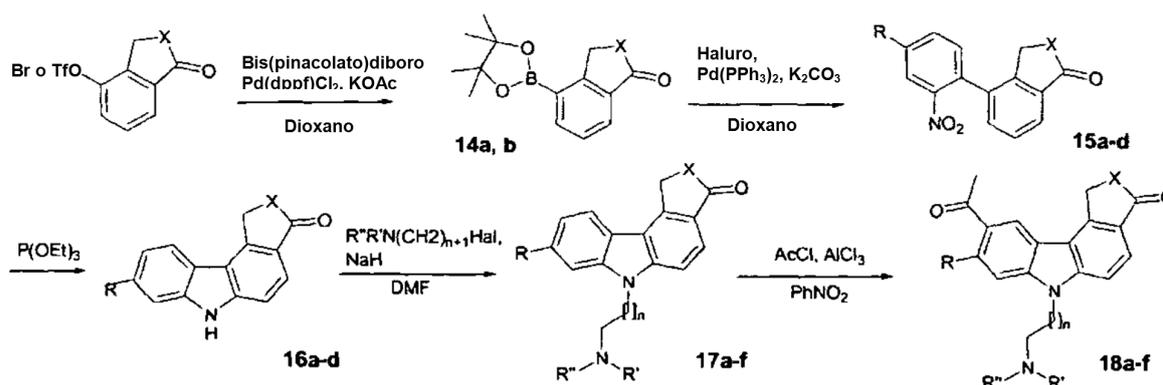
Se disolvió un bifenilo bruto en  $(\text{EtO})_3\text{P}$ . Se mantuvo la mezcla de reacción a 125-140 °C en un flujo de argón durante un período de aproximadamente 48 h (seguimiento mediante CCF: hexano/acetato de etilo, (1:1)) y se diluyó con agua. Se separó el precipitado mediante filtración y se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$ . Cuando no se formó precipitado, se extrajo el producto con acetato de etilo, se evaporó el extracto y se purificó el residuo en una columna de gel de sílice corta (hexano/acetato de etilo). Los rendimientos de los productos 11 a-g se muestran en la Tabla 5.

**2,7-Dimetoxi-9H-carbazol (11h)**

La reacción se llevó a cabo en un vial. Se disolvió el bifenilo bruto 10th (6,0 g) en  $\text{P}(\text{OEt})_3$  (36 ml). Se purgó el vial con argón. Se calentó la mezcla de reacción hasta 90 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche y se enfrió. Como resultado de ello, el carbazol precipitó. Se añadió una mezcla de  $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se separó el precipitado mediante filtración y se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se evaporó el filtrado. Se volvió a añadir  $\text{P}(\text{OEt})_3$ , y se dejó la mezcla para la ciclación durante 24 h. Se repitieron estas operaciones hasta que cesó la formación de precipitado y la CCF indicó que el bifenilo de partida había desaparecido. En total, se obtuvieron 2,9 g del carbazol (el 65% calculado para las dos etapas).

Para la alquilación del compuesto 11, se usó el procedimiento general de alquilación de carbazoles. Los rendimientos de los compuestos 12a-i se muestran en la Tabla 1.

Para la acilación de 12, se usó un procedimiento similar al descrito para el Esquema 1. Sin embargo, para la monoacilación, se redujo la cantidad de  $\text{AcCl}$  y  $\text{AlCl}_3$  hasta 1,5 eq. Los rendimientos de los productos 13a-j se muestran en la Tabla 2.

**Esquema 7****4,4,5,5-Tetrametil-2-(4-indanona-1-il)-[1,3,2]-dioxoborolano (14a X = CH<sub>2</sub>)**

Se disolvieron 4-trifluorometilsulfonilo-1-indanona (9,7 g, 34,6 mmol) y bis(pinacolato)diboro (11,4 g, 45,0 mmol) en dioxano (100 ml). Se añadieron AcOK (6,8 g, 69,2 mmol) y  $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$  (1,3 g, 1,8 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en un flujo de argón a 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche, se enfrió y se filtró a través de Celite. Se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se purificó en una columna de gel de sílice corta (hexano/acetato de etilo), dando 9,5 g de un producto que contenía el 20% (peso) de bis(pinacolato)diboro. El producto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

El éster borónico del bromuro se preparó de la misma manera. Cuando se usó 1 eq de bis(pinacolato)diboro, se obtuvo un producto más puro.

**4,4,5,5-Tetrametil-2-[4-(2-metilisoindolin-1-ona)-il]-[1,3,2]-dioxoborolano (14b X = NMe)**

Se disolvieron 4-Bromo-2-metilisoindolin-1-ona (3,23 g, 14,3 mmol) y bis(pinacolato)diboro (4,72 g, 18,6 mmol) en dioxano (60 ml). Se añadieron AcOK (2,80 g, 28,6 mmol) y  $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$  (0,5 g, 0,7 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en un flujo de argón hasta 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche, se enfrió y se filtró a través de Celite. Se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se purificó en una columna de gel de sílice corta (hexano/acetato de etilo), dando 4,2 g de un producto que contenía el 20% (peso) de bis(pinacolato)diboro. El producto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

**Bifenilo 15a (X = CH<sub>2</sub>, R = H)**

Se disolvieron 4,4,5,5-tetrametil-2-(4-indanona-1-il)-[1,3,2]-dioxoborolano (2,17 g, 8,4 mmol) y *o*-nitroyodobenceno (2,70 g, 10,9 mmol) en una mezcla de dioxano (30 ml) y agua (5 ml). Se añadieron  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2,30 g, 16,7 mmol) y

Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,48 g, 0,4 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en un flujo de argón hasta 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante un periodo de 24 h (seguimiento mediante CCF: hexano/acetato de etilo, (4:1)), se enfrió y se filtró a través de Celite. Se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó un precipitado no disuelto mediante filtración. Se evaporó el filtrado parcialmente y el producto se purificó en una columna de gel de sílice corta (hexano/acetato de etilo), dando 2,5 g de un producto que contenía PPh<sub>3</sub>O. El producto se cicló sin purificación adicional.

#### Bifenilo 15b (X = CH<sub>2</sub>, R = OMe)

Se disolvieron 4,4,5,5-tetrametil-2-(4-indanona-1-il)-[1,3,2]-dioxoborolano (1,20 g, 4,6 mmol) y *o*-nitroyodobenceno (0,87 g, 4,6 mmol) en una mezcla de dioxano (10 ml) y agua (2 ml). Se añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,28 g, 9,2 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,27 g, 0,2 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en un flujo de argón hasta 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante un periodo de 24 h (seguimiento mediante CCF: hexano/acetato de etilo, (4:1)), se enfrió y se filtró a través de Celite. Se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó un precipitado no disuelto mediante filtración. Se evaporó el filtrado parcialmente y el producto se purificó en una columna de gel de sílice corta (hexano/acetato de etilo), dando 1,25 g de un producto que contenía PPh<sub>3</sub>O. El producto se cicló sin purificación adicional.

#### Bifenilo 15c (X = NMe, R = H)

Se disolvieron 4,4,5,5-tetrametil-2-[4-(2-metilisoindolin-1-ona)-il]-[1,3,2]-dioxoborolano (2,17 g, 8,9 mmol) y *o*-nitroyodobenceno (2,44 g, 9,80 mmol) en una mezcla de dioxano (30 ml) y agua (6 ml). Se añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,50 g, 18,1 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,51 g, 0,4 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en un flujo de argón hasta 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante un periodo de 24 h (seguimiento mediante CCF: hexano/acetato de etilo, (4:1)), se enfrió y se filtró a través de Celite. Se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó un precipitado no disuelto mediante filtración. Se evaporó el filtrado parcialmente y el producto se purificó en una columna de gel de sílice corta (hexano/acetato de etilo), dando 2,3 g de un producto que contenía PPh<sub>3</sub>O. El producto se cicló sin purificación adicional.

#### Bifenilo 15d (X = NMe, R = OMe)

Se disolvieron 4,4,5,5-tetrametil-2-[4-(2-metilisoindolin-1-ona)-il]-[1,3,2]-dioxoborolano (0,97 g, 3,6 mmol) y 4-cloro-3-nitroanisol (0,67 g, 3,6 mmol) en una mezcla de dioxano (10 ml) y agua (2 ml). Se añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,98 g, 7,2 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,21 g, 0,2 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en un flujo de argón hasta 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante un periodo de 24 h (seguimiento mediante CCF: hexano/acetato de etilo, (4:1)), se enfrió y se filtró a través de Celite. Se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó un precipitado no disuelto mediante filtración. Se evaporó el filtrado parcialmente y el producto se purificó en una columna de gel de sílice corta (hexano/acetato de etilo), dando 0,76 g de un producto que contenía PPh<sub>3</sub>O. El producto se cicló sin purificación adicional.

#### Carbazol 16a (X = CH<sub>2</sub>, R = H)

La reacción se llevó a cabo en un vial. Se disolvió 4-(2-nitrofenil)indanona-1 (2,54 g, 10,0 mmol) en P(OEt)<sub>3</sub> (8 ml). Se purgó el vial con argón. Se calentó la mezcla de reacción hasta 90 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche y se enfrió. Como resultado de ello, el carbazol precipitó. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó el precipitado mediante filtración y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se evaporó el filtrado. Se volvió a añadir P(OEt)<sub>3</sub> (2 ml), y se dejó la mezcla para la ciclación durante 24 h. Se repitieron estas operaciones hasta que cesó la formación de precipitado y la CCF indicó que el bifenilo de partida había desaparecido. En total, se obtuvieron 0,58 g del carbazol.

#### Carbazol 16b (X = CH<sub>2</sub>, R = OMe)

La reacción se llevó a cabo en un vial. Se disolvió el 4-(4-metoxi-2-nitrofenil)-indanona-1 (1,25 g, 4,4 mmol) en P(OEt)<sub>3</sub> (8 ml). Se purgó el vial con argón. Se calentó la mezcla de reacción hasta 90 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche y se enfrió. Como resultado de ello, el carbazol precipitó. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó el precipitado mediante filtración y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se evaporó el filtrado. Se volvió a añadir P(OEt)<sub>3</sub> (1 ml) y se dejó la mezcla para la ciclación durante 24 h. Se repitieron estas operaciones hasta que cesó la formación de precipitado y la CCF indicó que el bifenilo de partida había desaparecido. En total, se obtuvieron 0,39 g del carbazol.

#### Carbazol 16c (X = NMe, R = H)

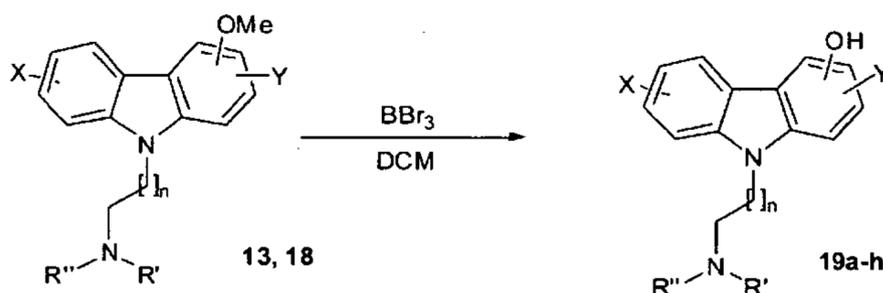
La reacción se llevó a cabo en un vial. Se disolvió el 4-(2-nitrofenil)-2-metilisoindolin-1-ona (2,29 g, 8,5 mmol) en P(OEt)<sub>3</sub> (10 ml). Se purgó el vial con argón. Se calentó la mezcla de reacción hasta 90 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche y se enfrió. Como resultado de ello, el carbazol precipitó. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó el precipitado mediante filtración y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se evaporó el filtrado. Se volvió a añadir P(OEt)<sub>3</sub> (0,5 ml) y se dejó la mezcla para la ciclación durante 24 h. Se repitieron estas operaciones hasta que cesó la formación de precipitado y la CCF indicó que el bifenilo de partida había desaparecido. En total, se obtuvieron 0,4 g del carbazol.

**Carbazol 16d (X = NMe, R = OMe)**

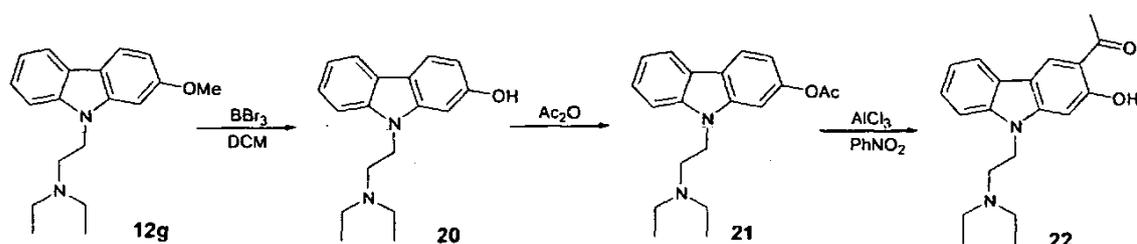
La reacción se llevó a cabo en un vial. Se disolvió el 4-(4-metoxi-2-nitrofenil)-2-metilisoindolin-1-ona (0,76 g, 2,6 mmol) en P(OEt)<sub>3</sub> (6 ml). Se purgó el vial con argón. Se calentó la mezcla de reacción hasta 90 °C, se mantuvo a esta temperatura durante una noche y se enfrió. Como resultado de ello, el carbazol precipitó. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó el precipitado mediante filtración y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se evaporó el filtrado. Se volvió a añadir P(OEt)<sub>3</sub> (0,5 ml) y se dejó la mezcla para la ciclación durante 24 h. Se repitieron estas operaciones hasta que cesó la formación de precipitado y la CCF indicó que el bifenílo de partida había desaparecido. En total, se obtuvieron 0,34 g del carbazol.

Para la alquilación de 16, se usó el procedimiento general de alquilación de carbazoles. Los rendimientos de los productos 17a-f se muestran en la Tabla 1.

Para la acilación de 17, se usó un procedimiento similar al descrito en el Esquema 1. Los rendimientos de los productos 18a-d se muestran en la Tabla 2.

**Esquema 8****Procedimiento general de desmetilación**

Se disolvió un compuesto de metoxilo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se enfrió la solución hasta -40 °C. Se añadió una solución 0,5 M de BBr<sub>3</sub> en DCM (4 eq, para un grupo metoxilo) en un flujo de argón. Después de 10 min, se retiró el baño de refrigeración. Se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se mantuvo durante un período de 1 h (seguimiento mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/MeOH, (4:1)) y se vertió en una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> acuoso y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó la capa orgánica y se extrajo la acuosa una vez más con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se secaron los extractos combinados con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporaron. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (CHCl<sub>3</sub>/MeOH). Los rendimientos de los productos 19a-h se muestran en la Tabla 6.

**Esquema 9****2-Hidroxi-9-N,N-dietilaminoetilcarbazol (20)**

Se disolvió 2-Metoxi-9-N,N-dietilaminoetilcarbazol 12g en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml). Se enfrió la solución hasta -40 °C. Se añadió una solución 0,5 M de BBr<sub>3</sub> en DCM (6 ml, 3,00 mmol) en un flujo de argón. Como resultado de ello, se formó una suspensión naranja. Se calentó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se mantuvo durante un período de 1,5 h y se vertió en una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> acuoso y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa una vez más con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se secaron los extractos combinados con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporaron. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), dando 0,176 g (92%) del producto.

**2-Acetoxi-9-N,N-dietilaminoetilcarbazol (21)**

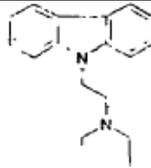
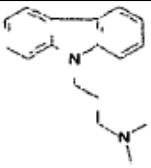
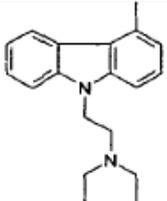
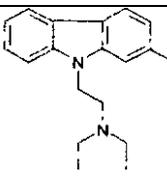
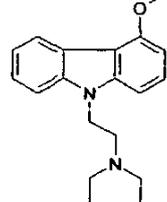
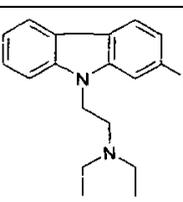
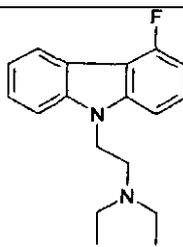
Se calentó una solución del compuesto 20 (0,176 g, 0,62 mmol) en Ac<sub>2</sub>O (2 ml) a reflujo durante un período de 30 min y se vertió en agua. Se neutralizó la mezcla resultante con NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo acetato de etilo. Se evaporó el extracto, dando 0,16 g (79%) del producto.

**3-Acetil-2-hidroxi-9-N,N-dietilaminoetilcarbazol (22)**

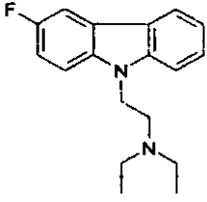
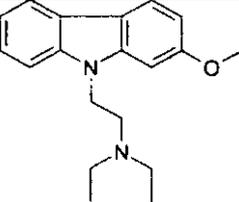
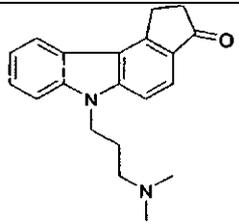
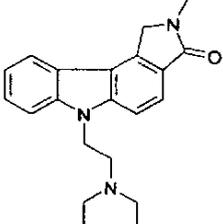
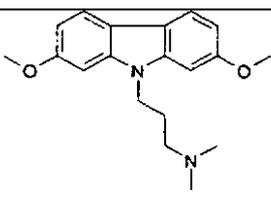
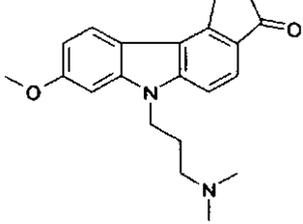
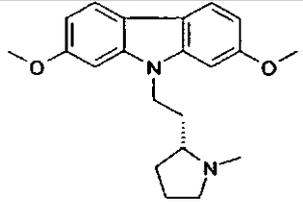
Se disolvió el compuesto 21 (0,16 g, 0,49 mmol) en PhNO<sub>2</sub> (2 ml) y se añadió AlCl<sub>3</sub> (0,1 g, 0,75 mmol). Se calentó la mezcla de reacción en un baño de aceite hasta 100 °C, se mantuvo a esta temperatura durante un período de 2 h, se diluyó con agua, se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se extrajo con HCl<sub>3</sub>. Se evaporó el extracto. Se purificó el residuo mediante cromatografía en una columna corta de gel de sílice (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), dando 0,044 g (28%) del compuesto 22.

5

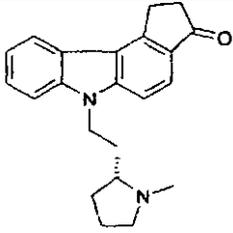
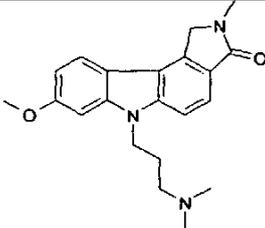
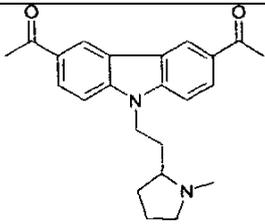
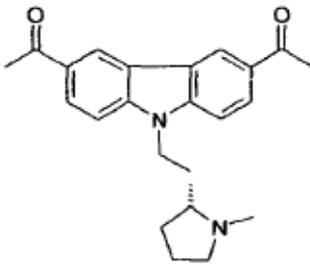
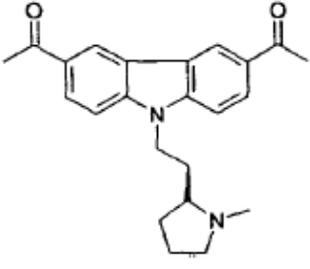
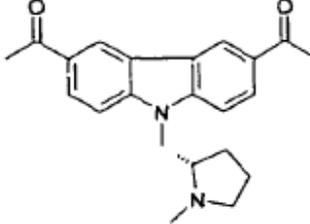
**Tabla 1. Alquilación de carbazoles**

		Rendimiento
<b>2a</b>		100%
<b>2b</b>		100%
<b>12a</b>		47%
<b>12b</b>		98% <sup>a</sup>
<b>12c</b>		59% <sup>a</sup>
<b>12d</b>		~25% <sup>b</sup>
<b>12e</b>		39% <sup>c</sup>

(Continuación)

		Rendimiento
12f		91%
12g		91% <sup>a</sup>
17a		31%
17b		28%
12h <sup>d</sup>		100%
17c		67%
12i <sup>d</sup>		100%

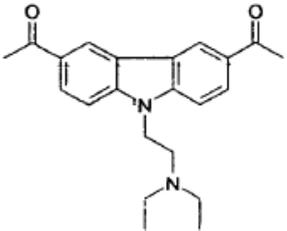
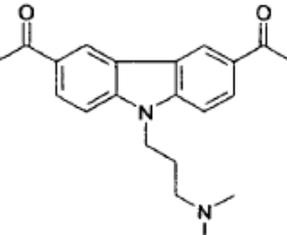
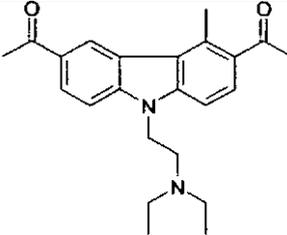
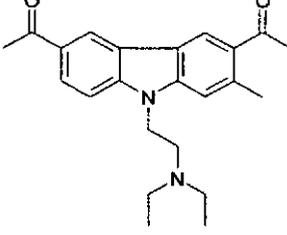
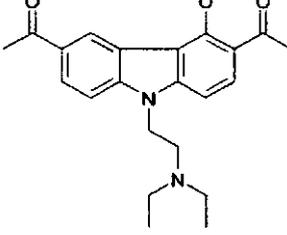
(Continuación)

		Rendimiento
17d		42%
17e		32%
3c		64%
3d		78%
3e		80%
3f		73%

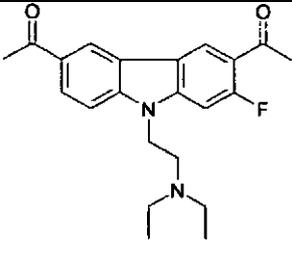
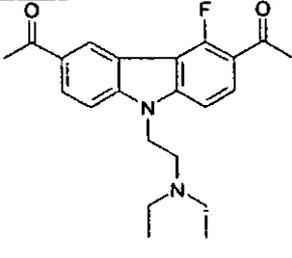
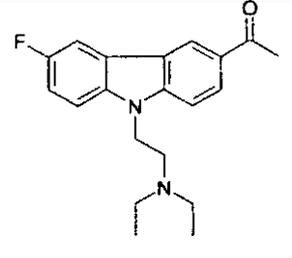
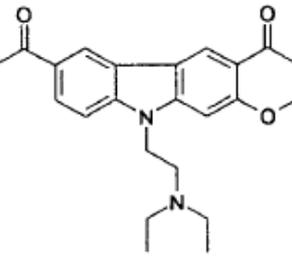
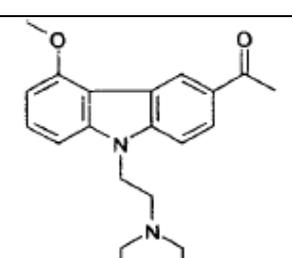
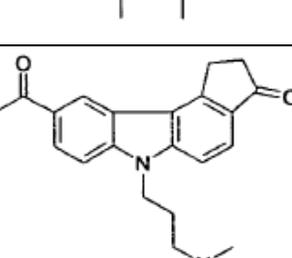
(Continuación)

	Rendimiento
<sup>a</sup> Contiene DMF. <sup>b</sup> El rendimiento no es exacto. Para la preparación, se usó carbazol en bruto. Purificación mediante clorhidrato. Purificación mediante clorhidrato. <sup>d</sup> Se aisló como sustancias cristalinas inmediatamente después de diluir la mezcla de reacción con agua.	

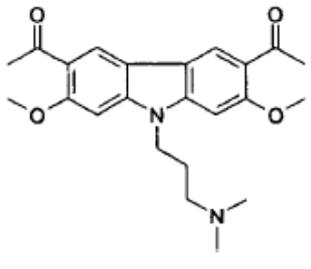
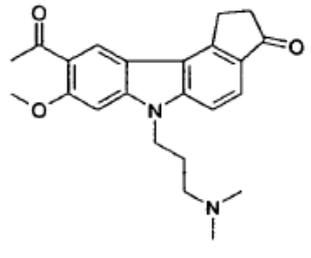
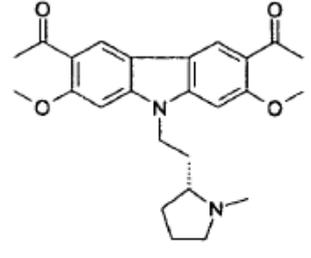
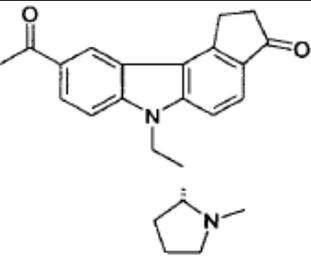
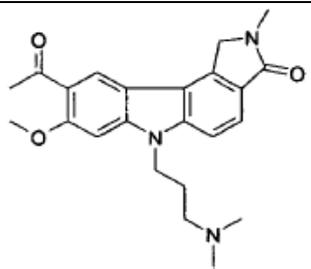
**Tabla 2. Acetilación de carbazoles alquilados**

		Rendimiento
<b>3a</b>		57%
<b>3b</b>		64%
<b>13a</b>		55%
<b>13b</b>		31%
<b>13c</b>		63%

(Continuación)

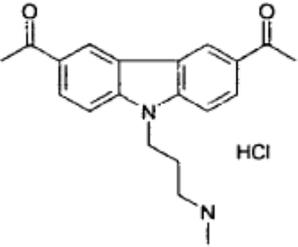
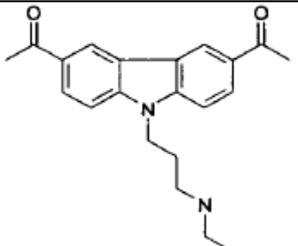
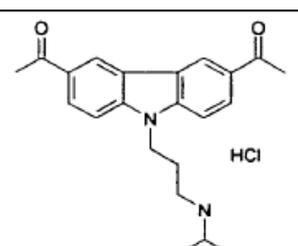
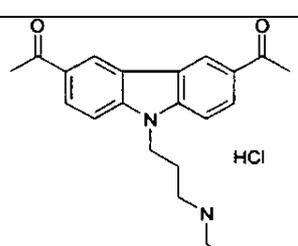
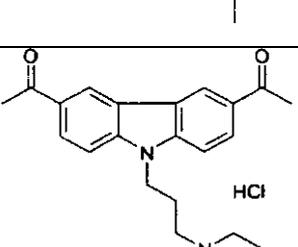
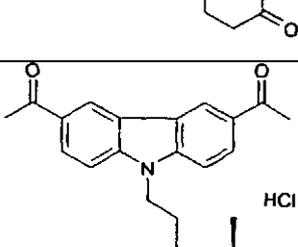
		Rendimiento
13d		92%
13e		88%
13f		95%
13g		69%
13h		57% <sup>a</sup>
18a		33%

(Continuación)

		Rendimiento
13i		74%
18		b
13j		48%
18c		46% <sup>a</sup>
18d		81%

<sup>a</sup>Después de la purificación mediante CLAR. <sup>b</sup>Se aisló una mezcla con el compuesto de partida y se usó luego sin separación.

Tabla 3. Alquilación de carbazoles con bromoalquildiacetilcarbazoles

		Rendimiento
6a		78%
6b		96%
6c		73%
6d		77%
6e		41%
6f		54%

(Continuación)

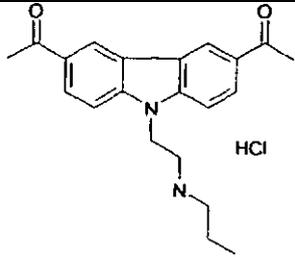
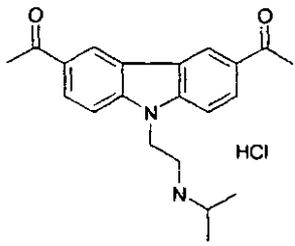
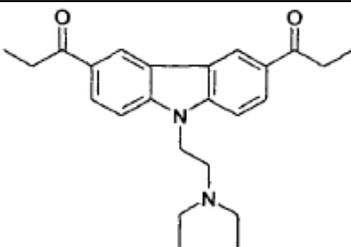
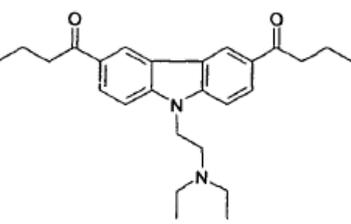
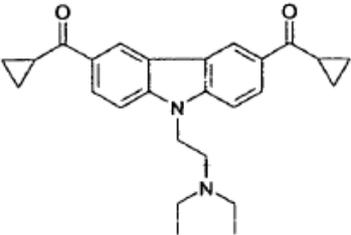
		Rendimiento
6g		54%
6h		46%

Tabla 4.

		Rendimiento
7a		32%
7b		54%
7c		14% <sup>a</sup>

(Continuación)

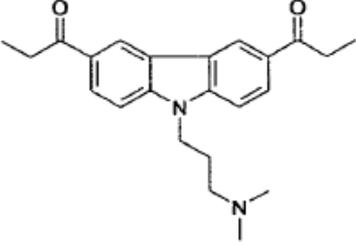
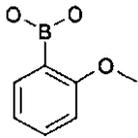
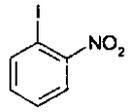
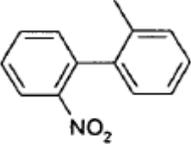
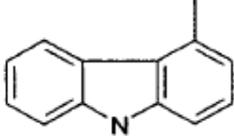
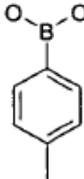
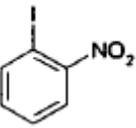
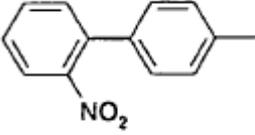
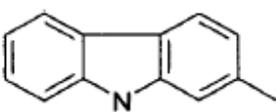
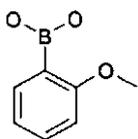
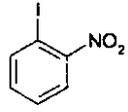
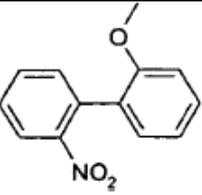
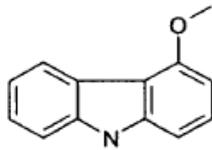
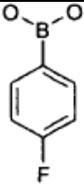
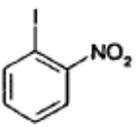
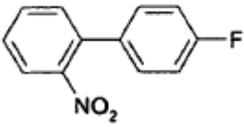
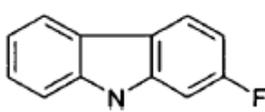
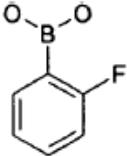
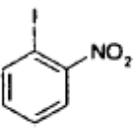
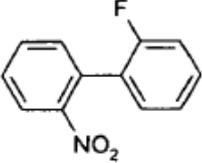
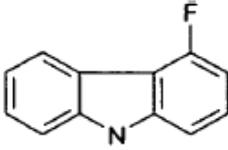
		Rendimiento
7d		64%
<sup>a</sup> Después de la purificación mediante CLAR		

Tabla 5

	Ácido borónico	Haluro	Bifenilo	Carbazol	Rendimiento (calculado para el haluro)
11a					35%
11b <sup>a</sup>					39%
11c					82%
11d					b
11e					37%

(Continuación)

	Ácido borónico	Haluro	Bifenilo	Carbazol	Rendimiento (calculado para el haluro)
11f					16% <sup>c</sup>
11g <sup>a</sup>					48%

<sup>a</sup>Precipitado como cristales. <sup>b</sup>El producto contenía (EtO)<sub>3</sub>PO y se usó sin purificación. <sup>c</sup>Solo se da el rendimiento del regioisómero diana.

Tabla 6

		Rendimiento
19a		43%
19b		23% <sup>a</sup>
19c		29% <sup>b</sup>

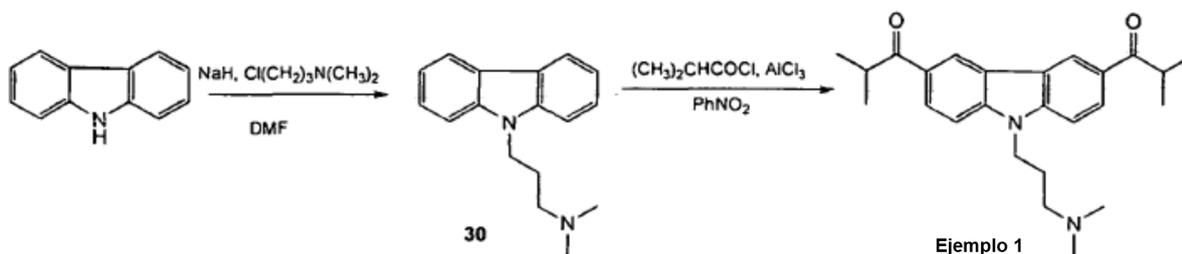
(Continuación)

		Rendimiento
<b>19d</b>		34% <sup>b</sup>
<b>19e</b>		10% <sup>a</sup>
<b>19f</b>		23% <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Después de la purificación mediante CLAR.  
<sup>b</sup>Obtenido tras procesar con una mezcla y separado mediante CLAR. <sup>c</sup>Purificación a través de clorhidrato.

**Ejemplos****Ejemplo 1**

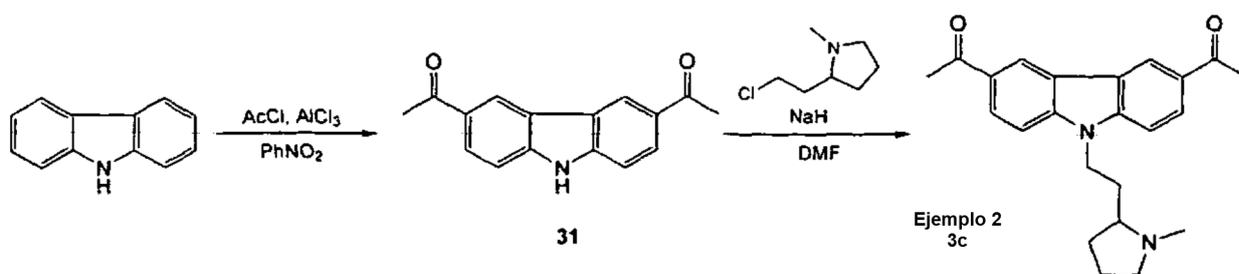
5

**[3-(9H-carbazol-9-il)propil]dimetilamina (30)**

10 Se disolvieron 3,0 g de carbazol (18,0 mmol) en DMF (20 ml). A continuación, se añadió NaH al 60% en parafina (2,5 g, 62,5 mmol) y se agitó la mezcla durante 10 min. Se añadieron 3,0 g de cloruro de 2-*N,N*-dimetilaminopropilo (19,0 mmol) en porciones, tras lo que la temperatura ascendió hasta 45-50 °C. Se mantuvo la mezcla de reacción a esta temperatura durante 2,5 h (Seguimiento mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , (9:1)). Se vertió lentamente la masa obtenida en una mezcla de hielo y agua, y se extrajo con acetato de etilo. Se secó el extracto con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó, dando el compuesto 30 (4,8 g, 100%) en forma de un aceite líquido de color marrón.

**1,1'-[9-[3-(dimetilamino)propil]-9H-carbazol-3,6-diil]bis(2-metilpropan-1-ona) (Ejemplo 1)**

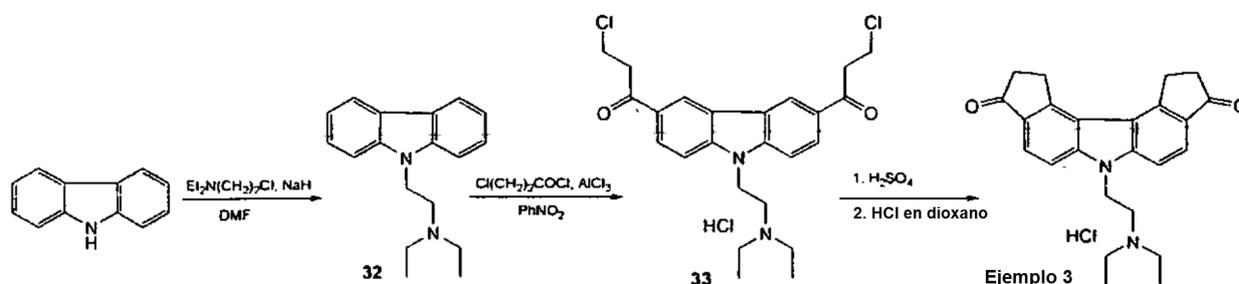
Se disolvió el Compuesto 30 (0,25 g, 1,0 mmol) en nitrobenzeno (5 ml). Se añadieron  $\text{AlCl}_3$  (0,6 g, 4,5 mmol) y, a continuación, cloruro de isobutiroilo (0,6 ml, 5,7 mmol) en porciones. Se agitó la mezcla de reacción durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL). Se vertió la mezcla obtenida en una mezcla de hielo y agua, y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ . Se evaporaron los extractos combinados y se purificó el residuo mediante cromatografía en una columna corta y gruesa de gel de sílice (eluyente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (99:1  $\rightarrow$  90:10)), proporcionando 0,189 g (47%) del producto. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1,20 (12H, d,  $J = 6,7$  Hz); 1,90-1,97 (2H, m); 2,11 (6H, s); 2,18 (2H, t,  $J = 6,7$  Hz); 3,91 (2H, septet,  $J = 6,7$  Hz); 4,50 (2H, t,  $J = 6,6$  Hz); 7,76 (2H, d,  $J = 8,7$  Hz); 8,14 (2H, dd,  $J = 8,7$  Hz,  $J = 1,5$  Hz); 9,11 (2H, d,  $J = 1,5$  Hz). ELSD: 100%, EM-IES:  $m/z$  392  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Ejemplo 2****1,1'-(9H-Carbazol-3,6-diil)dietanona (31)**

Se disolvió carbazol (16,9 g, 0,1 mol) en nitrobenzeno (300 ml). Se añadió  $\text{AlCl}_3$  anhidro (54,0 g, 0,4 mol) bajo agitación en un baño de hielo. A continuación, se añadió  $\text{AcCl}$  (55,5 g, 0,7 mol) lentamente gota a gota. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente bajo agitación y se mantuvo durante 13 h. Se añadió agua (500 ml) en pequeñas porciones bajo refrigeración en un baño de hielo para evitar la formación violenta de espuma. Se retiró el baño de refrigeración y se sometió la mezcla a reflujo con un condensador durante 2 h. Se extrajo el producto con cloroformo (3 x 150 ml). Se lavaron los extractos combinados consecutivamente con soluciones saturadas de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{NaCl}$ , se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporaron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ ), proporcionando 12,5 g de 1 (50%).

**1,1'-[9-[2-(1-Metilpirrolidin-2-il)etil]-9H-carbazol-3,6-diil]dietanona (Ejemplo 2, 3c)**

Se disolvió el derivado de diacetilo 31 (0,97 g, 3,86 mmol) en DMF (7 ml). Se añadió  $\text{NaH}$  (0,54 g, 13,5 mmol) y se agitó la mezcla durante 3-5 min a temperatura ambiente. Se añadió clorhidrato de 2-(2-cloroetil)-1-metilpirrolidina (1,07 g, 5,8 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 24 h a 60 °C (Seguimiento mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , (9:1)), se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Se secó el extracto con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (99:1  $\rightarrow$  90:10)), dando 0,90 g (64%) del producto. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1,41-1,49 (1H, m); 1,54-1,73 (3H, m); 1,76-1,85 (1H, m); 1,97-2,13 (3H, m); 2,14 (3H, s); 2,70 (6H, s); 2,86-2,93 (1H, m); 4,46-4,50 (2H, m); 7,72 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz); 8,12 (2H, dd,  $J = 8,8$  Hz,  $J = 1,6$  Hz); 9,04 (2H, d,  $J = 1,6$  Hz). ELSD: 100%, EM-IES:  $m/z$  363  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Ejemplo 3****[2-(9H-Carbazol-9-il)etil]dietilamina (32)**

Se disolvió carbazol (10,0 g, 59,8 mmol) en DMF (60 ml). A continuación, se añadió  $\text{NaH}$  al 60% en parafina (7,2 g, 180,0 mmol) en porciones. Se agitó la mezcla durante 10 min. Se añadió clorhidrato de hidrato de 2-N,N-dietilaminoetilo (10,5 g, 61,0 mmol) en porciones, tras lo que la temperatura ascendió hasta 50 °C. Se mantuvo la mezcla de reacción a esta temperatura durante 2,5 h (Seguimiento mediante CCF, hexano/acetato de etilo (4:1)). Se vertió lentamente la masa resultante en una mezcla de hielo y agua, y se extrajo con acetato de etilo. Se secó el extracto con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó dando el compuesto 1 (16,0 g, 100%) en forma de un aceite líquido de color

marrón.

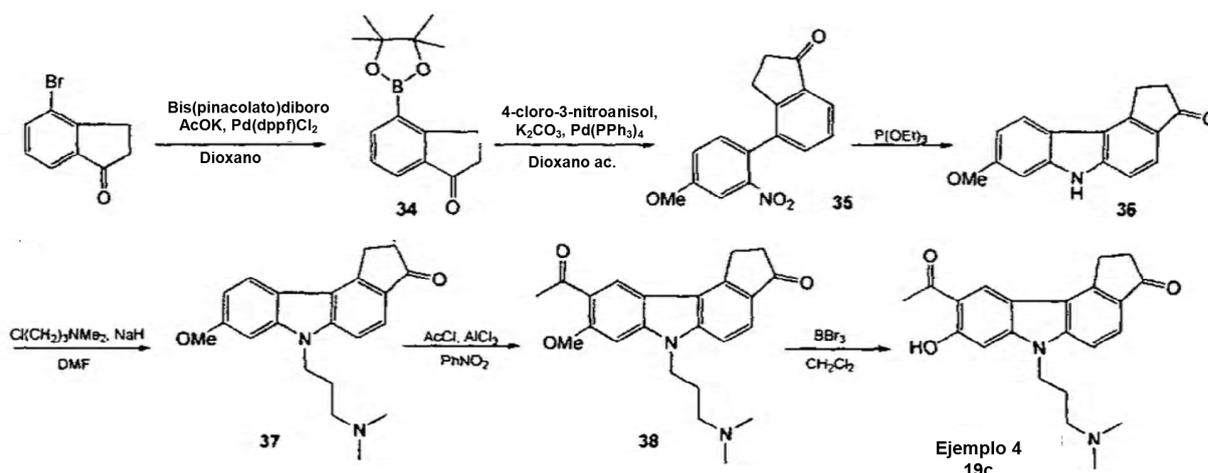
#### Clorhidrato de 1,1'-[9-[2-(dietilamino)etil]-9H-carbazol-3,6-diil]bis(3-cloropropan-1-ona) (33)

Se enfrió una solución del Compuesto 32 (17,9 g, 67,3 mmol) en nitrobenzono (150 ml) en un baño de hielo. Se añadió  $\text{AlCl}_3$  (45,0 g, 337,1 mmol) en porciones. A continuación, se añadió cloruro de 3-cloropropionilo (32,4 ml, 336,7 mmol) gota a gota durante 10 min. Se agitó la mezcla de reacción durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se vertió en una mezcla de hielo con HCl diluido y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ . Se evaporó el extracto. Se purificó el residuo mediante cromatografía en una columna corta y gruesa (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (99:1  $\rightarrow$  90:10)), proporcionando 22,9 g (76,3%) del clorhidrato 33.

#### Clorhidrato de 6-[2-(dietilamino)etil]-10,11-dihidro-1H-diciclopenta[c,g]carbazol-3,9(2H,6H)-diona (Ejemplo 3)

Se disolvió el clorhidrato 2 (22,9 g, 51,3 mmol) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98% (150 ml). Se mantuvo la solución a 80 °C durante 4 h (Seguimiento mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (4:1)) y se vertió en hielo. Se neutralizó la mezcla resultante con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ . Se evaporó el extracto. Se purificó el residuo mediante cromatografía en una columna corta y gruesa (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (99:1  $\rightarrow$  90:10)) y se recristalizó en MeOH, dando 0,562 g (3%) del producto. Se disolvió esto último en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se añadió HCl en dioxano y se evaporó la mezcla hasta secarla. Se lavó el residuo con éter y se secó, dando 0,6358 g el clorhidrato. RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,26 (6H, t, J = 7,4 Hz); 2,77-2,80 (4H, m); 3,42-3,47 (2H, m); 3,23-3,34 (4H, m); 3,83-3,85 (4H, m); 5,88 (2H, t, J = 7,8 Hz); 7,84 (2H, d, J = 8,6 Hz); 7,97 (2H, d, J = 8,6 Hz); 10,75 (1H, s.a.). ELSD: 100%, EM-IES: m/z 375  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Ejemplo 4



#### 4-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)indan-1-ona (34)

Se añadieron acetato de potasio (17,8 g, 181,6 mmol) y  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (3,3 g, 4,5 mmol) a una solución de 4-bromo-1-indanona (19,3 g, 91,5 mmol) y bis(pinacolato)diboro (23,2 g, 91,3 mmol) en dioxano (300 ml). Se calentó la mezcla hasta 80 °C bajo argón, se mantuvo a esta temperatura durante 16 h, se enfrió, se filtró a través de Celite y se evaporó. Se disolvió el residuo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se purificó el producto sobre una columna corta y gruesa con gel de sílice (eluyente: hexano-acetato de etilo (100:0  $\rightarrow$  50:50)). Rendimiento de 34: 23,4 g. El producto que contenía bis(pinacolato)diboro (aproximadamente 7% molar) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### 4-(4-Metoxi-2-nitrofenil)indan-1-ona (35)

Se añadieron potasa (7,5 g, 54,3 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (1,6 g, 1,4 mmol) a una solución de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)indan-1-ona 34 (7,0 g, 27,1 mmol) y 4-cloro-3-nitroanisole (5,1 g, 27,1 mmol) en una mezcla de dioxano (80 ml) y agua (20 ml). Se calentó la mezcla obtenida hasta 80 °C bajo argón, se mantuvo a esta temperatura durante 16 h (Seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo, (1:1)), se enfrió, se filtró a través de Celite, se evaporó y se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A continuación, se separó la mezcla mediante filtración de la porción insoluble, se evaporó con gel de sílice y se purificó sobre una columna corta y gruesa con gel de sílice (eluyente: hexano-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100:0  $\rightarrow$  0:100),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetato de etilo (100:0  $\rightarrow$  50:50)). Rendimiento de 35: 5,59 g. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### 8-Metoxi-1,6-dihidrociclopenta[c]carbazol-3(2H)-ona (36)

Se dividió el bifenilo 35 obtenido (5,59 g) en cinco porciones (de 1,11 g cada una); a continuación, se añadió  $\text{P}(\text{OEt})_3$  (por cada 7 ml) a cada porción. Se sometió la mezcla resultante a un soplado de argón en un matraz, se calentó hasta 90 °C, se mantuvo a esta temperatura durante 3 días y se enfrió. Precipitó carbazol. A continuación, se diluyó

la mezcla de reacción con éter; se separó mediante filtración el precipitado y se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Si quedó bifenilo inicial en el filtrado (seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo, (1:1)), se evaporó este filtrado y se añadió  $\text{P}(\text{OEt})_3$  (por cada 1 ml a cada matraz). Se sometió la mezcla a una ciclación repetida durante un día. Se repitió el procedimiento hasta que cesó la precipitación y los datos de la CCF mostraron la ausencia del bifenilo inicial. Rendimiento total de carbazol 36: 2,16 g.

#### 6-[3-(Dimetilamino)propil]-8-metoxi-1,6-dihidrociclopenta[c]carbazol-3(2H)-ona (37)

Se suspendió el Compuesto 36 (1,0 g, 3,98 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml); se añadió NaH (0,75 g, 12,0 mmol, 3 eq.). Se agitó la mezcla a la temperatura ambiente durante 5-10 min; a continuación, se añadió clorhidrato de cloruro de 3-dimetilamino-1-propilo (0,75 g, 4,74 mmol, 1,2 eq.). Se calentó la mezcla de reacción hasta  $70^\circ\text{C}$ , se mantuvo a esta temperatura durante 2 h (Seguimiento mediante CCF, eluyente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetato de etilo, (1:1)) para la presencia de carbazol inicial,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, (9:1) para la pureza del producto). Se diluyó la mezcla de reacción con agua, se extrajo con acetato de etilo, se evaporó y se purificó sobre una columna corta y gruesa con gel de sílice, eluyente:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (99:1  $\rightarrow$  90:10). Rendimiento de 37: 0,84 g (63%).

#### 9-Acetil-6-[3-(dimetilamino)propil]-8-metoxi-1,6-dihidrociclopenta[c]carbazol-3(2H)-ona (38)

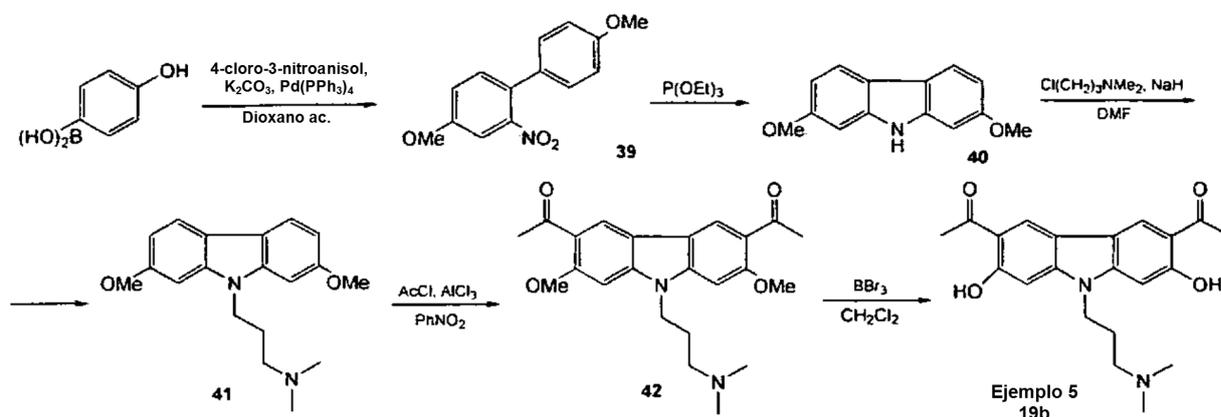
Se enfrió una solución del Compuesto 37 (0,84 g, 2,51 mmol) en  $\text{PhNO}_2$  (20 ml) en un baño de hielo. A continuación, se añadió  $\text{AlCl}_3$  (1,7 g, 12,7 mmol, 5 eq.) y después,  $\text{AcCl}$  (0,9 ml, 12,7 mmol, 5 eq.). Se mantuvo la mezcla durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se diluyó con agua, se neutralizó con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  y se evaporó. Se purificó el producto sobre una columna corta y gruesa, eluyente:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (99:1  $\rightarrow$  90:10). Rendimiento de 38: 0,658 g (69%).

#### 9-Acetil-6-[3-(dimetilamino)propil]-8-hidroxi-1,6-dihidrociclopenta[c]carbazol-3(2H)-ona (Ejemplo 4; 19c)

Se añadió una solución 0,5 M de  $\text{BBr}_3$  (16,5 ml, 5 eq.) gota a gota bajo argón a una solución del Compuesto 38 (0,658 g, 1,74 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) enfriada hasta  $-40^\circ\text{C}$ . Se mantuvo la mezcla durante 10 min; a continuación, se retiró un baño de refrigeración y se calentó la mezcla hasta la temperatura ambiente y se mantuvo durante 1-2 h (Seguimiento mediante CCF, eluyente:  $\text{CHCl}_3/\text{NH}_3$ -MeOH (9:1)). Se vertió la mezcla resultante en una mezcla de solución de  $\text{NaHCO}_3$  acuoso y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se separó la capa orgánica; se extrajo la acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evaporó y se disolvió en una mezcla:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-agua (40:9:1). Se purificó el producto en una columna de gel de sílice con el uso de la última mezcla como eluyente. Rendimiento del Ejemplo 4: 0,258 g (41%). Para la preparación del clorhidrato, se disolvió el producto aislado en una mezcla:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH; se añadió una solución de HCl en dioxano. Se evaporó la mezcla resultante hasta secarla; se lavó el residuo con éter.

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  2,14-2,20 (2H, m); 2,70 (6H, d,  $J = 4,9$  Hz); 2,78-2,81 (2H, m); 3,12-3,17 (2H, m); 3,60-3,62 (2H, m); 4,51 (2H, t,  $J = 7,1$  Hz); 7,28 (1H, s); 7,73 (2H, s - sistema AB degenerado); 8,55 (1H, s); 10,40 (1H, s.a.); 12,76 (1H, s). ELSD: 100%. EM-IES:  $m/z$  364  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Ejemplo 5



#### 4,4'-dimetoxi-2-nitrobifenilo (39)

Se añadieron potasa (9,10 g, 65,9 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (1,90 g, 1,6 mmol) a una solución de ácido 4-metoxifenilborónico (5,0 g, 32,9 mmol) y 4-cloro-3-nitroanisol (6,17 g, 32,9 mmol) en una mezcla de dioxano (80 ml) y agua (20 ml). Se calentó la mezcla resultante hasta  $8^\circ\text{C}$  bajo argón, se mantuvo a esta temperatura durante 16 h (Seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo (4:1)), se enfrió y se filtró a través de Celite. Se separó el producto mediante lavado con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se disolvió el residuo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se purificó sobre una columna corta y gruesa (eluyente: hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (100:0  $\rightarrow$  0:100),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetato de etilo (100:0  $\rightarrow$  50:50)). Rendimiento de 1: 8,47 g.

**2,7-dimetoxi-9H-carbazol (40)**

Se dividió el Compuesto 39 (8,47 g) en ocho porciones (de 1,06 g cada una). A continuación, se añadió P(OEt)<sub>3</sub> (por cada 7 ml) a cada porción. Se sometieron las mezclas resultantes a un soplado de argón, se calentaron hasta 90 °C, se mantuvieron a esta temperatura durante 3 días, se enfriaron y se diluyeron con éter. Se filtró el precipitado obtenido y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rendimiento de carbazol 40: 3,33 g.

**[3-(2,7-dimetoxi-9H-carbazol-9-il)propil]dimetilamina (40)**

Se suspendió el Compuesto 40 (0,7 g, 3,1 mmol) en DMF (6 ml). Se añadió hidruro de sodio (0,4 g, 10,0 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5-10 min. A continuación, se añadió clorhidrato de cloruro de 3-dimetilamin-1-propilo (0,73 g, 4,6 mmol). Se calentó la mezcla obtenida hasta 50-60 °C, se mantuvo a esta temperatura durante 16 h (Seguimiento mediante CCF, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etilo, (1:1) para la presencia del carbazol inicial; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, (9:1) para la pureza del producto) y se diluyó con agua. Se dejó reposar el precipitado blanco obtenido hasta que sedimentó durante 1 h, se separó mediante filtración y se secó al aire. Rendimiento de 41: 0,96 g (100%).

**1,1'-[9-[3-(dimetilamino)propil]-2,7-dimetoxi-9H-carbazol-3,6-diil]dietanona (42)**

Se disolvió el Compuesto 41 (0,96 g, 3,2 mmol) en PhNO<sub>2</sub> (20 ml); se enfrió la solución en un baño de hielo. A continuación, se añadió AcCl (1,1 ml, 15,4 mmol) seguido de AO<sub>3</sub> (2,1 g, 15,7 mmol) en porciones. Se mantuvo la mezcla resultante durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se diluyó con agua, se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se extrajo con CHCl<sub>3</sub> y se evaporó. Se purificó el producto sobre una columna corta y gruesa con gel de sílice. Rendimiento de 42: 0,787 g (62%).

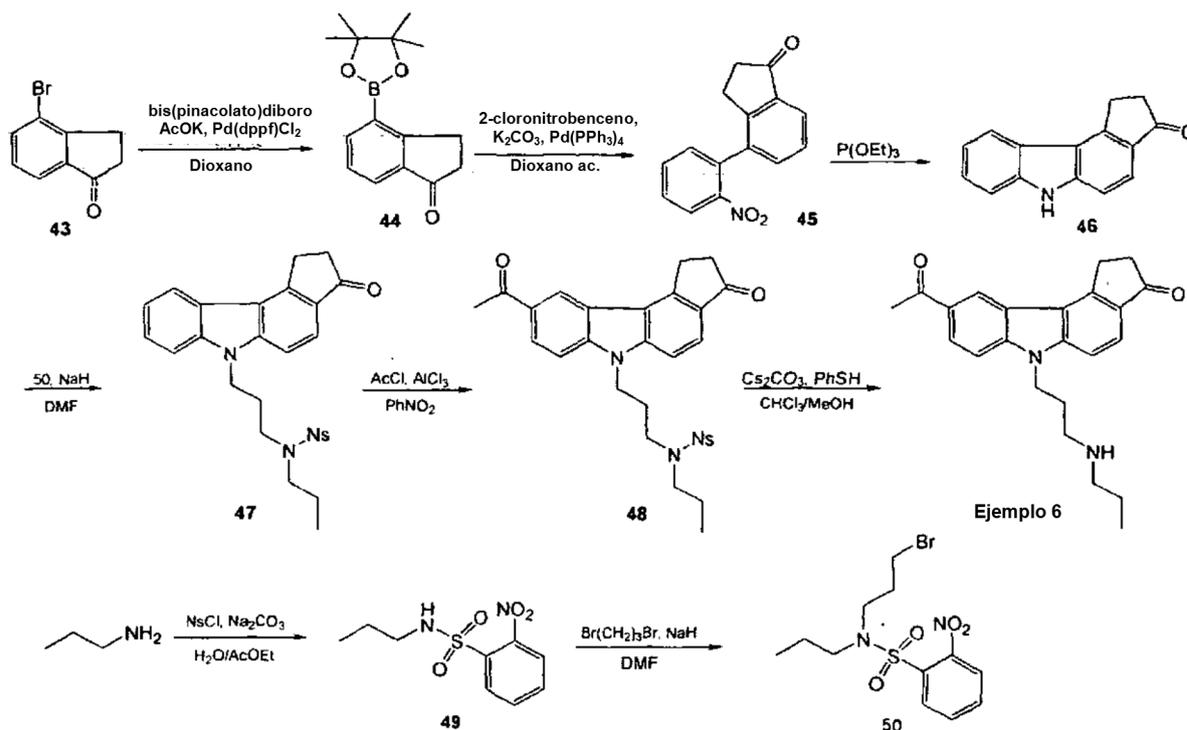
**1,1'-[9-[3-(dimetilamino)propil]-2,7-dihidroxi-9H-carbazol-3,6-diil]dietanona (Ejemplo 5; 19b)**

Se añadió una solución 0,5 M de BBr<sub>3</sub> (22,5 ml) gota a gota bajo argón a una solución del Compuesto 42 (0,787 g, 1,99 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90 ml), se enfrió hasta -40 °C. Tras 10 min, se retiró un baño de refrigeración; se calentó la mezcla hasta la temperatura ambiente y se mantuvo durante 1-2 h (Seguimiento mediante CCF, eluyente: cloroformo-metanol, (4:1)). Se vertió la mezcla resultante en una mezcla de solución de soda acuosa y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se separó la capa orgánica. Se extrajo la capa acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó y se disolvió en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-agua (40:9:1). Se purificó el producto sobre una columna. Rendimiento de Ejemplo 5: 0,379 g (52%).

A continuación, se disolvió el producto en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH. Se añadió una solución de HCl en dioxano. Se evaporó la solución resultante hasta secarla; se lavó el residuo con CH<sub>3</sub>CN y éter. De una forma básica del producto (0,379 g), se aislaron 0,339 g del clorhidrato.

RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ: 2,09-2,13 (2H, m); 2,72 (6H, s); 2,77 (6H, s); 3,13-3,16 (2H, m); 4,34 (2H, t, J = 7,1 Hz); 7,13 (2H, s); 8,84 (2H, s); 10,17 (1H, s.a.); 12,82 (2H, s). ELSD: 100%, EM-IES: m/z 369 [M+H]<sup>+</sup>.

## Ejemplo 6

**4-(2-Nitrofenil)indan-1-ona (45)**

Se añadieron potasa (8,1 g, 58,7 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,7 g, 1,5 mmol) a una solución del Compuesto 44 (7,51 g, 29,1 mmol) y 4-cloro-3-nitrobenzoceno (4,6 g, 29,1 mmol) en una mezcla de dioxano (80 ml) y agua (20 ml). Se calentó la mezcla obtenida bajo argón hasta 80 °C, se mantuvo a esta temperatura durante 16 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo (1:1)), se enfrió, se filtró a través de Celite y se evaporó. Se disolvió el producto resultante en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se separó un residuo insoluble mediante filtración. Se evaporó el producto resultante con gel de sílice y se purificó sobre una columna corta y gruesa (eluyente: hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100:0 → 0:100), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etilo (100:0 → 50:50)). Se aisló el Compuesto 45 (5,0 g) y se usó en la siguiente etapa sin purificación.

**1,6-Dihidrociclopenta[c]carbazol-3(2H)-ona (46)**

Se dividió el Compuesto 45 (5,0 g) en cinco porciones (de 1,0 g cada una). Se añadió P(OEt)<sub>3</sub> (por cada 7 ml) a cada porción. Se sometió el producto resultante a un soplado de argón en un matraz, se calentó hasta 90 °C, se mantuvo a esta temperatura durante 3 días y, a continuación, se enfrió. Se diluyó el precipitado de carbazol con éter. Se filtró el precipitado y se lavó con éter. En el caso de haber bifenilo inicial en el filtrado (seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo (1:1)), se evaporó este filtrado y, a continuación, se añadió P(OEt)<sub>3</sub> (1 ml a cada matraz) y se sometió a una ciclación durante 1 día. Se repitió el procedimiento hasta que cesó la precipitación y la CCF demostró la ausencia del bifenilo inicial. Se obtuvo el Carbazol 46 (2,7 g).

**2-Nitro-N-propilbencenosulfonamida (49)**

Se añadió una solución de 2-nitrofenilsulfocloruro (8 g, 36 mmol) en acetato de etilo (25 ml) gota a gota a temperatura ambiente a una mezcla de propilamina (3 ml, 36,0 mmol), acetato de etilo (15 ml), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 g, 37,7 mmol) y agua (25 ml). Se agitó la solución resultante durante 2 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se separó la capa orgánica, se lavó con agua y una solución de ácido cítrico, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. El precipitado cristalizó en forma de una masa blanca que se separó mediante lavado con hexano. Rendimiento de 49: (7,47 g, 85%).

**N-(3-Bromopropil)-2-nitro-N-propilbencenosulfonamida (50)**

Se añadió 1,3-dibromopropano (8,5 ml, 82,0 mmol, 10 eq.) a una solución del Compuesto 49 (2,0 g, 8,2 mmol) en DMF (20 ml). A continuación, se añadió NaH (0,6 g, 15,0 mmol) en porciones. La temperatura ascendió hasta 50-60 °C. Se agitó la mezcla a esta temperatura durante 20 min (seguimiento mediante CCF, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). A continuación, se vertió la mezcla cuidadosamente en hielo. Se extrajo el producto con acetato de etilo y se evaporó el extracto. Se lavó el residuo del 1,3-dibromopropano con hexano. Se disolvió el producto resultante en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se purificó sobre una columna corta y gruesa con gel de sílice, eluyente: hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100:0 → 0:100). El Compuesto 50 (1,87 g, 62%) en forma de un aceite rápidamente cristalizante.

**2-Nitro-*N*-[3-(3-oxo-2,3-dihidrociclopenta[*c*]carbazol-6(1*H*)-il)propil]-*N*-propilbencenosulfonamida (47)**

Se disolvieron el Compuesto 46 (0,538 g, 2,43 mmol) y bromuro 50 (0,9 g, 2,46 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml). A continuación, se añadió NaH (0,15 g, 3,75 mmol, 1,5 eq.). Se agitó la mezcla de reacción durante 20 min (seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo (1:1)). A continuación, se vertió la mezcla sobre hielo. Se extrajo el producto con acetato de etilo y se evaporó el extracto en un evaporador rotatorio. El residuo de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se retiró en un alto vacío. Se añadió metanol al precipitado endurecido. Se trituró el producto; se separó el precipitado mediante filtración. Rendimiento de 47: 0,638 g (52%).

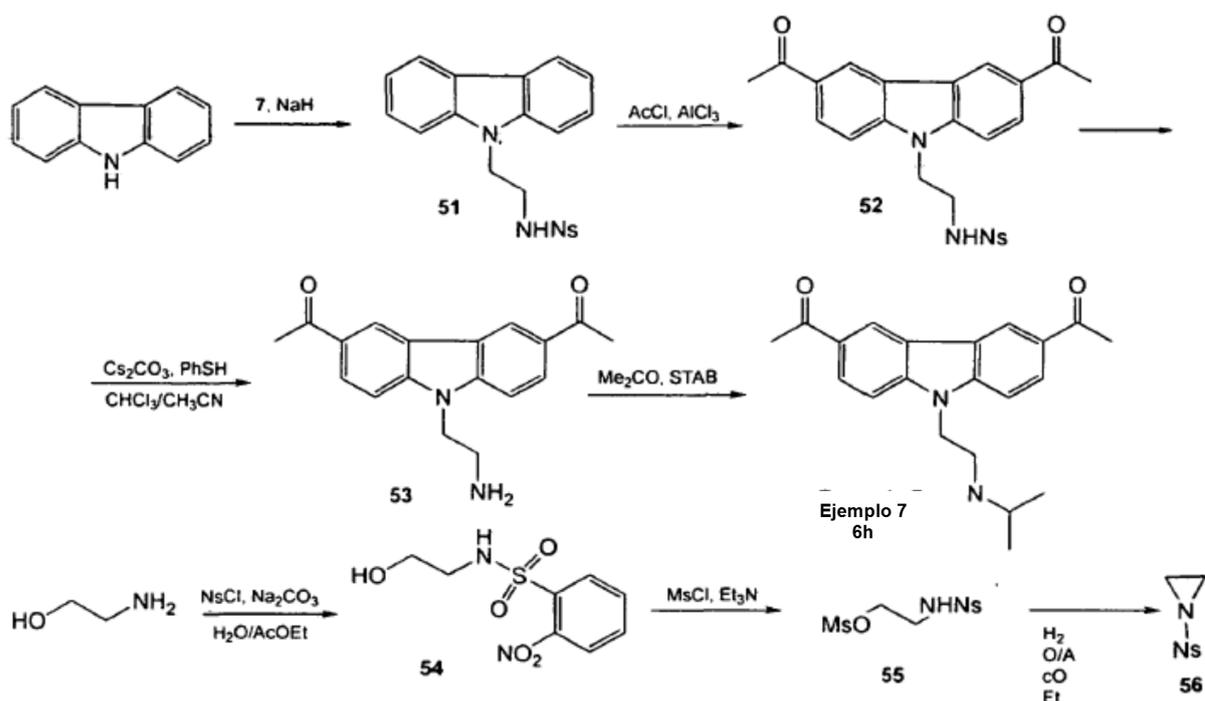
***N*-[3-(9-Acetil-3-oxo-2,3-dihidrociclopenta[*c*]carbazol-6(1*H*)-il)propil]-2-nitro-*N*-propilbencenosulfonamida (48)**

Se disolvió el Compuesto 47 (0,638 g, 1,26 mmol) en PhNO<sub>2</sub> (7 ml). Se enfrió la solución sobre un baño de hielo, se añadió AlCl<sub>3</sub> (0,67 g, 5,02 mmol) y, a continuación, AcCl (0,45 ml, 6,31 mmol). Se mantuvo la mezcla durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se diluyó con agua. Se extrajo el producto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se evaporó el extracto. Se evaporó el residuo y se hizo pasar el producto a través de Celite, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etilo (100:0→50:50). Rendimiento de 48: 0,453 g (66%).

**9-Acetil-6-[3-(propilamino)propil]-1,6-dihidrociclopenta[*c*]carbazol-3(2*H*)-ona (Ejemplo 6)**

Se suspendió el Compuesto 48 (0,496 g, 0,91 mmol) en una mezcla de MeOH (10 ml) y CHCl<sub>3</sub> (15 ml). Se calentó la mezcla hasta su ebullición. A continuación, se añadió Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,6 g, 1,82 mmol) y se vertió de una vez PhSH (0,2 ml, 1,96 mmol) (la solución se volvió azul). Se sometió la solución resultante a reflujo durante 2 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1)). Durante este periodo la mezcla de reacción se volvió verde. A continuación, se evaporó la mezcla hasta secarla. Se añadió una solución diluida de ácido cítrico. Se separó mediante filtración un precipitado amarillo, se lavó con éter, se suspendió en CH<sub>3</sub>CN y se sometió a reflujo. Tras enfriar, se separó mediante filtración el precipitado beis del filtrado amarillo y, a continuación, se lavó con éter. Se aisló el producto resultante (0,251 g, 76%). Para la transformación de la forma básica en clorhidrato, se disolvió el producto en una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol. (Se añadió la mezcla hasta que el producto se disolvió por completo). A continuación, se añadió una solución de ácido clorhídrico en dioxano. Se evaporó la solución hasta secarla. Se lavó un precipitado de color lila oscuro con metanol y acetonitrilo. Rendimiento del Ejemplo 6 en forma de clorhidrato: 0,118 g.

Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0,88 (3H, t, J = 7,32 Hz); 1,53-1,62 (2H, m); 2,13-2,20 (2H, m); 2,73 (2H, s); 2,80-2,83 (4H, m); 2,95-2,96 (2H, m); 3,65-3,68 (2H, m); 4,68 (2H, t, J = 7,3 Hz); 7,81 (1H, d, J = 8,6 Hz); 7,85 (1H, d, J = 8,6 Hz); 8,15 (1H, dd, J = 8,6 Hz, J = 1,3 Hz); 8,70 (1H, s.a.); 8,71 (1H, d, J = 1,3 Hz). ELSD: 100%, EM-IES: m/z 362 [M+H]<sup>+</sup>.

**Ejemplo 7**

**N-(2-Hidroxietil)-2-nitrobencenosulfonamida (54)**

Se disolvió etanolamina (10 ml, 165 mmol) en acetato de etilo (60 ml). A continuación, se añadió una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (22,7 g, 214,2 mmol) en agua (100 ml). A continuación, se añadió una solución de cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo (35,0 g, 157,9 mmol) en acetato de etilo (100 ml) gota a gota bajo agitación. Se agitó la solución resultante a temperatura ambiente durante 2 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se separó la capa orgánica, se lavó con agua y una solución de ácido cítrico, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. Rendimiento de 54: 29,5 g (73%) en forma de cristales blancos.

**Metanosulfonato de 2-[(2-nitrofenil)sulfonil]amino}etilo (55)**

Se añadió trietilamina (20 ml, 144,6 mmol) a una solución del Compuesto 54 (29,5 g, 119,9 mmol) en acetato de etilo (300 ml). Se enfrió la mezcla hasta 10 °C en un baño de hielo. A continuación, se añadió una solución de cloruro de mesilo (10,2 ml, 131,8 mmol) en acetato de etilo (50 ml) gota a gota a una temperatura de ≤ 20 °C. Se agitó la solución resultante a temperatura ambiente durante 3 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo (4:1)). Se filtró la mezcla de reacción, retirando el precipitado – clorhidrato de trietilamina. Se lavó el filtrado con NaHCO<sub>3</sub> acuoso, agua y se evaporó. Rendimiento de 55: 32,2 g (83%) en forma de cristales.

**1-[(2-Nitrofenil)sulfonil]aziridina (56)**

Se añadió una solución de KOH (1,73 g, 31 mmol) en agua (50 ml) a una solución del Compuesto 55 (10 g, 31 mmol) en acetato de etilo (100 ml). Se tiñó la capa acuosa de amarillo. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etilo (1:1)). Cuando fue necesario, se añadieron más porciones de solución de KOH (0,5 eq.). Se separó la capa orgánica, se lavó bien con agua, una solución de ácido cítrico (hasta pH 7), de nuevo con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. Rendimiento de 56: 6,6 g (93%) en forma de un aceite líquido amarillento.

**N-[2-(9H-Carbazol-9-il)etil]-2-nitrobencenosulfonamida (51)**

Se disolvió carbazol (1,10 g, 6,59 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (40 ml). A continuación, se añadió hidrato de sodio (0,33 g, 8,25 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15-20 min. A continuación, se añadió una solución de aziridina 56 (1,5 g, 7,89 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (30 ml) en una porción. Se agitó la mezcla resultante durante 1 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: hexano-acetato de etilo, 1: 1), se vertió en agua, se acidificó con HCl hasta pH 1 y se volvió a agitar a temperatura ambiente. Gradualmente, fue precipitando un producto naranja de la solución turbia. Se filtró el precipitado y se lavó con MeOH y éter. Rendimiento de 51: 2,15 g (83%) en forma de cristales naranjas.

**N-[2-(3,6-Diacetil-9H-carbazol-9-il)etil]-2-nitrobencenosulfonamida (52)**

Se disolvió el Compuesto 51 (5,0 g, 12,7 mmol) en PhNO<sub>2</sub> (30 ml). Se enfrió la solución en un baño de hielo. A continuación, se añadió AlCl<sub>3</sub> (8,5 g, 63,7 mmol) y después, AcCl (4,5 ml, 63,1 mmol). Se mantuvo la mezcla durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se diluyó con agua, se extrajo con cloroformo y se evaporó. Se purificó el producto sobre una columna corta y gruesa con gel de sílice, eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etilo /100:0→50:50). Se añadió una mezcla de etanol y se añadió amoníaco acuoso al 25% (4:1) al residuo. Se sometió el producto resultante a reflujo durante 1,5-2 h. Se separó mediante filtración una suspensión caliente. El producto 52 se aisló (4,11 g, 68%) en forma de cristales de color beis.

**1,1'-[9-(2-Aminoetil)-9H-carbazol-3,6-diil]dietanona (53)**

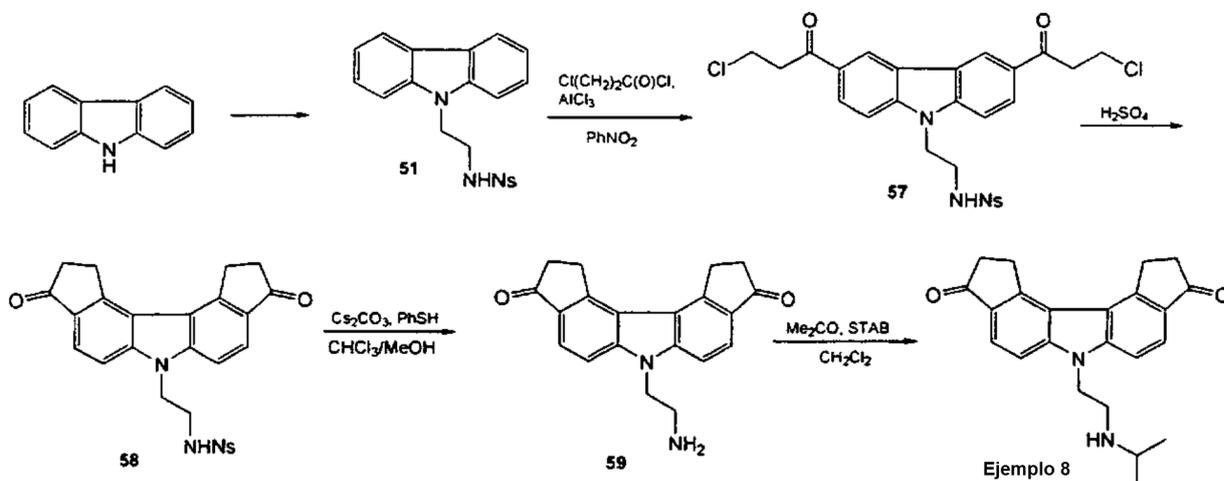
Se disolvió el Compuesto 52 (4,11 g, 8,58 mmol) bajo reflujo en una mezcla de CH<sub>3</sub>CN (150 ml) y metanol (50 ml). A continuación, se añadió Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,4 g, 25,78 mmol) y se vertió PhSH (2,6 ml, 25,48 mmol) de una vez. Se sometió a reflujo la mezcla resultante durante 2,5 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: cloroformo-metanol (9:1)) y se evaporó hasta secarla. A continuación, se añadieron agua y una solución de HCl. Como resultado de ello, se disolvieron todos los productos sólidos. Se extrajo la solución acuosa ácida con acetato de etilo hasta que este último dejó de amarillear. Se neutralizó la capa acuosa con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se extrajo con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (4:1) y se evaporó el extracto. Se separó el residuo mediante lavado con MeCN y se lavó con éter. Rendimiento de 53: 1,25 g (50%) en forma de cristales de color beis.

**1,1'-[9-(2-(Isopropilamino)etil)-9H-carbazol-3,6-diil]dietanona (Ejemplo 7; 6h).**

Se añadió acetona (5 ml, 68,10 mmol) a una solución del Compuesto 53 (1,25 g, 4,25 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml). A continuación, se añadió STAB (3,0 g, 14,15 mmol). Se agitó la mezcla obtenida a temperatura ambiente durante 4,5 h (seguimiento mediante CCF, eluyente: CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1)) y, a continuación, se vertió en una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub>. Se separó la capa orgánica, se extrajo la capa acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se secó el producto sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. Se purificó el residuo sobre una columna, eluyente: CHCl<sub>3</sub>-MeOH (99:1→90:10). El Ejemplo 7 (1,04 g, 73%) se aisló en forma de un aceite rápidamente cristalizante. Para la preparación de su clorhidrato, se disolvió la base en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A continuación, se añadió una solución de HCl en dioxano. Se evaporó la mezcla hasta secarla. Se lavó el producto con éter.

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,25 (6H, d,  $J = 6,6$  Hz); 2,72 (6H, s); 3,33-3,39 (3H, m); 4,87 (2H, t,  $J = 7,3$  Hz); 7,92 (2H, d,  $J = 8,7$  Hz); 8,17 (2H, dd,  $J = 8,7$  Hz,  $J = 1,6$  Hz); 9,01 (2H, d,  $J = 1,6$  Hz); 9,24 (1H, s.a.); 9,33 (1H, s.a.). ELSD: 100%, EM-IES:  $m/z$  336  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### Ejemplo 8



5

La síntesis del Compuesto 51 se describió en el Ejemplo 7.

#### ***N*-[2-[3,6-bis(3-cloropropanoil)-9*H*-carbazol-9-il]etil]-2-nitrobenzenosulfonamida (57)**

Se disolvió el Compuesto 51 (20,0 g, 50,6 mmol) en  $\text{PhNO}_2$  (130 ml) y se enfrió la solución en un baño de hielo. A continuación, se añadió  $\text{AlCl}_3$  (34,0 g, 254,7 mmol) y después, cloruro de 3-cloropropionilo (25,0 ml, 259,8 mmol). Se mantuvo la mezcla durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se vertió en una mezcla de  $\text{HCl}$  diluido y hielo, se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ , y se dejó durante 16 h. Se filtró el precipitado de color paja obtenido y se lavó éter. Rendimiento de 57: 18,47 g (63%).

10

#### ***N*-[2-(3,9-dioxo-1,2,3,9,10,11-hexahidro-6*H*-diciclopenta[*c,g*]carbazol-6-il)etil]-2-nitrobenzenosulfonamida (58)**

Se calentó ácido sulfúrico (200 ml) hasta 40 °C. A continuación, se añadió el Compuesto 57 (18,47 g, 32,12 mmol) en porciones. Se calentó la mezcla hasta 90 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 1,5-2 h (seguimiento mediante CCF, eluyente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetato de etilo (4:1)). Se vertió la mezcla resultante sobre hielo. Se separó el precipitado gris mediante filtración, se lavó sobre un filtro con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$  (4:1). Se volvió a cristalizar el precipitado restante (sobre un filtro) con  $\text{DMF}$ , se lavó con  $\text{CH}_3\text{CN}$  y éter. Rendimiento de 58 puro: 2,2 g (14%).

15

#### **6-[2-(aminoetil)-10,11-dihidro-1*H*-diciclopenta[*c,g*]carbazol-3,9(2*H*,6*H*)-diona (59)**

Se suspendió el Compuesto 58 (2,2 g, 4,38 mmol) en una mezcla de cloroformo (200 ml) y metanol (200 ml). A continuación, se añadió  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (4,3 g, 13,20 mmol) y  $\text{PhSH}$  de una vez (1,3 ml, 12,74 mmol). Se sometió la solución a reflujo durante 40 h (seguimiento mediante EM-CL), y se evaporó hasta secarla. A continuación, se añadió una solución acuosa de ácido cítrico. Se neutralizó la solución obtenida con solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$ . Se separó el precipitado mediante filtración, y se lavó con  $\text{CH}_3\text{CN}$  y éter. El producto aislado se usó en la siguiente etapa sin purificación.

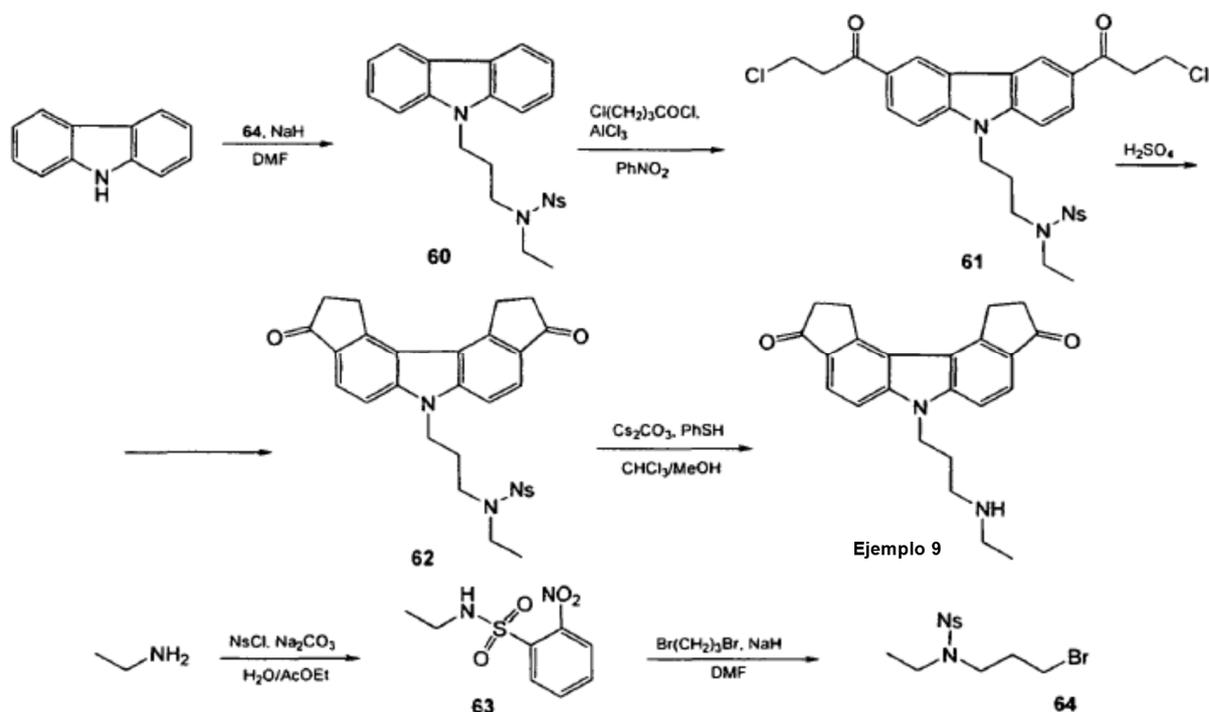
20

#### **6-[2-(isopropilamino)etil]-10,11-dihidro-1*H*-diciclopenta[*c,g*]carbazol-3,9(2*H*,6*H*)-diona (Ejemplo 8)**

Se suspendió el Compuesto 59 bruto (1,69 g) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml). A continuación, se añadieron acetona (4 ml) y  $\text{STAB}$  (3,4 g). Se agitó la mezcla durante 24 h (seguimiento mediante CCF, eluyente:  $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$  (9:1)), después se vertió en una solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$ . A continuación, se añadió otra porción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{MeOH}$ . Se separó la capa orgánica, se evaporó, y se lavó con  $\text{MeCN}$  y éter. Rendimiento de Ejemplo 8: 0,759 g. Para la preparación de su clorhidrato, se suspendió el producto aislado en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{MeOH}$ , y a continuación, se añadió una solución de  $\text{HCl}$  en dioxano. Se evaporó la mezcla resultante hasta secarla y se añadió etanol al residuo. Se sometió la solución etanólica a reflujo y se enfrió, y se filtró el precipitado. Rendimiento del clorhidrato del compuesto del Ejemplo 8: 0,684 g. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,24 (6H, d,  $J = 6,6$  Hz); 2,77-2,79 (4H, m); 3,34-3,43 (3H, m); 3,81-3,84 (4H, m); 4,91 (2H, t,  $J = 7,3$  Hz); 7,83 (2H, d,  $J = 8,6$  Hz); 7,91 (2H, d,  $J = 8,6$  Hz); 9,11 (2H, s.a.). ELSD: 100%, EM-IES:  $m/z$  360  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

35

## Ejemplo 9

**N-Etil-2-nitrobencenosulfonamida (63)**

Se añadió una solución de cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo (140 g, 361 mmol) en acetato de etilo (250 ml) gota a gota a temperatura ambiente a una mezcla de etilamina acuosa al 70% (50 ml, 630 mmol), acetato de etilo (100 ml), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (67 g, 632 mmol) y agua (250 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 4 h (seguimiento mediante CCF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se separó la capa orgánica, se lavó con agua y con una solución de ácido cítrico, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. El residuo se solidificó en una masa cristalina blanca. Se trituroó esta última con hexano, se separó mediante filtración y se secó, dando 134 g (92%) del producto.

**N-(3-Bromopropil)-N-etil-2-nitrobencenosulfonamida (64)**

Se disolvió el Compuesto 63 (7,8 g, 33,9 mmol) en DMF (100 ml). Se añadió 1,3-dibromopropano (35 ml, 343,0 mmol) y, a continuación, NaH en porciones (2,7 g, 67,5 mmol), tras lo que la temperatura ascendió hasta 50-60 °C. Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 1 h (seguimiento mediante CCF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), se vertió despacio en una mezcla de hielo y agua, y se extrajo con acetato de etilo. Se evaporó el extracto. Se lavó el residuo con hexano para eliminar el 1,3-dibromo-propano. El Compuesto 64 (9,7 g, 82%) se obtuvo en forma de un aceite amarillo viscoso.

**N-[3-(9H-Carbazol-9-il)propil]-N-etil-2-nitrobencenosulfonamida (60)**

Se disolvieron carbazol (4,15 g, 24,8 mmol) y bromuro 64 (9,7 g, 27,6 mmol) en DMF (30 ml). Se añadió NaH (2,0 g, 50,0 mmol, 2 eq) en porciones, tras lo que la temperatura ascendió hasta 60 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 h (seguimiento mediante CCF, hexano/acetato de etilo (3:2)), se vertió en una mezcla de hielo y agua, y se extrajo con acetato de etilo. Se trituroó el residuo con éter. Se separó el precipitado amarillo mediante filtración y se secó, proporcionando 6,65 g (61%) del producto.

**N-[3-[3,6-Bis(3-cloropropanoil)-9H-carbazol-9-il]propil]-N-etil-2-nitrobencenosulfonamida (61)**

Se disolvió el Compuesto 63 (6,65 g, 15,2 mmol) en PhNO<sub>2</sub> (70 ml). Se enfrió la solución en un baño de hielo. A continuación, se añadió AlCl<sub>3</sub> (12,2 g, 91,4 mmol) y después, cloruro de 2-cloropropionilo (8,8 ml, 91,4 mmol). Se mantuvo la mezcla durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se diluyó con agua y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se evaporó el extracto. Se purificó el residuo mediante cromatografía en una columna corta y gruesa (eluyente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetato de etilo (0:100→ 50:50)). Se trituroó el residuo con éter, se separó mediante filtración y se secó, dando 7,60 g (81%) de un producto cristalino verdoso.

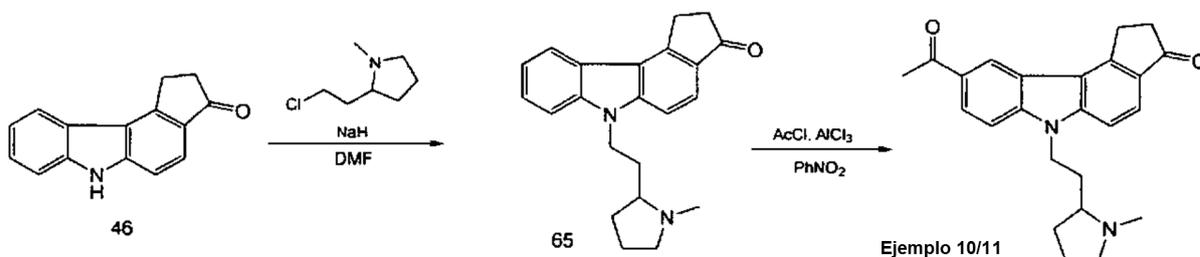
**N-[3-(3,9-Dioxo-1,2,3,9,10,11-hexahidro-6H-diclopenta[c,g]carbazol-6-il)propil]-N-etil-2-nitrobencenosulfonamida (62)**

Se calentó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (110 ml) hasta 40 °C. Se añadió el Compuesto 61 (7,6 g, 12,3 mmol) en porciones. Se calentó la mezcla de reacción hasta 100 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 2 h (seguimiento mediante CCF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetato de etilo (4:1)) y se vertió en hielo. Se separó mediante filtración el precipitado gris formado. A continuación, se vertió  $\text{CHCl}_3$ /MeOH (4:1) (500 ml) en el filtro. Se disolvió el sólido del filtro y se transfirió la solución formada a un embudo de decantación. Se añadió una solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Se separó la capa orgánica, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó. Se añadió acetonitrilo al residuo. Se separó mediante filtración un precipitado de color beis, se lavó con acetonitrilo y éter, y se secó, dando 1,56 g (23%) de un producto cristalino de color beis.

#### 6-{3-(Etilamino)propil}-10,11-dihidro-1H-diciclopenta[c,g]carbazol-3,9(2H,6H)-diona (Ejemplo 9)

Se suspendió el Compuesto 62 (1,56 g, 2,86 mmol) en una mezcla de  $\text{CHCl}_3$  (80 ml) y MeOH (80 ml). Se añadió  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (2,8 g, 8,59 mmol) e inmediatamente después, PhSH (0,87 ml, 8,53 mmol). Se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 6 h (seguimiento mediante EM-CL,  $\text{CHCl}_3$ /MeOH (9:1)), y se evaporó hasta secarla. Se añadió ácido cítrico acuoso. Se neutralizó la solución con una solución de  $\text{NaHCO}_3$ . Se separó el precipitado formado mediante filtración, se lavó con acetato de etilo, acetonitrilo, agua, de nuevo con acetonitrilo y con éter, dando 0,75 g (73%) del producto. Se transformó esto último en su clorhidrato. Tras evaporar con HCl 4 M en dioxano, se lavó el residuo con MeOH, proporcionando 0,59 g del clorhidrato. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1,66 (3H, t, J = 7,3 Hz); 2,09-2,17 (2H, m); 2,73-2,77 (4H, m); 2,86-2,91 (2H, m); 2,95-3,10 (2H, m); 3,77-3,80 (4H, m); 4,70 (2H, t, J = 7,3 Hz); 7,80 (2H, d, J = 8,6 Hz); 7,89 (2H, d, J = 8,6 Hz); 8,83 (2H, s.a.). ELSD: 100%, EM-IES: m/z 360  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Ejemplos 10 y 11



La síntesis del Compuesto 46 se describió en el Ejemplo 6.

#### 6-[2-(1-Metilpirrolidin-2-il)etil]-1,6-dihidrociclopenta[c]carbazol-3(2H)-ona (65)

Se disolvió el carbazol 46 (0,4 g, 1,81 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 ml) y, a continuación, se añadió NaH (0,22 g, 5,50 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5-10 min y se añadió clorhidrato de 2-(2-cloroetil)-1-metilpirrolidina (0,4 g, 2,17 mmol). Se calentó la mezcla hasta 60 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 4 h (seguimiento mediante CCF, eluyente:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (9:1)). Se vertió la mezcla resultante en agua. Se extrajo el producto con acetato de etilo, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó. Se trituro el residuo con éter. Se separó el precipitado mediante filtración. Rendimiento de 65: 0,365 g (61 %) – Isómero S y 0,336 g (55%) – Isómero R.

#### 9-Acetil-6-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-1,6-dihidrociclopenta[c]carbazol-3(2H)-ona (Ejemplos 10 y 11)

Se disolvió el Compuesto 65 (0,336 g, 1,00 mmol) en  $\text{PhNO}_2$  (7 ml). Se enfrió la solución en un baño de hielo. A continuación, se añadió  $\text{AlCl}_3$  (0,67 g, 5,02 mmol) y después, AcCl (0,36 ml, 5,04 mmol). Se mantuvo la mezcla resultante durante 40 min (seguimiento mediante EM-CL), se diluyó con agua, se neutralizó con solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$ , se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  y se evaporó. Se purificó el producto sobre una columna corta y gruesa, eluyente: 100:0→90:10. Rendimiento del producto: 0,307 g (82%) (R); el isómero S se obtuvo de una manera similar (77%).

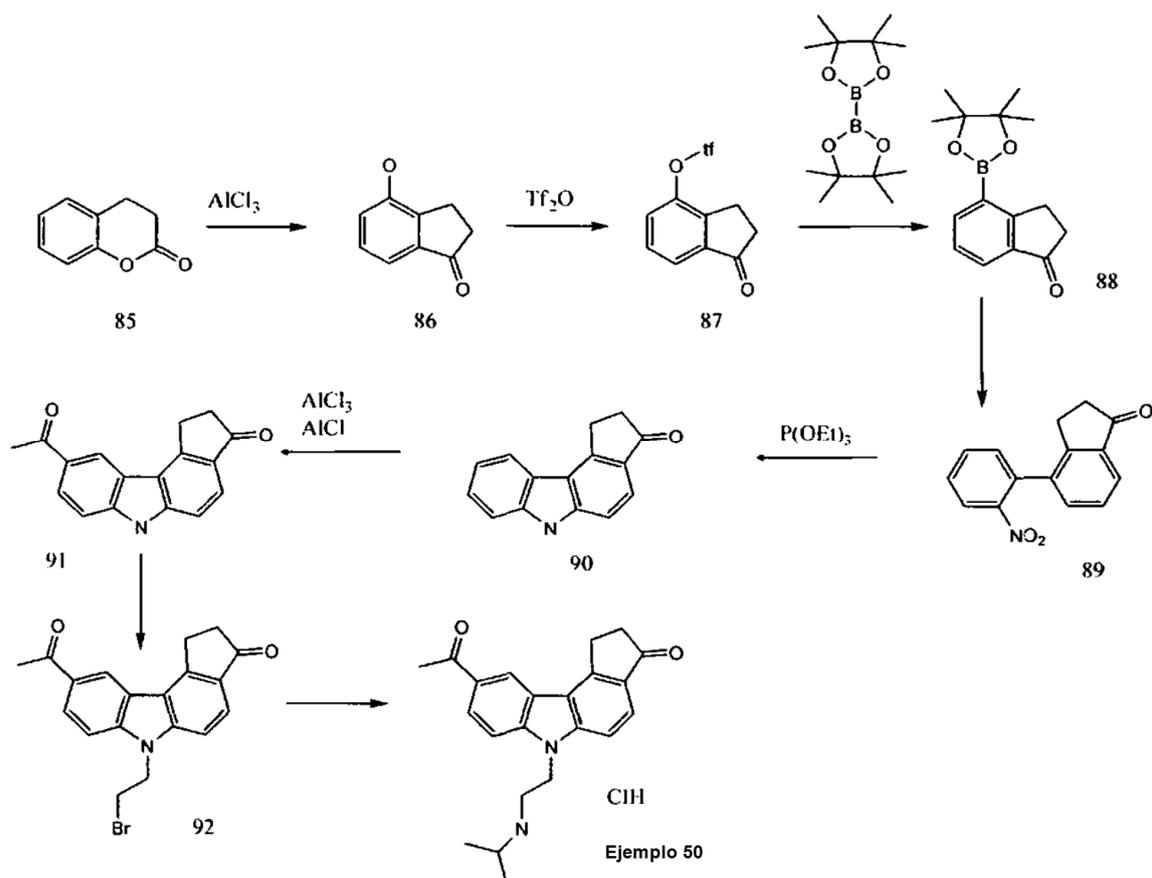
#### Ejemplo 10

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1,69-1,79 (1H, m); 1,86-2,01 (2H, m); 2,07-2,24 (2H, m); 2,42-2,56 (1H, m); 2,73 (3H, s); 2,75 (3H, d, J = 5,12 Hz); 2,79-2,82 (2H, m); 2,96-3,05 (1H, m); 3,36-3,43 (1H, m); 3,49-3,57 (1H, m); 3,64-3,67 (2H, m); 4,62-4,75 (2H, m); 7,80 (1H, d, J = 8,6 Hz); 7,87 (1H, d, J = 8,6 Hz); 7,96 (1H, d, J = 8,6 Hz); 8,19 (1H, dd, J = 8,6 Hz, J = 1,5 Hz); 8,70 (1H, d, J = 1,5 Hz); 10,63 (1H, s.a.). ELSD: 100%, EM-IES: m/z 374  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Ejemplo 11

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1,69-1,79 (1H, m); 1,86-2,01 (2H, m); 2,05-2,24 (2H, m); 2,40-2,46 (1H, m); 2,73 (3H, s); 2,75 (3H, d, J = 5,12 Hz); 2,79-2,82 (2H, m); 2,98-3,02 (1H, m); 3,36-3,43 (1H, m); 3,47-3,57 (1H, m); 3,63-3,66 (2H, m); 4,62-4,75 (2H, m); 7,80 (1H, d, J = 8,6 Hz); 7,87 (1H, d, J = 8,6 Hz); 7,96 (1H, d, J = 8,8 Hz); 8,18 (1H, dd, J = 8,8 Hz, J = 1,4 Hz); 8,69 (1H, d, J = 1,4 Hz); 10,72 (1H, s.a.). ELSD: 100%, EM-IES: m/z 374  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## Síntesis del Ejemplo 50

**Etapas 1. 4-hidroxiindan-1-ona (86)**

- 5 Se añadió crotonona 85 (100 g, 0,68 mol) gota a gota a una mezcla de 150 g de NaCl y 500 g de AlCl<sub>3</sub> a 150 °C. Se calentó la mezcla resultante hasta 180 °C y, a continuación, se agitó durante 8 h. Después se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente y se añadió 1 kg de hielo triturado con una intensa agitación. Tras homogenizar, se filtró la mezcla, se lavó con 1 l de agua fría y se secó, dando aproximadamente 80 g (80%) de 4-hidroxiindan-1-ona (86) en forma de un sólido gris.

**Etapas 2. Trifluorometanosulfonato de 1-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-4-ilo (87)**

- 10 Se añadió anhídrido triflico (152 g, 0,54 mol) gota a gota a una solución de 80 g del Compuesto 86 y 60 g de NEt<sub>3</sub> en 1 l de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0 °C. Se sometió a reflujo la mezcla resultante durante 2 h, se enfrió hasta la temperatura ambiente, se filtró, se lavó con agua 5 (0,5 l), ácido cítrico acuoso (50 g/0,5 l) y salmuera (0,5 l), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó, dando aproximadamente 100 g (67%) del Compuesto 87 en forma de un líquido oscuro.

**Etapas 3. 4-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)indan-1-ona (88)**

- 15 Se sometió a reflujo una mezcla que consistía en acetato de potasio (48 g, 0,5 mol, 1,5 eq.), triflato 87 (100 g, 0,36 mol, 1,1 eq.), bis(pinacolato)diborano (100 g, 0,38 mol, 1,2 eq.), PPh<sub>3</sub> (5 g, 0,02 mol, 0,06 eq.) y PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (6,9 g, 0,01 mol, 0,03 eq.) en tolueno desgasificado (2 l) bajo una atmósfera de argón durante una noche. Se evaporó la mezcla resultante hasta secarla y se cromatografió, eluyendo con EtOAc/hexanos 1/5. Se recogieron las fracciones que contenían el producto deseado y se evaporaron, dando aproximadamente 50 g (57%) del Compuesto 88 en forma de un sólido amarillo claro.
- 20

**Etapas 4. 4-(2-Nitrofenil)-indan-1-ona (89)**

- 25 Se mezclaron tolueno desgasificado (0,5 l), borolano 88 (10 g, 39 mmol), 2-cloro-1-nitrobenzoceno (6,3 g, 40 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (3 g, 2,6 mmol) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M (200 ml) bajo un flujo rápido de argón y se sometió la mezcla resultante a reflujo durante una noche. Se añadieron agua (200 ml) y EtOAc (500 ml). Se separó la capa acuosa y se extrajo con EtOAc (2 x 500 ml) y se secaron los extractos combinados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (EtOAc al 20% en hexanos), dando 9 g (91 %) del bifenilo intermedio 89 en forma de un sólido amarillo.

**Etapa 5. 1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (90)**

Se añadieron bifenilo 89 (9 g, 35 mmol) y trietilfosfita a una bomba sellada y se calentaron a 120 °C durante una noche. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se filtró la mezcla, dando 4 g de 1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona. La precipitación con dietiléter proporcionó 2 g más del producto deseado. El rendimiento común de 90 en forma de polvo amarillo fue del 77,5%.

**Etapa 6. 9-acetil-1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (91)**

Se suspendió 1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona 90 (6 g, 27,1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (100 ml). Se añadió AlCl<sub>3</sub> anhidro (6 g, 45 mmol) con agitación en un baño con hielo, seguido de la adición gota a gota de AcCl (2,4 ml, 33,2 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a aproximadamente 5 °C durante 24 h y se vertió en hielo agua. Se separó mediante filtración el sólido gris precipitado, se lavó con agua (2 x 100 ml), acetona (3 x 50 ml) y dietiléter (3 x 50 ml), dando 4 g (56,3%) de 9-acetil-1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona 91.

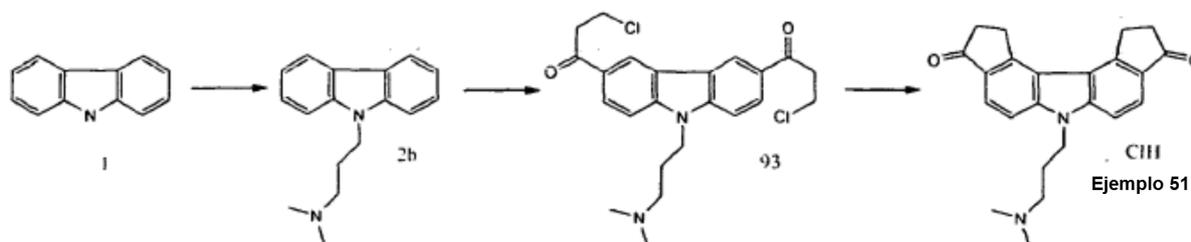
**Etapa 7. 9-acetil-1,2-dihidro-6-(2-bromoetil)-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (92)**

Se añadió NaH (2 g de 60%, 50 mmol) a una suspensión del Compuesto 91 (4 g, 15,2 mmol) en DMF seca (100 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h hasta que cesó la evolución de hidrógeno. Se añadió 1,2-dibrometano (20 g, 106 mmol) gota a gota bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a temperatura ambiente, a continuación a 60 °C durante 24 h y se vertió en agua con hielo (300 ml). Se separó mediante filtración el sólido gris precipitado y se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (CHCl<sub>3</sub>), dando 2 g del material de partida y aproximadamente 1 g (2,7 mmol, 35,5% del material convertido) del carbazol alquilado 92 en forma de un sólido color crema.

**Etapa 8. Clorhidrato de 9-acetil-1,2-dihidro-6-(2-(2-propil)aminoetil)-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (Ejemplo 50)**

Se añadieron bromuro 92 (1 g, 2,7 mmol) y 2-propilamina a una bomba sellada y se calentaron a 180 °C durante una noche. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se evaporó la mezcla hasta secarla, se mezcló el residuo con 100 ml de solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, y se filtró. Se purificó la torta del filtro mediante cromatografía en columna (CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10/1)). Se recogieron las fracciones que contenían el producto deseado, se evaporaron hasta secarlas, se diluyeron con HCl acuoso al 40% (10 ml), se evaporaron hasta secarlas y se volvieron a evaporar con tolueno (2 x 100 ml), dando 200 mg (0,52 mmol, 19%) de clorhidrato de 9-acetil-1,2-dihidro-6-(2-(2-propil)aminoetil)-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (Ejemplo 50) en forma de un sólido gris.

RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,23 d (6H), 2,74 s (3H), 2,83 m (2H), 3,67 m (2H), 4,87 m (2H), 7,85 dd (2H), 7,97 d (1H), 8,22 d (1H), 8,71 s (1H), 8,9-9,2 s amplio (2H).

**Síntesis del Ejemplo 51****Etapa 1. 9-(3-Dimetilaminopropil)-carbazol (2b)**

Se añadió NaH (14,4 g de 60%, 360 mmol) en porciones bajo argón a una suspensión de carbazol 1 (20 g, 119,8 mmol) en DMF seca (200 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h hasta que cesó la evolución del hidrógeno. Se añadió clorhidrato de cloruro de 3-dimetilaminopropilo (28 g, 180 mmol) en porciones a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción durante 20 min a temperatura ambiente, a continuación a 60 °C durante 3 h y se vertió en agua fría (500 ml). Se extrajo el producto con EtOAc (2 x 500 ml). Se volvió a extraer la capa orgánica con HCl al 10% (200 ml) y se extrajo la capa ácida con EtOAc para eliminar el carbazol sin reaccionar. Se añadió amoníaco saturado (200 ml) y se volvió a extraer el producto con EtOAc. La evaporación del disolvente proporcionó 25 g (99 mmol, 83%) de 9-(2-dimetilaminopropil)carbazol 2b en forma de un aceite marrón.

**Etapa 2. 3,6-di(4-Cloropropan-2-ona-il)-9-(2-dimetilaminopropil)carbazol (93)**

Se disolvió 9-(2-dimetilaminopropil)carbazol 2b (25 g, 99 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (150 ml). Se añadió AlCl<sub>3</sub> anhidro (40 g, 300 mmol) en porciones con agitación y enfriamiento en un baño de hielo. Se añadió cloruro de 3-cloropropionilo (30 ml, 312 mmol) gota a gota, mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C. Se agitó

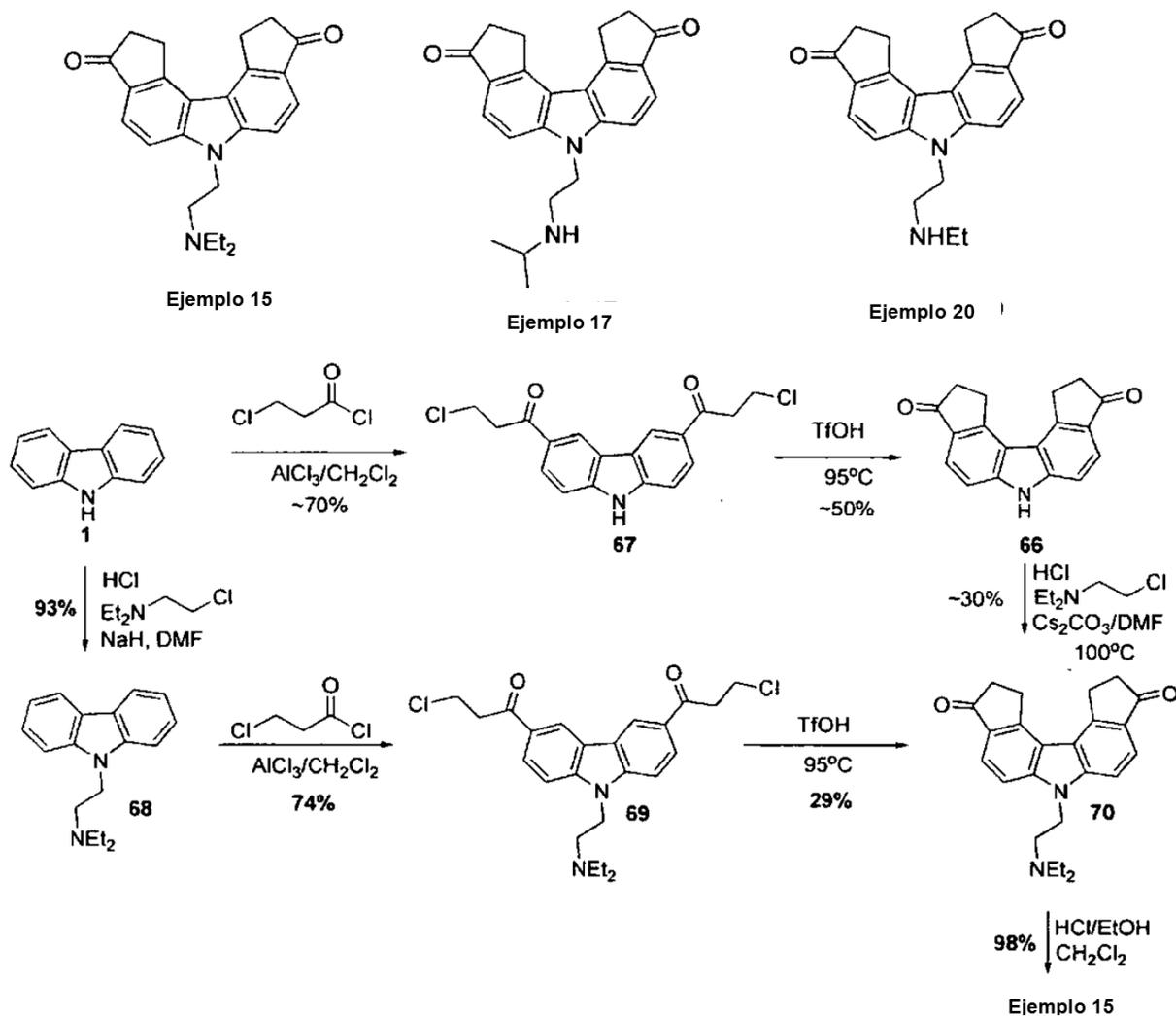
la mezcla de reacción a esta temperatura durante una noche, se vertió en hielo triturado y se extrajo con  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/1) (3 x 500 ml). Se evaporaron los extractos hasta secarlos y se trituró el aceite verde resultante con dietiléter (2 x 250 ml), dando 20 g (46 mmol, 47%) de 3,6-di(3-cloropropionil)-9-(2-dimetilaminopropil)-carbazol 93 en forma de un polvo gris.

### 5 Etapa 3. 6-(3-Dimetilaminopropil)-1,2,10,11-tetrahidro-6H-bis-(ciclopenta[c]carbazol-3,9-diona (Ejemplo 51)

Se añadió el 3,6-di-(3-cloropropionil)-9-(2-dimetilaminopropil)carbazol 93 (20 g, 46 mmol) en porciones a ácido trifluorometanosulfónico (100 g) con agitación a temperatura ambiente y se calentó la mezcla de reacción hasta 95 °C durante una noche. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo la mezcla de reacción. Se separó mediante filtración el precipitado, se mezcló con bicarbonato sódico saturado y se volvió a separar mediante filtración. La torta del filtro resultante contenía aproximadamente el 80% del producto deseado y el 20% del isómero. Tras una sola cristalización en metanol, se mezcló el precipitado con HCl 4 N/dioxano (100 ml), se evaporó hasta secarlo y se recristalizó en EtOH, dando aproximadamente 2,8 g (7,1 mmol, 15,4%) del Ejemplo 51 al 95% en forma de un sólido blanco.

EM-CL: 100%; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 95%: 2,18 m (2H), 2,7 s (6H), 2,78 m (4H), 3,15 m (2H), 3,83 m (4H), 4,68 m (2H), 7,85 dd (4H), 10,0 s.a. (1H).

### Síntesis alternativa de los Ejemplos 15 y 17, y Síntesis del Ejemplo 20



A menos que se indique lo contrario, los reactivos y los disolventes se usaron como se recibieron de los proveedores comerciales. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones se obtuvieron en un espectrómetro Bruker ARX 400 a 400 MHz. El pico del disolvente se usó como pico de referencia para los espectros de protones. El progreso de las reacciones se controló mediante análisis de CCF y/o EM-CL.

**9-(2-Dietilaminoetil)-carbazol (68)**

Se añadió NaH (14,4 g de 60%, 360 mmol, 3 eq.) en porciones bajo argón a una suspensión de carbazol (1) (20 g, 119,8 mmol, 1 eq.) en DMF seca (200 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min hasta que cesó la evolución del hidrógeno. Se añadió clorhidrato de cloruro de 2-dimetilaminoetilo (31 g, 180 mmol) en porciones a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción durante 20 min a temperatura ambiente, a continuación, a 60 °C durante 3 h (seguimiento mediante CCF) y se vertió en agua fría (1 l). Se extrajo el producto con EtOAc (5 x 200 ml); se volvió a extraer la capa orgánica con HCl al 10% (400 ml) y se extrajo la capa ácida con EtOAc para eliminar el carbazol sin reaccionar. Se ajustó el pH de la capa acuosa hasta aproximadamente 9 con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se volvió a extraer el producto con EtOAc. La evaporación del disolvente proporcionó 29,5 g (93%) de 9-(2-dietilaminoetil)carbazol (68) en forma de un aceite marrón.

**Clorhidrato de 3,6-di(4-cloropropan-2-ona-il)-9-(2-dietilaminoetil)carbazol (69)**

Se disolvió 9-(2-dietilaminoetil)carbazol (68) (17,9 g, 67,3 mmol, 1 eq) en diclorometano seco (150 ml). Se añadió AlCl<sub>3</sub> anhidro (45 g, 337 mmol, 5 eq.) en porciones con agitación y enfriamiento en un baño de hielo. Se añadió cloruro de 3-cloro-propionilo (32,4 ml, 337 mmol, 5 eq.) gota a gota, mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C. Se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 15 h, se vertió en HCl al 3% frío (se debería evitar la formación violenta de espuma) y se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (5 x 500 ml). Se evaporaron los extractos y se trituró el aceite verde resultante con dietiléter (5 x 50 ml), dando 24 g (74%) de clorhidrato de 3,6-di(3-cloropropionil)-9-(2-dietilaminoetil)-carbazol (69) en forma de un sólido gris oscuro.

RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 1,27 (t, 6H), 2,72 (c, 4H), 3,75 (m, 6H), 4,02 (m, 4H), 5,00 (t, 2H), 8,00 (d, 2H), 8,17 (d, 2H), 9,16 (s, 2H), 11,42 (s, 1H).

**6-(3-Dietilaminoetil)-1,2,10,11-tetrahydro-6H-bis-(ciclopenta[c]carbazol-3,9-diona (70)**

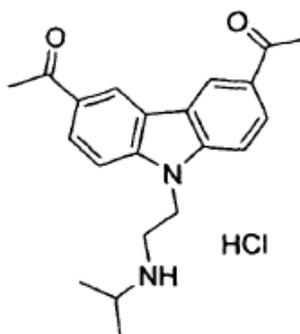
Se añadió el clorhidrato de 3,6-di-(3-cloropropionil)-9-(2-dimetilaminopropil)carbazol (69) (5 g, 10,33 mmol) en porciones a ácido trifluorometanosulfónico (50 g, 333 mmol, 32 eq.) con agitación a temperatura ambiente y se calentó la mezcla de reacción a 95 °C durante una noche. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo la mezcla de reacción. Se ajustó el pH de la capa acuosa hasta aproximadamente 9 con NaOH al 10% y se volvió a extraer el producto con EtOAc/THF = mezcla 3/1. Se evaporaron los disolventes y se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (EtOAc al 10% en EtOAc), dando 1,12 g (29%) del producto intermedio puro 70 en forma de un sólido blanco. EM (IES): m/z = 375,3 [M+H]<sup>+</sup>; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>): 0,70 (t, 6H), 2,41 (c, 4H), 2,68 (m, 6H), 3,73 (m, 4H), 4,55 (t, 2H), 7,77 (s, 4H).

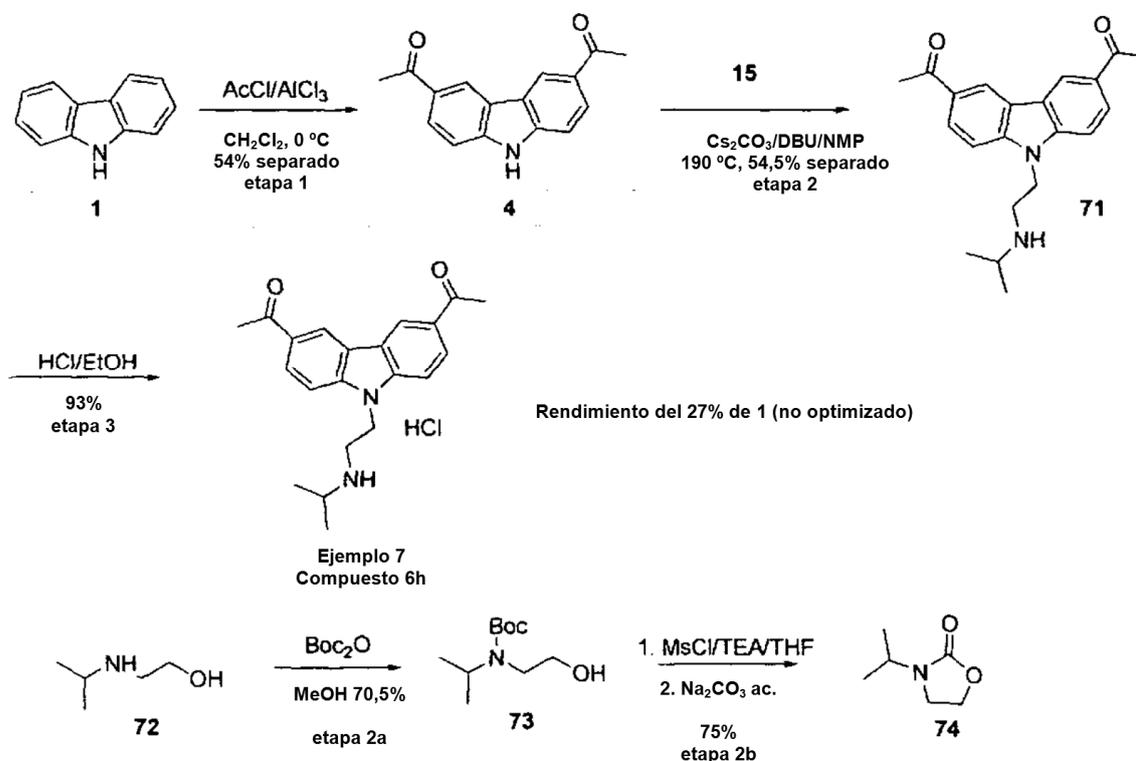
**Ejemplo 15**

Se disolvió el compuesto intermedio 70 (1,12 g, 2,99 mmol, 1 eq) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) y se añadió una solución de HCl al 10% en etanol (3,4 g, 93,1 mmol, 30 eq), provocando la formación de un precipitado voluminoso. Se evaporaron los disolventes a presión reducida y se trituró el residuo con MeOH caliente, dando 1,17 g (98%) del Ejemplo 15 en forma de un sólido de color blanco roto.

Pureza: 97,3% mediante CLAR; EM (IES): m/z = 375,3 [M-HCl+H]<sup>+</sup>; p.f. = 312,1-314,7 °C

Los Ejemplos 17 y 20 se preparan mediante un procedimiento idéntico con el uso de la cloroamina apropiada, es decir, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Cl o (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Cl.

**Síntesis alternativa del Ejemplo 7 (Compuesto 6h)**



### Apartado experimental

A menos que se indique lo contrario, los reactivos y los disolventes se usaron como se recibieron de los proveedores comerciales. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones se obtuvieron en un espectrómetro Bruker ARX 400 a 400 MHz. El pico del disolvente se usó como pico de referencia para los espectros de protones. Las CCF se realizaron sobre sílice, a no ser que se indique lo contrario.

### 3,6-Diacetilcarbazol (4)

Se suspendió carbazol (20 g, 0,12 mol, 1 eq) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (300 ml) bajo argón y se enfrió la mezcla resultante hasta  $0^\circ\text{C}$ . Se añadió  $\text{AlCl}_3$  (95,5 g, 0,72 mol, 6 eq) a la mezcla seguido de la adición gota a gota de cloruro de acetilo (25,5 ml, 0,36 mol, 3 eq), mientras se mantenía la temperatura interna a aproximadamente  $0^\circ\text{C}$ . Tras 3 horas de agitación a  $0^\circ\text{C}$ , se añadió otra porción de cloruro de acetilo (5 ml, 0,07 mol, 0,6 eq) y se continuó con la agitación durante otras 2 horas.

Se vertió la mezcla de reacción en hielo mientras se agitaba. Se recogió el sólido mediante filtración, se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a continuación con agua, y se secó en un horno de vacío a  $50^\circ\text{C}$ . Rendimiento de 16,3 g (54%) de carbazol 4. Se combinaron el filtrado y los lavados, y se extrajeron con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 300 ml). Se lavaron los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con  $\text{NaHCO}_3$  saturado (1 x 300 ml) y salmuera (1 x 300 ml). Tras secar sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evaporó el filtrado hasta secarlo, dando el producto bruto, que se usó sin mayor purificación.

EM (IES):  $m/z = 252,0$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 2-N-Boc-2-N-isopropilaminoetanol (14)

Se añadió  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (50,8 g, 0,23 mol, 2 eq) a una solución de 2-N-isopropilaminoetanol (72) (22,3 ml, 70%, 0,136 mol) en  $\text{MeOH}$  (200 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas, a continuación, se diluyó con agua (1,2 l) y se extrajo el producto con  $\text{EtOAc}$  (4 x 400 ml). Se lavaron los extractos de  $\text{EtOAc}$  combinados con salmuera (1 x 400 ml) y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se evaporó el disolvente y el producto bruto se purificó en columna (eluyente de hexanos: $\text{EtOAc}$  de 4:1 a 1:1), dando 19,5 g (rendimiento del 70,5%) de 73 puro en forma de una aceite viscoso.

### 3-Isopropil-2-oxazolidinona (74)

Se añadió  $\text{MsCl}$  (8,5 ml, 0,109 mol) gota a gota a una solución del alcohol (73) (18,5 g, 0,091 mol) y  $\text{TEA}$  (19 ml, 0,137 mol) en  $\text{THF}$  anhidro (200 ml) enfriado hasta  $-20^\circ\text{C}$  con agitación vigorosa. Se dejó calentar la reacción

lentamente hasta la temperatura ambiente (3 horas). Se retiraron los sólidos mediante filtración y se lavaron con THF (20 ml). Se añadió  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturado (100 ml) al filtrado y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una noche, a continuación se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml). Se lavaron los extractos de EtOAc combinados con HCl al 1% (1 x 200 ml), salmuera (1 x 200 ml) y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se evaporó el disolvente, dando 8,8 g (rendimiento del 75%) de carbamato cíclico (74), que se usó después sin purificación. EM (IES):  $m/z = 130,1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 3,6-Diacetil-9-(2-N-isopropilaminoetil)-carbazol (71)

Se agitó una mezcla de 3,6-diacetilcarbazol (4) (15,12 g, 0,06 mol), 3-isopropil-2-oxazolidinona (74) (7,80 g, 0,06 mol),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (39,2 g, 0,12 mol) y DBU (9 ml, 0,06 mol) en NMP (150 ml) a 190 °C durante 24 horas, y a continuación, se vertió en  $\text{H}_2\text{O}$  (500 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 300 ml). Se lavaron los extractos de EtOAc combinados con salmuera (2 x 200 ml) y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se evaporó el disolvente y se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (eluyente: MeOH (del 5 al 20%) (que contenía 0,1% de  $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ )/EtOAc). Las primeras fracciones contenían el material de partida sin reaccionar (~1,7 g). Se combinaron las fracciones puras y se evaporó el disolvente hasta secarlo, dando 9,36 g (que contenían EtOAc al 20% mediante RMN) de (71) puro. Se combinaron las fracciones menos puras, se evaporaron hasta secarlas y se trituro el residuo con EtOAc, dando otros 3,47 g del producto puro. Rendimiento total: 54,5% (tras restar la cantidad de EtOAc); (rendimiento del 61,6% en base al material de partida reaccionado).

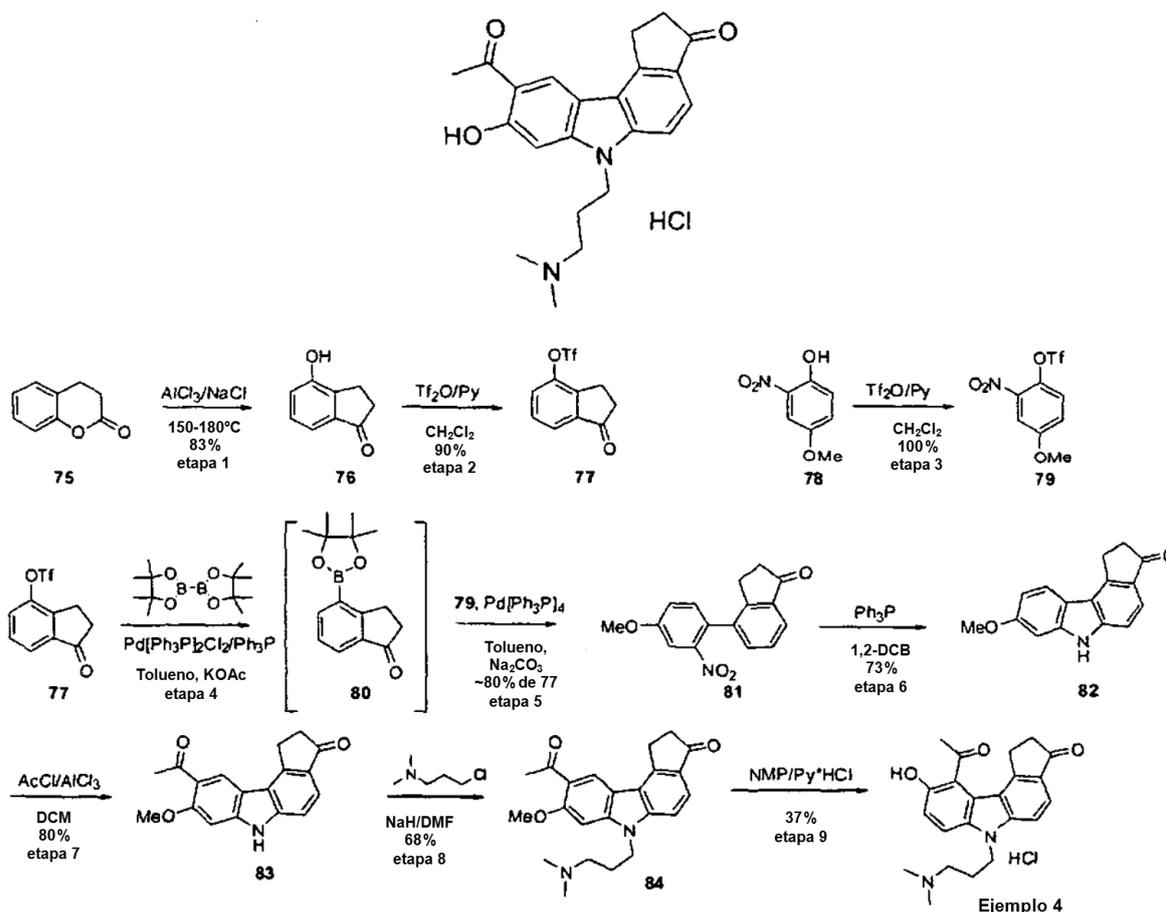
EM (IES):  $m/z = 337,1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### Compuesto 6h

Se disolvió el producto intermedio (71) (3,47 g, 0,0103 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) y se enfrió la solución resultante hasta aproximadamente 5 °C. Se añadió solución de HCl al 10%/EtOH (5,6 g, 0,0153 mol) gota a gota con agitación. Tras 40 minutos, se retiró el disolvente al vacío, se secó el residuo bajo un alto vacío a 40 °C, dando 3,5 g (rendimiento del 93%) de 6h. De igual manera, la otra cosecha de 71 (9,36 g, EtOAc al 20%) se convirtió en 6h.

Datos del análisis: Pureza: 99,5% mediante CLAR; EM (IES):  $m/z = 337,3$   $[\text{M}-\text{HCl}+\text{H}]^+$ ; p.f. = 292,7-294,1 °C.

### Síntesis alternativa del Ejemplo 4



**Etapa 1.** Se sintetizó 4-hidroxi-1-indanona (76) mediante recristalización inducida con cloruro de aluminio de dihidrocumarina (75), de acuerdo con *Org. Lett.*, 2007, 9(15), p. 2915-2918. La reacción se realizó en 100 g de (75), proporcionando (76) con un rendimiento del 85%.

5 **Etapa 2.** Se convirtió la indanona (76) en triflato (77) con un rendimiento del 90% mediante la reacción con anhídrido trifílico en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en presencia de Py, seguida de una cromatografía por desorción súbita.

**Etapa 3.** Se sintetizó el triflato (79) de la misma manera con un rendimiento cuantitativo, partiendo de 50 g de 4-metoxi-2-nitrofenol (78).

10 **Etapas 4 y 5.** Siguiendo el protocolo para una síntesis en un solo recipiente de compuestos de bifenilo de Synthetic Communications, 2006, 36 p. 3809-3820, se obtuvo el producto intermedio (81) en un rendimiento del 80%, partiendo de 60 g de triflato (77).

**Etapa 6.** Se llevó a cabo la ciclación del bifenilo intermedio (81) calentando con un exceso de trifenilfosfina en 1,2-diclorobenceno, primero a pequeña escala, proporcionando el carbazol (82) esperado con un rendimiento del ~50% (no optimizado) tras la precipitación en la mezcla de reacción con éter. Se aumentó la escala de la misma reacción hasta 42 g de (81), produciendo 27 g (rendimiento del 73%) del producto puro (82).

15 **Etapa 7.** Se llevó a cabo la acetilación del producto intermedio (82) (escala de 27,8 g) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de acuerdo con el protocolo estándar, dando 26 g (rendimiento del 80%) del producto intermedio (83).

**Etapa 8.** Tras una extracción exhaustiva con una mezcla (1:1) de EtOAc/THF, se obtuvo un rendimiento del aproximadamente 68% del producto bruto (84), que contenía una impureza de referencia según CCF. Se usó para la etapa de desmetilación sin mayor purificación.

20 **Etapa 9.** Se efectuó la eliminación del grupo metilo (84) calentando el sustrato en una mezcla (1:1) de  $\text{Py}^*\text{HCl}/\text{NMP}$  a 190 °C durante 10 h. Tras la purificación mediante cromatografía en columna, se obtuvieron 7,8 g (rendimiento del 37%) del Ejemplo 4 (base libre). Se trató con solución de HCl al 10% en EtOH, dando 8,4 g del Ejemplo 4 puro.

#### Apartado experimental

25 A menos que se indique lo contrario, los reactivos y los disolventes se usaron como se recibieron de los proveedores comerciales. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones se obtuvieron en un espectrómetro Bruker ARX 400 a 400 MHz. El pico del disolvente se usó como pico de referencia para los espectros de protones. El progreso de las reacciones se controló mediante análisis de CCF y/o EM-CL.

#### **4-Hidroxi-1-indanona (76)**

30 Se mezclaron cloruro de aluminio anhidro (550 g, 4,135 mol, 4 eq) y cloruro de sodio (105 g, 1,795 mol, 2,7 eq) y se calentaron hasta 150 °C. Se añadió dihidrocumarina (75) (100 g, 675,7 mol, 1 eq) lentamente, manteniendo la temperatura interna entre 150-160 °C. Tras la adición, se aumentó la temperatura hasta 200 °C y se agitó la mezcla de reacción durante 1,5 h y mientras estaba caliente, se vertió en una placa de porcelana hasta que se enfrió. Se rompió la masa solidificada y se añadió a una mezcla agitada vigorosamente de hielo y agua (4 l) que contenía 400 ml de HCl conc. Se agitó la suspensión resultante durante 1 h, se filtró, se lavó con agua y se secó, dando 85 g (85%) de 4-hidroxi-1-indanona (76) bruta en forma de un sólido gris. Resultó ser suficientemente pura para usarla en la siguiente etapa.

#### **1-Oxoindan-4-il-éster de ácido trifluorometanosulfónico (77)**

40 Se añadió anhídrido de ácido trifluorometanosulfónico (72,3 ml, 429,7 mmol, 1,2 eq) a una suspensión de 4-hidroxi-1-indanona (77) (53 g, 358,1 mmol, 1 eq) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (450 ml) y piridina (87 ml, 1074 mmol, 3 eq), mientras se mantenía la temperatura por debajo de 5 °C. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se continuó agitando durante 1 h. Se añadieron  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 ml) y agua (100 ml) a la mezcla de reacción, se separó la capa orgánica, se lavó posteriormente con solución de HCl al 2% (3 x 100 ml) y  $\text{NaHCO}_3$  saturado (2 x 100 ml), y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se evaporó el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se purificó el producto bruto mediante cromatografía por desorción súbita (EtOAc del 5% al 10% en hexanos), dando 90 g (90%) de 77 puro en forma de un líquido marrón.

45 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 2,76 (t, 2H), 3,19 (t, 2H), 7,65 (dd, 1H), 7,94 (2d, 2H).

#### **4-Metoxi-2-nitrofeniléster de ácido trifluorometanosulfónico (78)**

50 Se añadió anhídrido de ácido trifluorometanosulfónico (60 ml, 350 mmol, 1,2 eq) a una solución de 4-hidroxi-2-nitrofenol (78) (50,57 g, 298,9 mmol, 1 eq) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (550 ml) y piridina (72,5 ml, 897 mmol, 3 eq), mientras se mantenía la temperatura por debajo de 5 °C. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Se añadió agua (100 ml) a la mezcla de reacción, se separó la capa orgánica, se lavó posteriormente con soluciones de solución HCl al 7%, a continuación,  $\text{NaHCO}_3$  saturado y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se filtró la solución de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a través de un lecho corto de  $\text{SiO}_2$  y se eliminó el disolvente al vacío, dando 89 g (99%) del triflato 79 puro en forma de un líquido amarillo pálido.

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 3,92 (s, 3H), 7,49 (dd, 1H), 7,71 (d, 1H), 7,81 (d, 1H).

#### 4-(4-Metoxi-2-nitrofenil)-indan-1-ona (81)

5 Se sometió a reflujo bajo atmósfera de argón durante una noche una mezcla que consistía en acetato de potasio (29,44 g, 0,3 mol, 1,5eq), triflato (77) (61,44 g, 0,22 mol, 1,1 eq), bis(pinacolato)diborano (60,94 g, 0,24 mol, 1,2 eq), PPh<sub>3</sub> (3,15 g, 0,012 mol, 0,06 eq) y PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (4,21 g, 0,006 mol, 0,03 eq) en tolueno desgasificado (2 l). Se añadieron el triflato (79) (60,24 g, 0,2 mol, 1 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (11,55 g, 0,01 mol, 0,05 eq) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M (800 ml) consecutivamente al mismo matraz bajo un flujo rápido de argón y se sometió la solución resultante a reflujo durante una noche. Se añadieron agua (200 ml) y EtOAc (500 ml), se separó la capa acuosa y se extrajo con EtOAc (2 x 500 ml) y se secaron los extractos combinados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (EtOAc al 20% en hexanos), dando 44 g (80%) del bifenilo intermedio (81) en forma de un sólido amarillo.

#### 8-Metoxi-1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (82)

15 Se sometió a reflujo una solución de 4-(4-metoxi-2-nitrofenil)-indan-1-ona (81) (42 g, 148,4 mmol, 1 eq) y trifeniilfosfina (116 g, 445 mmol, 3 eq) en *o*-diclorobenceno (400 ml) con agitación vigorosa durante 4 h, y a continuación se enfrió hasta 0 °C. Se añadió dietiléter (4 l) y se separó el precipitado mediante filtración, se lavó con dietiléter (3 x 100 ml) y se secó, dando 17 g (46%) de (82). Se evaporó el filtrado y se lavó el residuo con MeOH frío (5 x 100 ml), dando 10 g más (27%) del carbazol (82). Rendimiento total de 27 g (73%).

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 2,74 (m, 2H), 3,50 (m, 2H), 3,88 (s, 3H), 6,90 (d, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,47 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,97 (d, 1H), 11,79 (s, 1H).

#### 20 9-Acetil-8-metoxi-1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (83)

Se disolvió 8-metoxi-1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (82) (27,8 g, 110,8 mmol, 1 eq) en diclorometano seco (300 ml). Se añadió AlCl<sub>3</sub> anhidro (29,5 g, 221,5 mmol) en porciones con agitación y se enfrió, seguido de la adición gota a gota de AcCl (24 ml, 332,4 mmol, 3 eq). Se agitó la mezcla de reacción a aproximadamente 5 °C durante 24 h y se vertió en agua con hielo (se debería evitar la formación violenta de espuma). Se separó mediante filtración el sólido naranja precipitado, se lavó con agua (10 x 100 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 ml), acetona (3 x 50 ml), dando 26 g (80%) de 9-acetil-8-metoxi-1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (83).

#### 9-Acetil-8-metoxi-1,2-dihidro-6-(3-dimetilaminopropil)-ciclopenta[c] carbazol-3-ona (84)

30 Se añadió NaH (6,88 g de 60%, 171,95 mmol) a una suspensión de 9-acetil-8-metoxi-1,2-dihidro-6H-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (83) (26 g, 68,78 mmol, 1 eq) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (300 ml), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente aproximadamente durante 20-30 min hasta que cesó la evolución de hidrógeno. Se añadió clorhidrato de cloruro de 3-dimetilaminopropilo (16,3 g, 103,16 mmol) en porciones bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a temperatura ambiente, a continuación a 60 °C durante 24 h y se vertió en agua con hielo (4 l). Se acidificó la solución acuosa hasta un pH de aproximadamente 2 con HCl conc. y se extrajo el material de partida sin reaccionar con EtOAc/THF = mezcla 3/1. Tras ajustar el pH de la capa acuosa hasta 35 aproximadamente 9, se extrajo el producto con una mezcla (1:1) EtOAc:THF (10 x 500 ml). Se lavaron los extractos combinados con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente, proporcionando 22 g (68%) del carbazol bruto (84), pureza razonable mediante EM-CL. Se usó en la siguiente etapa sin mayor purificación.

NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 1,88 (t, 2H), 2,13 (s, 6H), 2,16 (t, 2H), 2,62 (s, 3H), 2,75 (m, 2H), 3,47 (m, 2H), 4,01 (s, 3H), 4,52 (t, 2H), 7,32 (s, 2H), 7,65 (dd, 4H), 8,32 (s, 2H).

#### 40 9-Acetil-8-hidroxi-1,2-dihidro-6-(3-dimetilaminopropil)-ciclopenta[c]carbazol-3-ona

45 Se sometió a reflujo una solución de 9-acetil-8-metoxi-1,2-dihidro-6-(3-dimetilaminopropil)-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (84) (22 g, 58,2 mmol, 1 eq) y clorhidrato de piridina (134,4 g, 1164 mmol, 20 eq) en NMP (150 ml) durante 10 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se vertió en solución acuosa de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% (3 l). Se separó mediante filtración el sólido verde oscuro precipitado, se lavó con agua (5 x 100 ml) y se secó. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (eluyente de MeOH al 10%-20% en EtOAc), dando 7,81 (37%) de 9-acetil-8-hidroxi-1,2-dihidro-6-(3-dimetilaminopropil)-ciclopenta[c]carbazol-3-ona pura en forma de un sólido amarillo pálido.

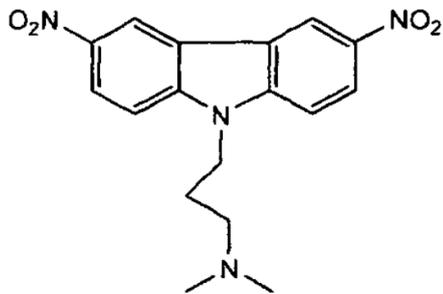
EM (IES): m/z = 363,3 [M+H]<sup>+</sup>.RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO): 1,86 (t, 2H), 2,17 (s, 6H), 2,20 (t, 2H), 2,79 (m, 2H), 2,81 (s, 3H), 3,52 (m, 2H), 4,43 (t, 2H), 7,15 (s, 2H), 7,66 (dd, 4H), 8,50 (s, 2H), 12,71 (s, 1H).

#### 50 Ejemplo 4

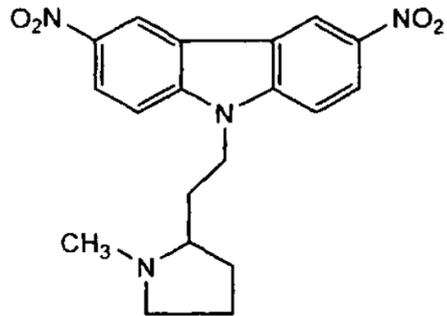
Se disolvió 9-acetil-8-hidroxi-1,2-dihidro-6-(3-dimetilaminopropil)-ciclopenta[c]carbazol-3-ona (7,81 g, 21,46 mmol, 1 eq) en una mezcla de agua (20 ml) y solución de HCl al 10% (20 ml) en etanol (200 ml) y se evaporó la solución homogénea hasta secarla. Se secó el residuo al vacío durante una noche, dando 8,47 g del Ejemplo 4 en forma de un sólido gris.

Pureza: 99,2% mediante CLAR; EM (IES):  $m/z = 363,3$   $[M-HCl+H]^+$ ; p.f. = 241,3 °C (Descomposición); RMN de  $^1H$  (DMSO-  $d_6$ ): 2,15 t (2H), 2,68 s (3H), 2,69 s (3H), 2,80 m (2H), 2,82 s (3H), 3,11 m (2H), 3,55 m (2H), 4,53 t (2H), 7,29 s (2H), 7,73 dd (4H), 8,52 s (2H), 11,00 s (1H), 12,76 s (1H).

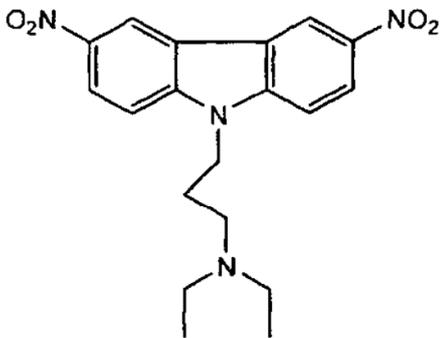
Los compuestos de fórmula estructural (II) se preparan de una manera similar a los compuestos de fórmula estructural (I), e incluyen, por ejemplo:



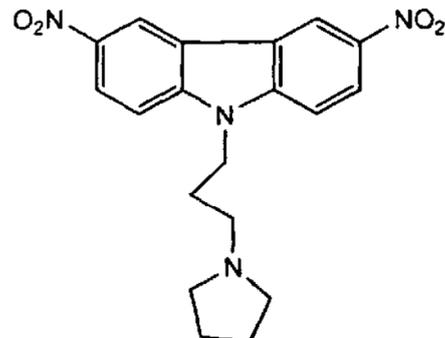
Ejemplo 21



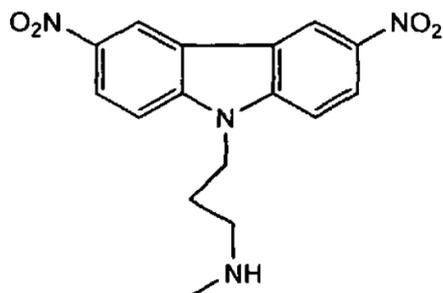
Ejemplo 22



Ejemplo 23

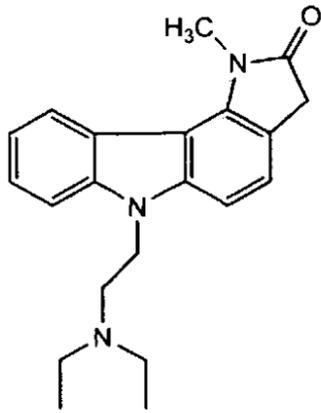


Ejemplo 24

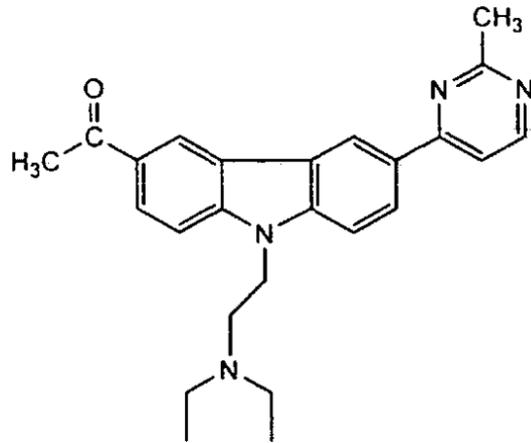


Ejemplo 25

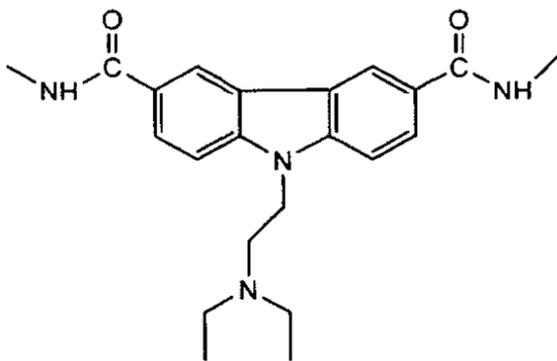
Compuestos de carbazol adicionales de la presente invención son:



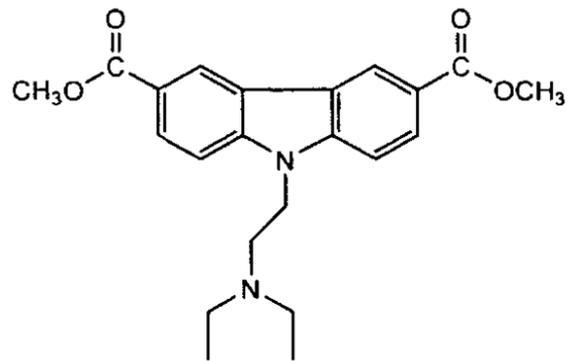
Ejemplo 17b



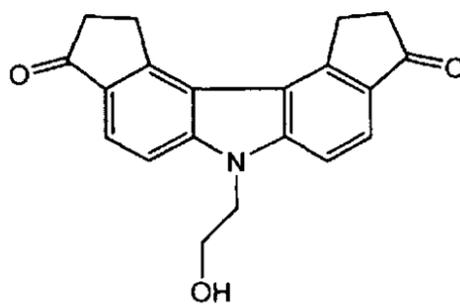
Ejemplo 26



Ejemplo 27

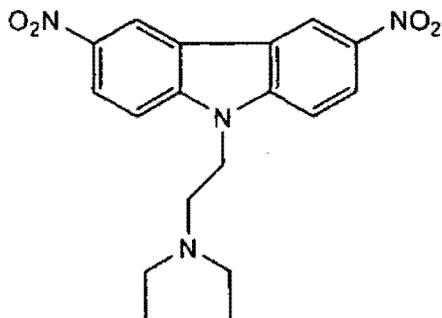


Ejemplo 28



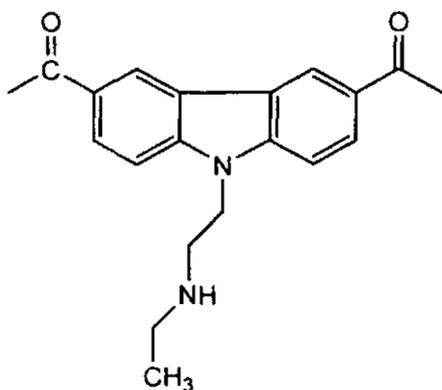
Ejemplo 37

Un compuesto útil en los procedimientos de la presente invención tiene una estructura:

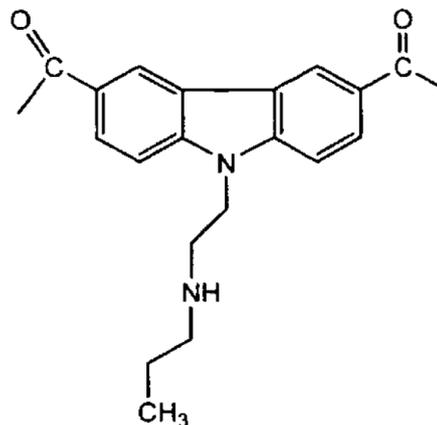


Compuesto 100

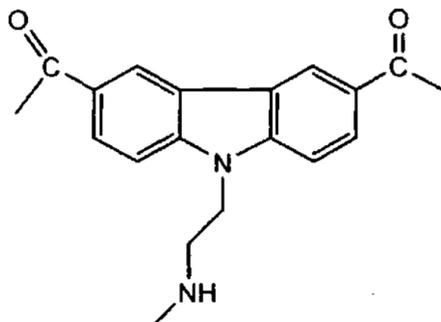
Ejemplos adicionales que tienen una fórmula estructural (I) incluyen, pero sin limitación:



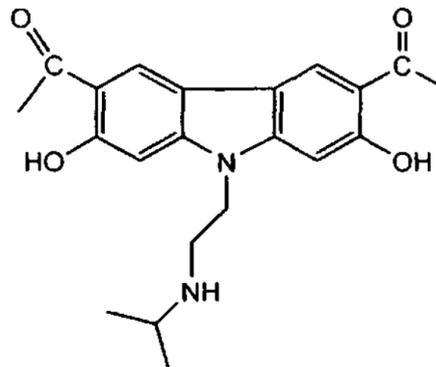
Ejemplo 29



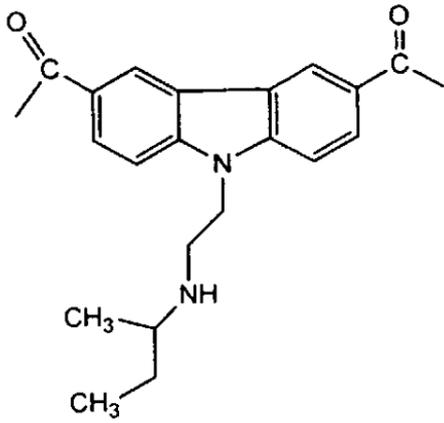
Ejemplo 30



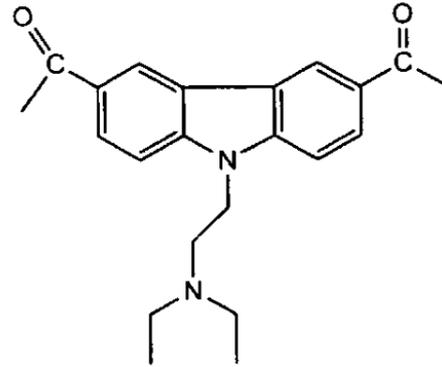
Ejemplo 31



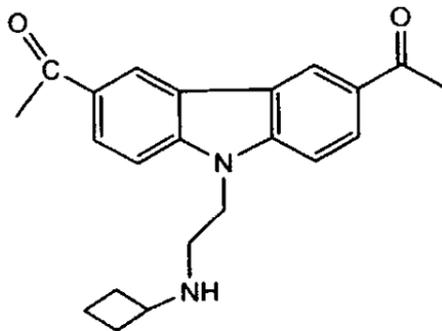
Ejemplo 32



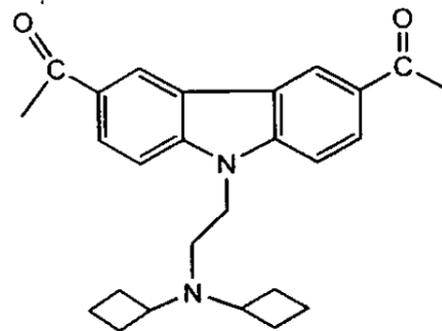
Ejemplo 33



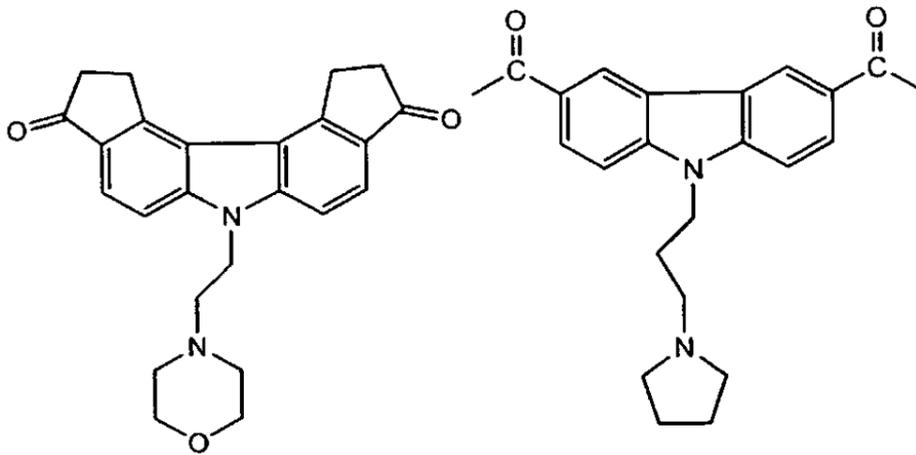
Ejemplo 34



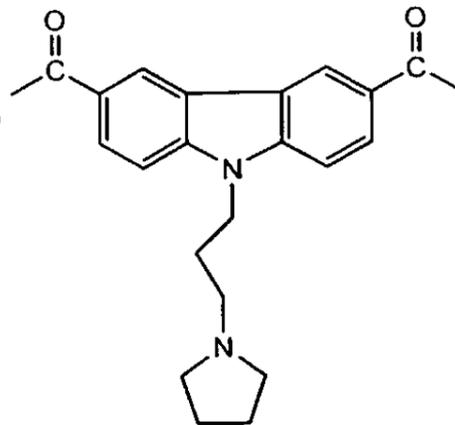
Ejemplo 35



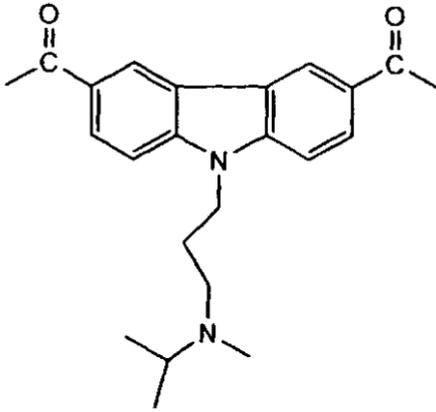
Ejemplo 36



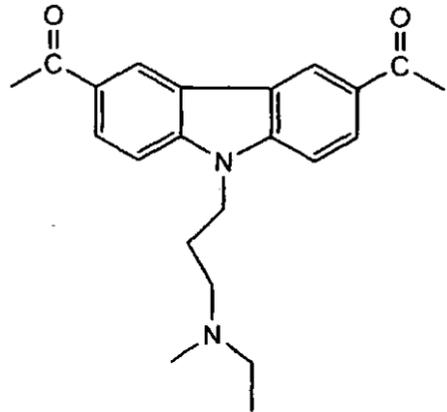
Ejemplo 38



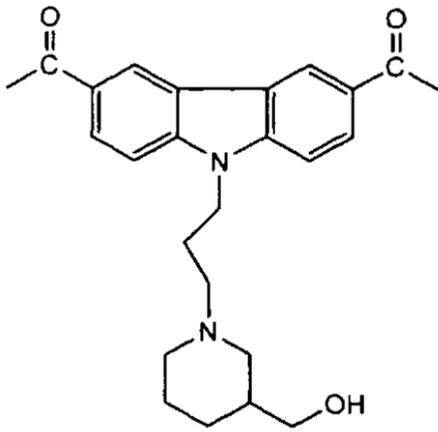
Ejemplo 39



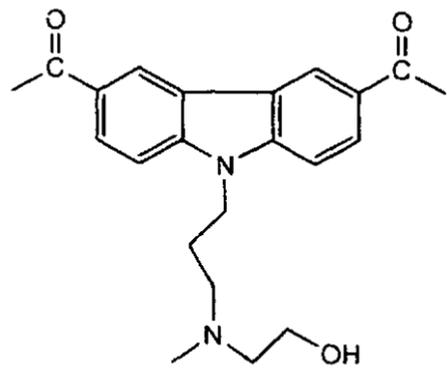
Ejemplo 40



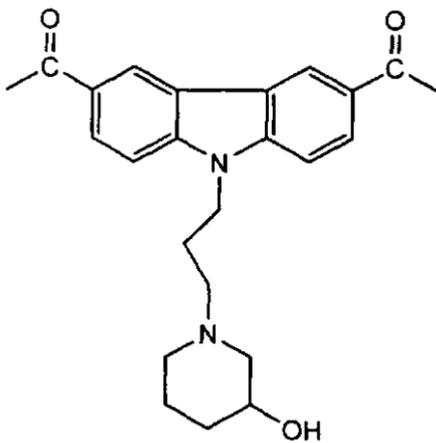
Ejemplo 41



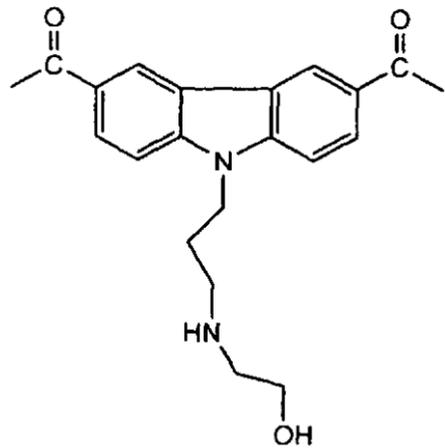
Ejemplo 42



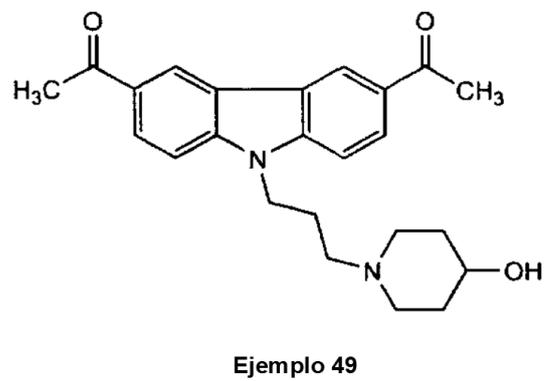
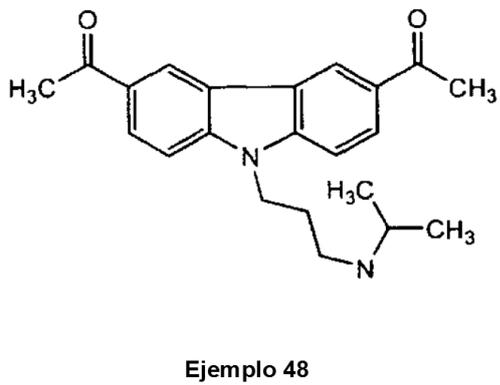
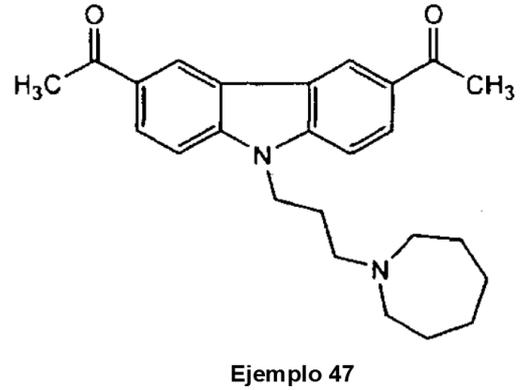
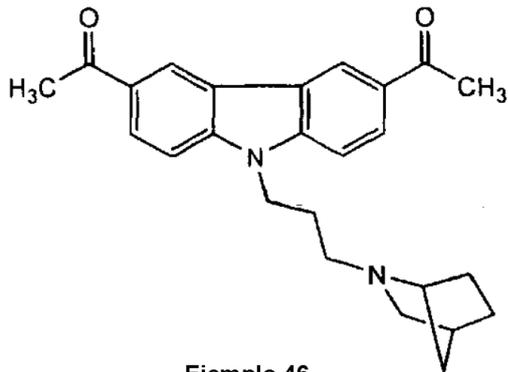
Ejemplo 43



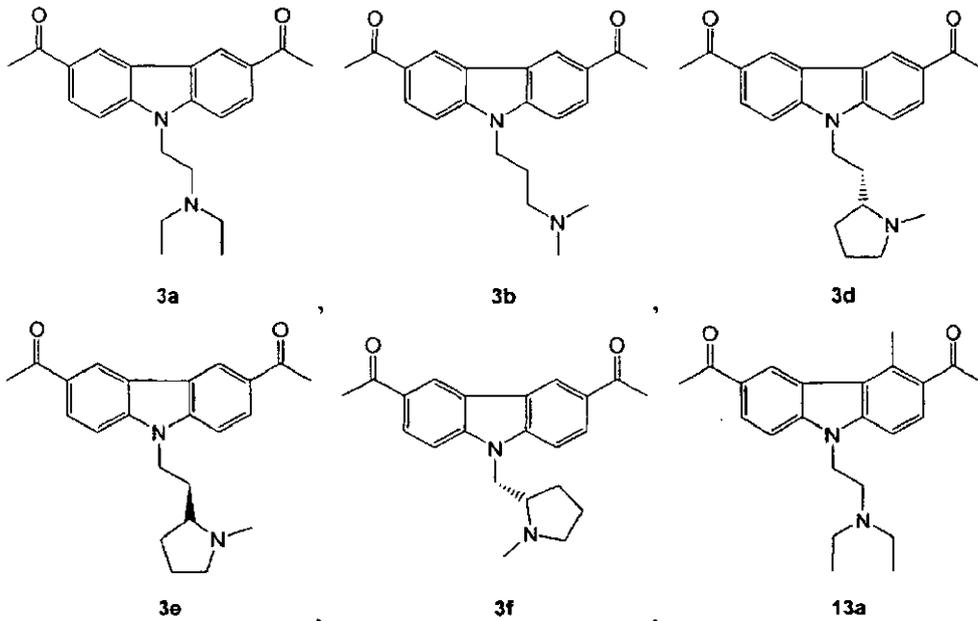
Ejemplo 44

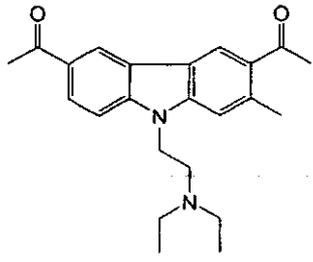


Ejemplo 45

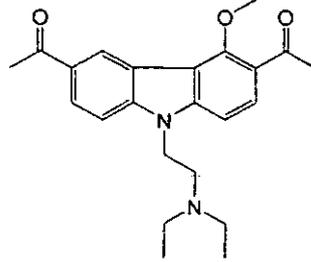


Así pues, los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación:

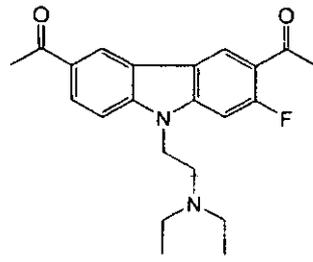




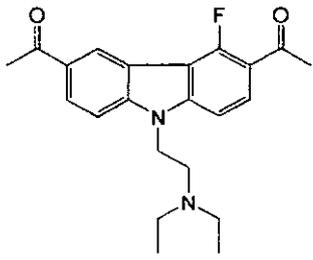
13b



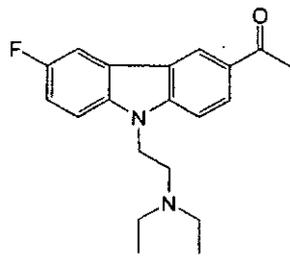
13c



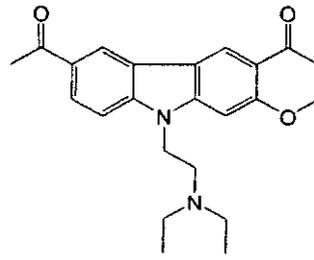
13d



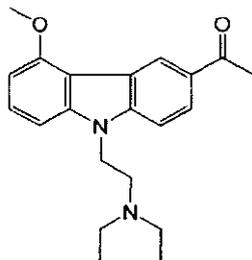
13e



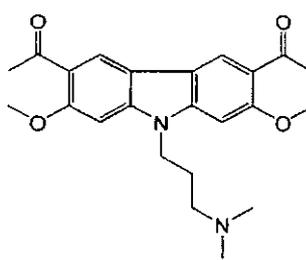
13f



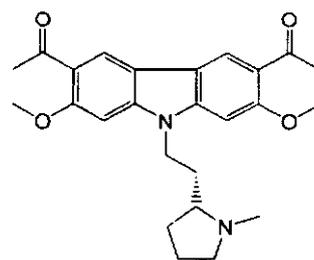
13g



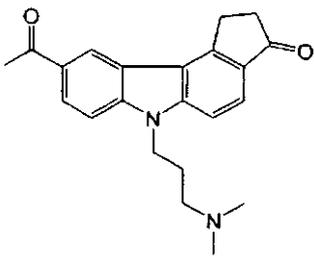
13h



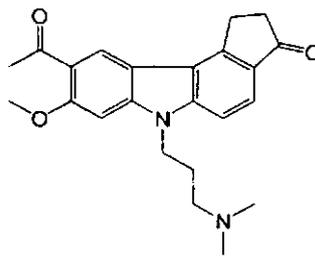
13i



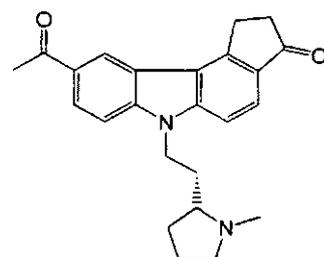
13j



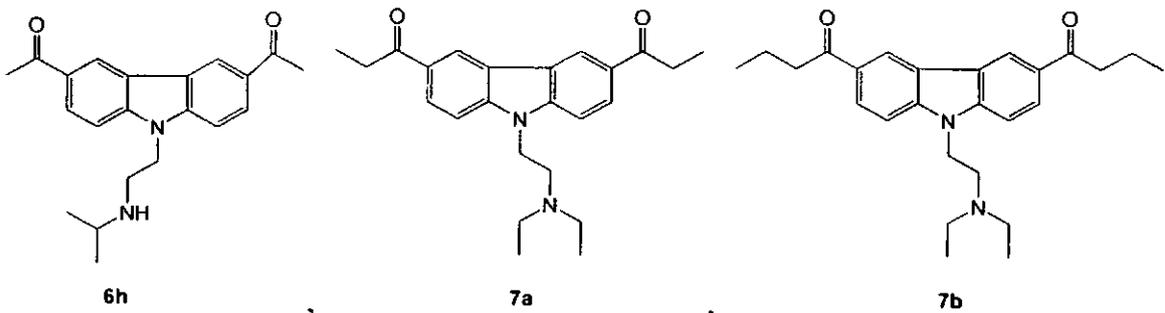
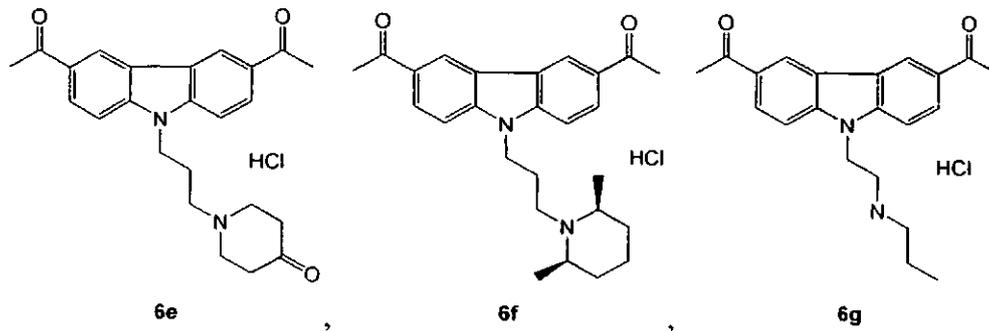
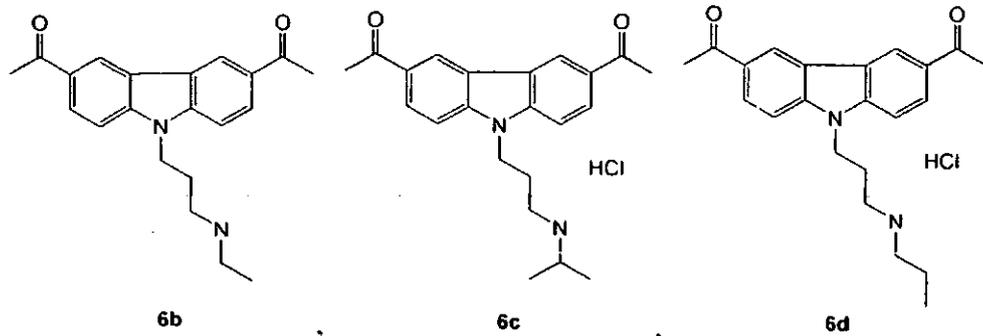
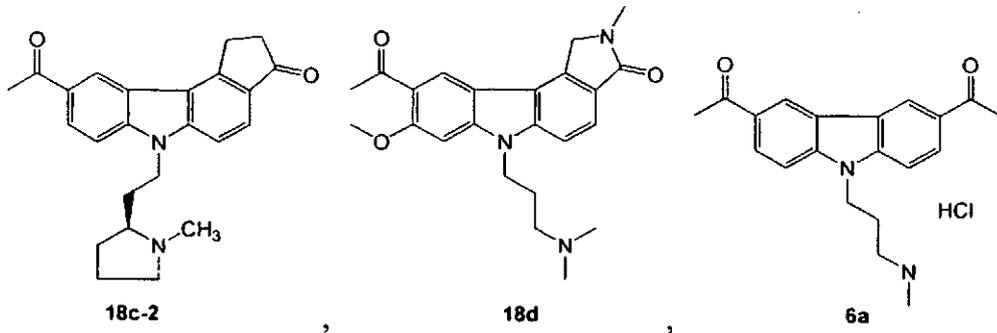
18a

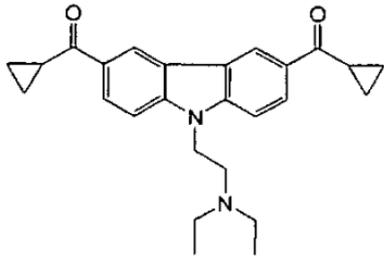


18b

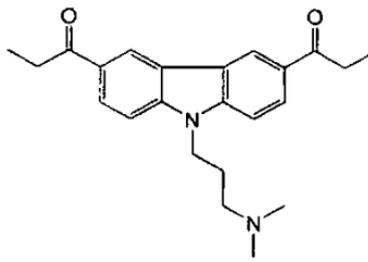


18c-1

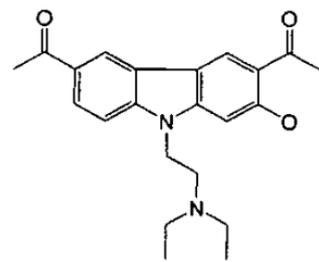




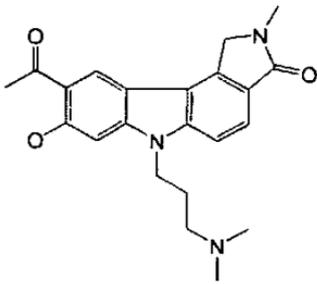
7c



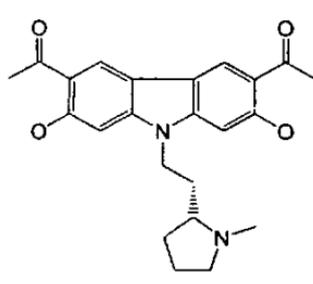
7d



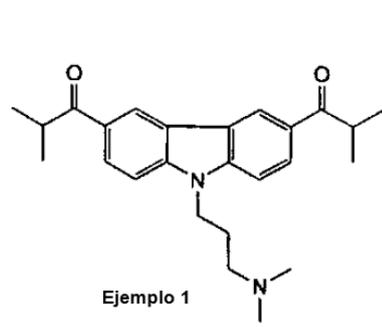
19a



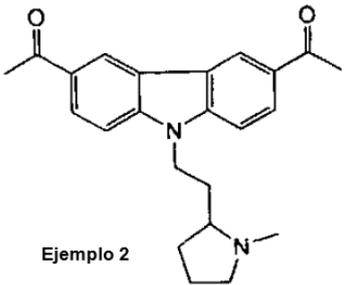
19e



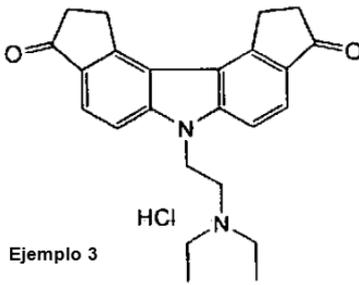
19f



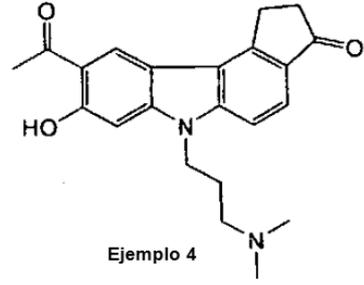
Ejemplo 1



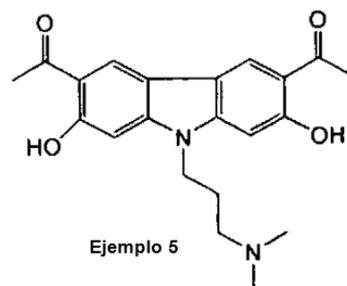
Ejemplo 2



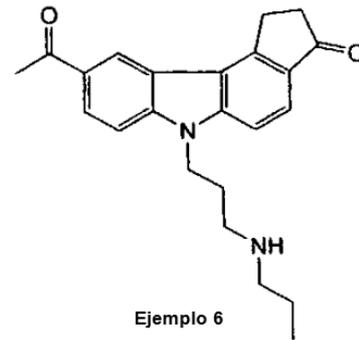
Ejemplo 3



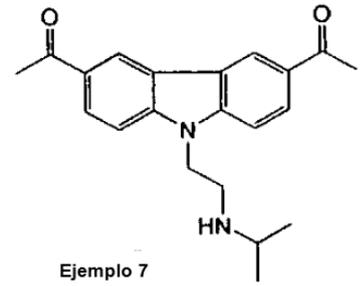
Ejemplo 4



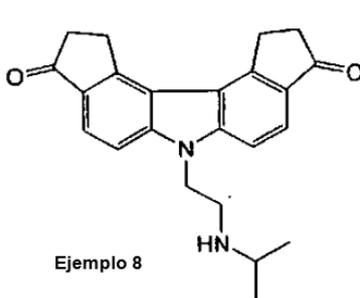
Ejemplo 5



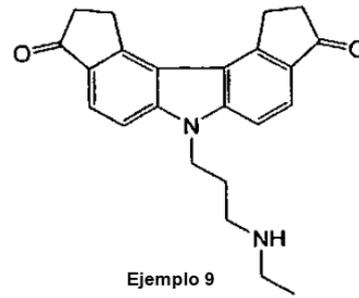
Ejemplo 6



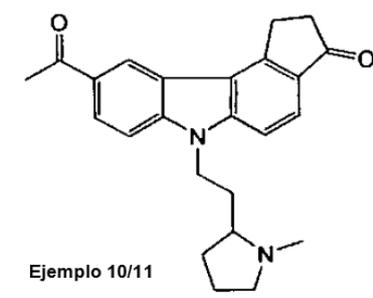
Ejemplo 7



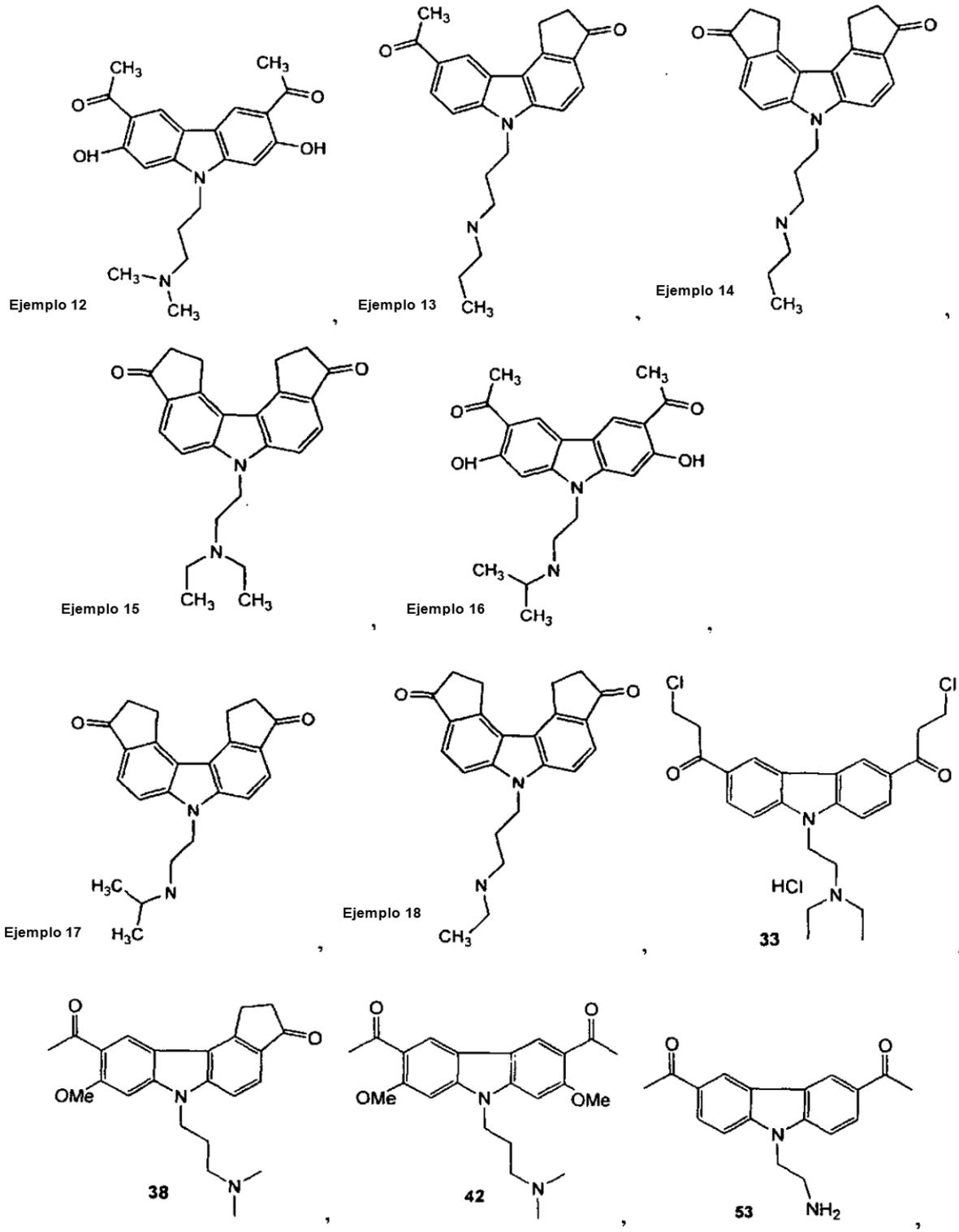
Ejemplo 8

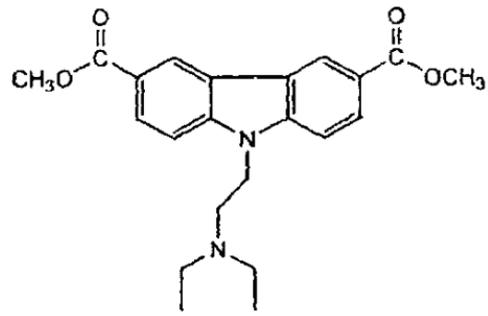
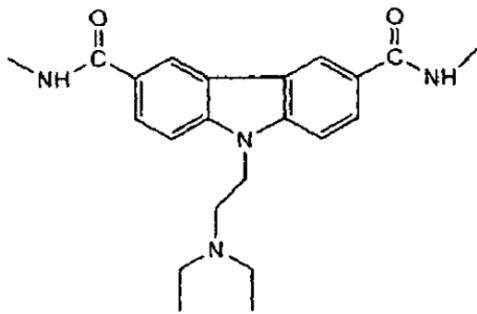
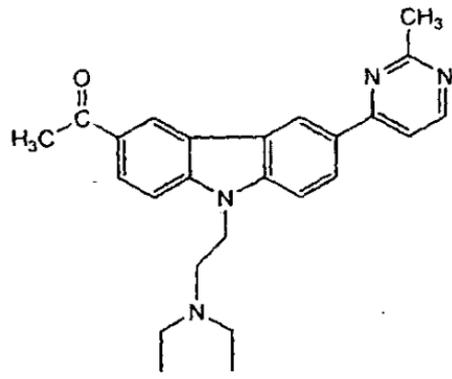
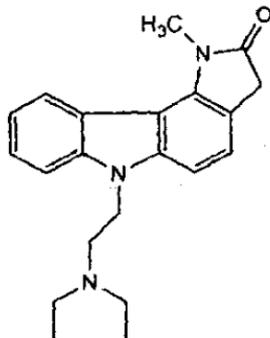
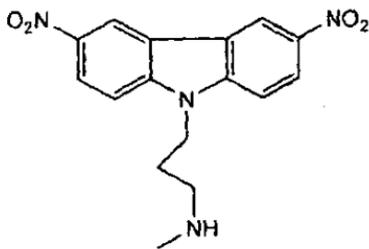
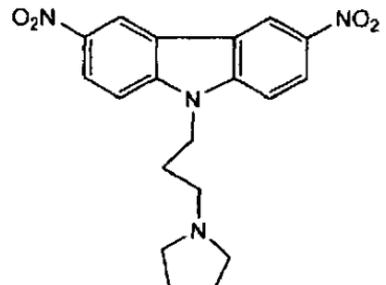
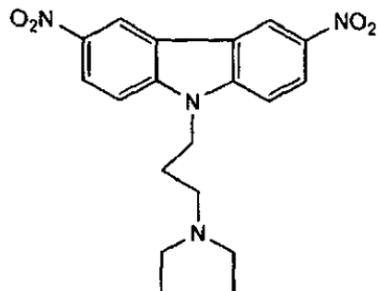
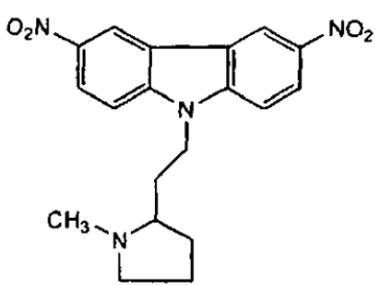
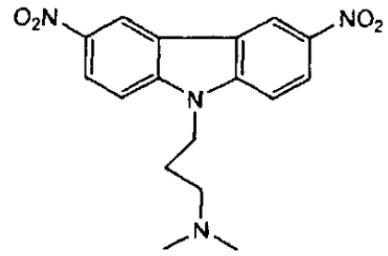
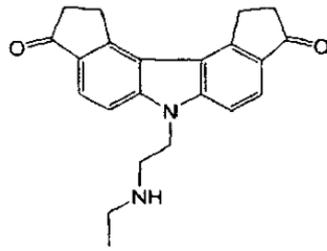
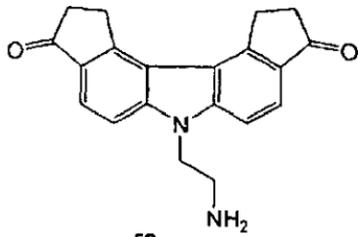


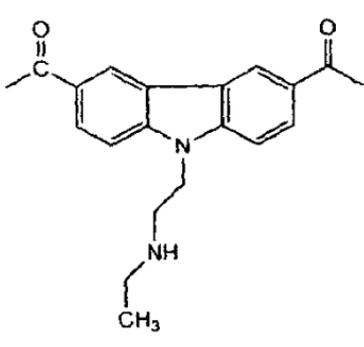
Ejemplo 9



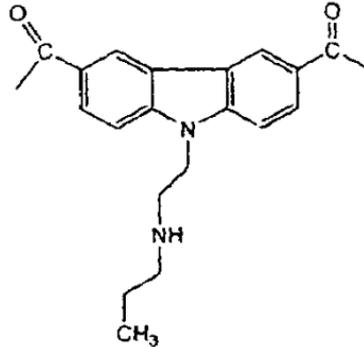
Ejemplo 10/11



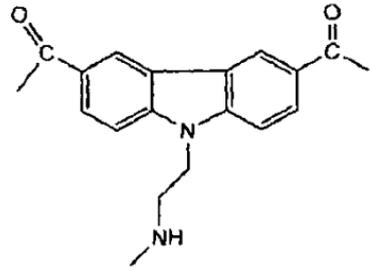




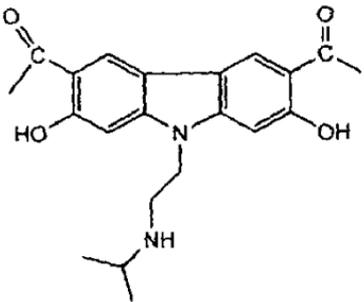
Ejemplo 29



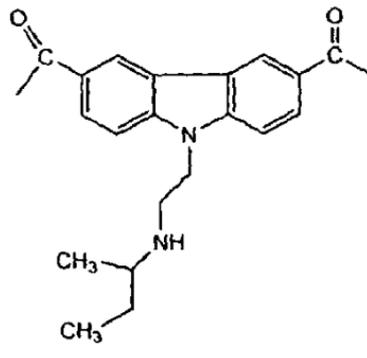
Ejemplo 30



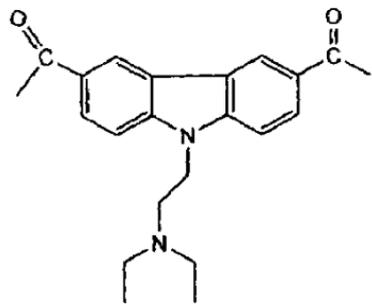
Ejemplo 31



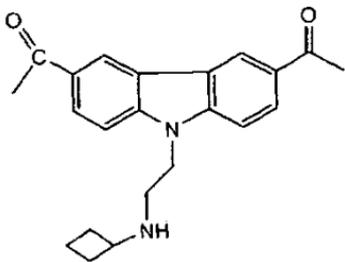
Ejemplo 32



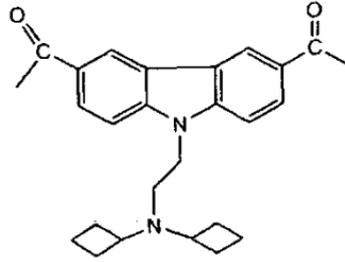
Ejemplo 33



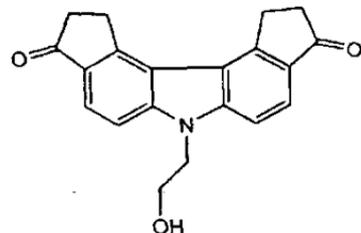
Ejemplo 34



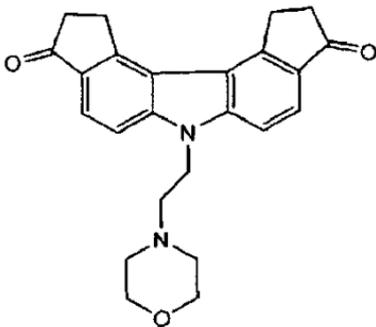
Ejemplo 35



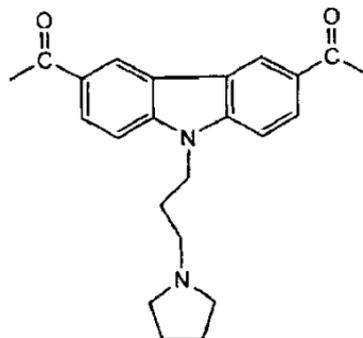
Ejemplo 36



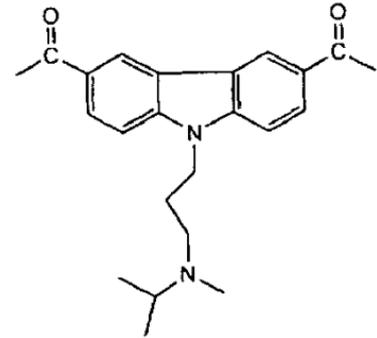
Ejemplo 37



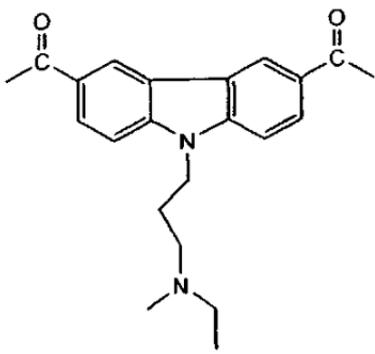
Ejemplo 38



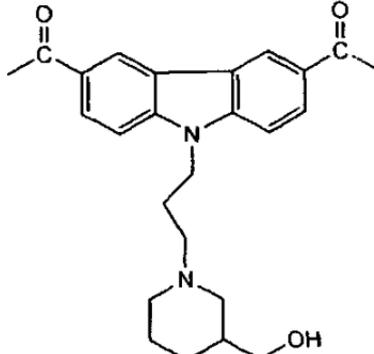
Ejemplo 39



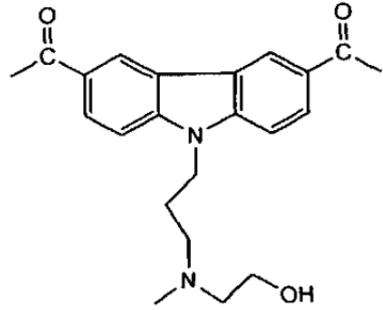
Ejemplo 40



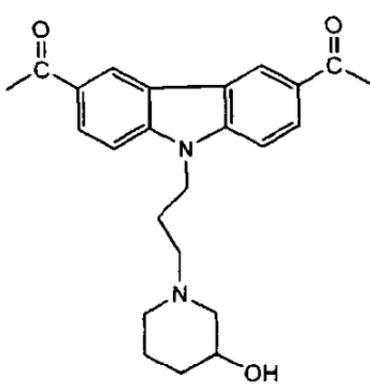
Ejemplo 41



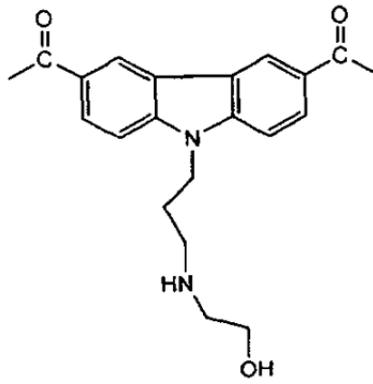
Ejemplo 42



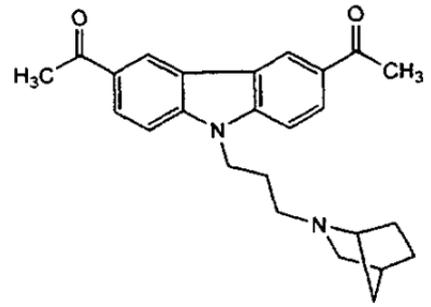
Ejemplo 43



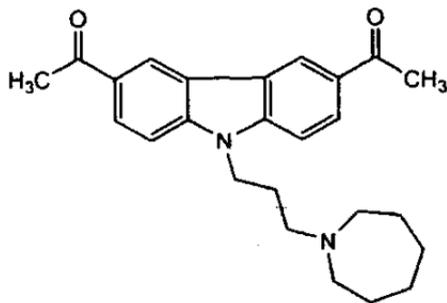
Ejemplo 44



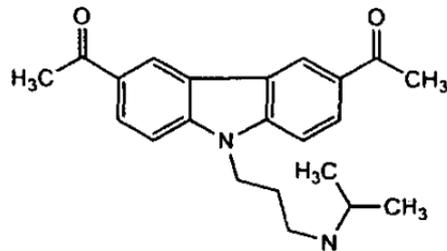
Ejemplo 45



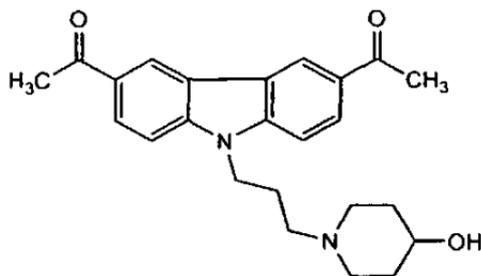
Ejemplo 46



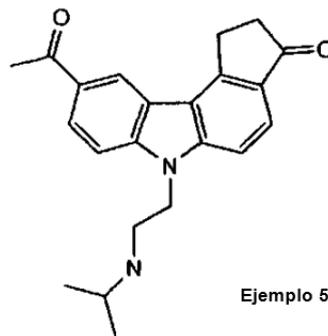
Ejemplo 47



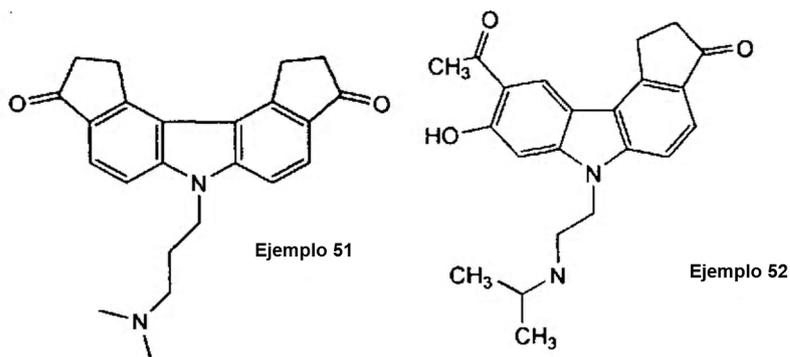
Ejemplo 48



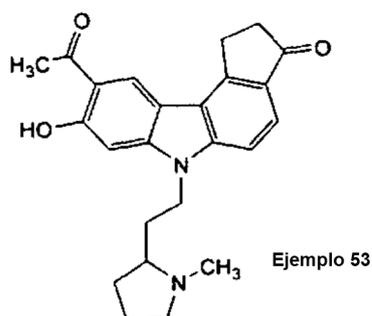
Ejemplo 49



Ejemplo 50



y



- 5 La potencia de un compuesto de carbazol se determina midiendo la capacidad del compuesto para activar a p53. En particular, se usa una línea celular con indicador de luciferasa sensible a p53 para identificar los compuestos capaces de activar a p53. La activación de p53 se presenta como el valor de la  $CE_{50}$ , que es la concentración eficaz del compuesto que se necesita para aumentar la actividad de p53 en un 50% frente a una actividad de p53 de referencia.

El ensayo de activación de p53 para la determinación del valor de la  $EC_{50}$  se realizó de la siguiente manera:

## 10 Definiciones y terminología

ConALuc: construcción de indicador de luciferasa sensible a p53

DMSO: dimetilsulfóxido

SBF: suero bovino fetal

### Equipo

- 15 Luminómetro Fluoroscán de 96 pocillos (por ejemplo, Fluoroscán, LabSystems, Inc, programa de ajustes, el tiempo de integración es de 0,1 segundos, el voltaje PMT es de 1000 y el tiempo de retardo es cero.

Pipeta multicanal de intervalo 50-300 ul.

Placas de 96 pocillos.

### Materiales

- 20 Líneas celulares con indicador.

HT1080-L (células de fibrosarcoma humanas con indicador ConALuc).

RCC45ConALuc (línea celular de carcinoma de células renales humanas con indicador ConALuc).

Medio DMEM estándar.

Medio RPMI estándar.

- 25 Penicilina/estreptomicina x 100.

Tripsina-EDTA en dilución 1/10 a 1/1 en PBS estéril.

PBS.

Sistema de análisis de luciferasa Bright-Glo (Fisher RP-E2620).

9-aminoacridina (9aa) 20 mM en DMSO (Sigma A38401), activador de p53 (control positivo).

5 Compuesto 100 20 mM en DMSO (Chembridge), activador de p53 (control positivo).

DMSO (Fisher D128-500) (control negativo).

**Procedimiento**

1. Se usaron dos tipos de células estándar, bien células HT1080-L o RCC45ConALuc. Ambas líneas celulares expresan establemente una construcción de indicador de luciferasa sensible a p53.
- 10 2. Se cultivaron células HT1080-L en medio DMEM que contenía SBF al 10%. Se cultivaron células RCC45ConALuc en medio RPMI que contenía SBF al 10% (se puede añadir penicilina/estreptomicina hasta una concentración final del 1%, si se desea). Ambas líneas celulares se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%. Para cultivar de manera normal, se dividieron ambas líneas celulares usando 1 x tripsina-EDTA en una proporción de 1:20 para HT1080-L y de 1:5 para las células RCC45ConALuc cada 3-4 días (cuando las células tenían una confluencia del 80-90%).
- 15 3. Un día antes del experimento, se trataron las células con tripsina durante aproximadamente 5 minutos en una solución de 1 x tripsina/EDTA en una incubadora a 37 °C y se sembraron en placas de 96 pocillos. Se sembraron células HT1080-L a una densidad de 1 x 10<sup>4</sup>/ pocillo en medio DMEM estándar en un volumen de 50 µl. Se sembraron RCC45ConALuc a una densidad de 2 x 10<sup>4</sup>/pocillo en el volumen de 50 ul en medio RPMI estándar.
- 20 4. Al día siguiente, se prepararon diversos compuestos de carbazol mediante la dilución de las soluciones madre en medio DMEM estándar de tal manera que las células se trataron con las concentraciones químicas finales de la Tabla 1 que se presenta a continuación. Las soluciones madre se prepararon en DMSO. Típicamente, los productos químicos se prepararon como soluciones madre 20 mM. Sin embargo, esta concentración depende de la solubilidad de un compuesto dado y, por lo tanto, las concentraciones patrón reales se anotaron en el momento del experimento (por ejemplo, los compuestos menos solubles pueden tener una concentración patrón de 5 o 10 mM)
- 25 5. Cada compuesto de ensayo usó dos filas de una placa de 96 pocillos, por lo tanto, se analizaron cuatro compuestos (por ejemplo, W, X, Y, Z) simultáneamente en una placa. Además de los compuestos de ensayo, cada placa incluyó controles positivos y negativos. Como control positivo, se usó 9aa a una dosis de 3 µM. Como control negativo, se usó DMSO a una concentración final del 0,1%.
- 30

**Tabla 1. Esquema de una placa experimental con concentraciones finales de productos químicos**

	Control negativo	Control positivo	Compuestos del banco (Comp. W, X, Y, X) (uM)									
			0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. W	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. W	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. X	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. X	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. Y	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. Y	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. Z	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Comp. Z	DMSO	9aa 3 uM	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10	20

1. Las diluciones de los productos químicos añadidos a la placa se prepararon en forma de concentraciones dobles en DMEM estándar y se añadieron al pocillo correspondiente en un volumen de 50 µl.
- 35 2. Se diluyeron los productos químicos en DMEM estándar en diluciones en serie del doble a partir de 40 µM (2

x la concentración más alta, por ejemplo, 20  $\mu\text{M}$ ). Para una línea celular, el volumen mínimo fue de 125  $\mu\text{l}$  de 2 x solución de trabajo de producto químico de cada concentración en DMEM estándar.

5 3. Además de un control positivo añadido a una concentración en cada placa, se añadió un control positivo de Compuesto 100, o el compuesto más activo en cada etapa de la detección, a cada serie del ensayo en un intervalo de concentraciones completo para garantizar el rendimiento del ensayo adecuado y constante (estimado mediante la comparación de las curvas de dosis-respuesta de la activación de p53 entre las series).

10 4. Dieciséis horas después de la adición del compuesto, se comprueba microscópicamente la presencia de un efecto tóxico en todos los pocillos con las concentraciones de compuestos más altas, ya que la muerte de las células causada por los compuestos puede no permitir la detección de actividad de la luciferasa. Cuando citotoxicidad resultó ser evidente, se verificó la presencia de toxicidad en otras dosis de los mismos compuestos. Se registró la dosis más baja causante de efecto tóxico. En caso de observarse citotoxicidad en las 3-4 dosis más bajas de los compuestos (en una pauta de dosificación actual a 0,3  $\mu\text{M}$  e inferior), se volvió a analizar el compuesto por separado en un intervalo de concentraciones más bajas, permitiendo al menos 4 dosis diferentes del doble del compuesto a analizar sin signos de citotoxicidad).

15 5. Tras el examen microscópico, se añadieron 15  $\mu\text{l}$  de sistema de ensayo de luciferasa Bright Glo a cada pocillo y después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se leyeron las placas en un luminómetro de placas de 96 pocillos con un tiempo de medición de 0,1 segundos. Se incluyó una etapa de agitación antes de la medición.

20 6. Se calcularon la veces de activación de la luciferasa para cada concentración de cada producto químico dividiendo la actividad de la luciferasa detectada a cada concentración de producto químico entre el promedio de la actividad de la luciferasa para el control de DMSO en la misma placa. A continuación, se representaron gráficamente las veces frente a la concentración química para determinar si los compuestos eran activos. A partir de los datos, se determinaron tanto la máxima activación como la Emax (concentración que produce la activación de p53 máxima).

25 7. Para cada compuesto, se repitió este ensayo dos veces más. Una vez completadas tres series, se usaron los datos brutos para calcular el valor de  $\text{CE}_{50}$ .

Se consideró no válido el análisis cuando:

una diferencia entre dos duplicados aumenta un 10% durante más del 10% de las lecturas;

se observa la muerte de las células tratadas con DMSO;

30 inducción de luciferasa menor del triple en las células tratadas con el control positivo (Compuesto 3a, 0,4  $\mu\text{M}$ ) frente a la actividad de la luciferasa de las células tratadas con DMSO;

incapacidad para obtenerse la curva dependiente de la dosis de la inducción de la luciferasa con el control positivo (por ejemplo, Compuesto 100, 0,03-20  $\mu\text{M}$ ).

35 Los siguientes son ejemplos no restrictivos de los valores de  $\text{CE}_{50}$  para diversos compuestos de carbazol útiles en el procedimiento de la presente invención:

Compuesto	Valor de $\text{CE}_{50}$ (activación de p53, $\mu\text{M}$ )
Compuesto 100	1,30
Ejemplo 21	0,83
Ejemplo 22	0,53
Compuesto 3a	0,29
Compuesto 3b	0,49
Compuesto 7d	0,64
Ejemplo 23	0,88
Ejemplo 24	0,78
Ejemplo 25	0,88
Ejemplo 2	0,64

(Continuación)

Compuesto	Valor de CE <sub>50</sub> (activación de p53, mM)
Ejemplo 27	0,54
Ejemplo 15	0,03
Compuesto 19a	0,40
Compuesto 3e	0,78
Ejemplo 7	0,37
Ejemplo 4	0,07
Compuesto 18c-1	0,08
Compuesto 18c-2	0,10
Compuesto 19e	0,07
Ejemplo 13	0,22
Ejemplo 14	0,05
Ejemplo 6	0,24
Ejemplo 17	0,04
Ejemplo 18	0,09
Ejemplo 38	0,12

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquellos en los que el ingrediente activo se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para lograr su objetivo previsto. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de uno de los presentes compuestos de carbazol que consigue lograr el efecto deseado. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos de carbazol se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se expresa como la proporción entre DL<sub>50</sub> y DE<sub>50</sub>. Los compuestos que muestran altos índices terapéuticos son los preferidos. Los datos obtenidos a partir de dichos datos se pueden usar para formular un intervalo de dosis para un uso en seres humanos. La dosis se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones de compuesto que incluye la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz es competencia de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada que se proporciona en la presente memoria.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de carbazol de fórmula estructural (I) o (II) requerido para su uso en terapia varía con la naturaleza de la afección que se esté tratando, la duración de la actividad que se desea, y la edad y el estado del paciente, y en última instancia, es determinada por el médico asistente. Las cantidades de dosis y los intervalos se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del compuesto de carbazol que sean suficientes para mantener los efectos terapéuticos deseados. La dosis deseada se puede administrar convenientemente en una sola dosis o en múltiples dosis administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como una, dos, tres, cuatro o más subdosis al día. A menudo, se desean o son necesarias múltiples dosis. Por ejemplo, el presente compuesto de carbazol se puede administrar con una frecuencia de: cuatro dosis administradas como una dosis al día en intervalos de cuatro días (q4d x 4); cuatro dosis administradas como una dosis al día en intervalos de tres días (q3d x 4); una dosis administrada al día en intervalos de cinco días (qd x 5); una dosis a la semana durante tres semanas (qwk3); cinco dosis diarias, con dos días de descanso y otras cinco dosis diarias (5/2/5); o cualquier pauta de dosificación determinada como apropiada para las circunstancias.

La dosis de una composición que contiene un compuesto de carbazol de fórmula estructural (I) o (II), o una composición que contiene el mismo, puede ser de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. La dosis de una composición puede ser cualquier dosis incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente

- 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La dosis de una composición puede ser cualquier dosis incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 175  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 225  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 275  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 325  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 350  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 375  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 425  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 475  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 525  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 550  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 575  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 625  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 650  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 675  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 725  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 775  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 825  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 850  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 875  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 925  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 950  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 975  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg o 200 mg/kg. Las dosis anteriores son ejemplos del caso medio, pero puede haber casos individuales en los que se empleen dosis más altas o más bajas, y dichas dosis están dentro del alcance de la presente invención.
- 5
- 10 Cuando se administra en combinación con otros agentes terapéuticos, el presente compuesto de carbazol se puede administrar en dosis relativamente bajas. Además, el uso de agentes de direccionamiento puede permitir que la dosis necesaria sea relativamente baja. Ciertos compuestos se pueden administrar a dosis relativamente altas debido a factores que incluyen, pero sin limitación, baja toxicidad y alta depuración.
- 15 Para el uso humano, un compuesto de fórmula estructural (I) o (II) se puede administrar solo, pero generalmente se administra mezclado con un vehículo farmacéutico seleccionado con respecto a la vía de administración deseada y a la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los compuestos de fórmula (I) o (II) en preparaciones farmacéuticas.
- 20 Los presentes compuestos de carbazol se pueden administrar simultáneamente o metronómicamente con otros tratamientos contra el cáncer tales como quimioterapia y/o radioterapia. El término "simultáneo" o "simultáneamente" significa que el otro tratamiento contra el cáncer y el compuesto de carbazol se administran con una diferencia de 6 horas, 3 horas o menos horas entre sí. El término "metronómicamente" significa la administración de los otros tratamientos contra el cáncer en momentos diferentes de los tratamientos contra el cáncer y a una frecuencia determinada en relación con la administración de repetición y/o el régimen de tratamiento anticancerígeno.
- 25 El compuesto de carbazol o las composiciones que contienen el compuesto de carbazol se pueden administrar de cualquier manera, incluyendo, pero sin limitación oralmente, parenteralmente, sublingualmente, transdérmicamente, rectalmente, transmucosamente, tópicamente, por inhalación, por administración bucal, o combinaciones de las mismas. La administración parenteral incluye, pero sin limitación, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal e intraarticular. El compuesto de carbazol también se puede administrar en forma de un implante que permita una liberación lenta del compuesto, así como una infusión i.v. lenta controlada.
- 30 Los compuestos de carbazol de la presente invención se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades y afecciones. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden usar en combinación con radiación y/o un agente quimioterapéutico en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, los compuestos de carbazol se pueden usar para mejorar el tratamiento de los tumores que habitualmente se tratan con un antimetabolito, por ejemplo, metotrexato o 5-fluorouracilo (5-FU).
- 35 El uso de los compuestos de carbazol de la presente invención puede producir la regresión parcial o completa de las células cancerosas, es decir, la desaparición parcial o completa de dichas células de la población celular. Por ejemplo, se puede usar un procedimiento de la invención para disminuir la velocidad de crecimiento del tumor, disminuir el tamaño o el número de tumores, o para inducir la regresión tumoral parcial o completa.
- 40 El presente compuesto de carbazol se puede usar para tratar una enfermedad o afección *in vivo* mediante la administración a un individuo en necesidad del mismo. La enfermedad o la afección puede ser un cáncer. Se puede tratar una variedad de tipos de cáncer, incluyendo, pero sin limitación: carcinomas, incluyendo de vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer pulmonar de células pequeñas y no pequeñas, y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello del útero, tiroides, renal y de piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkins, linfoma de no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkettts, tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (CCR), cáncer de páncreas, mieloma, leucemia mieloide y linfoblástica, neuroblastoma y glioblastoma.
- 45
- 50
- 55 La transformación inducida por *tax* del VLTH, un agente causante de la leucemia linfoblástica de linfocitos T en personas adultas (ATL), puede compartir las mismas dianas moleculares implicadas en el CCR. Por ejemplo, NF- $\kappa$ B es constitutivamente activa en células de transformadas por *tax*. Al igual que en el CCR, la actividad de p53 se

inhibe a través de la activación de NF- $\kappa$ B en las células transformadas por *tax*, y la inhibición de p53 no implica el secuestro de p300. En base al mecanismo común de la activación de p53, las composiciones también se pueden usar para tratar la leucemia inducida por el VLTH. Independientemente de su estado de p53, la mayoría de los cánceres humanos tienen NF- $\kappa$ B constitutivamente hiperactivada. La composición también es capaz de inhibir NF- $\kappa$ B mediante la reprogramación de los complejos de NF- $\kappa$ B de transactivación en complejos de transrepresión, que se pueden usar para el tratamiento de cualquier tumor, independientemente de su estado de p53. Las composiciones también se pueden usar para el tratamiento de infecciones por el VIH, porque las LTR del VIH son muy dependientes de la actividad de NF- $\kappa$ B.

La composición también se puede usar como una terapia adyuvante para superar la resistencia a fármacos anticancerígenos que puede estar causada por la activación de NF- $\kappa$ B constitutiva. El fármaco anticancerígeno puede ser un agente quimioterapéutico o radiación, como se describe en la presente memoria.

Un procedimiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los presentes compuestos de carbazol en combinación con un agente quimioterapéutico que puede romper el ADN monocatenario o bicatenario, o que puede bloquear la replicación del ADN o la proliferación celular. Alternativamente, un procedimiento de la presente invención comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los presentes compuestos de carbazol en combinación con terapias que incluyen el uso de un anticuerpo, por ejemplo, herceptina, que tiene actividad en la inhibición de la proliferación de las células cancerosas. Por consiguiente, los cánceres, por ejemplo, los cánceres colorrectales, cánceres de cabeza y cuello, cánceres pancreáticos, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres de vejiga, cánceres de vulva, leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas de células renales, cánceres de ovario, tumores cerebrales, osteosarcomas y carcinomas pulmonares son susceptibles al tratamiento mejorado por la administración de uno de los presentes carbazoles en combinación con un agente quimioterapéutico o un anticuerpo.

Los cánceres que se pueden tratar mediante la presente invención también incluyen tumores sólidos, es decir, carcinomas y sarcomas. Los carcinomas incluyen neoplasmas malignos derivados de las células epiteliales que se infiltran en (es decir, invaden) los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. Los adenocarcinomas son carcinomas derivados de tejido glandular o de tejidos que forman estructuras glandulares reconocibles. Otra categoría amplia de cánceres incluye sarcomas, que son tumores cuyas células están incrustadas en una sustancia fibrilar u homogénea, como el tejido conjuntivo embrionario. La presente invención también permite el tratamiento de los cánceres de los sistemas mieloides o linfoides, incluyendo leucemias, linfomas y otros cánceres que normalmente no están presentes en forma de una masa tumoral, pero se distribuyen en los sistemas vasculares o linforreticulares.

Otras formas de cáncer que se pueden tratar mediante los presentes compuestos de carbazol incluyen, por ejemplo, oncología pediátrica y de adultos, crecimiento de malignidades/tumores sólidos, carcinoma de células mixoides y redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas de tejidos blandos humanos, incluyendo sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma de células escamosas, en particular, de cabeza y cuello, carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma oral, malignidades de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica y leucemia de células pilosas, linfomas de derrame (linfomas basados en cavidades corporales), cáncer pulmonar de linfoma tímico (incluyendo carcinoma de células pequeñas, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres de células no pequeñas, cáncer de mama (incluyendo carcinoma de células pequeñas y carcinoma ductal), cánceres gastrointestinales (incluyendo cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal y pólipos asociados con neoplasia colorrectal), cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cánceres urológicos (incluyendo cáncer de vejiga tales como los tumores de vejiga primarios superficiales, carcinoma invasivo de células transicionales de la vejiga y cáncer de vejiga con invasión muscular), cáncer de próstata, tumores malignos del tracto genital femenino (incluyendo carcinoma de ovario, neoplasmas epiteliales peritoneales primarios, carcinoma cervical, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos del folículo ovárico), tumores malignos del tracto genital masculino (incluyendo cáncer testicular y cáncer de pene), cáncer de riñón (incluyendo carcinoma de células renales, cáncer de cerebro (incluyendo tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, gliomas e invasión metastásica de células tumorales en el sistema nervioso central), cánceres de hueso (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos de piel humana y cáncer de células escamosas), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, derrame peritoneal, derrame pleural maligno, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de vesícula biliar, neoplasmas trofoblásticos, hemangiopericitoma y sarcoma de Kaposi. Por consiguiente, es de esperar que la administración de uno de los presentes compuestos de carbazol mejore los regímenes de tratamiento.

Los compuestos de la presente invención también pueden potenciar la eficacia de los fármacos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Los presentes compuestos de carbazol son potentes inhibidores de la respuesta de NF- $\kappa$ B, que implica la supresión de la expresión/secreción de las dianas de NF- $\kappa$ B proinflamatorias tales como TNF, IL-1, IL-6, IL-8 y otras muchas. Por lo tanto, la inhibición de NF- $\kappa$ B por uno de los presentes carbazoles daría lugar a la supresión de las reacciones inflamatorias locales y sistémicas. La quinacrina, que se cree que actúa mediante un mecanismo muy similar al presente carbazol, se usó ampliamente como agente antiinflamatorio para el tratamiento

de enfermedades autoinmunes y de la inflamación crónica.

Los ejemplos de enfermedades que se pueden beneficiar de la terapia de combinación con compuestos adecuados para el procedimiento de la presente invención son artritis reumatoide, soriasis, vitiligo, granulomatosis de Wegener y lupus eritematoso sistémico (LES). El tratamiento de la artritis, la granulomatosis de Wegener y el LES a menudo implica el uso de terapias inmunosupresoras tales como radiación ionizante, metotrexato y ciclofosfamida. Dichos tratamientos normalmente provocan, ya sea directa o indirectamente, daño en el ADN. La inhibición de NF- $\kappa$ B y/o la activación de p53 en las células inmunes ofensivas vuelven las células más sensibles a ser controladas por estos tratamientos estándar. La soriasis y el vitiligo se tratan comúnmente con radiación ultravioleta (UV) en combinación con psoraleno. Los presentes compuestos de carbazol inducen el efecto letal de los UV y del psoraleno, y aumentan el índice terapéutico de este régimen de tratamiento. En general, los compuestos de carbazol útiles en los procedimientos de la presente invención potencian el control de las células de enfermedades inflamatorias en combinación con los fármacos inmunosupresores usados actualmente.

Además de las afecciones anteriores, los compuestos de la presente invención también se pueden usar en procedimientos de tratamiento de afecciones tales como, pero sin limitación, aterosclerosis, restenosis, vasculitis, nefritis, retinopatía, enfermedad renal, trastornos proliferativos de la piel, soriasis, cicatrización queloide, queratosis actínica, síndrome de Stevens-Johnson, artritis reumatoide (AR), artritis crónica juvenil (ACJ) de comienzo sistémico, osteoporosis, lupus eritematoso sistémico, enfermedades hiperproliferativas de los ojos, incluyendo el crecimiento epitelial, vitreorretinopatía proliferativa (VRP), retropatía diabética, enfermedades hemangio-proliferativas, ictiosis y papilomas.

Los carbazoles de la presente invención también muestran actividad antimicrobiana, por ejemplo, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo *Salmonella*; actividad antiprotozoaria; y actividad antiviral.

Como los expertos en la técnica apreciarán, se pueden usar agentes activos o auxiliares adicionales en los procedimientos descritos en la presente memoria. La referencia en la presente memoria al tratamiento también se extiende a la profilaxis, así como al tratamiento de enfermedades o síntomas establecidos.

La presente invención se puede aplicar a poblaciones de células *ex vivo*. Por ejemplo, los presentes compuestos de carbazol se pueden usar *ex vivo* para determinar el régimen óptimo y/o la dosis de la administración del presente compuesto de carbazol para una indicación dada, un tipo de célula, un paciente y otro parámetro. La información obtenida a partir de dicho uso se puede usar con fines experimentales o en el entorno clínico para establecer el protocolo para el tratamiento *in vivo*. Otros usos *ex vivo* para los que se destina la invención son evidentes para los expertos en la técnica.

El presente compuesto de carbazol también se puede administrar en combinación con radiación. Las enfermedades que se pueden tratar con radiación electromagnética incluyen enfermedades neoplásicas, tumores benignos y malignos, y células cancerosas.

La presente invención también contempla el tratamiento de radiación electromagnética de otras enfermedades no enumeradas en la presente memoria. Las realizaciones preferidas de la presente invención emplean la radiación electromagnética de: radiación gamma (de  $10^{-20}$  a  $10^{-13}$  m), radiación de rayos X (de  $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  m), luz ultravioleta (de 10 nm a 400 nm), luz visible (de 400 nm a 700 nm), radiación infrarroja (de 700 nm a 1 mm) y radiación de microondas (de 1 mm a 30 cm).

En la actualidad, muchos protocolos de tratamiento para el cáncer emplean radiosensibilizadores activados por radiación electromagnética, por ejemplo, rayos X. Los ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen, pero sin limitación, los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxurea, cis-platino, y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.

La terapia fotodinámica (TFD) del cáncer emplea luz visible como el activador de la radiación del agente sensibilizador. Los ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen los siguientes, pero sin limitación: derivados de hematoporfirina, PHOTOFRIN®, derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño (SnET2), feorbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc, y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.

Los radiosensibilizadores se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos además de uno de los presentes compuestos de carbazol, incluyendo dichos compuestos, pero sin limitación, compuestos que potencian la incorporación de radiosensibilizadores en las células diana, compuestos que controlan el flujo de agentes terapéuticos, nutrientes y/u oxígeno hacia las células diana, agentes quimioterapéuticos que actúan sobre el tumor con o sin radiación adicional u otros compuestos terapéuticamente eficaces para tratar el cáncer u otra enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar en combinación con radiosensibilizadores incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, oxígeno, carbógeno, transfusiones de glóbulos rojos, perfluorocarbonos (por ejemplo, FLUOSOLW®-DA), 2,3-DPG, BW12C, bloqueadores de canales de calcio, pentoxifilina, compuestos antiangiogénicos, hidralazina y L-BSO.

5 El agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente o compuesto farmacológico que induzca la apoptosis. El agente o compuesto farmacológico puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, un péptido, un polipéptido, un ácido nucleico o un anticuerpo. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y antagonistas de los mismos, productos naturales y sus derivados, radioisótopos, anticuerpos, así como productos naturales, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un compuesto de carbazol de la presente invención se puede administrar con antibióticos tales como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas de nitrógeno tales como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, cis-platino, hidroxiurea, taxol y sus derivados sintéticos y naturales, y similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mixtos tales como adenocarcinoma de la mama, en los que los tumores incluyen células dependientes de gonadotropina y células independientes de gonadotropina, el compuesto se puede administrar en combinación con leuprolida o goserelina (análogos de péptidos sintéticos de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto inhibidor con otra modalidad de tratamiento, por ejemplo, cirugía o radiación, también denominada en la presente memoria "modalidades anti-neoplásicas adyuvantes". Otros agentes quimioterapéuticos útiles en la invención incluyen hormonas y antagonistas de las mismas, radioisótopos, anticuerpos, productos naturales y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos útiles para el procedimiento de la presente invención se enumeran en la siguiente tabla.

TABLA 1

<u>Agentes alquilantes</u>	<u>Productos naturales</u>
<u>Mostazas nitrogenadas</u>	<u>Fármacos antimetabólicos</u>
mecloretamina	
ciclofosfamida	
ifosfamida	<u>-Taxanos</u>
melfalán	paclitaxel
clorambucil	alcaloides de la vinca
Mostaza de uracilo	vinblastina (VLB)
temozolomida	vincristina
	vinorelbina
<u>Nitrosoureas</u>	vindesina
carmustina (BCNU)	Taxotere® (docetaxel)
lomustina (CCNU)	estramustina
semustina (metil-CCNU)	fosfato de estramustina
clormetina	
estreptozocina	<u>Epipodofilotoxinas</u>
<u>Etilenimina/Metil-melamina</u>	etopósido
trietil-melamina (TEM)	tenipósido
trietil-tiofosforamida	
(tiotepa)	<u>Antibióticos</u>
hexametil-melamina (HMM, altretamina)	actimomicina D
<u>Alquilsulfonatos</u>	daunomicina (rubidomicina)
busulfán	doxorubicina (adriamicina)
pipobromán	mitoxantroneidarubicina

(Continuación)

**Alkylating agents**

Triazines

dacarbazina (DTIC)

**Antimetabolitos**

Análogos de ácido fólico

metotrexato

trimetrexato

pemetrexed

(Antifolato multi-dirigido)

Análogos de pirimidina

5-fluorouracilo

fluorodesoxiuridina

gemcitabina

Arabinósido de citosina

(AraC, citarabina)

5-azacitidina

2,2'-difluorodesoxi-citidina

floxuridina

pentostatina

Análogos de purina

6-mercaptapurina

6-tioguanina

azatioprina

2'-desoxicoformicina

(pentostatina)

eritrohidroxinonil-adenina (EHNA)

fosfato de fludarabina

2-clorodesoxiadenosina

(cladribina, 2-CdA)

**Inhibidores de topoisomerasa de tipo I**

camptotecina

topotecán

irinotecán

**Natural products**

bleomicina

esplicamicina (mitramicina)

mitromicina-C

dactinomicina

afidicolina

epirubicina

idarrubicina

daunorrubicina

mitramicina

desoxi co-formicina

Enzimas

L-asparaginasa

L-arginasa

**Radiosensibilizadores**

metronidazol

misonidazol

desmetilmisonidazol

pimonidazol

etanidazol

nimorazol

RSU 1069

E09

RB 6145

Antiandrógenos no esteroideos

SR4233

flutamida

nicotinamida

5-bromodeoxiuridina

5-yododesoxiuridina

bromodesoxicidina

**Miscelanea de agentes**

Complejos de coordinación de platino

(

Continuación)

<b><u>Agentes de alquilación</u></b>	<b><u>Productos naturales</u></b>
<b><u>Modificadores de respuestas biológicas</u></b>	cisplatino carboplatino
G-CSF	oxaliplatino
GM-CSF	antracenediona
<b><u>Agentes de diferenciación</u></b>	mitoxantrona
derivados de ácido retinoico	<b><u>Urea sustituida</u></b>
<b><u>Hormonas y antagonistas</u></b>	hidroxiurea
<b><u>Adrenocorticosteroides/ antagonistas</u></b>	<b><u>Derivados de metilhidrazina</u></b>
prednisona y equivalentes	N-metilhidrazina (MIH)
dexametasona	procarbazina
ainoglutetimida	supresor adrenocortical
	mitotano ( <i>o,p'</i> - DDD)
	ainoglutetimida
<b><u>Progestinas</u></b>	<b><u>Citocinas</u></b>
caprotato de hidroxiprogesterona	interferón ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
acetato de medroxiprogesterona	interleucina-2
acetato de megestrol	<b><u>Fotosensibilizadores</u></b>
	derivados de hematoporfirina
<b><u>Estrógenos</u></b>	FOTOFRIN®
dietilstilbestrol	derivados de benzoporfirina
etinil-estradiol/ equivalente	Npe6
	etioporfirina de estaño (SnET2)
<b><u>Antiestrógeno</u></b>	feoborida-a
tamoxifén	bacterioclorofila
	naftalocianinas
<b><u>Andrógenos</u></b>	ftalocianinas
propionato de testosterona	ftalocianinas de cinc
fluoximesterona/equivalentes	
	<b><u>Radiación</u></b>
<b><u>Antiandrógenos</u></b>	rayos X
flutamida	luz ultravioleta
liberador de gonadotropina	radiación gamma
análogos de hormonas	luz visible
leuprolida	radiación infrarroja
	radiación de microondas

5 Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos que son particularmente útiles en combinación con radiosensibilizadores incluyen, por ejemplo, camptotecina, carboplatino, cis-platino, daunorrubicina, doxorrubicina, interferón (alfa, beta, gamma), irinotecán, hidroxiurea, clorambucilo, 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, 2-cloroadenosina, fludarabina, azacitidina, gemcitabina, pemetrexed, interleucina 2, irinotecán, docetaxel, paclitaxel, topotecán, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida, droloxafina, y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.

10 Los agentes que afectan a los microtúbulos interfieren en la mitosis celular y son bien conocidos en la técnica por su actividad citotóxica. Los agentes que afectan a los microtúbulos útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, alocolicina (NSC 406042), halicondrina B (NSC 609395), colchicinas (NSC 757), derivados de colchicinas (por ejemplo, NSC 33410), dolastatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (NSC 125973), derivados de TAXOL® (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina NSC 361792), tritil-cisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), eptilonas naturales y sintéticas

15 incluyendo, pero sin limitación, eptilona A, eoptilona B y discodermolida (véase Service, (1996) *Science*, 274:2009)

estramustina, nocodazol, MAP4 y similares. Los ejemplos de dichos agentes también se describen en Bulinski (1997) *J. Cell Sci.* 110:3055-3064; Panda (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 94:10560-10564; Muhlradt (1997) *Cancer Res.* 57:3344-3346; Nicolaou (1997) *Nature* 397:268-272; Vasquez (1997) *Mol. Biol. Cell.* 8: 973-985; y Panda (1996) *J. Biol. Chem* 271:29807-29812.

5 Los agentes citostáticos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17- $\alpha$ -etinilestadiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clortrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutarnida, toremifeno, zoladex.

10 Otros agentes citostáticos son antiangiogénicos, tales como inhibidores de metaloproteinasas matriciales y otros inhibidores de VEGF, tales como anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU668. También se pueden utilizar anticuerpos anti-HER2. Un inhibidor de EGFR es EKB-569 (un inhibidor irreversible). También se incluyen el anticuerpo C225 inmunoespecífico para los inhibidores de EGFR e inhibidores de Src.

También es adecuado para su uso como un agente citostático CASODEX® (bicalutamida, Astra Zeneca) que vuelve no proliferativos los carcinomas dependientes de andrógenos. Otro ejemplo más de agente citostático es el antiestrógeno TAMOXIFEN® que inhibe la proliferación o el crecimiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos. Los inhibidores de la transducción de señales proliferativas celulares son agentes citostáticos. Los ejemplos representativos incluyen inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de Her-2, inhibidores de quinasa MEK-1, inhibidores de quinasa MAPK, inhibidores de P13, inhibidores de quinasa Src e inhibidores de PDGF.

Debido a su capacidad única para inducir la apoptosis en las células tumorales, los miembros de la familia de los TNF se consideran posibles fármacos contra el cáncer. Sin embargo, muchas células tumorales escapan del ácido proapoptótico de los ligandos letales, lo que reduce el uso de estos agentes a los cánceres sensibles a ligandos letales y permite que el tumor se escape de la respuesta inmune del huésped. El inhibidor de NF- $\kappa$ B se puede usar para sensibilizar células tumorales a la muerte de un ligando letal tal como un TNF polipeptídico.

El TNF polipeptídico puede ser un miembro de la superfamilia de ligandos de los TNF. Los ejemplos representativos de TNF polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, TNF- $\alpha$ , CD134L/OX40L, CD27L/CD70, FasL/CD95, CD30L, TNF- $\beta$ /LT- $\alpha$ , LT- $\beta$  y TRAIL. Los miembros de la superfamilia de TNF son proteínas naturales que están implicadas en el mantenimiento y la función del sistema inmunológico, y que pueden desencadenar la apoptosis. El TNF polipeptídico puede ser TRAIL, que induce la apoptosis principalmente en el tumor pero no en células normales. La actividad de los denominados "ligandos letales" se cree que está mediada por la unión con los miembros de la familia de receptores de TNF, que contienen dominios de muerte estructuralmente similares en sus porciones intracelulares. La unión de estos receptores, específica de cada ligando letal, desencadena la activación de una cascada de eventos que resulta en la activación de la caspasa. Los ejemplos representativos de receptores TNF-R unidos por los TNF polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, LNGFR/p75, CD40, CD137/4-1BB/IL4, TNFR1/p55/CD120a, TNFR2/p75/CD120b, CD134/OX40/ACT35, CD27, Fas/CD95/APO-1, CD30/Ki-1, LT- $\beta$  R, DR3, DR4, DR5, DcR1/TRID, TR2, GITR y osteoprotegerina.

Se contempla también el uso de otros agentes en lugar del TNF polipeptídico. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo que imita la actividad de un TNF polipeptídico. Los ejemplos representativos de dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo agonista contra FAS, receptor de TRAIL o TNFR. Además, se pueden usar aptámeros y otros ligandos sintéticos capaces de activar los receptores correspondientes.

También es posible diagnosticar si se puede tratar un tumor de un paciente con uno de los presentes compuestos de carbazol. Se obtiene una muestra del tumor del paciente. A continuación, se transducen células del tumor con un sistema indicador de p53, tal como un indicador *LacZ* sensible a p53. Luego se incuban las células transducidas con el compuesto. La producción de una señal mediada por p53 por encima de los controles indica que el tumor se puede tratar con el compuesto de carbazol.

Las Fig. 1a y 1b son gráficas que muestran que los presentes carbazoles inhiben la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en las células tratadas con TNF (Fig. 1a) y una comparación de la concentración activa (valores CE<sub>50</sub>) en la activación de p53 y la inhibición de NF- $\kappa$ B (Fig. 1b).

Los presentes compuestos de carbazol tienen importantes propiedades anticancerígenas *in vitro* (Fig. 2) e *in vivo* (Fig. 3). La Fig. 2 muestra el efecto de diversos compuestos de carbazol en células tumorales que difieren en sus estados de p53 después del tratamiento durante 1 hora con diferentes concentraciones de cuatro de los presentes compuestos de carbazol. Se evaluó la supervivencia celular a las 72 horas mediante tinción con azul de metileno. Por lo tanto, se tiene la teoría, pero no se confía en ella, de que la activación de p53 por los presentes compuestos de carbazol puede no ser la señal inductora de muerte primaria, sino que más bien puede reflejar un tipo de estrés celular causado por la desactivación de NF- $\kappa$ B constitutivamente activa.

Las células tumorales analizadas fueron p53 de adenocarcinoma de colon HCT116 de tipo natural (Fig. 2a), p53 de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 mutante (Fig. 2b), p53 de carcinoma de colon DLD1 de tipo natural (Fig.

2c), p53 de adenocarcinoma de pulmón A549 de tipo natural (Fig. 2d), p53 de carcinoma de células renales Caki1 de tipo natural (Fig. 2e), p53 de adenocarcinoma de colon HT29 mutante (Fig. 2f), eliminación de p53 de adenocarcinoma de pulmón H1299 (Fig. 2g), p53 de adenocarcinoma de mama MCF7 de tipo natural (Fig. 2H), p53 de carcinoma de células renales RCC45 de tipo natural (Fig. 2i), carcinoma de células renales ACHN (Fig. 2j) y fibrosarcoma de pulmón HT1080 (Fig. 2K). La célula tumoral analizada en la Fig. 3 es el modelo de xenoinjerto HCT116 sc.

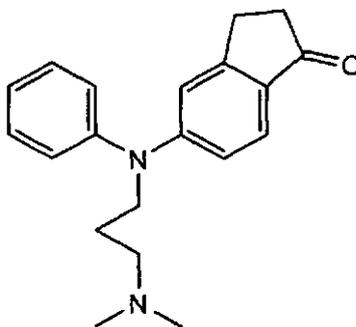
Los presentes compuestos de carbazol analizados no dañaron el ADN (Tabla I). Por lo tanto, se tiene la teoría de que la citotoxicidad de los presentes compuestos de carbazol se debe a un único tipo de estrés de células no genotóxicas que implica la supresión de NF- $\kappa$ B al que las células cancerosas son más sensibles que las células normales. Esto ilustra que los presentes carbazoles son una nueva clase muy eficaz de agentes terapéuticos anticancerígenos.

**Tabla I**

Resumen de los efectos de los presentes compuestos de carbazol y doxorubicina para comparar el ADN y la señalización de respuesta al daño del ADN.

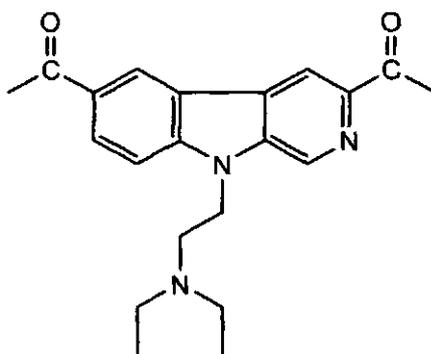
Compuesto	Ubicación celular	Tinción con $\gamma$ H2AX	Activación de ATM/ATR	Fosfo. de Chk1/2	Fosfor. De p53	Inhibición de tipo II		Ensayo de Ames
						en células	<i>in vitro</i>	
<b>Compuesto 100</b>	citoplasmática	no	no	no	S392	no	ligadura	negativa
<b>Compuesto 6h</b>	citoplasmática	no	no	no	S392	ND	ligadura	negación
<b>Ejemplo 3</b>	citoplasmática	no	no	no	ND	ND	ligadura	negativa
<b>doxorubicina</b>	nuclear	sí	sí	sí	S15, 46, 392	sí	relegación	negativa
ND – no determinada								

De acuerdo con una característica importante de la presente invención, una superposición tridimensional (3D) de los conformeros de moléculas de carbazol activas e inactivas reveló características de los compuestos que contribuyen a su actividad. Una característica importante es la planaridad del núcleo de carbazol. Al comparar múltiples alineaciones tridimensionales de los conformeros, se encontró que en todos los compuestos de carbazol activos, la región del núcleo de carbazol era plana (Fig. 4). Los compuestos inactivos pueden ser planos o no planos (Fig. 5). Otros estudios estructurales de los compuestos que tienen distribuciones similares de átomos en la arquitectura molecular confirmaron que la planaridad de la zona del anillo de carbazol es importante en la determinación de la potencia de la activación de p53 por parte del compuesto de carbazol (Fig. 6 y 7). En la Figura 6, se muestra un carbazol activo, es decir, el Ejemplo 2. En la Figura 7, se muestra un carbazol inactivo, es decir, el Compuesto 200. El Compuesto 200 tiene una fórmula estructural:



El hallazgo de que los compuestos de carbazol capaces de activar p53 tienen estructura plana condujo a una hipótesis no utilizada de que el mecanismo de acción de estos compuestos está mediado por la intercalación de ADN. Se plantea la hipótesis de que la correlación entre la potencia de activación de p53 y la estructura plana del núcleo de carbazol refleja una capacidad de intercalar ADN. Para probar esta hipótesis, prácticamente se intercalaron los compuestos de carbazol en la estructura tridimensional de ADN tomada del complejo de p53-ADN (estructura PDB de 1TUP). La intercalación inicial se realizó de la siguiente manera. Se superpuso una molécula de

carbazol activo, es decir, el Compuesto 300, sobre la estructura de ADN de manera que la zona anular plana quedó situada entre y paralela a dos pares de bases de apilamiento. A continuación, se colocó la molécula intercalada contra Arg280 de p53. El residuo Arg280 se considera crucial para la interacción entre p53 y el ADN. Véase M. Kitayner *et al.*, *Molecular Cell*, 22, páginas 741-753, junio de 2006. Dicha superposición de fuerza bruta viola las interacciones de van der Waals entre los átomos de las dos estructuras. Con el uso del paquete informático de mecánica molecular MOLOC, se optimizó el complejo de ADN-análogo de carbazol-p53 terciario para reducir las tensiones de Van der Waals y del ángulo de torsión en la estructura de molécula y ADN combinada. Después de la optimización, se ajustó la posición de la molécula activa en la cavidad del ADN con el plano del anillo paralelo a los pares de bases de ADN de apilamiento. Como resultado de este procedimiento de optimización, los aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) situados en los sustituyentes del anillo de carbazol se colocaron en la ranura principal y la cadena lateral unida al nitrógeno del carbazol se colocaron en el surco menor estrecho. La fórmula estructural para el compuesto 300 es:



Como resultado de este estudio, se creó un fragmento de ADN de doble cadena con una cavidad interior mejor conformada para acomodar los compuestos de carbazol activadores de p53. Con el uso del paquete informático GOLD, se realizó el acoplamiento molecular en una variedad de compuestos de carbazol con actividad de p53 conocida. Se demostró que, como media, las moléculas altamente activas ( $CE_{50}$  de activación de p53  $< 130 \mu\text{M}$ ) se adaptaban mucho mejor a esta cavidad que las moléculas con  $CE_{50} > 130 \mu\text{M}$ . Los conformeros de compuestos de carbazol muy activos se colocan de manera uniforme dentro de la cavidad, mientras que la calidad del ajuste disminuyó entre los compuestos de carbazol que tenían una potencia de activación de p53 débil. La mayoría de las moléculas inactivas se caracterizaron por una calidad muy deficiente de ajuste.

Un posicionamiento adecuado del sustituyente unido al nitrógeno del carbazol en el surco menor del ADN puede ser importante para la consecución de una buena actividad de p53. Simplemente, el ajuste de la cadena lateral al surco menor mejora el ajuste global del compuesto de carbazol. Además, el análisis de votación de átomos de la superposición tridimensional de los compuestos activos de carbazol muestra que un grupo amino cargado positivamente en la cadena lateral es importante para alcanzar la actividad.

Las posiciones de los átomos de HBA (puentes de hidrógeno) en los sustituyentes de carbazol y su identidad son importantes para lograr la actividad de p53. La baja calidad de los átomos de HBA (es decir, del nitrógeno) conduce a una débil actividad del compuesto de carbazol. La ausencia de átomos de HBA en los sustituyentes de carbazol vuelve inactivo un compuesto. Todos los compuestos altamente activos tienen sustituyentes de carbazol no rotados. El acoplamiento de moléculas altamente activas  $CE_{50} < 130 \mu\text{M}$  y activas ( $CE_{50}$  de aproximadamente  $1 \text{ nM}$ ) en la cavidad de ADN demuestra que los sustituyentes de carbazol rotados con buenos átomos de HBA pueden crear puentes de hidrógeno con los átomos de ADN. Por el contrario, los sustituyentes de carbazol no rotados no forman puentes de hidrógeno con el ADN, lo que conduce a su alta actividad.

La actividad antitumoral del Ejemplo 7 (Compuesto 6h) se demostró usando el modelo de tumor singénico de melanoma B16 de la siguiente manera. Se inocularon por vía intradérmica a ratones C57BL/6 en 2 zonas del abdomen  $5 \times 10^4$  células de melanoma B16 murino. El tratamiento comenzó cuando al menos uno de los sitios de la inoculación de los tumores desarrolló un tumor (tamaño medio de aproximadamente  $6 \text{ mm}^3$ ). Los ratones fueron tratados diariamente por sonda oral durante un máximo de 14 días, bien con el vehículo de control de metilcelulosa al 0,5% o con  $30 \text{ mg/kg}$  del Ejemplo 7 ( $n = 5$  ratones/grupo de tratamiento). Las mediciones de los tumores se recogieron con calibradores digitales cada 1-2 días. El efecto del tratamiento en cada tumor se presenta en las Figuras 8a y 8b. A excepción de un ratón del grupo de tratamiento de Ejemplo 7, no se observó ningún efecto sobre el peso total del ratón en ninguno de los grupos de tratamiento (cambios  $< 10\%$ ). En el Día 9, se produjo una disminución de aproximadamente el triple del crecimiento del tumor en el grupo de tratamiento con el Ejemplo 7 en comparación con el grupo de vehículo de control (supresión del crecimiento del 68%).

Para confirmar la actividad antitumoral del Ejemplo 7, se administró el compuesto de carbazol ( $30 \text{ mg/kg}$ ) por vía oral usando el modelo de xenoinjerto HCT116. En este ensayo, se inocularon en ratones atímicos  $5 \times 10^6$  de células tumorales HCT116 en dos zonas. El 90% de los tumores aparecieron entre el séptimo y el décimo primer día de la inoculación. Se comenzaron con los tratamientos orales diarios de  $30 \text{ mg/kg}$  del compuesto del Ejemplo 7 en

metilcelulosa al 0,5% o un vehículo de control de metilcelulosa al 0,5% cuando al menos un tumor por ratón hubo alcanzado un tamaño de 20-25 mm<sup>3</sup>. Los ratones se trataron hasta que los tumores de control alcanzaron 1000 mm<sup>3</sup>. Tras comenzar el tratamiento, se hizo un seguimiento del estado general, de la pérdida de peso y de la supervivencia de los ratones, así como del tamaño de los tumores medidos cada dos días.

5

**Tabla 2: Grupos experimentales**

Grupo	Número de ratones	Línea celular	Tratamiento	Modo de administración	Pauta de dosificación	Medición tumoral; seguimiento
1(control)	10	HCT116	Metilcelulosa al 0,5%	p.o.	Una vez al día D1-D5, D8-D12M D15-D19 cuando los tumores alcanzan un volumen de 20-25 mm <sup>3</sup> ; volumen de 250 ul por cada 25 g de peso del ratón.	Cada dos días una vez que los tumores son visibles; seguimiento diario; peso de los ratones cada dos días.
2	10	HCT116	7,5 mg/kg del Ejemplo 7 en metilcelulosa al 0,5%	p.o.	Una vez al día D1-D5, D8-D12M D15-D19 cuando los tumores alcanzan un volumen de 20-25 mm <sup>3</sup> ; volumen de 250 ul por cada 25 g de peso del ratón.	
D: día						

En este ensayo, el 100% de los ratones del Grupo 2 sobrevivieron al experimento. No se observó pérdida de peso en el grupo 1 tratado con el vehículo de control, mientras que en el grupo 2, tres ratones habían perdido el 15-20% de peso al final del experimento. El peso del resto de los ratones del grupo 2 fluctuó en el intervalo del 95-105% del peso original. No se observó ningún otro signo anormal en el aspecto, en la actividad o en la conducta de los ratones del grupo 2.

En el grupo de control 1, los tumores HCT116 crecieron de manera exponencial, como se esperaba, con una desviación normal entre los tumores de crecimiento más rápido y más lento. En el grupo 2 tratado con el Ejemplo 7, se retrasó el crecimiento de todos los tumores en comparación con el grupo tratado con el vehículo de control. Al décimo cuarto día de comenzar el tratamiento, ninguno de los tumores tratados alcanzó el tamaño del tumor de control de crecimiento más lento (530 mm<sup>3</sup>). En el crecimiento medio de los tumores, el tratamiento con el Ejemplo 7 suprimió el crecimiento tumoral por un factor de aproximadamente 3,5 (73% de inhibición) en comparación con el grupo 1 tratado con vehículo de control. Es importante destacar que uno de los tumores tratados se curó por completo y que, en la autopsia, sólo se encontró una mínima formación de tejido conjuntivo en la zona del tumor. El tamaño de varios tumores tratados no sólo aumentó más lentamente que los tumores de control, sino que disminuyó, lo que indica la muerte de células tumorales y la destrucción del tumor como resultado del tratamiento con el compuesto del Ejemplo 7. Este resultado se observó durante los primeros 3-5 días de tratamiento, después los tumores tratados siguieron creciendo lentamente.

Este experimento muestra que el compuesto del Ejemplo 7 tiene un efecto supresor del crecimiento de tumores de xenoinjertos subcutáneos HCT116 en ratones atímicos. El valor de supresión del crecimiento es del 73%, que se considera según los estándares del NCI como una actividad anticancerígena significativa (> 42%). Los resultados anteriores se ilustran en las Figuras 3 y 8-10.

La Figura 3 es una curva del crecimiento tumoral medio que muestra el tratamiento de tumor de xenoinjerto de carcinoma de colon HCT116 con el compuesto del Ejemplo 7 y un control (MC). Los tumores tratados con el compuesto del Ejemplo 7 presentan un volumen del tumor sustancialmente reducido. Las barras de la gráfica del volumen del tumor frente a los días de tratamiento representan la desviación estándar. La Fig. 8 contiene gráficas que muestran el crecimiento de cada tumor en ratones tratados con el vehículo de control (Fig. 8a) y con el compuesto del Ejemplo 7 (Fig. 8b).

La Fig. 9 muestra el crecimiento de tumores individuales, de hasta 100 mm<sup>3</sup>, en los ratones tratados con el compuesto del Ejemplo 7. La Figura 10 muestra que el tamaño del tumor disminuyó durante los primeros días de tratamiento y los tumores que se curaron.

La Fig. 11 muestra un compuesto de carbazol, es decir, el Compuesto 100, que activa a p53 en el ensayo descrito anteriormente que presenta una actividad anticancerígena significativa contra una amplia variedad de células de cáncer analizadas. Se sembró cada una de las líneas celulares presentadas en la Figura 11 en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se trataron las células con un intervalo de concentraciones del Compuesto 100. El tratamiento se produjo durante 24 horas, momento en el cual se reemplazó el medio lleno de compuesto por el medio libre de compuesto y se dejaron crecer las células hasta que los pocillos de control, que se habían tratado solo con el vehículo de control (DMSO), alcanzaron una monocapa (típicamente en el plazo de 48 horas). Entonces, se fijaron y tiñeron las células con azul de metileno al 0,5% en metanol al 50%. Se eluyó el colorante con SDS al 1% y se midió la absorbancia a 650 nm. Los datos se presentan como la absorbancia a 650 nm frente a la concentración del Compuesto 100.

Los compuestos de los Ejemplos 7, 15 y 13 mostraron una potente actividad anticancerígena. En un ensayo de eficacia con el uso de estos tres compuestos, se inoculó por vía subcutánea en ratones atímicos una suspensión de células de carcinoma de células renales humanas Caki1 en ambos flancos traseros. El tratamiento comenzó cuando al menos el tumor de un ratón alcanzó 20-50 mm<sup>3</sup>. Se trataron los ratones por vía oral con sonda bien con 30 mg/kg del Ejemplo 7, 5 mg/kg del Ejemplo 15 o 25 mg/kg del Ejemplo 13 formulado en hidroximetilcelulosa al 0,2%. Como control positivo, un grupo se trató con 40 mg/kg de Sunitinib, un fármaco aprobado para el tratamiento del carcinoma de células renales. El tratamiento se administró durante 4 semanas en una pauta de dosificación de 5 días de administración/2 días de descanso. Una vez completado el tratamiento, se hizo un seguimiento de los ratones durante un período adicional de 4 semanas para determinar la velocidad de crecimiento del tumor en volver a la normalidad. Los tres compuestos provocaron una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con el vehículo de control (Día 24 (final del tratamiento) Ejemplo 7: 73% de inhibición, Ejemplo 15: 50% de inhibición, Ejemplo 13: 62% de inhibición). Este efecto antitumoral de los Ejemplos 7 y 13 y, en menor medida, del Ejemplo 15 fue sustancialmente mayor que el del control de Sunitinib (42%). Curiosamente, la interrupción del tratamiento con cualquiera de los presentes compuestos no condujo a un nuevo crecimiento rápido del tumor. Al contrario, la finalización del tratamiento con Sunitinib produjo el crecimiento inmediato del tumor, de manera que el día 40, no había una diferencia significativa en el volumen tumoral observado entre los grupos tratados con Sunitinib y los de vehículo de control.

En resumen, los tres carbazoles provocaron la inhibición del crecimiento tumoral que persistió incluso después de finalizar el tratamiento. La magnitud de la potencia del Ejemplo 7 es superior o igual a la del Ejemplo 13, que es superior a la del Ejemplo 15. El tratamiento con el Ejemplo 7 no causó efectos secundarios aparentes en comparación con los Ejemplos 13 y 15. Los efectos secundarios más graves se observaron con el Ejemplo 13, en el que dos ratones tuvieron que ser retirados del tratamiento durante un periodo breve de tiempo y un ratón se retiró de forma permanente debido a la pérdida de peso que condujo a la eutanasia prematura. Así pues, el Ejemplo 7 pareció ser el carbazol más "seguro" en este ensayo. Como el Ejemplo 15 solo causó un 10-15% de pérdida de peso que duró poco tiempo, este compuesto fue el segundo más seguro en este segundo modelo de tumor. Basándose en los resultados, el Ejemplo 7 es un compuesto preferido con una potente actividad antitumoral (70-80% de inhibición) en ausencia de efectos secundarios.

En otro ensayo, se evaluaron la actividad antitumoral y la toxicidad de los Ejemplos 7, 15 y 13, a la dosis máxima tolerada (DMT) en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de adenocarcinoma ileocecal humano HCT-8 y en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de adenocarcinoma de colon humano HT-29. También se realizó una comparación de la eficacia antitumoral y la toxicidad de los Ejemplos 7, 15 y 13 a la DMT de un lado a otro frente a los xenoinjertos de colon humanos HCT-8 y HT-29.

Como se muestra anteriormente, los Ejemplos 7, 15 y 13 demostraron una eficacia antitumoral contra varios xenoinjertos tumorales humanos sc en ratones atímicos o SCID (tales como tumores HCT-116, DLDL, Caki1 y MDA-MB-231, con las células tumorales inoculadas en forma de una suspensión de células en los ratones). Se evaluaron la eficacia antitumoral *in vivo* y la toxicidad de estos tres compuestos a su DMT repetitiva contra xenoinjertos HCT-8 (relativamente sensibles a la quimioterapia tales como 5-FU e irinotecán) y HT-29 (relativamente resistentes a la quimioterapia) establecidos en ratones atímicos mediante el trasplante de piezas de aproximadamente 50 mg. En este estudio, se compararon el efecto antitumoral y la toxicidad de los tres carbazoles contra tumores de cáncer de colon HCT-8 y HT29, comenzando el tratamiento cuando el tamaño del tumor hubo alcanzado 150-200 mg (aproximadamente 7 días después del trasplante del tumor).

#### Materiales y procedimientos

**Animales.** Se adquirieron ratones atímicos hembra de ocho a doce semanas de vida (nu/nu, peso corporal de 22-25 g) en Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianápolis, IN) y se mantuvieron en jaulas de cinco ratones/jaula con agua y comida ad libitum de acuerdo con un protocolo para animales aprobado institucionalmente.

**Fármacos.** Los tres compuestos se formularon en hidroxipropilmetilcelulosa al 0,2% a concentraciones de 0,5 mg/ml para el Ejemplo 15, 3 mg/ml para el Ejemplo 7 y 2,5 mg/ml para el Ejemplo 13.

**Tumores.** Se usaron xenoinjertos de adenocarcinoma ileocecal humano HCT-8 y de adenocarcinoma de colon HT-29. Los xenoinjertos se establecieron inicialmente mediante la inyección s.c. de 10<sup>6</sup> células cultivadas y se pasaron

los tumores varias generaciones mediante el trasplante de aproximadamente 50 mg de tumor no necrótico (2-3 piezas) a través de un trocar de los tumores de paso cuando los tumores alcanzaron a 1-1,5 g.

Dosis de fármaco y calendario. Todos los compuestos se administraron por vía oral (p.o.) a la DMT con el Ejemplo 15: 5 mg/kg/día; Ejemplo 7: 30 mg/kg/día y el Ejemplo 13: 25 mg/kg/día, 5 días a la semana durante 4 semanas (5 días/semana x 5) o hasta que el ratón tuvo que ser sacrificado debido a un gran tamaño tumoral. El tratamiento se inició 7 días después del trasplante del tumor cuando los tumores habían alcanzado 150-200 mg. Los ratones del grupo de control recibieron el vehículo (hidroxipropilmetilcelulosa al 0,2%) en 200 µl por cada 20 g de peso corporal del ratón (igual que los grupos de tratamiento). Se usaron cinco ratones por cada grupo experimental con 10 tumores (1 tumor en cada uno de los flancos laterales izquierdo y derecho).

Medición de los tumores. Se midieron dos ejes (mm) de tumor (L, eje más largo; W, eje más corto) con ayuda de un calibrador Vernier. Se calculó el peso del tumor (mg) usando la fórmula: peso del tumor =  $1/2 (L \times W^2)$ . Las medidas de los tumores se tomaron diariamente, al mismo tiempo que el tratamiento farmacológico y 3-4 veces a la semana después de la terapia.

Evaluación de la dosis máxima tolerada (DMT) y de la toxicidad. La DMT se definió como la dosis más alta de fármaco que no causaba letalidad relacionada con el fármaco en ratones con una pérdida de peso menor del 20% del peso corporal original y las toxicidades fueron reversibles. Se determinaron diariamente las cinéticas de las toxicidades inducidas por fármacos (pérdida de peso corporal, diarrea y letalidad) durante los primeros 10 días posteriores al tratamiento y cada dos días a partir de entonces.

Actividad antitumoral. La actividad antitumoral se evaluó mediante la máxima inhibición del crecimiento tumoral (MICT), que es el peso medio del tumor del grupo tratado (PMTGT) en comparación con el grupo de control no tratado (PMTGC) en el mismo punto temporal (MICT =  $(PMTGT - PMTGC) \div PMTGC \times 100\%$ ). El tiempo de duplicación del tumor (TDT) se definió como el tiempo medio para que el tumor alcanzara el doble de su peso inicial. La respuesta tumoral se expresó como la respuesta parcial del tumor (RP) cuando el peso del tumor se redujo al menos un 50% del tamaño inicial del tumor y la respuesta tumoral completa (RC) se definió como la incapacidad para detectar el tumor tras palpar en el sitio inicial de la aparición del tumor.

### Resultados

(a) Actividad antitumoral y toxicidad del Ejemplo 15, 7 y 13 en ratones atímicos portadores de xenoinjertos HCT-8.

Los datos de la siguiente tabla muestran la actividad antitumoral y la toxicidad del vehículo de control, Ejemplo 15, Ejemplo 7 y Ejemplo 13 administrados por vía oral durante 5 días y 2 días de descanso a la semana a ratones atímicos portadores de xenoinjertos HCT-8. Los datos indican que el Ejemplo 13 y 15 tuvieron una actividad antitumoral moderada contra los xenoinjertos HCT-8 con tasas inhibitorias del 35-40% y retardo del crecimiento tumoral del 17% (Ejemplo 13) y del 57% (Ejemplo 15), respectivamente, en comparación con el vehículo de control (doble de tiempo: 4,8 días). Los cuatro ciclos de tratamiento planificados para los Ejemplos 13 y 15 no se completaron debido al gran volumen tumoral que hizo necesario el sacrificio de los ratones. El Ejemplo 7 fue mucho más activo que los Ejemplos 13 y 15 contra los xenoinjertos HCT-8 con una velocidad de inhibición del 65,9% y un retardo de 142% de crecimiento del tumor. El Ejemplo 7 no produjo ninguna RP o RC. En cuanto a la toxicidad, el vehículo produjo una toxicidad leve con el grupo de animales de tumor HCT-8 individual con 5 días de tratamiento y 2 días de descanso a la semana x 2-4 semanas.

### Tabla

Actividad antitumoral y toxicidad del Ejemplo 15, 7 y 13 en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de adenocarcinoma ileocecal HCT-8 humanos

Tratamiento (mg/kg/d)	Actividad antitumoral				Toxicidad (%)	
	MICT (%)	TDT (día)	RP (%)	RC (%)	PMP	letalidad
Vehículo de control	--	48 ± 03	0	0	55 ± 19	0
Ejemplo 15 (5)	40,0 ± 18,6	7,5 ± 3,5	0	0	10,0 ± 3,8	0
Ejemplo 7 (30)	65,9 ± 11,0	11,6 ± 2,5	0	0	12,2 ± 6,8	0
Ejemplo 13 (25)	35,7 ± 20,0	5,6 ± 1,2	0	0	8,5 ± 2,9	0

MICT: máxima inhibición del crecimiento del tumor; TDT: tiempo de duplicación del tumor; RP: respuesta parcial del tumor; RC: respuesta completa del tumor; PMP: pérdida máxima de peso con respecto al peso corporal previo al tratamiento. El grupo de control recibió hidroxipropilmetilcelulosa al 0,2% (vehículo) a 200 µl por cada 20 g de peso corporal del ratón. Se usaron cinco ratones por cada grupo experimental con 10 tumores (en los flancos laterales izquierdo y derecho).

(a) Actividad antitumoral y toxicidad del Ejemplo 15, 7 y 13 en ratones atímicos portadores de xenoinjertos HT-29. Los datos de la siguiente tabla muestran la actividad antitumoral y la toxicidad del vehículo de control, Ejemplo 15, Ejemplo 7 y Ejemplo 13 administrados por vía oral durante 5 días y 2 días de descanso a la semana a ratones atímicos portadores de xenoinjertos HT-29, que son más resistentes a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos en comparación con HCT-8. Los datos indican que los tres compuestos fueron más activos frente a este tumor que frente a HCT-8. Del mismo modo, el Ejemplo 13 fue el compuesto menos activo de los tres, con tasas inhibitoras del 48% y el retardo del crecimiento tumoral del 50% (el tiempo de duplicación del tumor para el control fue de 7,8 días). Aunque el Ejemplo 15 produjo una inhibición similar del crecimiento del tumor (58%), tuvo un menor efecto sobre el retraso del crecimiento tumoral (retraso del 76% frente al 122%) en comparación con el Ejemplo 7. No se produjo RP ni RC mediante los tres agentes. Con respecto a la toxicidad, el Ejemplo 7 y 13 produjeron una menor pérdida de peso corporal. El Ejemplo 7 fue más tóxico en el experimento con HT-29 en comparación con el experimento con HCT-8, con una pérdida de peso del 18% y un 40% de letalidad.

#### Tabla

Actividad antitumoral y toxicidad del Ejemplo 15, 7 y 13 en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de carcinoma de colon HT-29 humanos.

Tratamiento (mg/kg/d)	Actividad antitumoral				Toxicidad (%)	
	MICT (%)	TDT (día)	RP (%)	RC (%)	PMP	letalidad
Vehículo de control	--	7,8 ± 0,8	0	0	5,6 ± 4,2	0
Ejemplo 15 (5)	58,4 ± 6,4	13,1 ± 2,3	0	0	17,9 ± 6,8	40
Ejemplo 7 (30)	58,5 ± 17,4	17,3 ± 4,8	0	0	7,6 ± 5,1	0
Ejemplo 13 (25)	47,6 ± 6,7	11,7 ± 1,2	0	0	4,4 ± 2,2	0

MICT: máxima inhibición del crecimiento del tumor; TDT: tiempo de duplicación del tumor; RP: respuesta parcial del tumor; RC: respuesta completa del tumor; PMP: pérdida máxima de peso con respecto al peso corporal previo al tratamiento. El grupo de control recibió hidroxipropilmetilcelulosa al 0,2% (vehículo) a 200 µl por cada 20 g de peso corporal del ratón. Se usaron cinco ratones por cada grupo experimental con 10 tumores (en los flancos laterales izquierdo y derecho).

#### Conclusión

En conclusión, los ejemplos 15 y 13 muestran una actividad antitumoral moderada, mientras que el Ejemplo 7 tuvo una mejor eficacia antitumoral contra ambos xenoinjertos HCT-8 y HT-29.

El Ejemplo 15 fue más tóxico que los Ejemplos 7 y 15 en el estudio de HT-29.

A diferencia de la respuesta a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, los xenoinjertos HT-29 fueron más sensibles a los tres carbazoles en comparación con la respuesta observada con los xenoinjertos HCT-8.

Los datos muestran que el Ejemplo 7 es un compuesto preferido frente a ambos xenoinjertos HCT-8 y HT-29.

En otro experimento, se demostró la actividad antitumoral del Ejemplo 7 en un modelo murino de neuroblastoma. Los ratones transgénicos *N-myc* (TH-MYCN) portan el oncogén *N-myc* humano bajo el control de un promotor de la tirosina hidroxilasa, que se expresa en células neuroectodérmicas durante el desarrollo temprano, y los ratones desarrollan un equivalente murino del neuroblastoma humano. Estos ratones han demostrado ser un excelente modelo que comparte varias características importantes con la enfermedad humana, incluyendo el sitio del tumor y sus metástasis, la histología del tumor, la tinción positiva para las proteínas marcadoras asociadas con el neuroblastoma, la presencia de sinapsis y gránulos neurosecretorios, las ganancias y pérdidas de los cromosomas en las regiones sinténicas con las observadas en el neuroblastoma humano, y la amplificación del número de copias de *N-myc* específicamente en los tumores que se desarrollan.

La quimioterapia moderna ha mejorado espectacularmente las tasas de supervivencia para muchos tipos de cáncer. Sin embargo, el desarrollo de resistencia multifarmacológica en el ámbito clínico para el neuroblastoma es una de las principales causas de fracaso del tratamiento y salvar la resistencia multifarmacológica tiene un enorme potencial clínico. Los fármacos dirigidos a nuevas vías que previamente no estaban implicadas en el neuroblastoma podrían proporcionar una nueva vía para los protocolos de tratamiento.

Los resultados del ensayo mostraron que el compuesto del Ejemplo 7 tiene una actividad antitumoral notable en este modelo de neuroblastoma, aunque las dosis altas demostraron ser tóxicas en algunos ratones. Los ratones tratados con 30 mg/kg del Ejemplo 7 perdieron peso rápidamente y de forma inesperada (2 g en una noche, en algún caso) y

fueron encontrados muertos con bazos pequeños y signos de deshidratación. Los ratones que sobrevivieron a la terapia estuvieron sin tumor durante un período que se extendió de 15 a 47 días, sin embargo no todos los ratones fueron tratados según la misma pauta de dosificación. Las dosis fueron modificadas según la pérdida de peso. En base a los resultados, el Ejemplo 7 presenta una buena eficacia en el modelo de neuroblastoma TH-MYCN.

5 La quimioterapia moderna ha mejorado espectacularmente las tasas de supervivencia para muchos tipos de cáncer. Sin embargo, el desarrollo de resistencia multifarmacológica en el ámbito clínico para el neuroblastoma es una de las principales causas de fracaso del tratamiento y la resistencia multifarmacológica tiene un enorme potencial clínico. Los fármacos dirigidos a nuevas vías que previamente no estaban implicadas en el neuroblastoma podrían proporcionar una nueva vía para los protocolos de tratamiento.

10 La administración diaria del Ejemplo 7 también evitó la aparición de tumores en un modelo de ratón transgénico MMTV-neu de cancerogénesis mamaria.

15 El cáncer de mama (CM) es un problema de salud grave debido a la alta incidencia de esta enfermedad y al éxito limitado de los tratamientos disponibles. Se sabe que los antecedentes familiares de esta enfermedad junto con varios factores genéticos específicos con alto grado de probabilidad predisponen a los individuos a padecer CM. Por lo tanto, las mujeres de los grupos de alto riesgo de padecer CM, teóricamente, se pueden beneficiar de una terapia preventiva contra el CM. Los presentes compuestos de carbazol pueden modular varias rutas celulares relacionadas con el cáncer en una dirección que conduce a la supresión del crecimiento tumoral. El compuesto del Ejemplo 7 no causa efectos secundarios graves en los ratones cuando se administra a dosis terapéuticas (20-25 mg/kg). El Ejemplo 7 no mostró actividad mutagénica en el ensayo de Ames. En este estudio, se probó el Ejemplo 7 como un agente preventivo para el CM en ratones.

20 Modelo en animales: los ratones hembra MMTV-neu en los antecedentes de la cepa FVB expresan el proto-oncogén Her2 no activado bajo el promotor de MMTV sensible a la estimulación con estrógenos. Los ratones desarrollan tumores mamarios espontáneos a partir de 24 semanas de edad, desarrollando normalmente un 70-80% de los animales tumores a los 10 meses de edad. Los objetivos de este ensayo fueron: (a) comparar la incidencia de los tumores en los ratones tratados con el Ejemplo 7 frente al vehículo de control (agua) y (b) comparar la ganancia de peso y el aspecto general de los ratones tratados con el Ejemplo 7 frente al vehículo de control.

25 Diseño del estudio: se destetaron 40 ratones hembras de los reproductores a los 21 días de vida y se colocaron en jaulas separadas (4 ratones/jaula). En este momento, los ratones se marcaron y se asignaron a grupos de tratamiento o control (20 ratones en cada uno). Se midió el peso corporal en ambos grupos una vez a la semana. A partir de las 4 semanas de vida, se administró a los ratones del grupo de tratamiento agua que contenía el Ejemplo 7. Se calculó el consumo de líquido en los grupos de tratamiento y de control cada día. En base a estas medidas, se calculó el consumo de líquido por gramo de peso de ratón, y se ajustó la concentración del Ejemplo 7 en el agua hasta la dosis terapéutica deseable. Se prepararon semanalmente soluciones del Ejemplo 7. Se hizo un seguimiento de la formación de tumores mediante palpado de las glándulas mamarias de los ratones una vez a la semana. Los ratones fueron sacrificados cuando el tamaño del tumor acumulado hubo alcanzado el volumen de 1000 mm<sup>3</sup>.

Grupo	Número de ratones	Dosis diaria	Modo de administración
1	20	Ninguna (agua)	Bebida diaria
2	20	aproximadamente 25 mg/kg del Ejemplo 7	Bebida diaria

30 Resultados preliminares: los ratones del grupo de tratamiento consumieron el Ejemplo 7 a una velocidad media de 20 mg/kg al día. La variabilidad se debe a la precisión limitada de la administración de los fármacos a través del agua bebida. No se observaron diferencias entre el tratamiento y el grupo de control en la distribución de peso ni anomalías en el aspecto de los animales.

35 En el transcurso del experimento se produjeron varias muertes espontáneas en los grupos de tratamiento y de control. La causa de la muerte no estaba clara, porque los animales no tenían tumores y el examen patológico post-mortem bruto no mostró anomalías obvias. Ninguno de los ratones murió antes que varias semanas después del comienzo de la administración del Ejemplo 7. Durante el ensayo, tres ratones de control murieron aproximadamente con 15, 41 y 42 semanas de vida, respectivamente. Siete ratones murieron en el grupo del Ejemplo 7 a diferentes edades de entre 12 y 45 semanas (de 7 a 41 semanas desde el comienzo del tratamiento experimental).

40 Veituno y 19 ratones alcanzaron la edad de portar el tumor en los grupos de control y de tratamiento, respectivamente. Entre ellos, se desarrolló un tumor en 14 (67%) de los ratones de control y 7 (37%) de los ratones que recibieron el Ejemplo 7.

50 Esta prueba demostró:

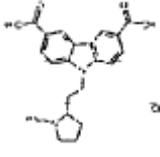
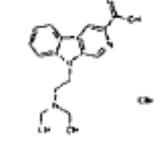
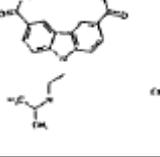
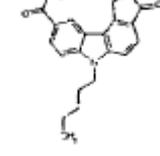
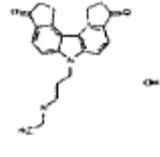
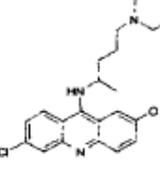
- (a) la administración crónica del Ejemplo 7 con agua potable a aproximadamente 20 mg/kg al día no causó cambios en el peso corporal de los ratones;
- (b) una mayor tasa de mortalidad en el grupo tratado con el Ejemplo 7 frente al grupo de control, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa y no había correlación entre la duración y el periodo de tratamiento y la muerte de los ratones; y
- (c) una tasa más baja de la carga tumoral entre los ratones tratados con el Ejemplo 7 en comparación con los animales de control.

5

10

Los compuestos de carbazol de la presente invención también presentan actividad antiparasitaria. En particular, se analizó el efecto de los compuestos de carbazol en el parásito de la malaria mediante el cultivo de *Plasmodium falciparum* (cepa D10) *in vitro* en presencia o ausencia de compuestos de ensayo. Se seleccionaron compuestos de carbazol activos e inactivos (con respecto a la activación de p53) para la prueba, como era la quinacrina, un agente convencional contra la malaria. La Tabla 3 resume las estructuras de los compuestos, junto con sus valores de CE<sub>50</sub> en el ensayo de activación de p53.

**Tabla 3. Compuestos de ensayo**

Compuesto	Estructura	CE <sub>50</sub> , μM
Ejemplo 2		0,64
Compuesto 400		Inactivo
Ejemplo 7		0,37
Compuesto 500		Inactivo
Ejemplo 18		0,09
Quinacrina (QC)		aproximadamente 5

15

Se analizaron el Ejemplo 2, el Compuesto 400 y el Ejemplo 7 a concentraciones de 29, 57 y 143 nM. El Compuesto 500, el Ejemplo 18 y la quinacrina se analizaron solo a 143 nM.

20

En cada experimento, se evaluaron microscópicamente 1.000 eritrocitos para determinar el número de células infectadas. En los experimentos de control (sin compuestos de ensayo añadidos o PBS añadido), el porcentaje de células infectadas varió entre el 1,6% y 6,4%. Los índices de reducción de la infectividad determinados en el estudio

se muestran en la Fig. 12. La potencia del ensayo de activación de p53 claramente, pero indirectamente, se correlacionó con la inhibición de *Plasmodium falciparum in vitro*. Tres compuestos activos del ensayo de activación de p53 (Ejemplos 2, 7 y 18) demostraron actividad antimalárica comparable a la quinacrina. Los compuestos inactivos del ensayo de activación de p53 (Compuestos 400 y 500) no mostraron una reducción de la parasitemia.

- 5 Los compuestos de los Ejemplos 7, 13 y 15 también mostraron actividad antiprotozoaria. La tripanosomiasis africana humana (TAH) o "enfermedad del sueño" es una de las infecciones tropicales más importantes, pero igualmente más desatendidas. Está causada por un protozoo, *Trypanosoma brucei*, que se transmite a los seres humanos por la picadura de la mosca tsé-tsé (*Glossina* spp). Aunque fue casi eliminada en la década de los 60, la TAH ha reaparecido a una escala epidémica en una serie de zonas sub-saharianas habitadas por la mosca tsé-tsé. Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 500.000 personas portan actualmente los tripanosomas y morirán si no se tratan. La elevada mortalidad asociada con la TAH se debe, al menos en parte, a la falta de fármacos eficaces que se pueden administrar fácilmente.

- 15 Los fármacos usados actualmente para tratar la TAH están anticuados, son tóxicos y difíciles de administrar en el campo. La suramina y la pentamidina, que se usan para tratar la enfermedad en una fase temprana, se deben inyectar en un centro de salud. Sin embargo, el acceso a los centros de salud es poco común en las zonas rurales de África, en las que la enfermedad es endémica. Además, muchos pacientes en la fase temprana no buscan tratamiento porque no saben que están infectados. Esto se debe a la escasa detección de las poblaciones en riesgo, así como a la naturaleza relativamente suave, variable e intermitente, de los síntomas de la TAH en las fases tempranas. Para el momento que surgen los síntomas obvios, los pacientes normalmente ya se encuentran en la fase tardía de la enfermedad. El tratamiento de la fase final de la TAH es especialmente problemático, ya que implica la inyección de melarsoprol, un arsénico que quema literalmente a los pacientes a través de su inyección. Este tratamiento es tan doloroso que muchos pacientes lo rechazan y tienen que ser contenidos físicamente y obligados a recibir la medicación. Además, el melarsoprol tiene importantes efectos secundarios adversos que provocan la muerte del 5-20% de los pacientes tratados. Por estas razones, así como el problema esperado de la resistencia farmacológica, existe la necesidad urgente de crear una fuente de nuevos fármacos oralmente biodisponibles para ocupar el lugar de los anticuados medicamentos actuales.

- 25 Las pruebas han demostrado que los compuestos de los Ejemplos 7, 13 y 15 tienen una actividad notable contra *T. brucei* (baja  $CI_{50}$  nanomolar) *in vitro*. Se realizaron experimentos preliminares de desactivación de *T. brucei in vitro*. El ciclo de vida de *T. brucei* implica una etapa de desarrollo "procíclico" en la mosca tsé-tsé, y una forma de "torrente sanguíneo" en los seres humanos. Todos los estudios se realizaron con la etapa de torrente sanguíneo del parásito, porque es la etapa de desarrollo causante de la enfermedad.

- Para evaluar las actividades relativas contra el tripanosoma de los Ejemplos 7, 13 y 15, y para determinar la concentración de cada compuesto que mató el 50% de los parásitos ( $CI_{50}$ ), se expuso *T. brucei* a un intervalo de concentraciones de compuestos. La suramina, un fármaco convencional contra el TAH, se usó como control positivo.

- 35 Se sembró *T. brucei* del torrente sanguíneo ( $3 \times 10^3$  células/ml) en una placa de 24 pocillos (500  $\mu$ l de los medios por pocillo). Se añadieron las concentraciones de los compuestos (0-200 nM para el Ejemplo 7, 0-20 nM para el Ejemplo 13 y 0-3 nM para el Ejemplo 15) a las células (cultivos por duplicado). Los cultivos control recibieron volúmenes iguales de DMSO. Los tres compuestos de prueba eliminaron completamente a *T. brucei* ya que no se detectaron parásitos después de 48 horas de cultivo en presencia de los fármacos. Los cultivos de control tratados con DMSO (vehículo) contenían parásitos a una densidad de  $3 \times 10^6$ /ml.

- 40 La actividad tripanocida aumentó en el Ejemplo 7 menos que en el Ejemplo 13, que fue menor que el Ejemplo 15, con valores de  $CI_{50}$  de aproximadamente 43 nM aproximadamente, 6-11 nM, y aproximadamente 0,5 nM, respectivamente. La  $CI_{50}$  de la suramina es superior a 300 nM.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son excelentes para el desarrollo como fármacos tripanocidas.

- 45 Se analizó la actividad el compuesto del Ejemplo 15 frente a cepas de diferentes hongos. Se hizo un ensayo de susceptibilidad *in vitro* con el Ejemplo 15 mediante los procedimientos CLSI M27A3 y M38A2 para 31 cepas de hongos clínicos y de laboratorio. En general, las cepas seleccionadas demostraron diferentes patrones de susceptibilidad para los fármacos antifúngicos actuales. Para la evaluación del Ejemplo 15, se analizaron 8 cepas de *Aspergillus* spp., 21 de *Candida* spp., 1 de *Cryptococcus neoformans* y 1 de *Debaryomyces hansenii*.

- 50 Cepas de *Aspergillus* spp.: se usaron ocho cepas de *Aspergillus* spp. durante todo el estudio. También se analizaron seis de *A. fumigatus*, una de *A. flavus* y una de *A. terreus*. El grupo de *A. fumigatus* incluyó dos cepas resistentes al itraconazol (cepas RIT13 y RIT5) (1), una cepa de resistencia cruzada al triazol (MUT10) (2, 3), una cepa de resistencia cruzada a la equinocandina (EMFRS678P) (4) y 2 aislados susceptibles de tipo natural (R21 y ATCC13073). Las cepas "de no *fumigatus*" fueron sensibles a todos los antifúngicos disponibles a excepción del aislado de *A. terreus* (menos susceptible a la anfotericina B de manera natural) (5).

- 55 Cepas de *Candida* spp.: en el estudio, se usaron 20 aislados clínicos de *Candida* spp. y una cepa de control de laboratorio (*C. albicans* SC5314). En la colección se incluyeron:

5 aislados de *C. albicans*, dos cepas de tipo natural (SC5314 y ATCC 36082), un aislado resistente a la equinocandina (M205) (6) y dos aislados clínicos resistentes al fluconazol (3795 y 3184) (7).

3 cepas de *C. krusei*, 1 cepa de control de la ATCC (control de CLSI de ATCC 6258) y 2 cepas clínicas isogénicas (98 y 100). 100 es resistente de forma cruzada a la equinocandina (8, 9).

5 2 cepas de *C. glabrata*, una cepa clínica de tipo natural (3168) y un aislado con resistencia cruzada a la equinocandina (3830) (10).

2 cepas de *C. tropicalis*, una cepa de control de la ATCC (ATCC 750) y una cepa con resistencia cruzada a la equinocandina (T3) (11).

10 2 cepas de *C. dubliniensis*, una cepa de tipo natural (3949) y la otra con efecto paradójico contra la equinocandina (M204).

4 cepas de *Candida* spp. con susceptibilidad a la equinocandina reducida de manera natural (12): 1 de *C. orthopsilosis* (981224), 1 de *C. metapsilosis* (2006-113), *C. parapsilosis* (control de CLSI de ATCC 22019 ) y *C. guilliermondii* (ATCC6260) (13).

15 Otra *Candida* spp. y géneros: 1 de *C. rugosa* (M83), 1 de *C. lipolytica* (M159), *C. lusitanae* (200450), 1 de *Cryptococcus neoformans* (499) y 1 de *Debaryomyces hansenii*.

Pruebas de susceptibilidad: la prueba de susceptibilidad *in vitro* de Ejemplo 15 se realizó usando procedimientos normalizados del CLSI para la levadura (M27A3) (14) y para mohos (M38A2) (15). Las lecturas de la MCI (mínima concentración inhibitoria) se realizaron a las 24 y 48 horas.

Tabla 1: susceptibilidades *in vitro* de cepas fúngicas contra el Ejemplo 15

Cepa	Organismo	Genotipo	Fenotipo	Ejemplo 15	
				MCI* (24 h)	MCI* (48 h)
ATCC 13073	<i>A. fumigatus</i>	tipo natural	Susceptible	2,56	5,13
R21	<i>A. fumigatus</i>	tipo natural	Susceptible	1,28	2,56
MUT10	<i>A. fumigatus</i>	Cyp51Ap G138C	resistencia cruzada al triazol	0,66	1,28
RIT5 <sup>a</sup>	<i>A. fumigatus</i>	AfuMDR3 y AfuMDR4 sobre-expresados constitutivamente	Resistencia al itraconazol	0,66	1,28
RIT13 <sup>a</sup>	<i>A. fumigatus</i>	sobreexpresión de AfuMDR3 y AfuMDR4 inducida por azoles más Cyp51Ap G54E	Resistencia al itraconazol	1,61	1,28
EMFRS678P	<i>A. fumigatus</i>	Fks1pS678P	Resistencia cruzada a la equinocandina	1,28	2,56
AFCLF9128	<i>A. flavus</i>	tipo natural	Susceptible	0,33	0,33
At123	<i>A. terreus</i>	tipo natural	Resistencia a AMB intrínseca	0,08	1,28
SC5314	<i>C. albicans</i>	tipo natural	Susceptible	0,04	0,08
ATCC36082	<i>C. albicans</i>	tipo natural	Susceptible	0,04	0,04
M205	<i>C. albicans</i>	Fks1pS645P	Resistencia cruzada a la equinocandina	0,16	0,33
3795	<i>C. albicans</i>	Erg11p F136L/K134R	Resistencia al fluconazol	0,16	0,16

(Continuación)

Cepa	Organismo	Genotipo	Fenotipo	Ejemplo 15	
				MCI* (24 h)	MCI* (48 h)
3184	<i>C. albicans</i>	sobreexpresión de CDR1	Resistencia al fluconazol	0,33	0,66
3168	<i>C. glabrata</i>	tipo natural	Susceptible	0,16	0,16
3830	<i>C. glabrata</i>	Fks2pS663P	Resistencia cruzada a la equinocandina	0,16	0,16
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	tipo natural	Susceptible (resistencia al fluconazol de manera natural)	0,33	0,66
98 <sup>b</sup>	<i>C. krusei</i>	tipo natural	Susceptible (resistencia al fluconazol de manera natural)	0,33	0,33
100 <sup>b</sup>	<i>C. krusei</i>	Fks1pF655F/C	Resistencia cruzada a la equinocandina	0,33	0,33
ATCC750	<i>C. tropicalis</i>	tipo natural	Susceptible	0,08	0,16
T3	<i>C. tropicalis</i>	Fks1pS645S/P <sup>a</sup>	Resistencia cruzada a la equinocandina	0,04	0,04
3949	<i>C. dubliniensis</i>	tipo natural	Susceptible	0,16	0,16
204	<i>C. dubliniensis</i>	tipo natural	Efecto paradójico contra la equinocandina	0,16	0,16
M159	<i>C. lipolytica</i>	tipo natural	Susceptible	0,02	0,08
M83	<i>C. rugosa</i>	tipo natural	Susceptible	0,16	0,66
200450	<i>C. lusitaniae</i>	tipo natural	Susceptible	0,04	0,16
ATCC6260	<i>C. guilliermondii</i>	tipo natural	Susceptibilidad reducida cruzada a la equinocandina	0,08	0,16
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	tipo natural	Susceptibilidad reducida cruzada a la equinocandina	0,08	0,08
981224	<i>C. orthopsilosis</i>	tipo natural	Susceptibilidad reducida cruzada a la equinocandina	0,16	0,16
2006-113	<i>C. metapsilosis</i>	tipo natural	Susceptibilidad reducida cruzada a la equinocandina	0,16	0,16
20124	<i>Debaryomyces hansenii</i>	tipo natural	Susceptible	0,16	0,16
499	<i>Cryptococcus neoformans</i>	tipo natural	Susceptible	0,02	0,08

\*Media geométrica de dos repeticiones en  $\mu\text{M}$ .

<sup>a</sup>número de aminoácido correspondiente al equivalente de *C. albicans*.

Susceptibilidades al Ejemplo 15 de *Aspergillus* spp.: las cepas de *A. flavus* y *A. terreus* son más sensibles al Ejemplo 15 que las cepas de *A. fumigatus* (24 h, MCI, medias geom. 0,40 y 1,59  $\mu$ M, respectivamente). Por otra parte, no hubo diferencias en la MCI entre las cepas resistentes al azol y a la equinocandina y las susceptibles (Tabla 1).

- 5 Susceptibilidades al Ejemplo 15 de levaduras: no hubo diferencias en las MCI del Ejemplo 15 entre los aislados resistentes o susceptibles al azol o a la equinocandina. Como media, las MCI de las levaduras fueron 8 veces inferiores a la MCI de *Aspergillus* spp. (Tabla 1). Las MCI obtenidas para el Ejemplo 15 son compatibles o mejores que las MCI para los fármacos antifúngicos convencionales. Las cepas resistentes al azol y a la equinocandina son sensibles para el Ejemplo 15.
- 10 Efecto del Ejemplo 15 en la viabilidad de *Aspergillus fumigatus*: se evaluó la actividad antifúngica del Ejemplo 15 en la cepa Af293 de *A. fumigatus* usando el ensayo de viabilidad con XTT. Se eligió esta cepa porque es una de las cepas mejor caracterizadas y fue la cepa usada para la secuenciación del genoma de *A. fumigatus*. El ensayo de viabilidad con XTT se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (XTT) en presencia de menadiona como un agente de acoplamiento de electrones. Existe una relación entre el número de hongos viables y la cantidad de reducción de XTT (16).

#### Procedimientos

Se usaron los mismos procedimientos descritos anteriormente en la realización del ensayo de XTT (17). Se sembraron conidios de Af293 en tubos con BHI inclinados de Sabouraud con cloranfenicol y gentamicina (Becton Dickinson, MD), se incubaron durante 7 a 10 días a temperatura ambiente y se recogieron mediante lavado del tubo inclinado con 10 ml de Tween 20 al 0,05% en solución salina normal (SN). A continuación, se pasó la suspensión de conidios a través de un filtro de 100  $\mu$ m, se contaron en un hemocitómetro y se diluyeron hasta  $2,0 \times 10^6$  UFC/ml. Luego se diluyeron los conidios 1:50 en RPMI tamponado con MOPS (ácido morfolinpropanosulfónico) (pH 7,0). Se usó una solución madre del Ejemplo 15 disuelta en DMSO. Se diluyó el Ejemplo 15 se diluyó en RPMI tamponado con MOPS (pH 7,0) (concentración final de DMSO: 2% antes de la adición a las suspensiones de hongos). Después de la adición del medio que contenía fármaco a cada pocillo, se añadió la suspensión de conidios (100  $\mu$ l) (t = 0 h). Los pocillos de control contenían conidios, medio y vehículo sin fármaco. Los pocillos de blanco consistían en medio solo sin conidios. Un experimento inicial usando un intervalo amplio de concentraciones del Ejemplo 15 sin hongo añadido demostró que el reactivo del Ejemplo 15 no afectó a la densidad óptica en el ensayo de XTT. Se incubaron las placas a 37 °C, y se llevó a cabo el ensayo de XTT a las 24 h esencialmente como se ha descrito previamente (16), pero con una ligera adaptación. Se disolvió una solución madre de XTT (Sigma Chemical, St. Louis, MO) en SN (1 mg/ml). Se preparó una solución 10 mM del agente de acoplamiento de electrones menadiona (Sigma Chemical) en acetona y después se diluyó 1:10 en SM. Se preparó una solución de trabajo que consistía en 4,0 ml de XTT y 0,5 ml de menadiona inmediatamente antes de su uso. Se añadieron cincuenta microlitros de la solución de combinación a cada pocillo, y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C. Se transfirieron cien microlitros de sobrenadante a una placa nueva, y se determinó la densidad óptica a 450 nm ( $DO_{450}$ ) usando un lector de placas Labsystems Multiskan Plus. Las concentraciones finales de XTT y menadiona en cada pocillo eran 200  $\mu$ g/ml y 25  $\mu$ M, respectivamente.

El Ejemplo 15 tuvo actividad antifúngica contra Af293. La CI<sub>50</sub> fue de aproximadamente 2,5  $\mu$ M. La supresión completa del crecimiento fúngico se produjo a concentraciones del Ejemplo 15 superiores a 12,5  $\mu$ M, basándose en la inspección visual de los pocillos.

1. A. M. Nascimento, *et al.*, 2003, 47:1719-26.
2. G. Garcia-Effron, *et al.*, 2008, *J Clin Microbiol*, 46:1200-6.
3. S. J. Howard, *et al.*, 2006, *Int. J Antimicrob Agents*, 28:450-3.
4. E. M. Rocha, *et al.*, 2007, *Antimicrob Agents Chemother*, 51:4174-6.
- 45 5. W. J. Steinbach, *et al.*, 2004, *Clin Infect Dis.*, 39: 192-8.
6. G. S. Garcia-Effron, *et al. Antimicrob Agents Chemother*.
7. S. Perea, *et al.*, 2001, *Antimicrob Agents Chemother*, 45:2676-84.
8. M. Hakki, *et al.*, 2006, *Antimicrob Agents Chemother*, 50:2522-4.
9. J. N. Kahn, *et al.*, 2007, *Antimicrob Agents Chemother*, 5(1:1)876-8.
- 50 10. J. D. Cleary, *et al.* 2008, *Antimicrob Agents Chemother*, 52:2263-5.
11. G. Garcia-Effron, *et al.* 2008, *Antimicrob Agents Chemother*, 52:4181-3.
12. G. Garcia-Effron, *et al.* 2008, *Antimicrob Agents Chemother*, 52:2305-12.

13. D. S. Perlin, 2007, *Drug Resist Update*, 10:121-30.  
 14. Clinical Laboratory Standard Institute, C.L.S.I., 2008, III ed., 28 (14).  
 15. Clinical Laboratory Standard Institute, C.L.S.I., 2008, II ed., 28(16).  
 16. J. Meletiadis, *et al.*, 2001, *J Clin Microbiol*, 39:3402-8.

- 5 17. Y. F. Brun *et al.*, 2007, *Antimicrob Agents Chemother*, 51(5):1804-12.

El compuesto de carbazol de la presente invención también presenta actividad antibacteriana. En particular, se determinó el efecto de los compuestos de carbazol de la presente invención en bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*) y Gram negativas (DH5- $\alpha$ ) mediante el siguiente procedimiento, y se resume en las Figuras 13a y 13b.

Ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de los compuestos de carbazol en bacterias Gram (-) y Gram (+).

10 **Equipo**

Lector de placas de 96 pocillos (por ejemplo, Multiscan, LabSystems, Inc)

Pipeta multicanal de intervalo 50-300  $\mu$ l

Filtros

Placas de 96 pocillos (Coming Costar Cat. N° 3598)

- 15 Placas petri de 100 mm

Asas de siembra estériles de 1  $\mu$ l (Fisher 22-170-209)

Tubos de fondo redondo con tapa a presión de 14 ml (Falcon 352059)

**Materiales**

DHS- $\alpha$  (bacterias Gram (-) de *E. coli*)

- 20 *Bacillus subtilis* (bacterias gram (+))

Agar LB de Difco (BD 244510 para DHS- $\alpha$ )

Caldo LB de Difco (BD 244610 para DHS- $\alpha$ )

Caldo de nutrientes de Difco (BD 233000 para DHS- $\alpha$ )

Agar de nutrientes de Difco (BD 212000 para *B. subtilis*)

- 25 **Procedimiento**

**Preparación de reactivos**

- 30 Para preparar las placas para el cultivo de DH5- $\alpha$ , se combinan 40 g de agar LB de Difco por cada litro de agua MilliQ. Autoclave en la configuración de líquidos. Cuando el recipiente que contiene la solución está frío, se vierte en placas petri de 100 mm y se dejan ligeramente destapadas para evitar la acumulación de humedad en forma de geles de agar. Se estallan las burbujas que se forman antes de la sedimentación del agar. Se conserva a 4 °C.

Para preparar el medio para el cultivo de DH 5- $\alpha$ , se combinan 25 g de caldo LB de Difco por cada litro de agua MilliQ. Autoclave en la configuración de líquidos para esterilizar.

- 35 Para preparar las placas para el cultivo *B. subtiles*, se combinan 23 g de agar de nutrientes de Difco por cada litro de agua MilliQ. Autoclave en la configuración de líquidos. Cuando el recipiente que contiene la solución está frío, se vierte en placas petri de 100 mm y se dejan ligeramente destapadas para evitar la acumulación de humedad en forma de geles de agar. Se estallan las burbujas que se forman antes de la sedimentación del agar. Se almacenan a 4 °C.

Para preparar el medio para el cultivo de *B. subtiles*, se combinan 8 g de caldo de nutrientes de Difco por cada litro de agua MilliQ. Autoclave en la configuración de líquidos para esterilizar.

- 40 **Preparación de las bacterias**

Dos días antes del inicio del ensayo de citotoxicidad, se inoculan DH5- $\alpha$  y *B. subtilis* en 1 ml de medios correspondientes de soluciones madre de glicerina. Se dejan crecer durante un día a 37 °C con agitación.

Se mueve rápidamente cada bacteria en las placas de agar apropiadas usando un asa de siembra estéril y se deja crecer durante la noche a 37 °C en la incubadora de bacterias.

5 Con el uso de un asa de siembra estéril, se recoge una sola colonia de bacterias y se inoculan 5 ml de los medios correspondientes en un tubo con tapón a presión de 14 ml. Se cultivan durante la noche (~ 16 h) a 37 °C con agitación.

El día siguiente, se mide la DO<sub>600nm</sub> para el cultivo para garantizar que las bacterias están en crecimiento exponencial (DO<sub>600nm</sub> = 0,4-0,8).

**Ensayo de la citotoxicidad (1)**

10 Se diluyen 5 ml de cultivos de DH5-α y *B. subtilis* a una DO<sub>600nm</sub> de 0,002, que corresponde a aproximadamente 2 x 10<sup>6</sup> células/ml en un volumen suficiente para el experimento (en función del número de placas). Se retiran 50 µl en cada pocillo de X placas de 96 pocillos (X = N° de placas necesario para un experimento dado).

Los compuestos se añadirán a la placas en diluciones del triple de 0,005 a 50 µM de acuerdo con la Tabla 2.

15 Los productos químicos para el ensayo se prepararon mediante la dilución de las soluciones madre en caldo LB o caldo nutritivo para los estudios de DH5-α y de *B. subtilis*, respectivamente. Las células se tratan con las concentraciones químicas finales presentadas en el esquema que figura a continuación (Tabla 2). Las soluciones madre se preparan en DMSO. Típicamente, los productos químicos se preparan como soluciones madre 20 mM. Sin embargo, esta concentración depende de la solubilidad de un producto químico determinado, y las concentraciones madre reales se deben anotar en el momento del experimento.

**Tabla 4. Esquema de una placa experimental con concentraciones finales de productos químicos**

	Control pos.	Control neg.	Compuestos de carbazol (Comp. W, X, Y, X) (µM)									
Comp. W	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50
Comp. W	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50
Comp. X	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50
Comp. X	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50
Comp. Y	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50
Comp. Y	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50
Comp. Z	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50
Comp. Z	100 µg/ml de ampicilina	DMSO	0,00762	0,0229	0,0686	0,206	0,617	1,25	1,85	5,56	16,67	50

20 Cada compuesto químico del banco de compuestos que a de ser probado requiere 2 filas de una placa de 96-pocillos, por lo tanto, se pueden analizar en una placa simultáneamente 4 productos químicos (por ejemplo, W, X, Y, Z). Además de los productos químicos de ensayo, cada placa debe incluir controles positivos y negativos. Como control positivo, se usa ampicilina a 100 µg/ml. Como control negativo, se usa DMSO en una cantidad igual al volumen más elevado del compuesto de ensayo usado (DMSO al ~0,25% para 50 µM).

25 Las diluciones de los productos químicos que se añaden a la placa se preparan como 2 x concentraciones en medios de bacterias adecuadas y se añaden a los pocillos correspondientes en un volumen de 50 µl.

30 Los productos químicos se diluyen en medios bacterianos apropiados en diluciones en serie del triple a partir de 50 µM (por ejemplo, el doble de la concentración más alta (por ejemplo, 50 µM) = 100 µM). Se necesitan 300 µl de la concentración doble más alta con el fin de usar 1/3 para hacer la primera dilución y 200 µl de los medios para todas

las diluciones posteriores. Se mezclan 100 µl de la concentración doble más alta con 200 µl de medios y, a continuación, se mezclan 100 µl de la primera dilución con 200 µl de los medios para producir la siguiente dilución. Este procedimiento se repite hasta que se prepara un total de 10 dosis dobles.

5 Además de un control positivo añadido a una concentración a cada placa, se añade el control positivo de ampicilina a cada ensayo ejecutado en un intervalo de concentraciones completo (diluciones del triple) para garantizar el rendimiento del ensayo adecuado y constante (estimado mediante la comparación de las curvas de dosis respuesta entre las series).

10 Tras la adición de compuestos de carbazol a placas de 96 pocillos que contenían bacterias, se transfieren las placas a la incubadora de bacterias a 37 °C durante 48 horas. Después de la incubación, se medirá la DO<sub>600nm</sub> para cada pocillo de las placas de 96 pocillos.

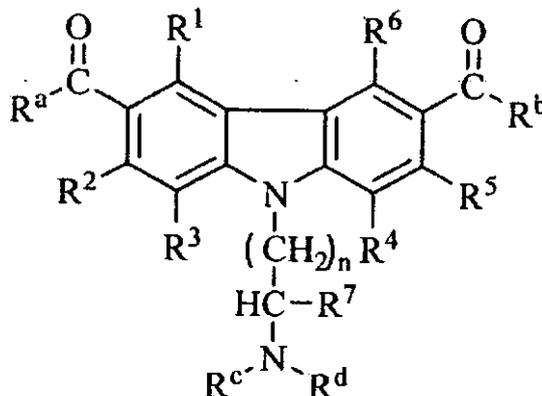
#### **Análisis de los datos**

15 Se compara la DO<sub>600nm</sub> media de las soluciones del compuesto de ensayo con la del control de DMSO dividiendo la DO<sub>600nm</sub> media de la solución de ensayo entre la del control de DMSO y multiplicando por 100 para producir el % control de DMSO (es decir, el % de citotoxicidad). Se representa gráficamente el % del control de DMSO frente a la concentración de compuesto para generar curvas en forma sigmoideal. Una vez completadas tres series, los datos brutos de las tres series se usan para calcular la CI<sub>50</sub>.

20 Los resultados de la prueba demostraron que los compuestos de carbazol de los Ejemplos 15, 7, 4, 12, 13, 17 y 18, y el Compuesto 18c-1 demostraron un efecto antibacteriano contra *siibtilis B.* y HB 101 de *E. coli* en un intervalo de potencias. Las bacterias Gram (+) parecieron más sensibles a los presentes compuestos de carbazol. Además, varios de los compuestos de carbazol, por ejemplo, los Ejemplos 15 y 17, fueron más eficaces contra las bacterias que el control de ampicilina. Por lo tanto, los presentes compuestos de carbazol demuestran una actividad antibacteriana definida.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una fórmula estructural:



5

en la que  $R^a$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $OR^e$ ,  $N(R^e)_2$  y  $SR^e$ ; alternativamente, cualquiera de  $R^a$  y  $R^1$  o  $NR^e$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo heterocíclico o carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

10  $R^b$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $OR^e$ ,  $N(R^e)_2$  y  $SR^e$ ; alternativamente, cualquiera de  $R^b$  y  $R^6$  o  $NR^e$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros, o un anillo heterocíclico o carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

15  $R^c$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , hidroxialquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^e$ , o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

$R^d$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y  $C(=O)R^e$ , o  $R^d$  y  $R^7$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

20  $R^e$  está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, o dos grupos  $R^e$  se toman junto con un nitrógeno al que están unidos para formar un anillo alifático de cinco o seis miembros;

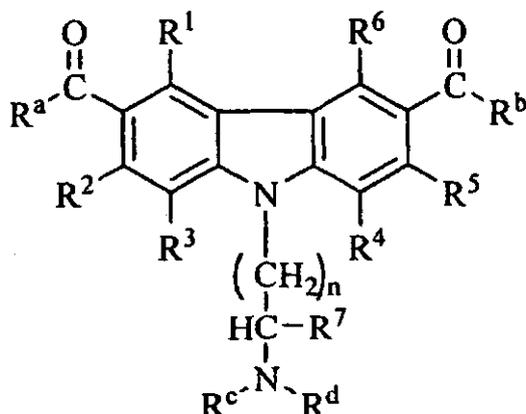
25  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo,  $OR^e$ ,  $C(=O)R^e$ ,  $C(=O)OR^e$ ,  $OC(=O)R^e$ ,  $C(=O)N(R^e)_2$ ,  $C(=O)NR^eSO_2R^e$ ,  $N(R^e)_2$ ,  $NR^eC(=O)R^e$ ,  $R^eC(=O)N(R^e)_2$ , CN,  $NO_2$ ,  $CF_3$ ,  $OCF_3$ ,  $SR^e$ ,  $SOR^e$ ,  $SO_2R^e$ ,  $SO_2N(R^e)_2$  y  $OSO_2CF_3$ ;

$R^7$  está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; y

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

30 o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene una fórmula estructural general (1a):



en la que  $R^a$  es alquilo  $C_{1-3}$ , haloalquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$ ,  $N(R^e)_2$  o  $OR^e$ , o  $R^a$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros;

$R^b$  es alquilo  $C_{1-4}$ , haloalquilo  $C_{1-4}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$ ,  $N(R^e)_2$  o  $OR^e$ , o  $R^b$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco o seis miembros, o un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno;

$R^c$  es alquilo  $C_{1-6}$ , cicloalquilo  $C_{3-5}$  o hidroxialquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^d$  es hidrógeno, alquilo  $C_{1-4}$  o cicloalquilo  $C_{3-5}$ , o  $R^d$  y  $R^7$  junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno, o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

$R^e$  es independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^1$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^2$  es hidrógeno, hidroxilo o alcoxilo  $C_{1-3}$ ;

$R^3$  y  $R^4$  son independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^5$  es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo  $C_{1-3}$  o halo;

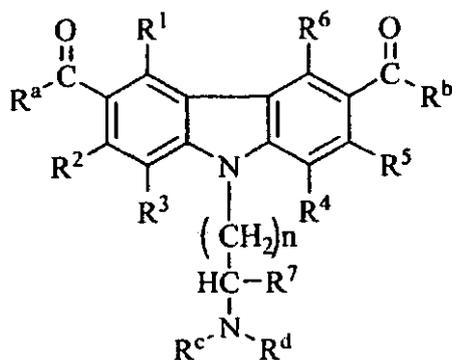
$R^6$  es hidrógeno, alquilo  $C_{1-3}$ , alcoxilo  $C_{1-3}$  o halo;

$R^7$  es hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ ; y

$n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene una fórmula estructural general (1b):

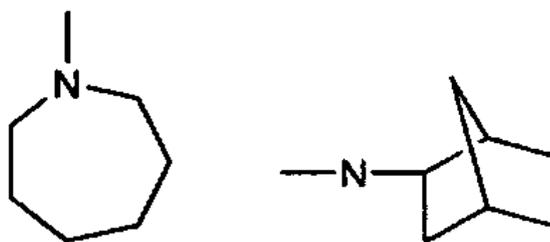


en la que  $R^a$  es metilo, etilo, *n*-propilo, ciclopropilo,  $NH(CH_3)$  o  $OCH_3$ , o  $R^a$  y  $R^1$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco miembros;

$R^b$  es metilo, etilo, *n*-propilo, ciclopropilo,  $NH(CH_3)$  o  $OCH_3$ , o  $R^b$  y  $R^6$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico alifático de cinco miembros o un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno;

$R^c$  es metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, ciclobutilo o 2-hidroxietilo;

$R^d$  es hidrógeno, metilo, etilo o ciclobutilo, o  $R^d$  y  $R^7$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno, o  $R^c$  y  $R^d$  se toman conjuntamente para formar un resto morfolino; un resto tetrahidrofurilo; un resto piperidinilo; un resto



o un resto

R<sup>1</sup> es hidrógeno;

R<sup>2</sup> es hidrógeno, hidroxilo o metoxilo;

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son hidrógeno;

R<sup>5</sup> es hidrógeno, hidroxilo, metoxilo o fluoro;

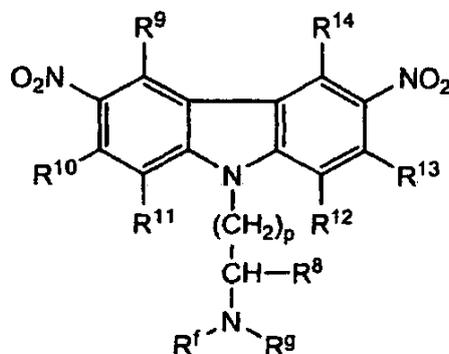
R<sup>6</sup> es hidrógeno, metilo, metoxilo o fluoro;

R<sup>7</sup> es hidrógeno; y

n es 1 o 2,

o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

4. Un compuesto que tiene una fórmula estructural:



en la que R<sup>f</sup> está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, y C(=O)R<sup>h</sup>, o R<sup>f</sup> y R<sup>g</sup> se toman conjuntamente para formar un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno;

R<sup>g</sup> está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo y C(=O)R<sup>h</sup>, o R<sup>g</sup> y R<sup>8</sup> junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo alifático de cinco, seis o siete miembros;

R<sup>h</sup> está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, o dos grupos R<sup>h</sup> tomados junto con un nitrógeno al que están unidos forman un anillo alifático de cinco o seis miembros;

R<sup>8</sup> está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo;

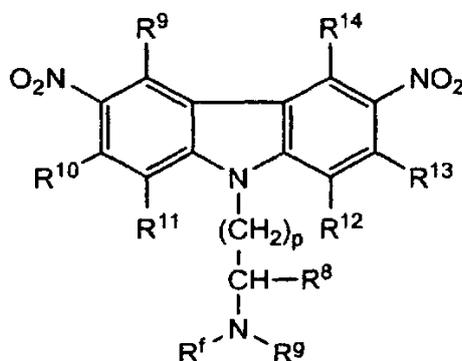
R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup> y R<sup>14</sup> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo, OR<sup>h</sup>, C(=O)R<sup>h</sup>, C(=O)OR<sup>h</sup>, OC(=O)R<sup>h</sup>, C(=O)N(R<sup>h</sup>)<sub>2</sub>, C(=O)NR<sup>h</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>h</sup>, N(R<sup>h</sup>)<sub>2</sub>, NR<sup>e</sup>C(=O)R<sup>h</sup>, NR<sup>h</sup>C(=O)N(R<sup>h</sup>)<sub>2</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SR<sup>h</sup>, SOR<sup>h</sup>, SO<sub>2</sub>R<sup>h</sup>, SO<sub>2</sub>N(R<sup>h</sup>)<sub>2</sub> y OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; y

p es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

con la condición de que cuando p sea 2, uno de entre R<sup>f</sup> y R<sup>g</sup> es diferente de etilo,

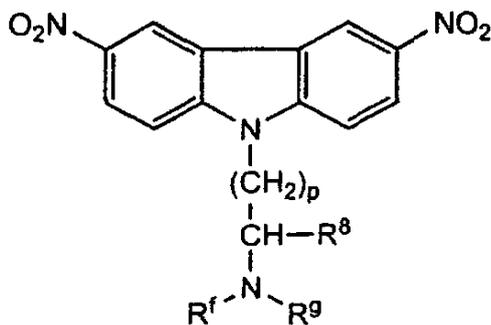
o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptable.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto tiene una fórmula estructural general (IIa):



- 5 en la que R<sup>f</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>;  
 R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>, o R<sup>9</sup> y R<sup>8</sup>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco o seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno;  
 R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;  
 R<sup>10</sup> es hidrógeno, hidroxilo o alcoxilo C<sub>1-3</sub>;  
 10 R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> son independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;  
 R<sup>13</sup> es hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo C<sub>1-3</sub> o halo;  
 R<sup>14</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub> o alcoxilo C<sub>1-3</sub>;  
 R<sup>8</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>; y  
 p es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,  
 15 con la condición de que cuando p sea 2, uno de entre R<sup>f</sup> y R<sup>9</sup> es diferente de etilo;  
 o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

6. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto tiene una fórmula estructural (IIb):



- 20 en la que R<sup>f</sup> es metilo o etilo;  
 R<sup>9</sup> es hidrógeno o metilo, o R<sup>9</sup> y R<sup>8</sup>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo alifático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno;  
 R<sup>8</sup> es hidrógeno; y  
 25 p es 1 o 2,  
 o una de sus sales o uno de sus hidratos farmacéuticamente aceptables.

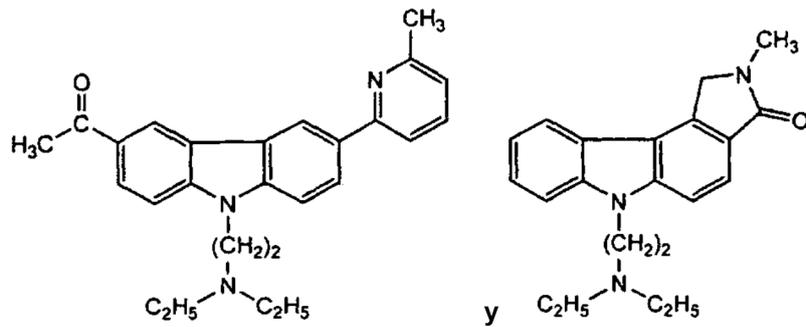
7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R<sup>a</sup> es metilo, etilo, NH(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>3</sub> o forma un anillo alifático de cinco miembros con R<sup>1</sup>, R<sup>b</sup> es metilo, etilo, NH(CH<sub>3</sub>), OCH<sub>3</sub>, forma un anillo alifático de cinco miembros con R<sup>6</sup> o forma un anillo alifático de cinco miembros que contiene nitrógeno con R<sup>6</sup>, y R<sup>d</sup> es hidrógeno, metilo, etilo o un anillo alifático de cinco miembros con R<sup>7</sup>.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> es hidrógeno o forma un anillo alifático de cinco miembros con R<sup>a</sup>, R<sup>2</sup> es hidrógeno o hidroxilo, R<sup>3</sup> es hidrógeno, R<sup>4</sup> es hidrógeno, R<sup>5</sup> es hidrógeno o hidroxilo, R<sup>6</sup> es hidrógeno, forma un anillo alifático de cinco miembros con R<sup>b</sup> o forma un anillo alifático de cinco miembros que contiene

nitrógeno con  $R^b$ ,  $R^7$  es hidrógeno o forma un anillo de cinco miembros con  $R^d$  y  $n$  es 2 o 3.

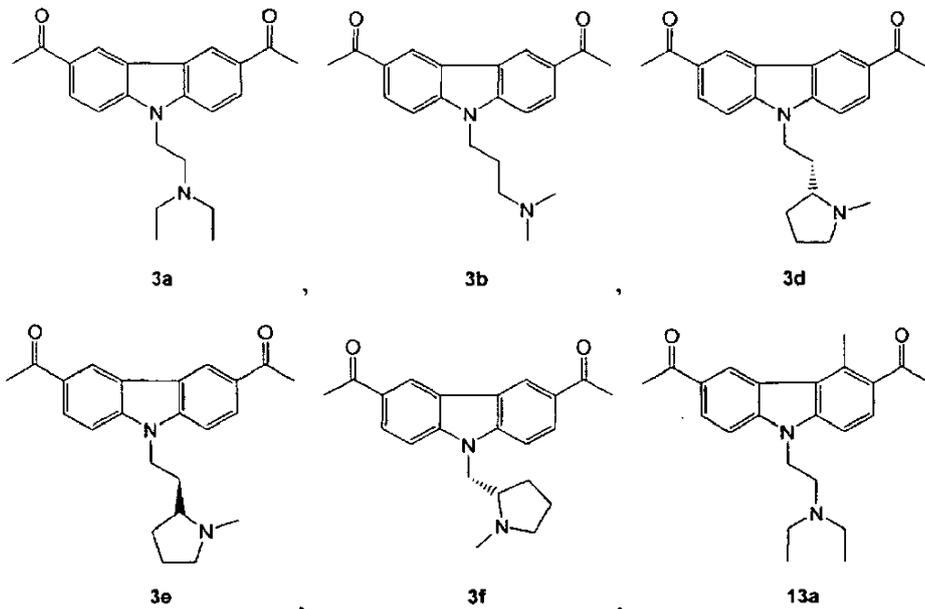
9. El compuesto de la reivindicación 4, en el que  $R^f$  es metilo o etilo,  $R^g$  es hidrógeno, metilo, etilo o forma un anillo alifático de cinco miembros que contiene nitrógeno con  $R^f$  y  $R^8$ , o  $R^8$  es hidrógeno;  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  y  $R^{14}$  son hidrógeno,  $p$  es 2 o 3.

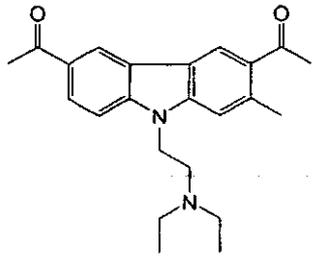
5 10. Un compuesto que tiene una fórmula estructural:



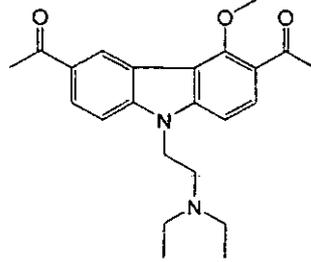
10 11. El compuesto de la reivindicación 1 o 4 que tiene un valor de  $CE_{50}$  para la activación de p53 de menos de aproximadamente  $1,35 \mu M$ .

12. Un compuesto de la reivindicación 1, 4 o 10 seleccionado del grupo que consiste en:

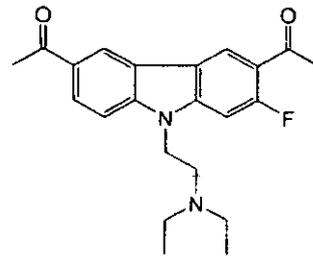




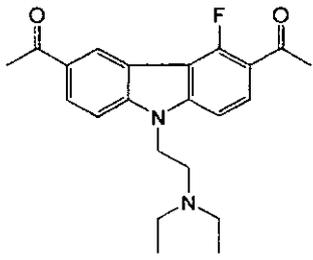
13b



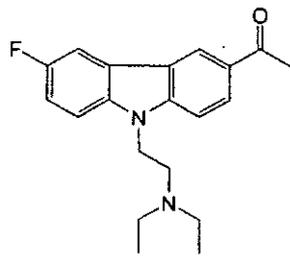
13c



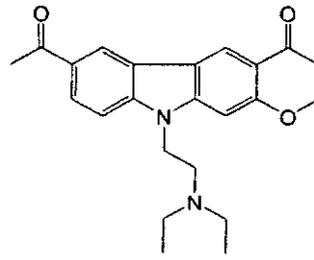
13d



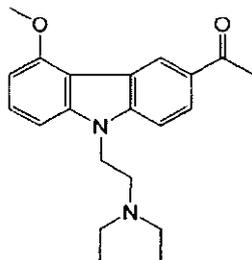
13e



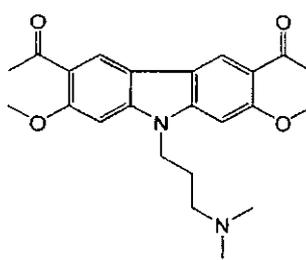
13f



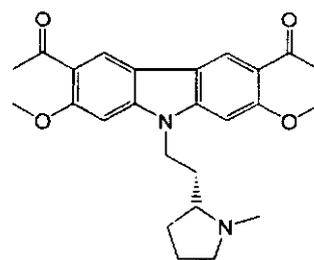
13g



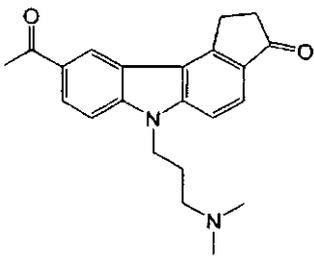
13h



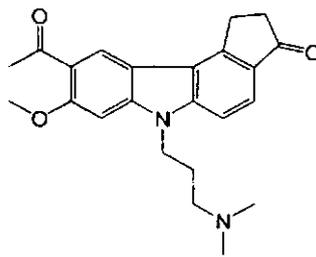
13i



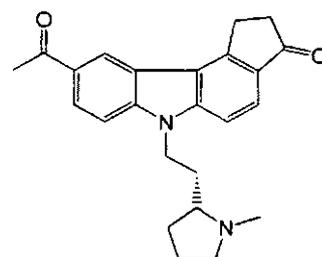
13j



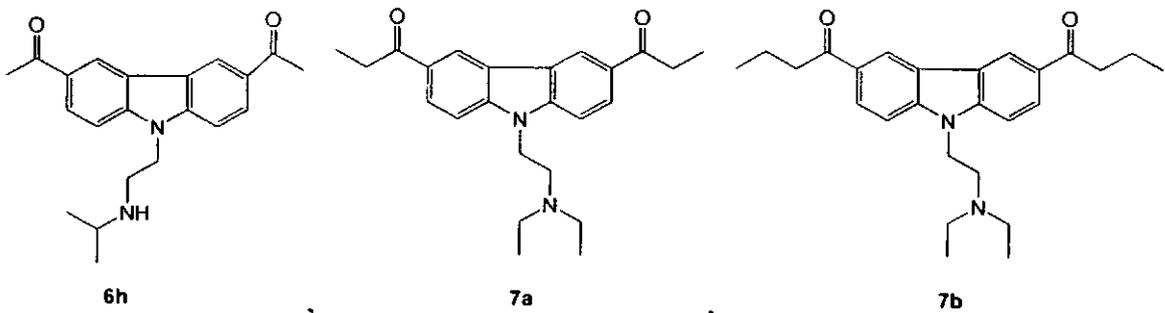
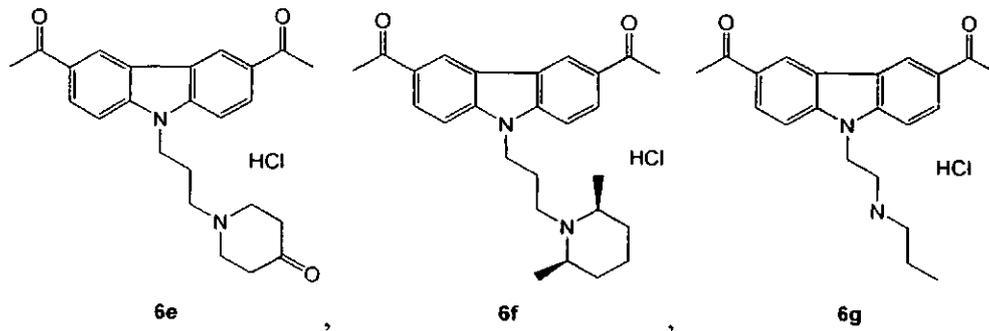
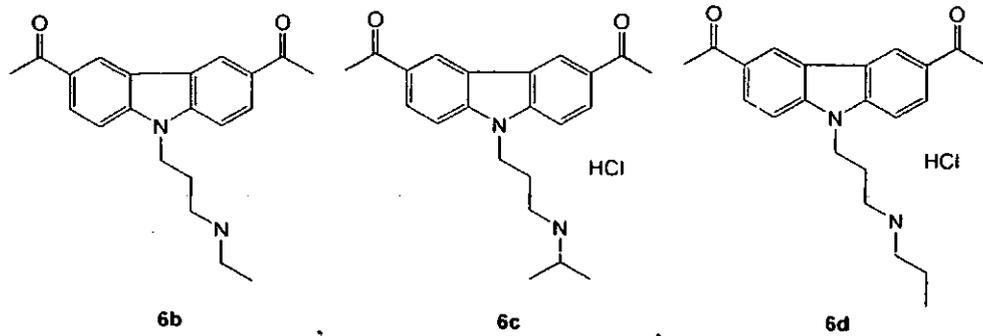
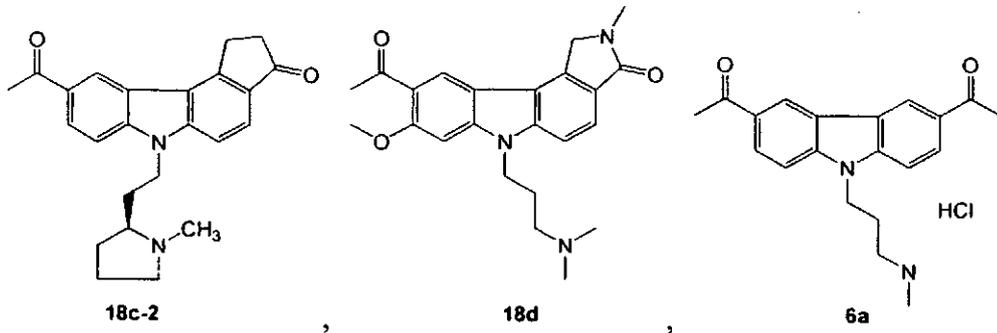
18a

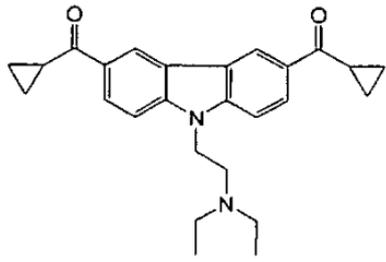


18b

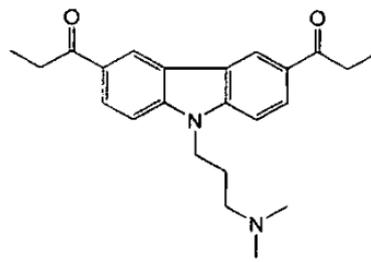


18c-1

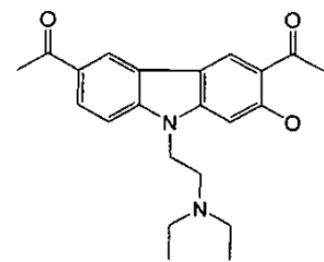




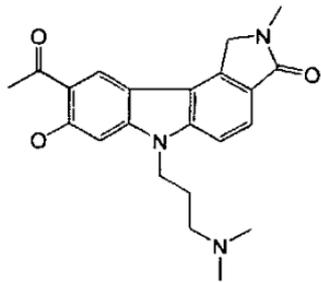
7c



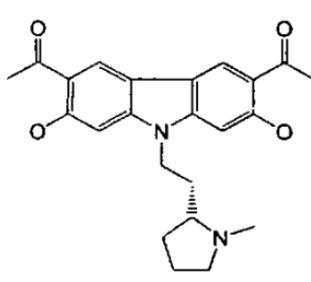
7d



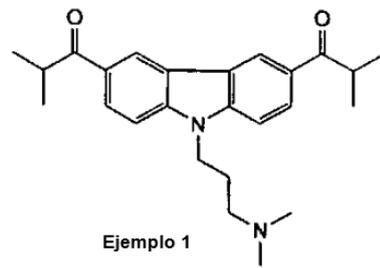
19a



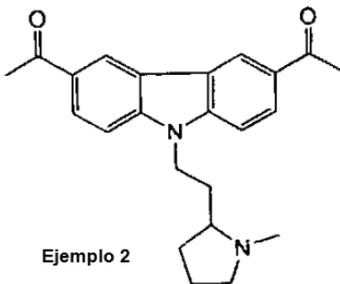
19e



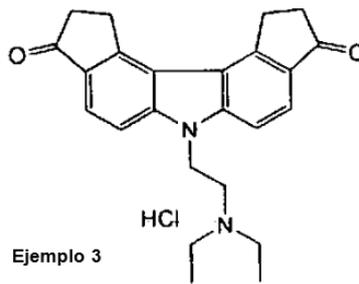
19f



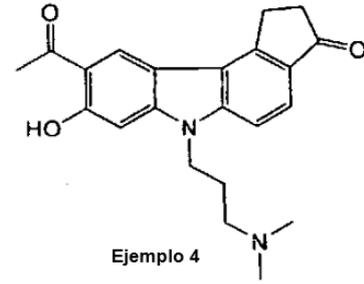
Ejemplo 1



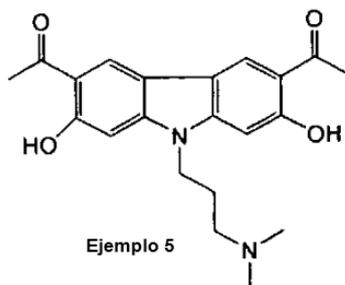
Ejemplo 2



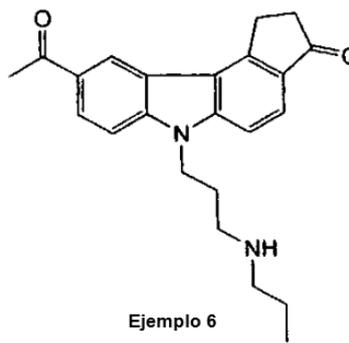
Ejemplo 3



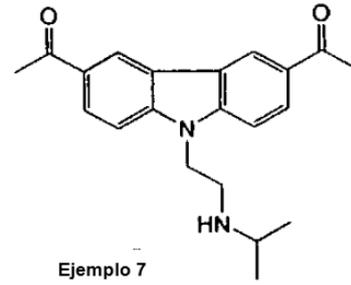
Ejemplo 4



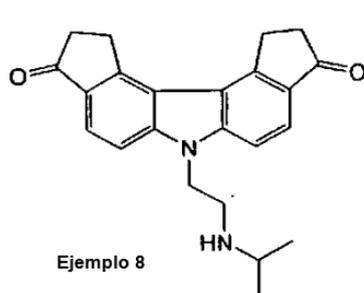
Ejemplo 5



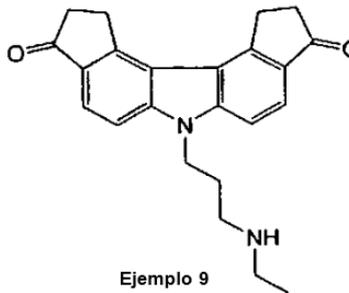
Ejemplo 6



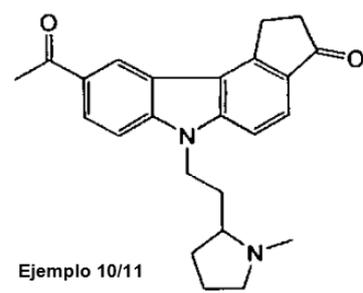
Ejemplo 7



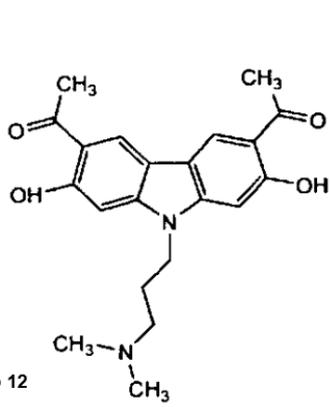
Ejemplo 8



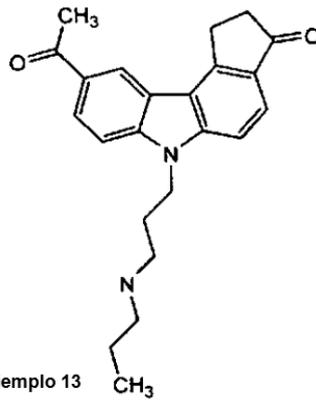
Ejemplo 9



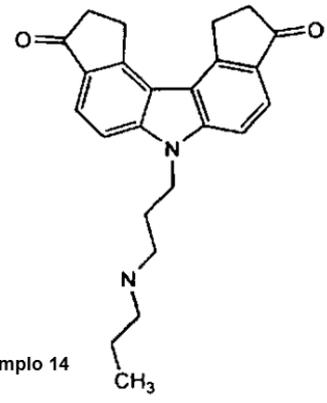
Ejemplo 10/11



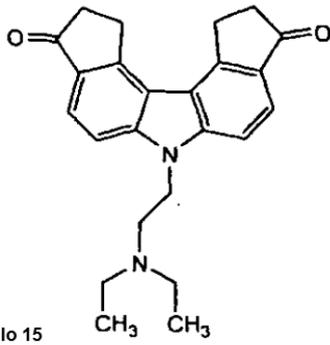
Ejemplo 12



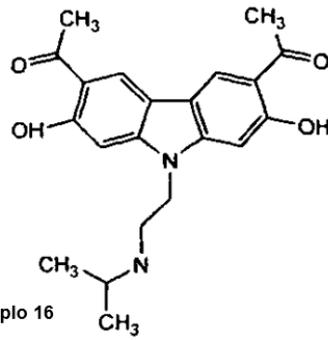
Ejemplo 13



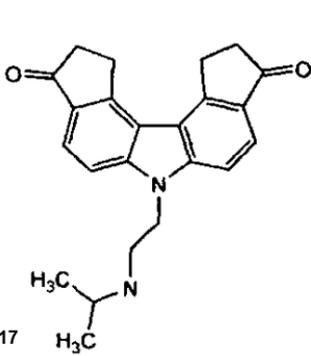
Ejemplo 14



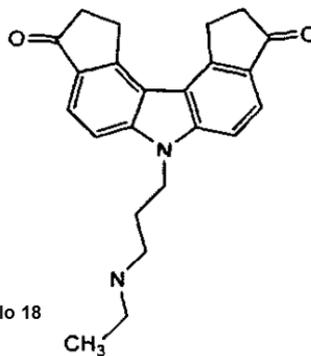
Ejemplo 15



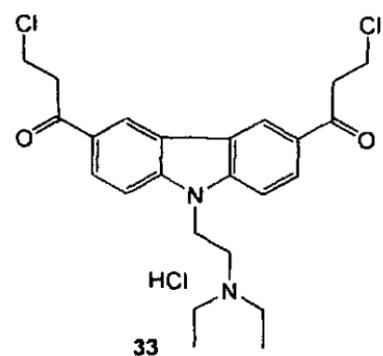
Ejemplo 16



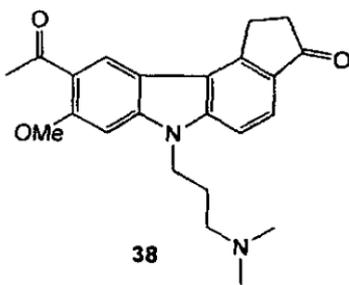
Ejemplo 17



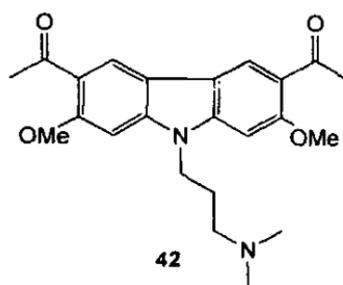
Ejemplo 18



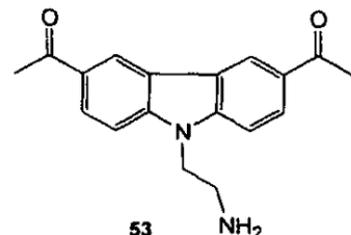
33



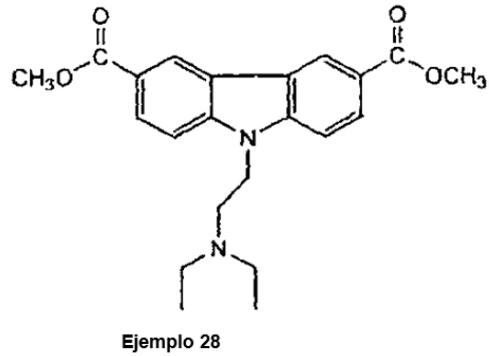
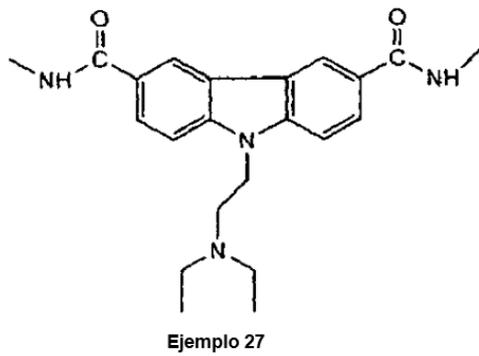
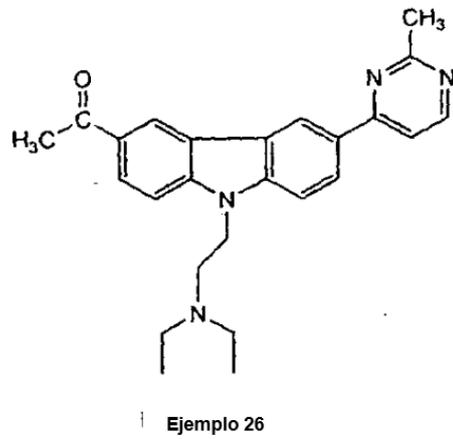
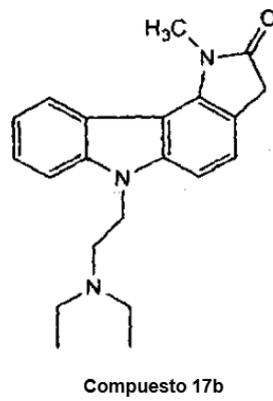
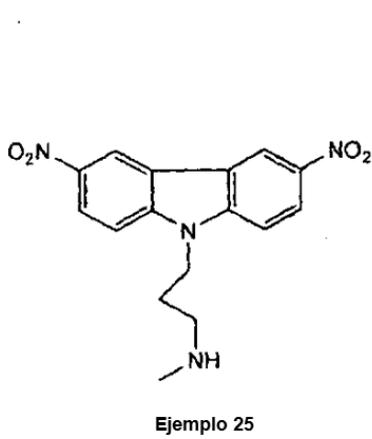
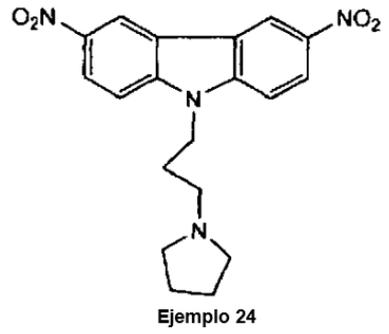
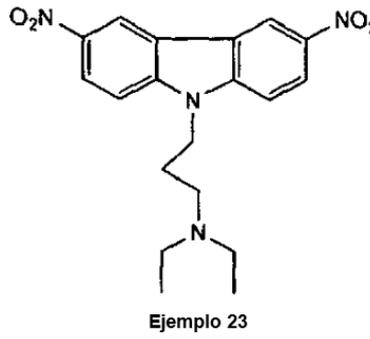
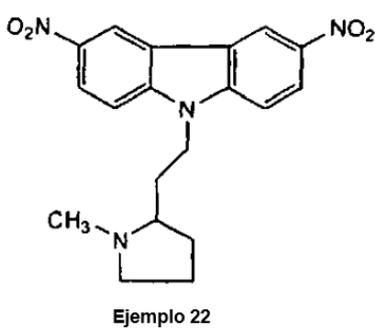
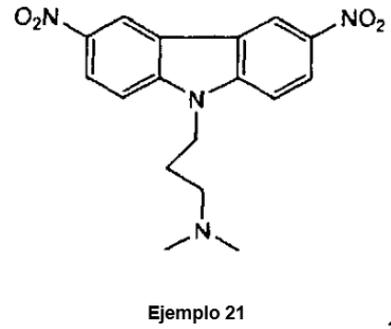
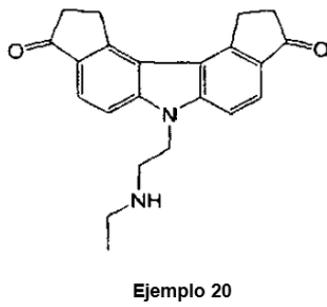
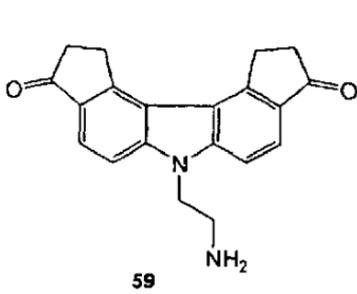
38

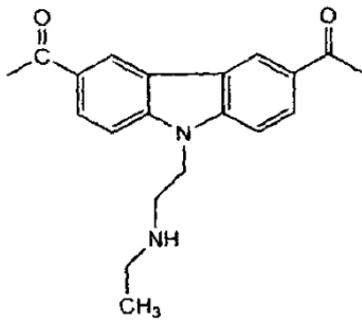


42

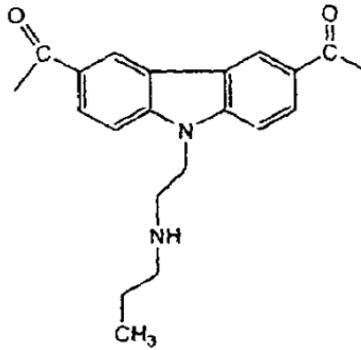


53

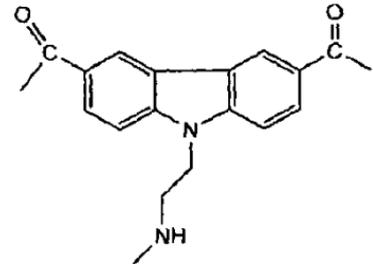




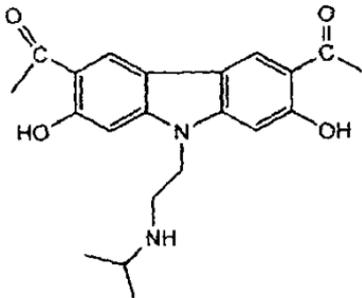
Ejemplo 29



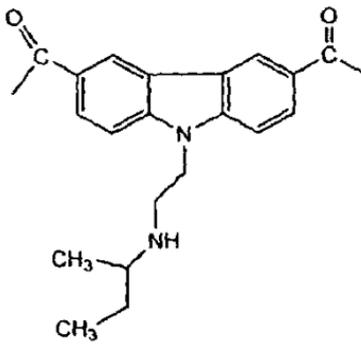
Ejemplo 30



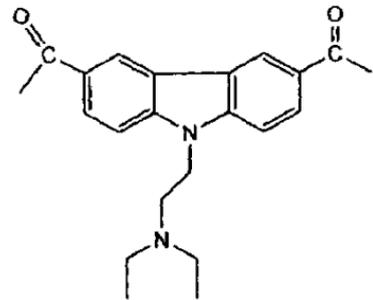
Ejemplo 31



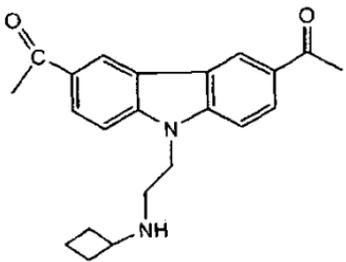
Ejemplo 32



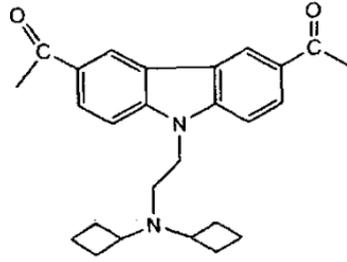
Ejemplo 33



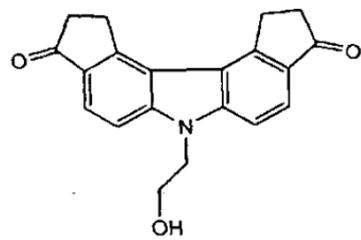
Ejemplo 34



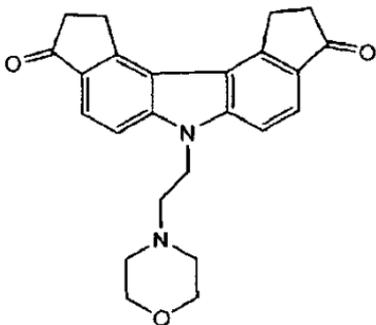
Ejemplo 35



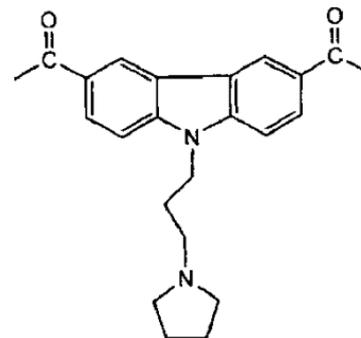
Ejemplo 36



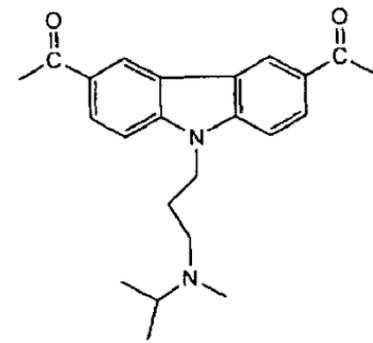
Ejemplo 37



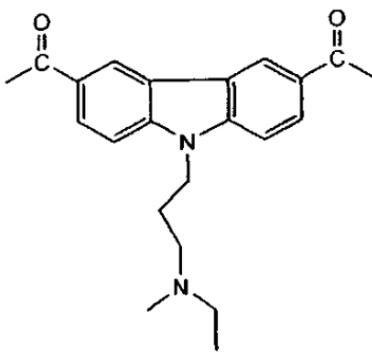
Ejemplo 38



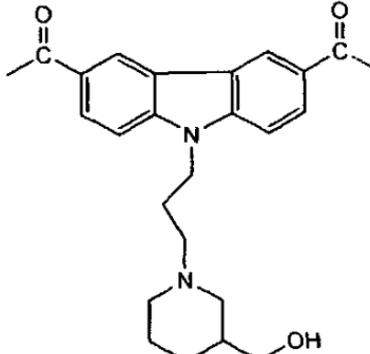
Ejemplo 39



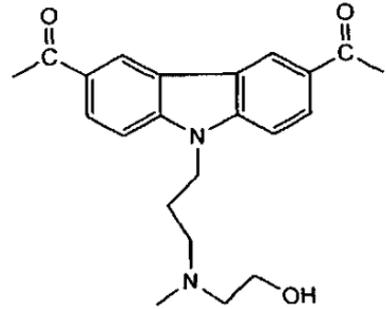
Ejemplo 40



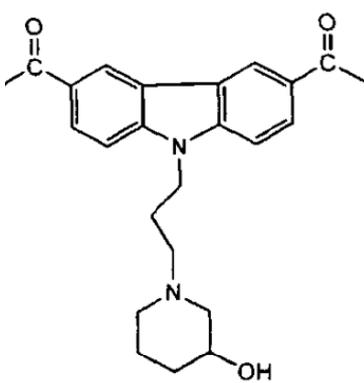
Ejemplo 41



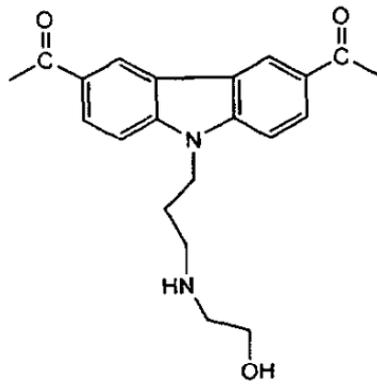
Ejemplo 42



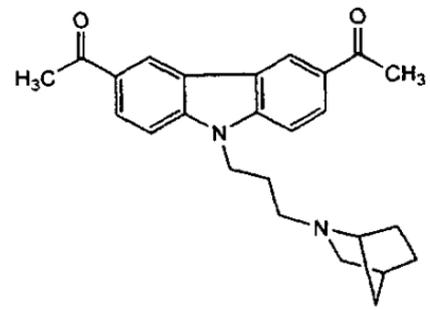
Ejemplo 43



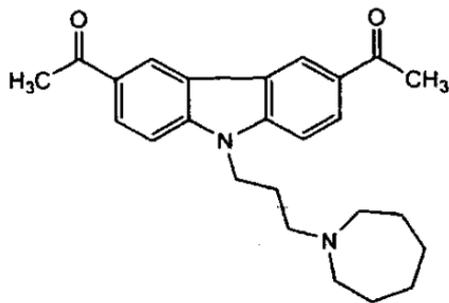
Ejemplo 44



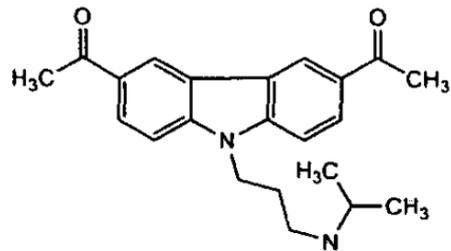
Ejemplo 45



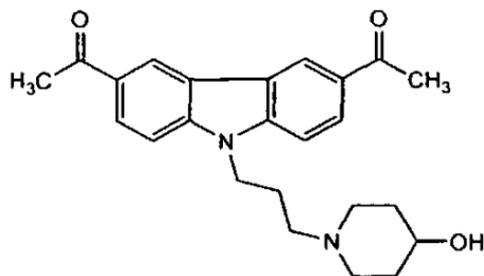
Ejemplo 46



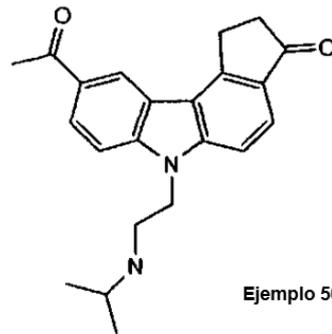
Ejemplo 47



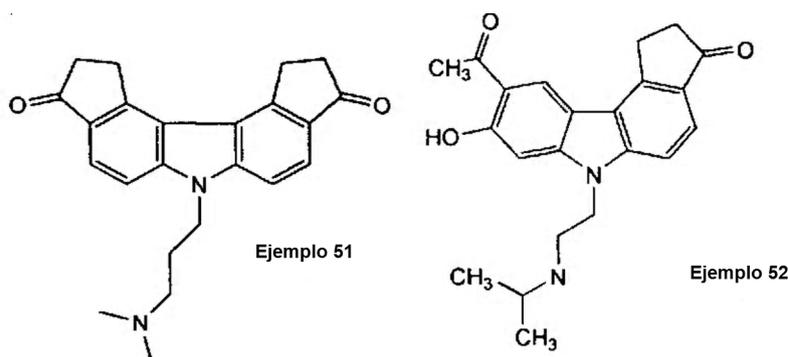
Ejemplo 48



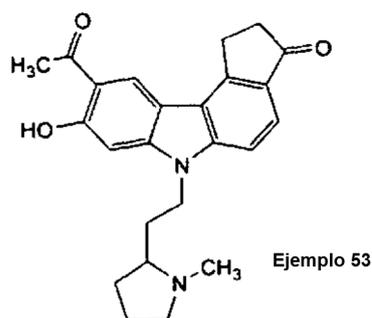
Ejemplo 49



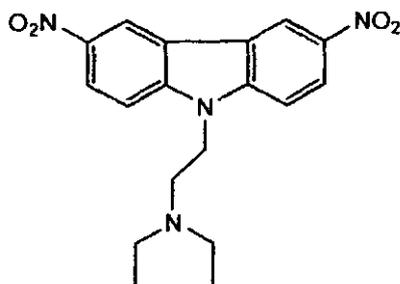
Ejemplo 50



y



13. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en el compuesto de la reivindicación 1, el compuesto de la reivindicación 4, el compuesto de la reivindicación 10 o un Compuesto 100 de fórmula



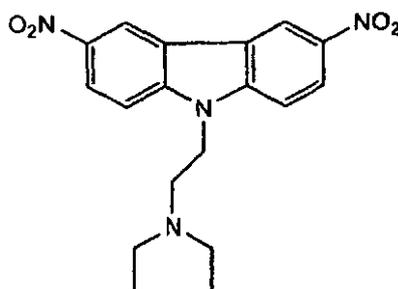
para su uso en el tratamiento de un cáncer mediante la administración del compuesto en una cantidad terapéuticamente eficaz a un individuo en necesidad del mismo.

14. El compuesto de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de un cáncer según la reivindicación 13, en el que el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en carcinomas, carcinoma de vejiga, cáncer de vejiga acelerado y metastásico, carcinoma de mama, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de riñón, carcinoma de hígado, cáncer pulmonar de células pequeñas y no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de ovario, carcinoma de próstata, carcinoma de testículos, carcinomas del tracto genitourinario, carcinomas del sistema linfático, carcinoma de recto, carcinoma de laringe, carcinoma de páncreas, carcinoma pancreático exocrino, carcinoma de esófago, carcinoma de estómago, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma de cuello del útero, carcinoma de tiroides, carcinoma de renal, carcinoma de piel, carcinoma de células escamosas, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkins, linfoma de no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico, linfoma de Burketts, tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielóide, leucemia promielocítica, tumores del sistema nervioso central y periférico, astrocitoma, neuroblastoma, glioma, schwannomas, tumores de origen mesenquimal, fibrosarcoma, rhabdomiocarcinoma, osteosarcoma, melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactinoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (CCR), cáncer de páncreas, mieloma, leucemia mielóide y linfoblástica, neuroblastoma, glioblastoma; cánceres colorrectales, cánceres de cabeza y cuello, cánceres pancreáticos, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres de vejiga, cánceres de vulva, linfomas, melanomas, carcinomas de células renales, cánceres de ovario, tumores cerebrales, osteosarcomas y carcinomas pulmonares, tumores sólidos, es decir, carcinomas y sarcomas, neoplasmas malignos derivados de células epiteliales que se infiltran en tejidos circundantes y dan lugar a metástasis, adenocarcinomas, sarcomas, oncología pediátrica y de

adultos, crecimiento de malignidades/tumores sólidos, carcinoma de células mixoides y redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas de tejidos blandos humanos, sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de esófago, carcinoma oral, malignidades de células sanguíneas, mieloma múltiple, leucemias, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia de células pilosas, linfomas de derrame, linfoma tímico, cáncer de pulmón, carcinoma de células pequeñas, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres de células no pequeñas, cáncer de mama, carcinoma de células pequeñas, carcinoma ductal, cánceres gastrointestinales, cáncer de estómago, cáncer de colon, pólipos asociados con neoplasia colorrectal, cáncer de hígado, cánceres urológicos, cáncer de vejiga, tumores de vejiga primarios superficiales, carcinoma invasivo de células transicionales de la vejiga, cáncer de vejiga con invasión muscular, cáncer de próstata, tumores malignos del tracto genital femenino, neoplasmas epiteliales peritoneales primarios, carcinoma cervical, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de vulva, cáncer uterino, tumores sólidos del folículo ovárico, tumores malignos del tracto genital masculino, cáncer testicular, cáncer de pene, cáncer de riñón, tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, invasión metastásica de células tumorales en el sistema nervioso central, cánceres de hueso, osteomas, osteosarcomas, cánceres de piel, melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos de piel humana, cáncer de células escamosas, cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, derrame peritoneal, derrame pleural maligno, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de vesícula biliar, neoplasmas trofoblásticos, hemangiopericitoma y sarcoma de Kaposi.

15. El compuesto de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el compuesto se administra en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapia, un agente que afecta a los microtúbulos, un agente citostático, un TNF polipeptídico y mezclas de los mismos.

16. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en el compuesto de la reivindicación 1, el compuesto de la reivindicación 4, el compuesto de la reivindicación 10 o un Compuesto 100 de fórmula

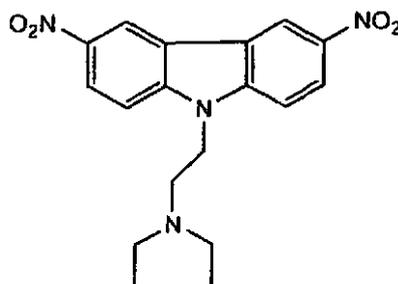


para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto a un individuo en necesidad del mismo.

17. El compuesto de la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la enfermedad inflamatoria está seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, soriasis, vitíligo, granulomatosis de Wegener, lupus eritematoso sistémico (LES).

18. El compuesto de la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el compuesto se administra en combinación con un fármaco inmunosupresor.

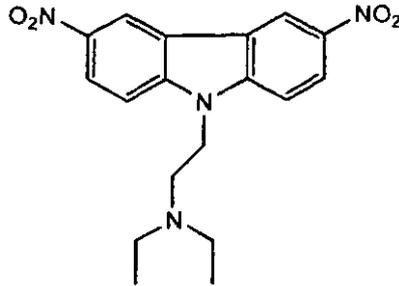
19. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en el compuesto de la reivindicación 1, el compuesto de la reivindicación 4, el compuesto de la reivindicación 10 o un Compuesto 100 de fórmula



para su uso en el tratamiento de una infección seleccionada del grupo que consiste en una infección microbiana, una infección protozoaria o una infección viral mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto a un individuo en necesidad de ello.

20. El compuesto de la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento de una infección de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la infección es malaria.

21. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en el compuesto de la reivindicación 1, el compuesto de la reivindicación 4, el compuesto de la reivindicación 10 o un Compuesto 100 de fórmula



5

para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en aterosclerosis, restenosis, vasculitis, nefritis, retinopatía, enfermedad renal, trastornos proliferativos de la piel, soriasis, cicatrización queloide, queratosis actínica, síndrome de Stevens-Johnson, artritis reumatoide (AR), artritis crónica juvenil (ACJ) de comienzo sistémico, osteoporosis, lupus eritematoso sistémico, enfermedades hiperproliferativas de los ojos, crecimiento epitelial, vitreorretinopatía proliferativa (VRP), retinopatía diabética, enfermedades hemangioproliferativas, ictiosis y papilomas.

10

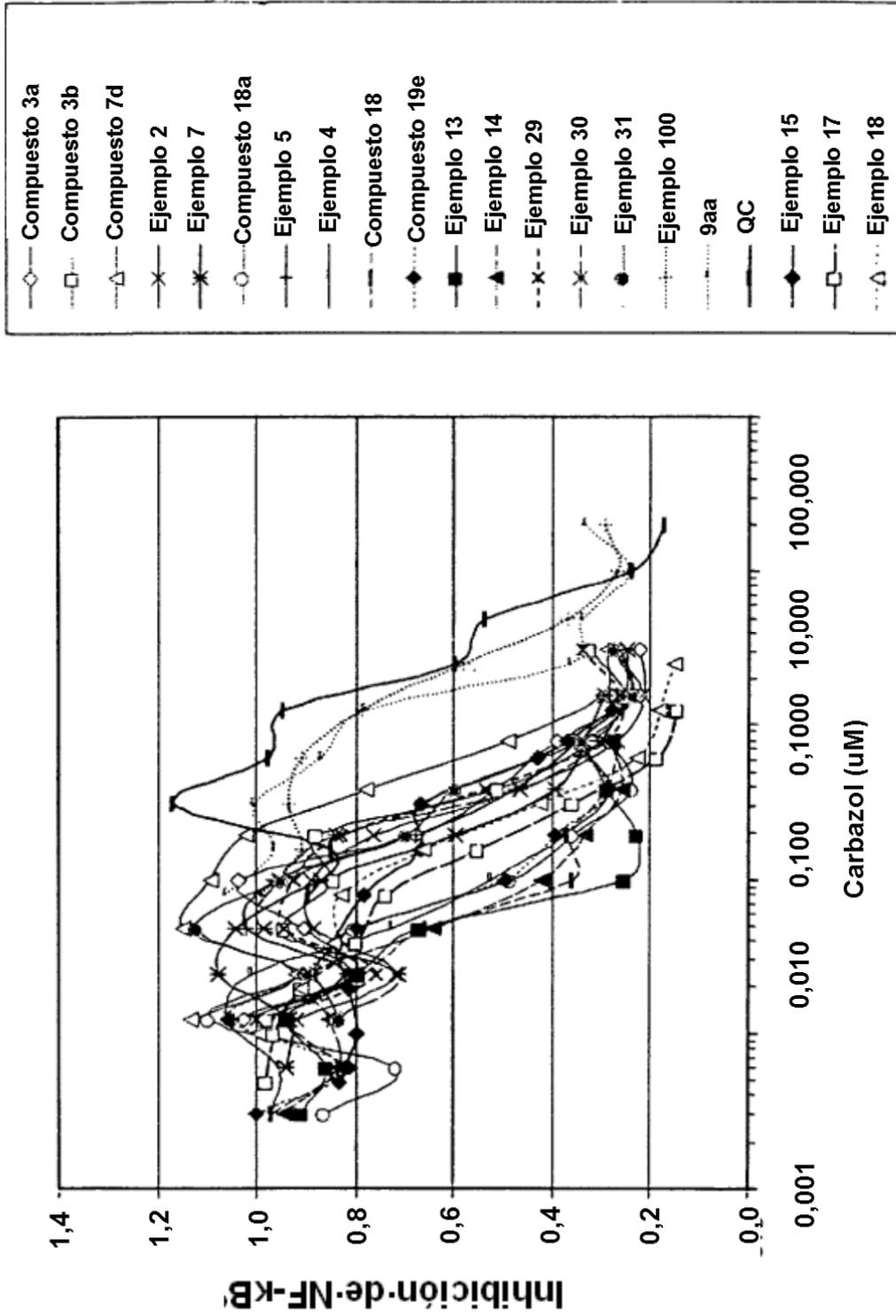
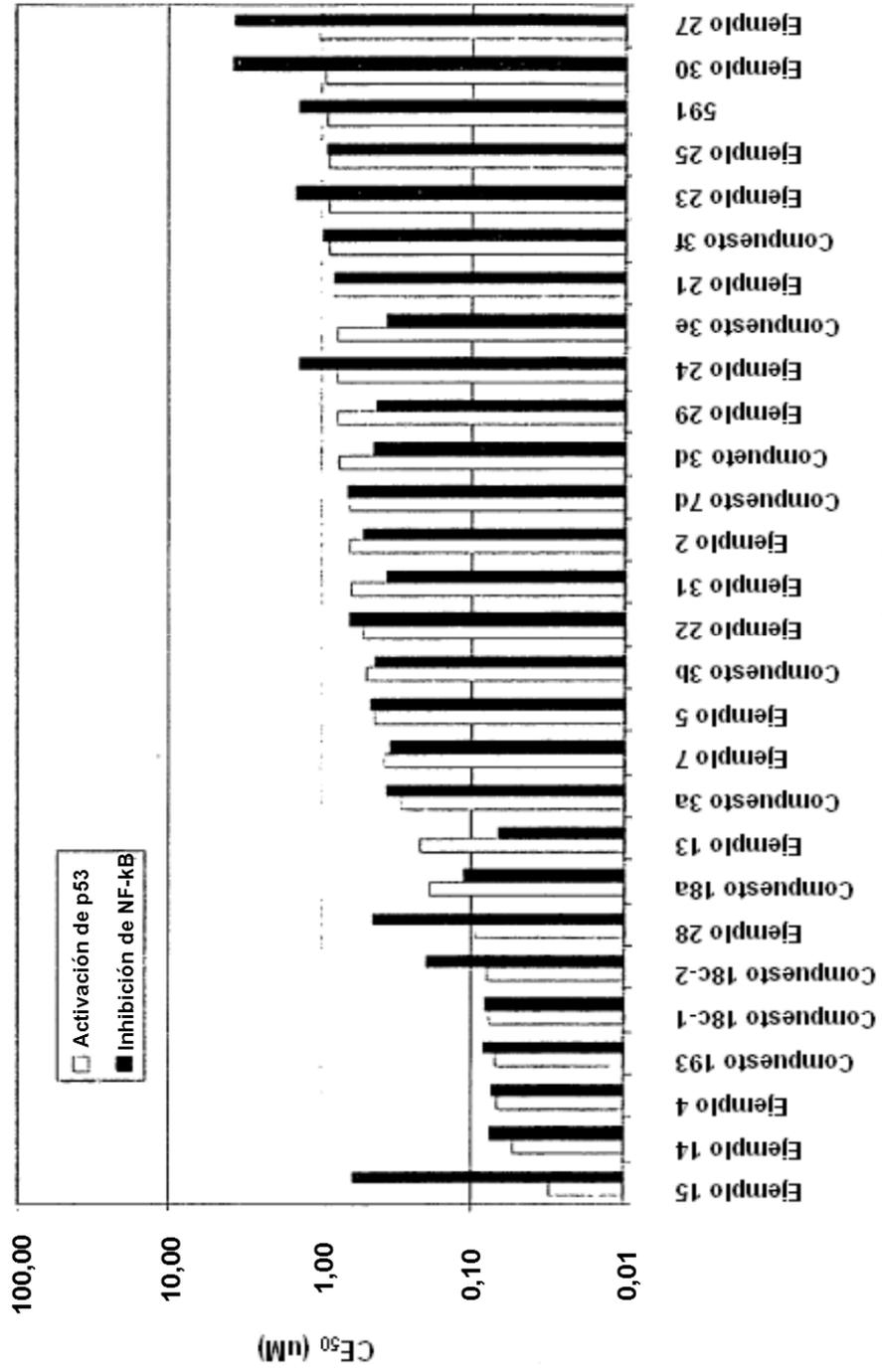


FIG. 1a



carbazol

FIG. 1b

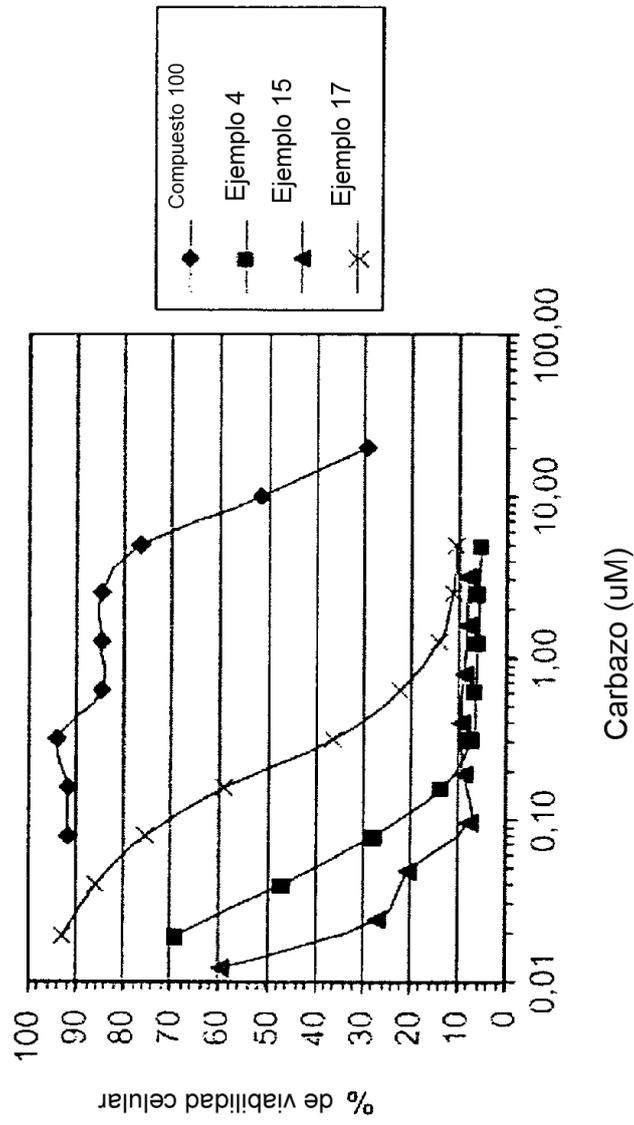


FIG. 2a

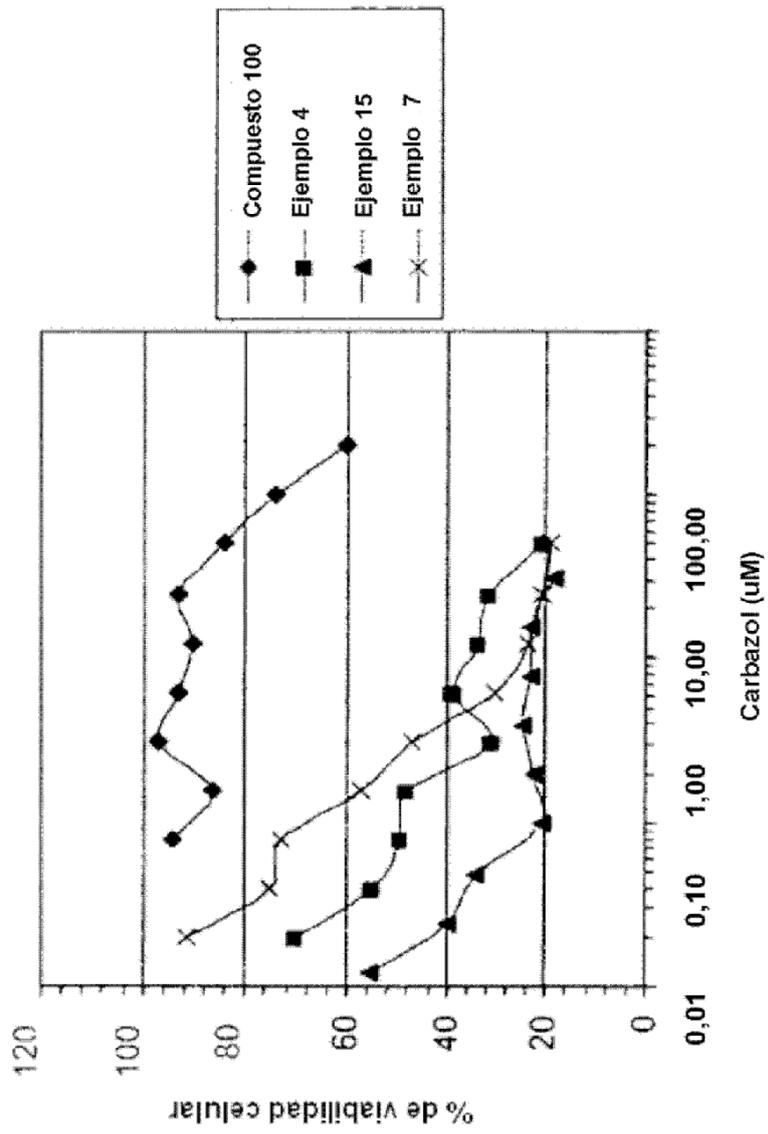


FIG. 2b

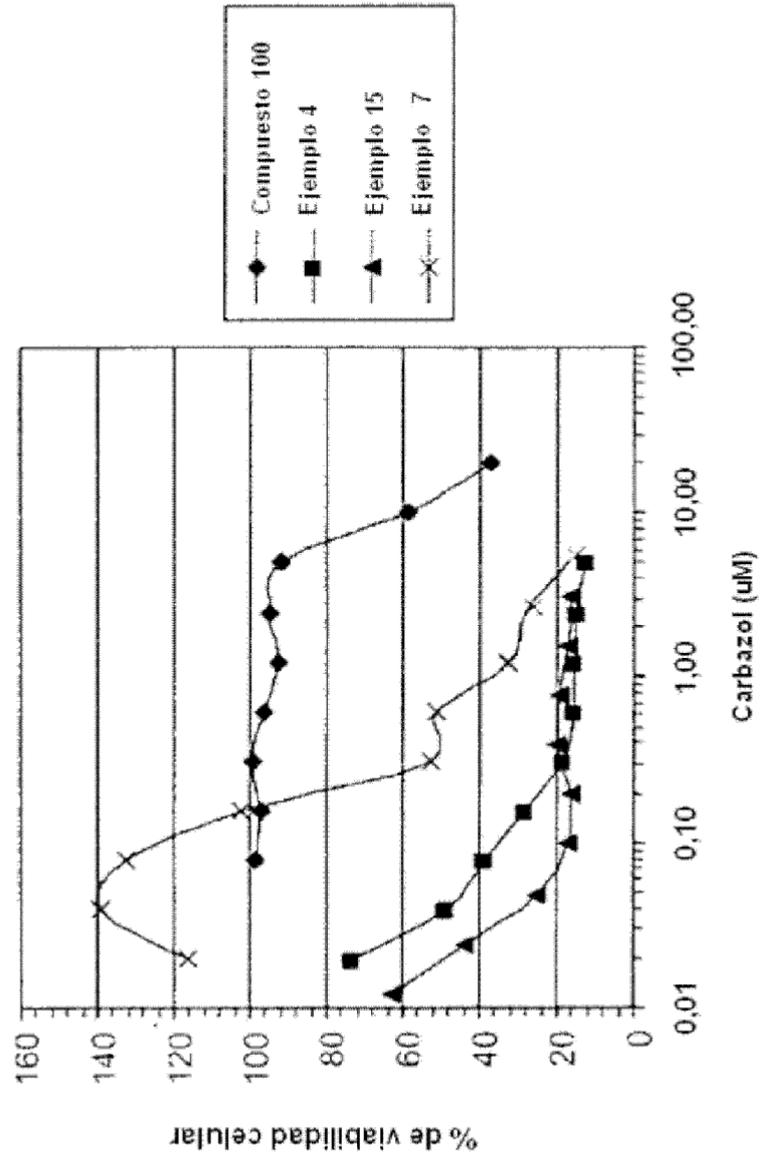


FIG. 2c

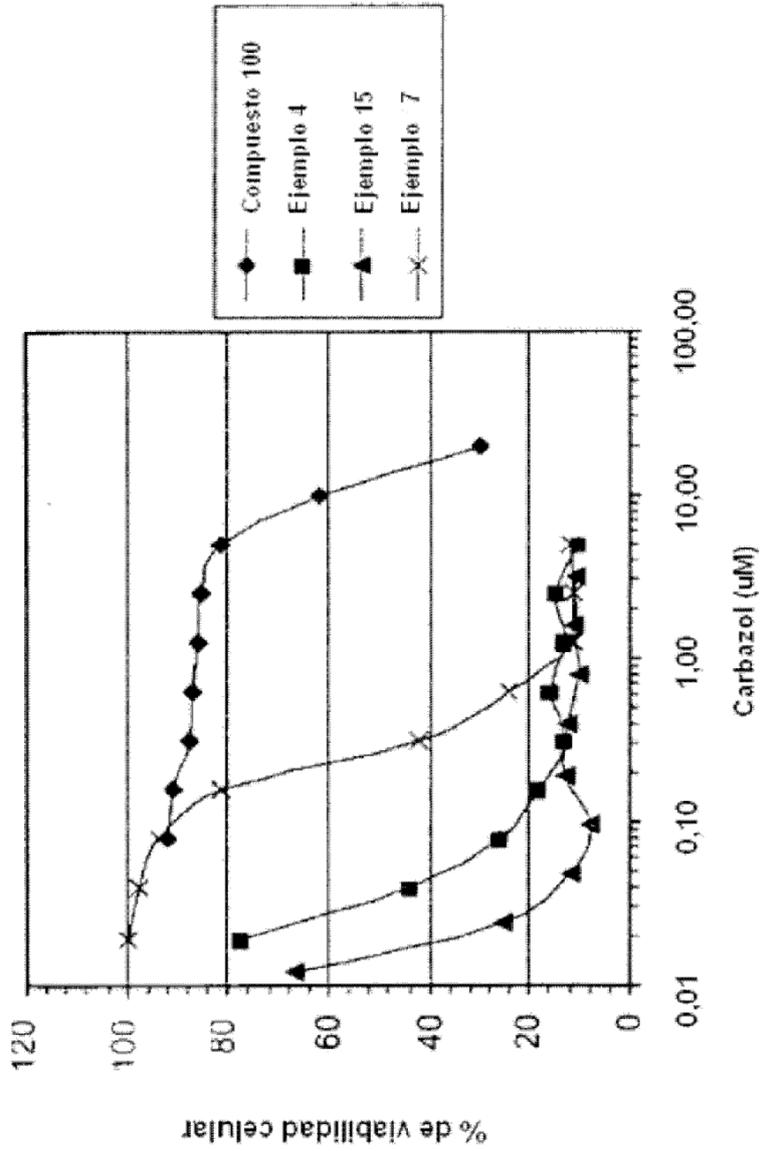


FIG. 2d

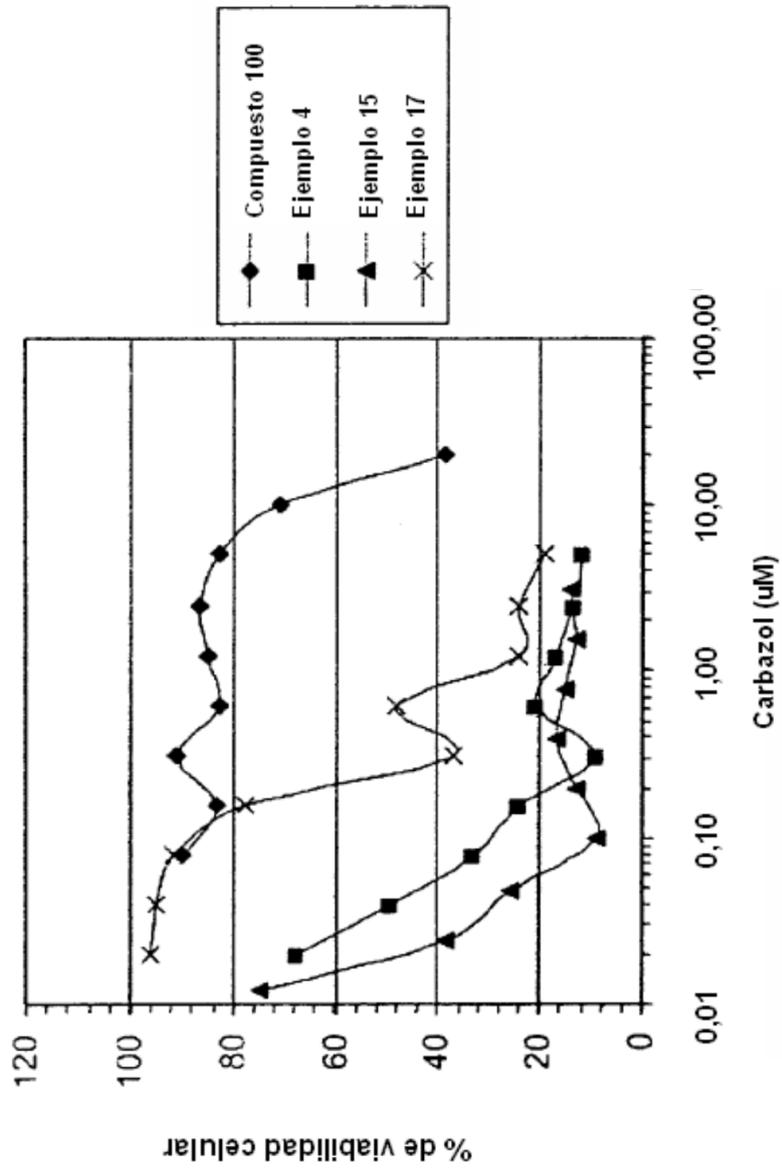


FIG. 2e

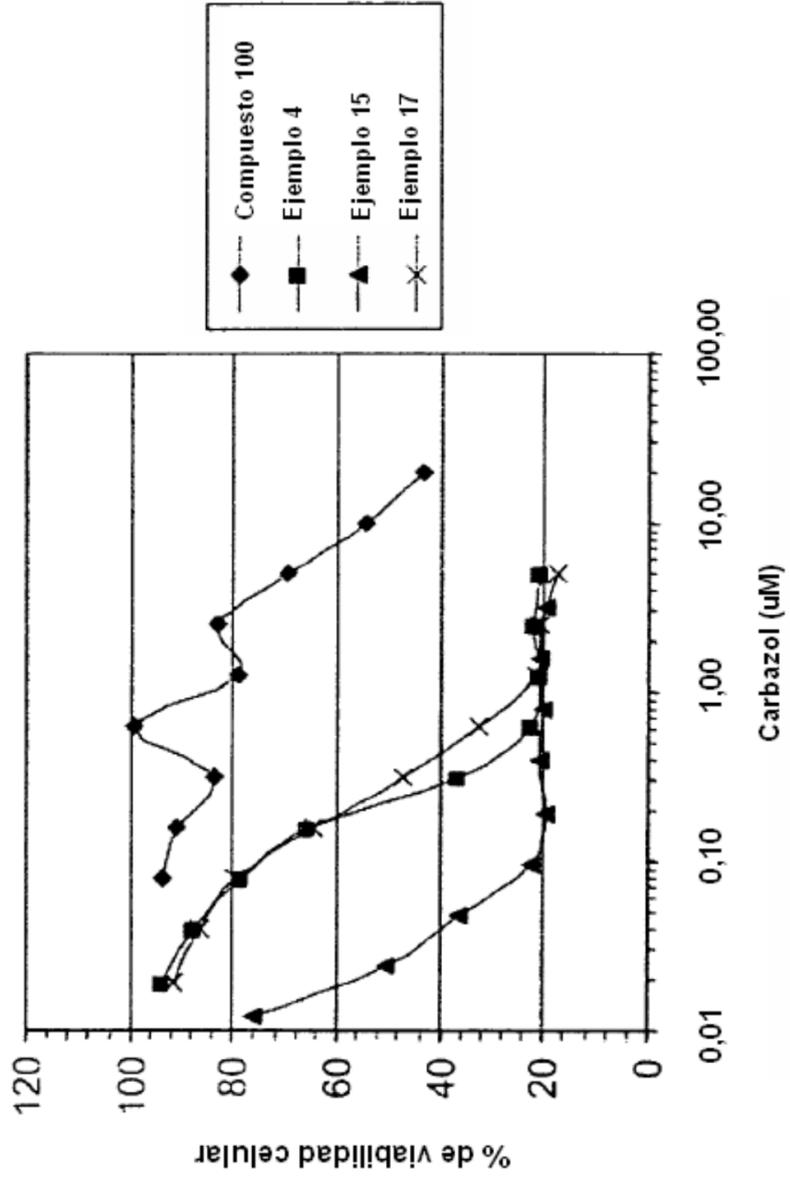


FIG. 2f

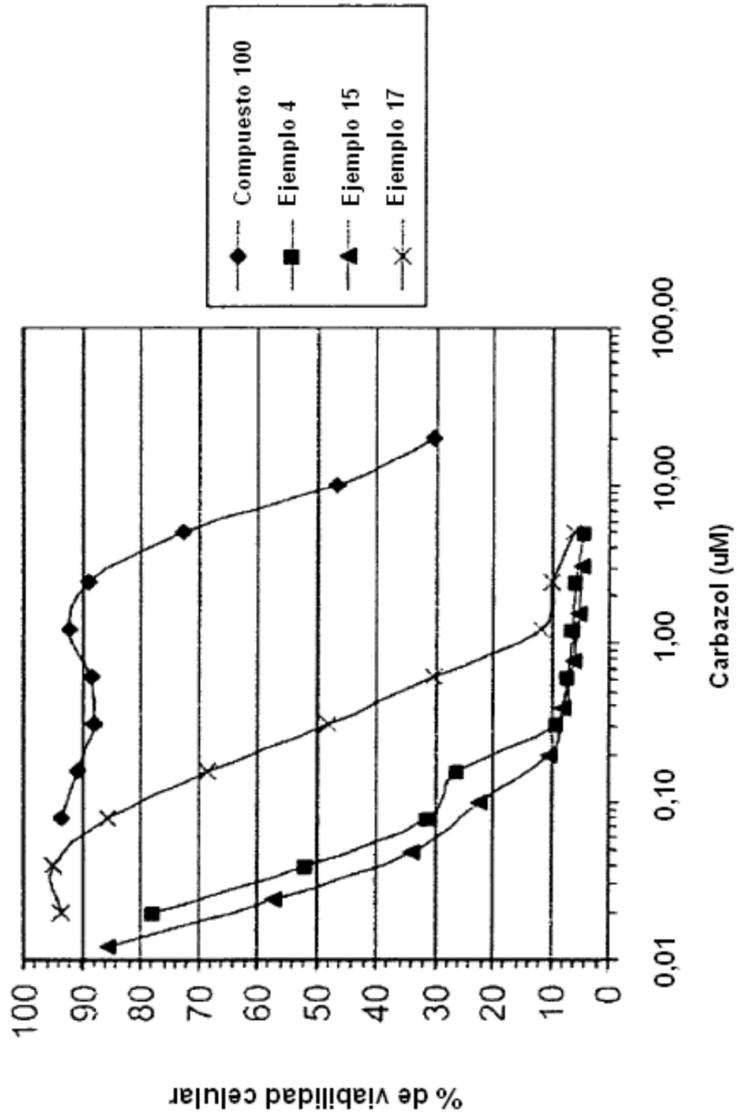


FIG. 2g

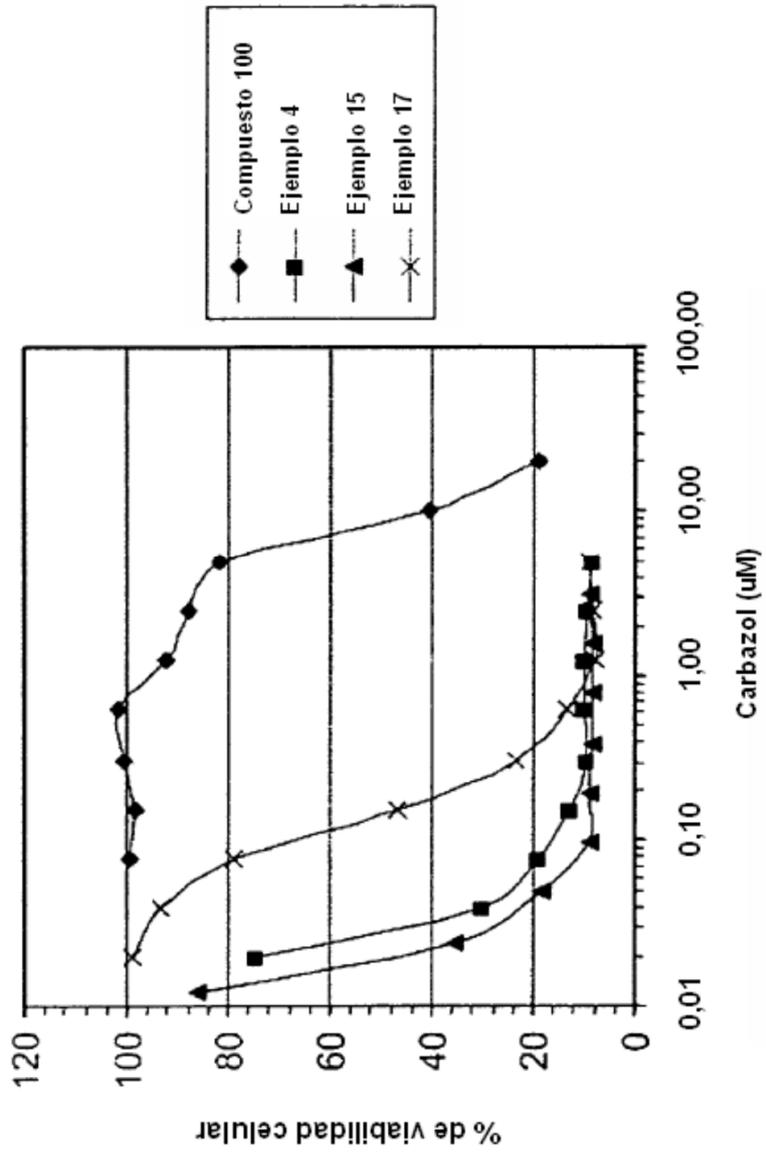


FIG. 2h

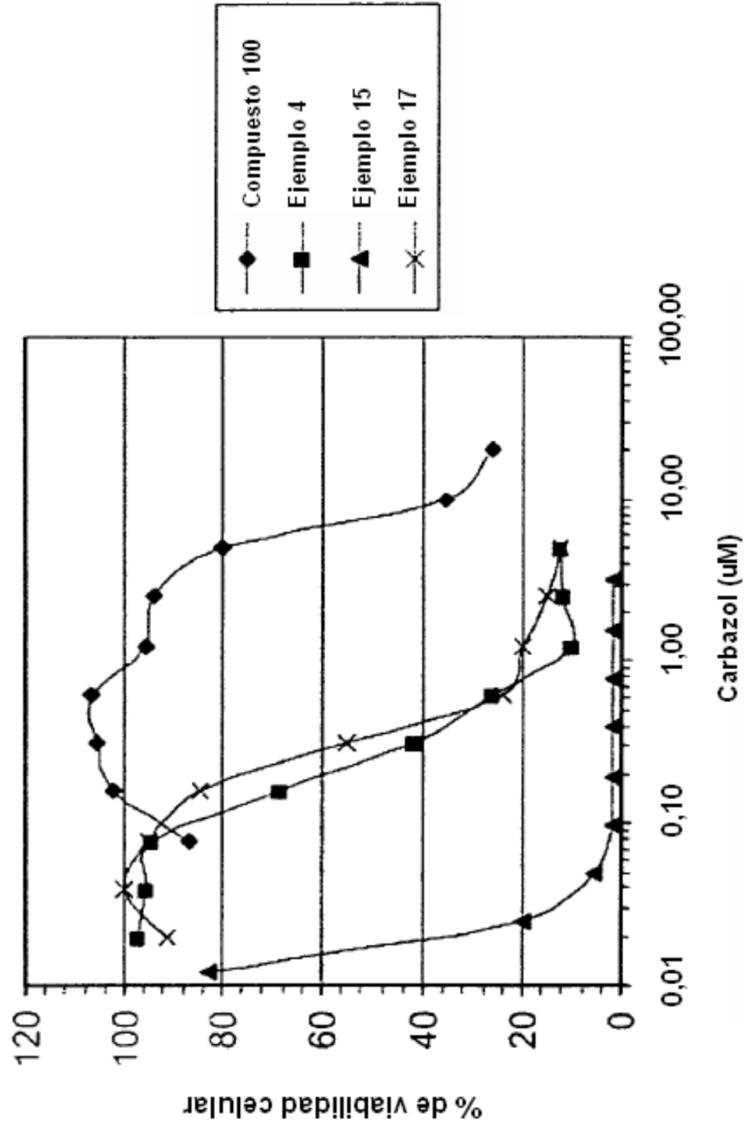
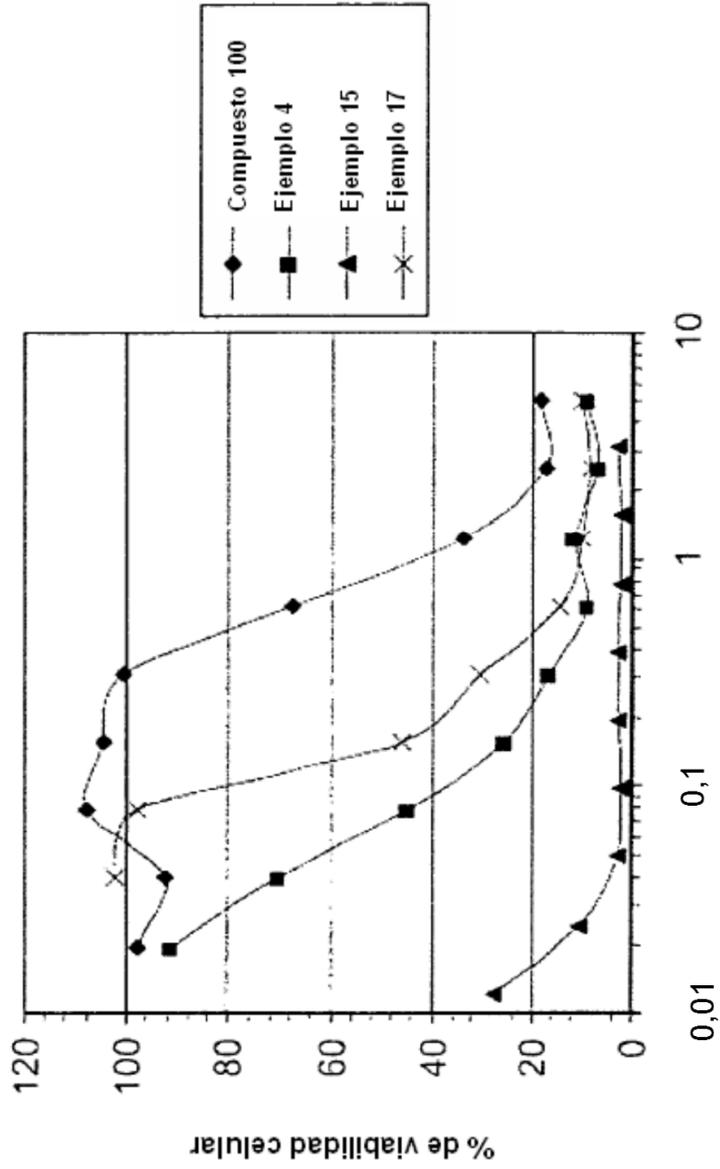


FIG. 2i



Carbazol (µM)

FIG. 2j

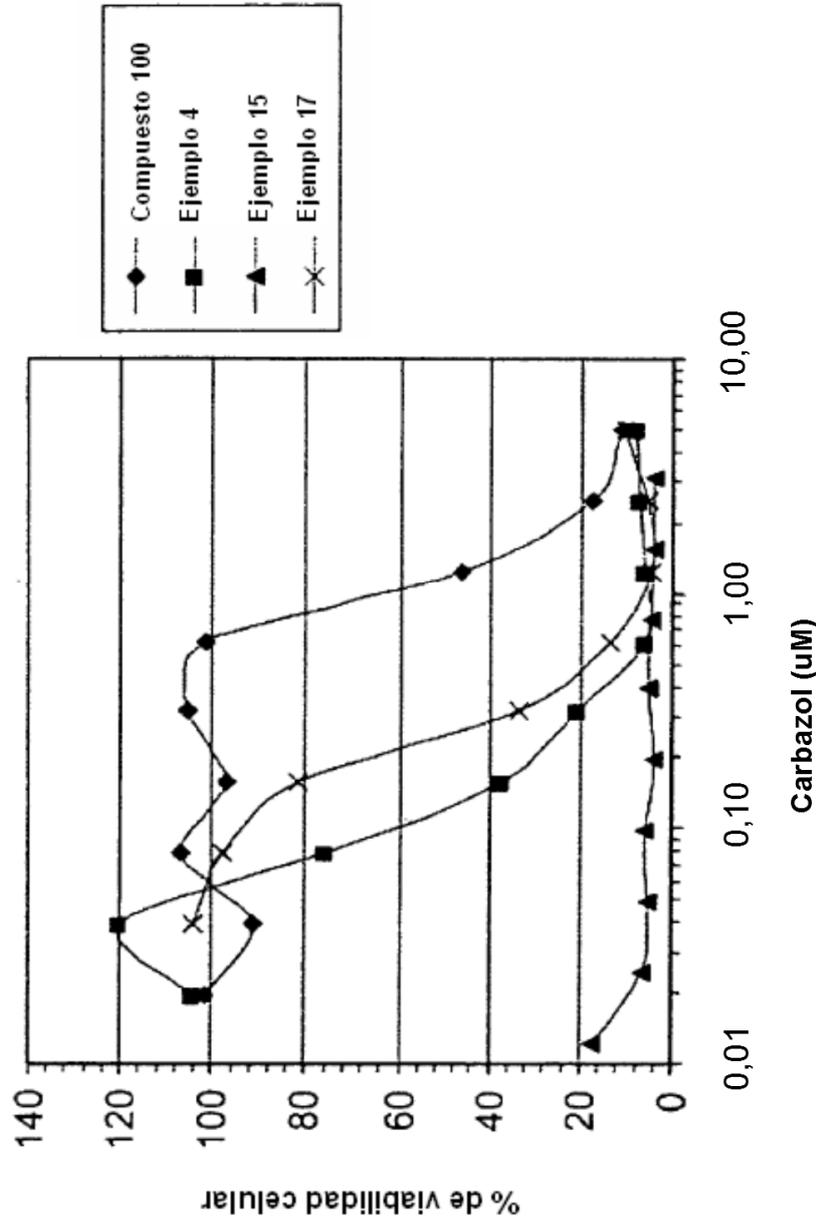
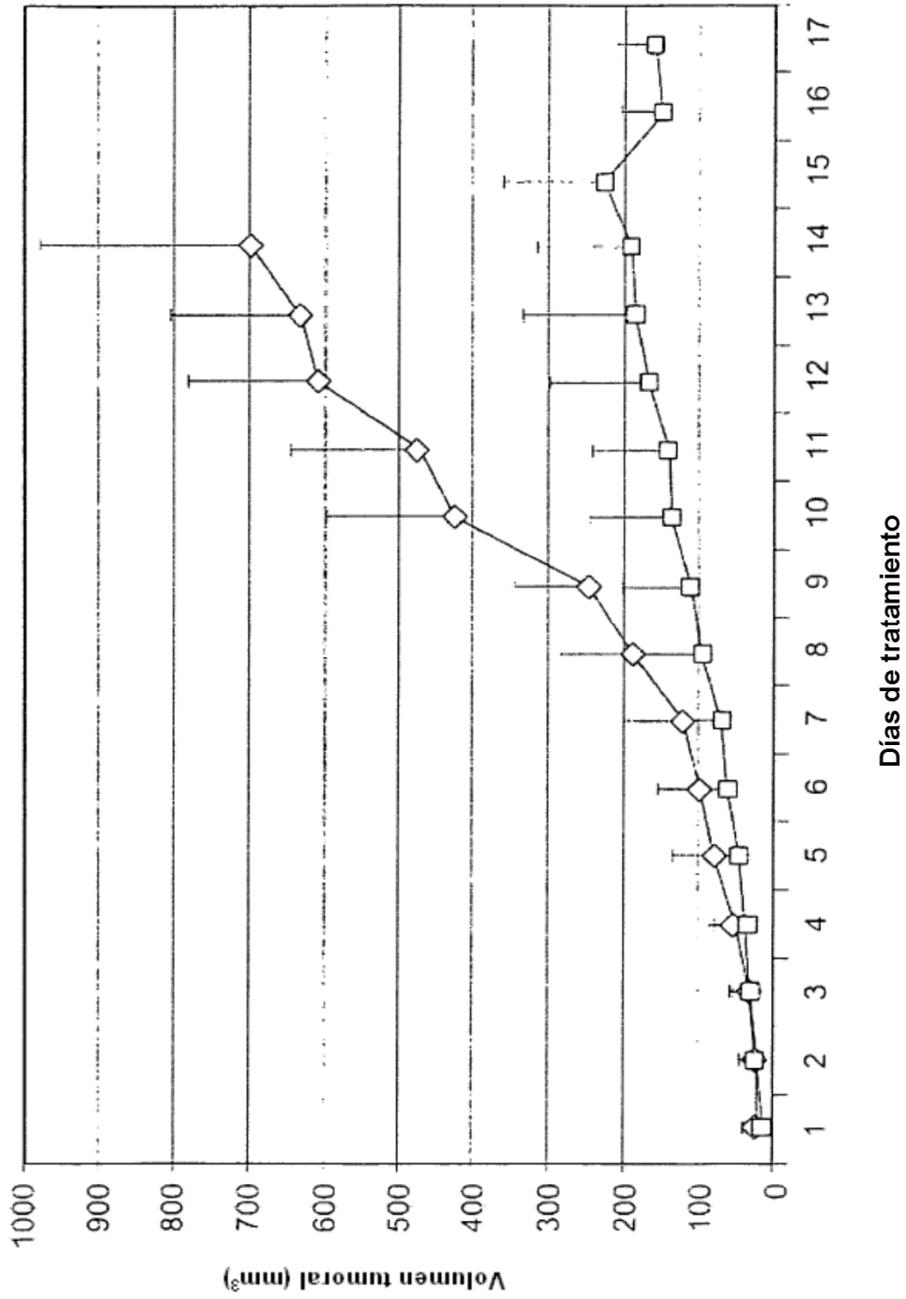
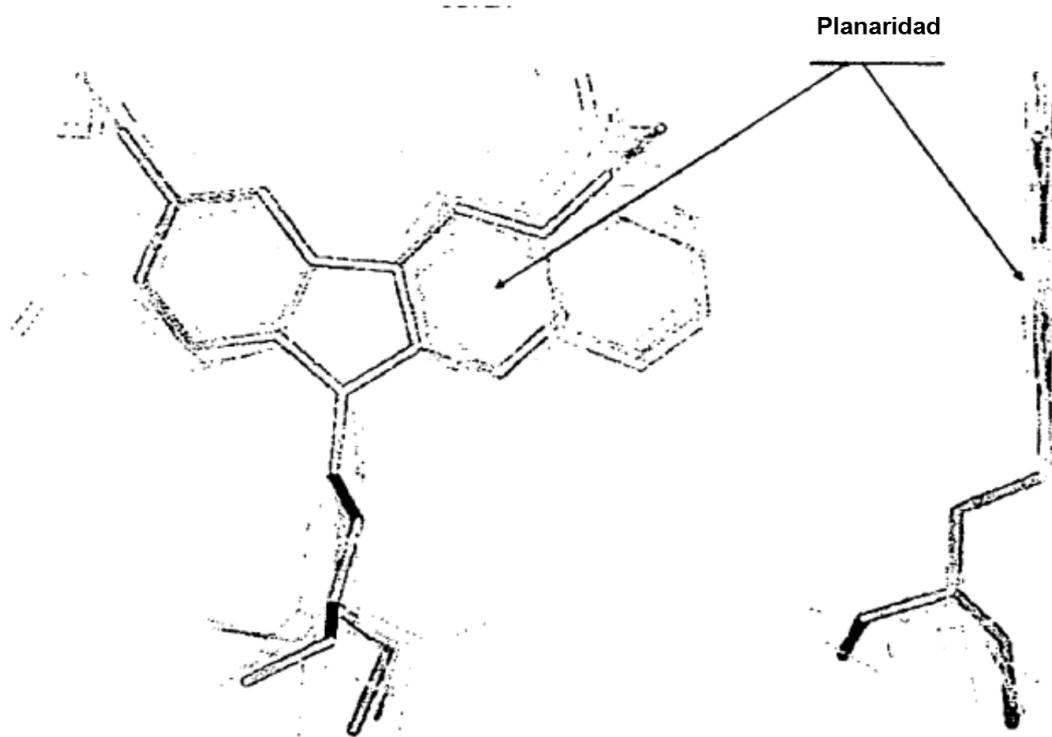


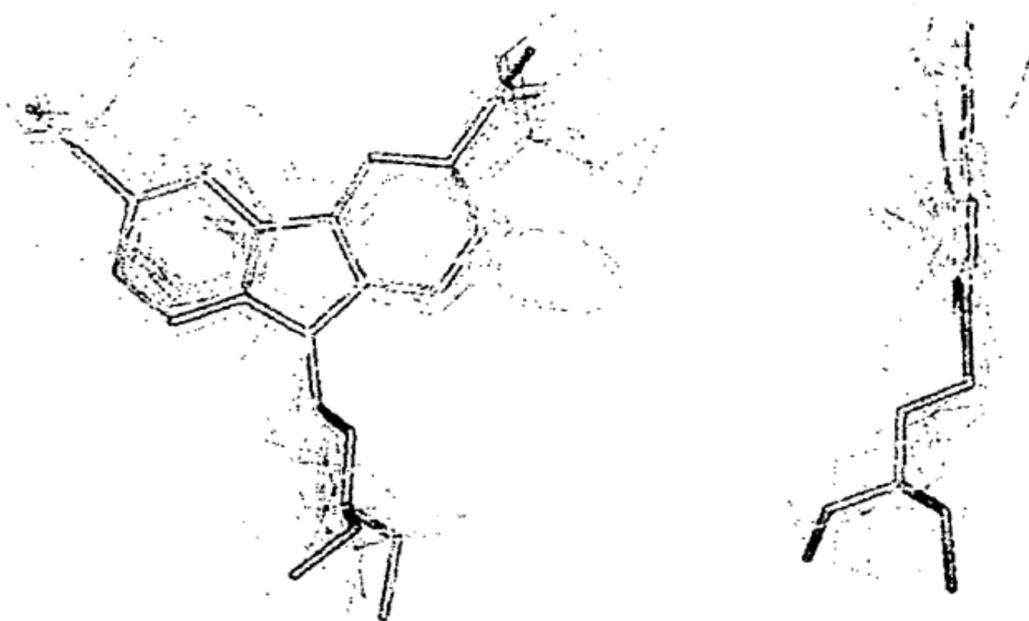
FIG. 2k

FIG. 3

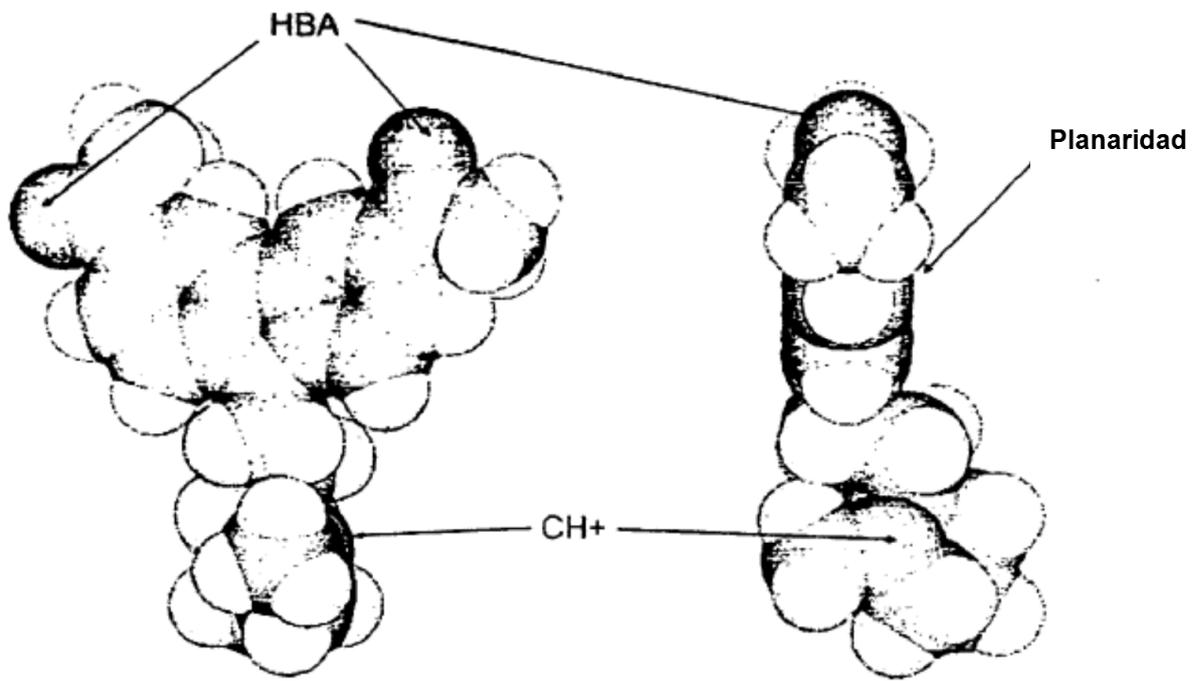




**FIG. 4**



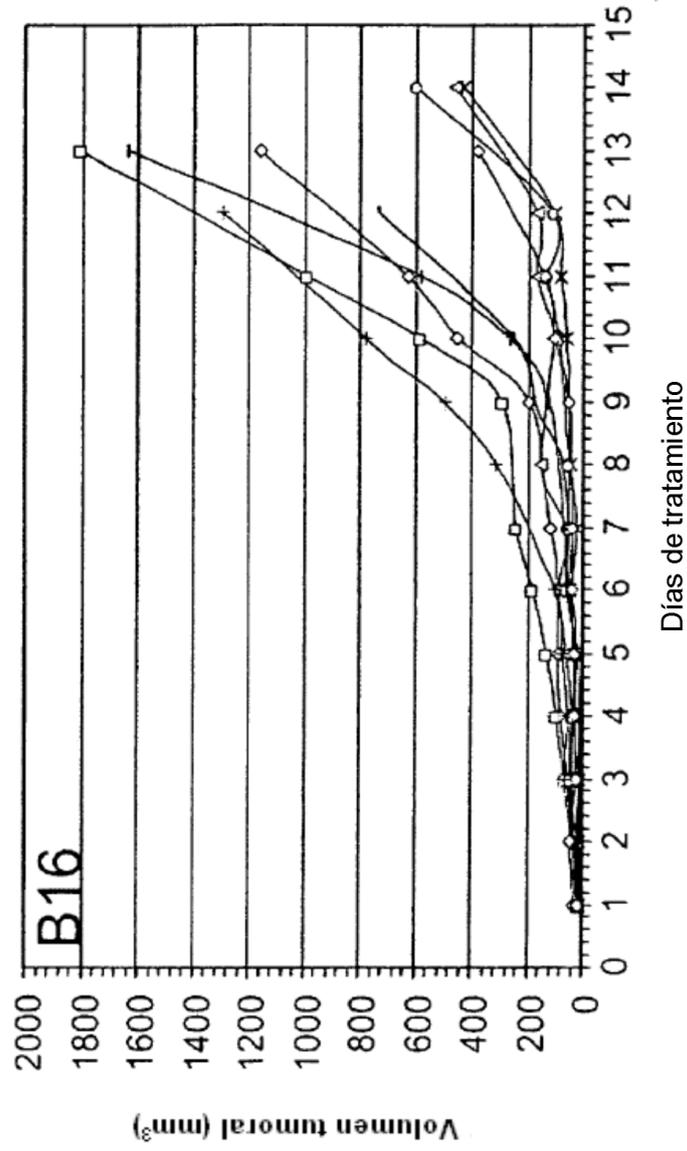
**FIG. 5**



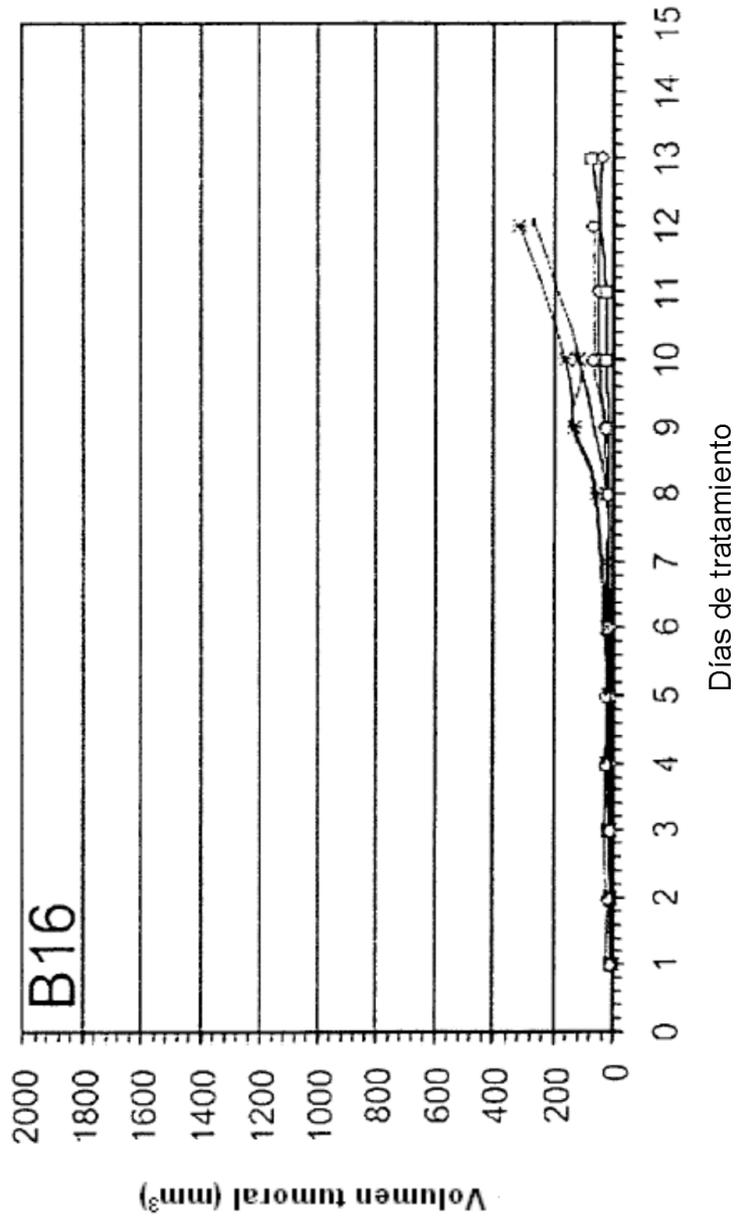
**FIG. 6**



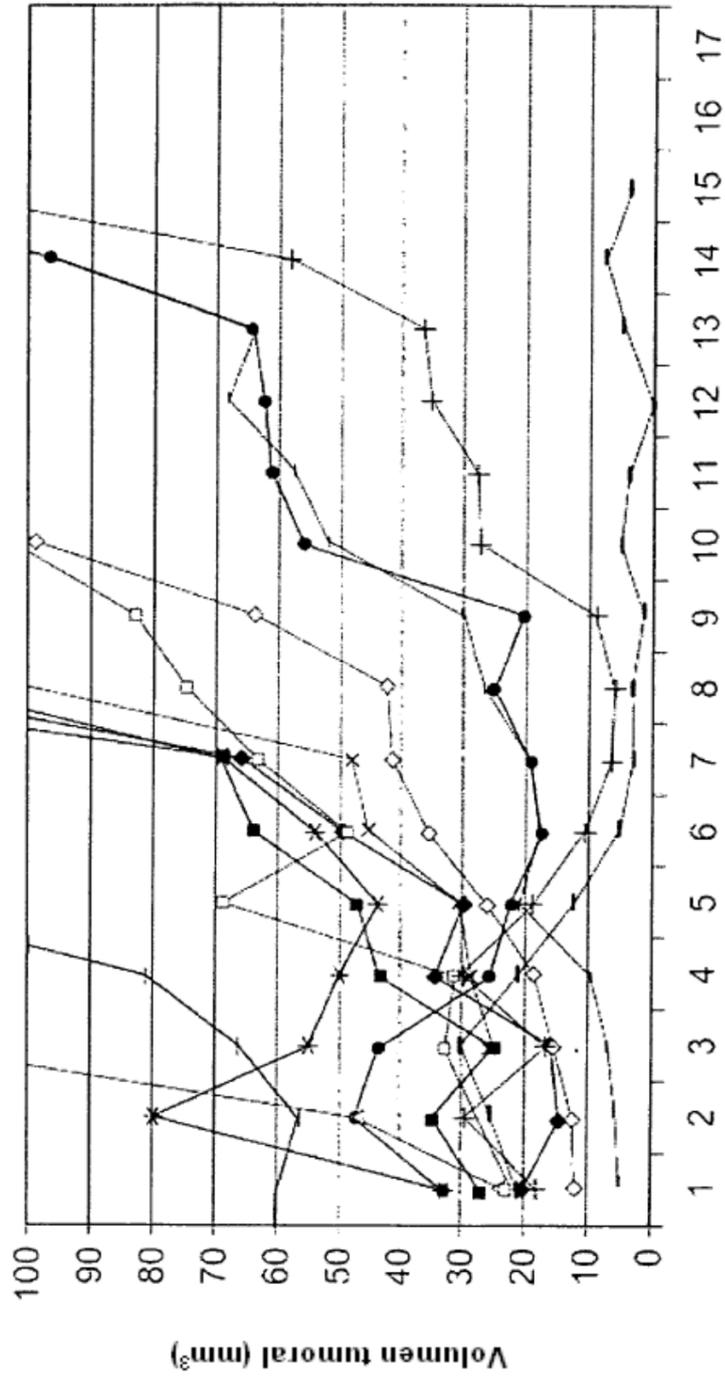
**FIG. 7**



**FIG. 8a**

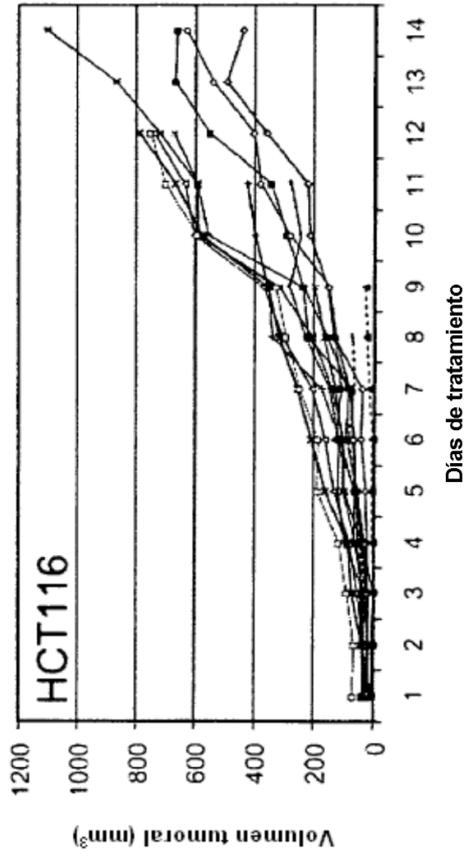


**FIG. 8b**

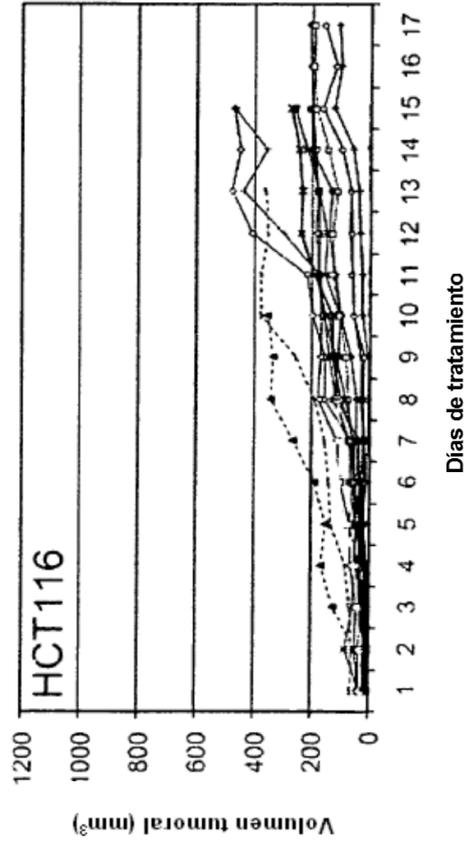


Días de tratamiento

**FIG. 9a**



**FIG. 9b**



**FIG. 9c**

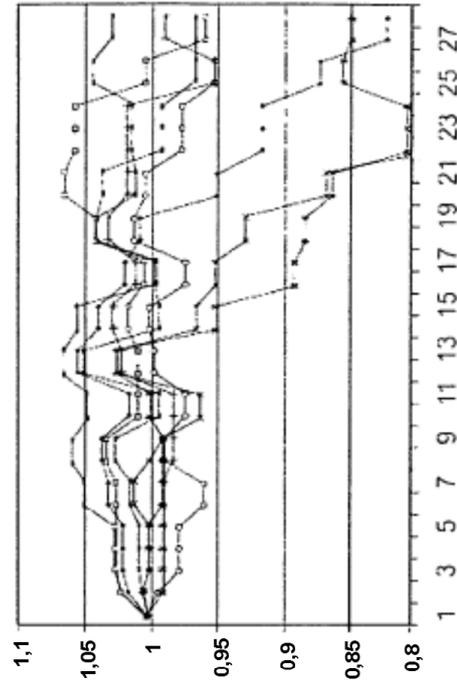


FIG. 10A

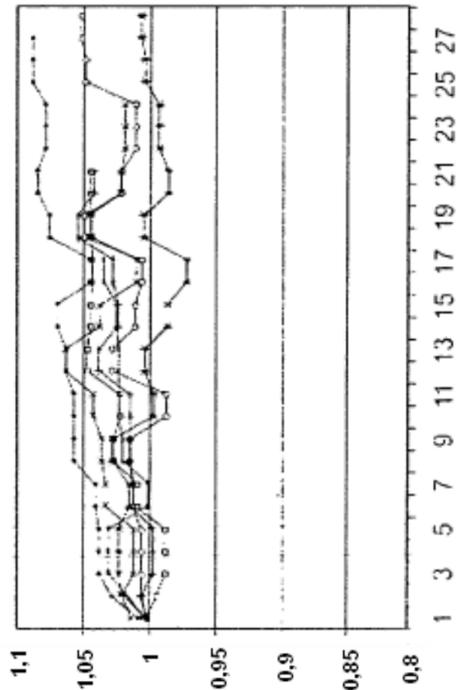
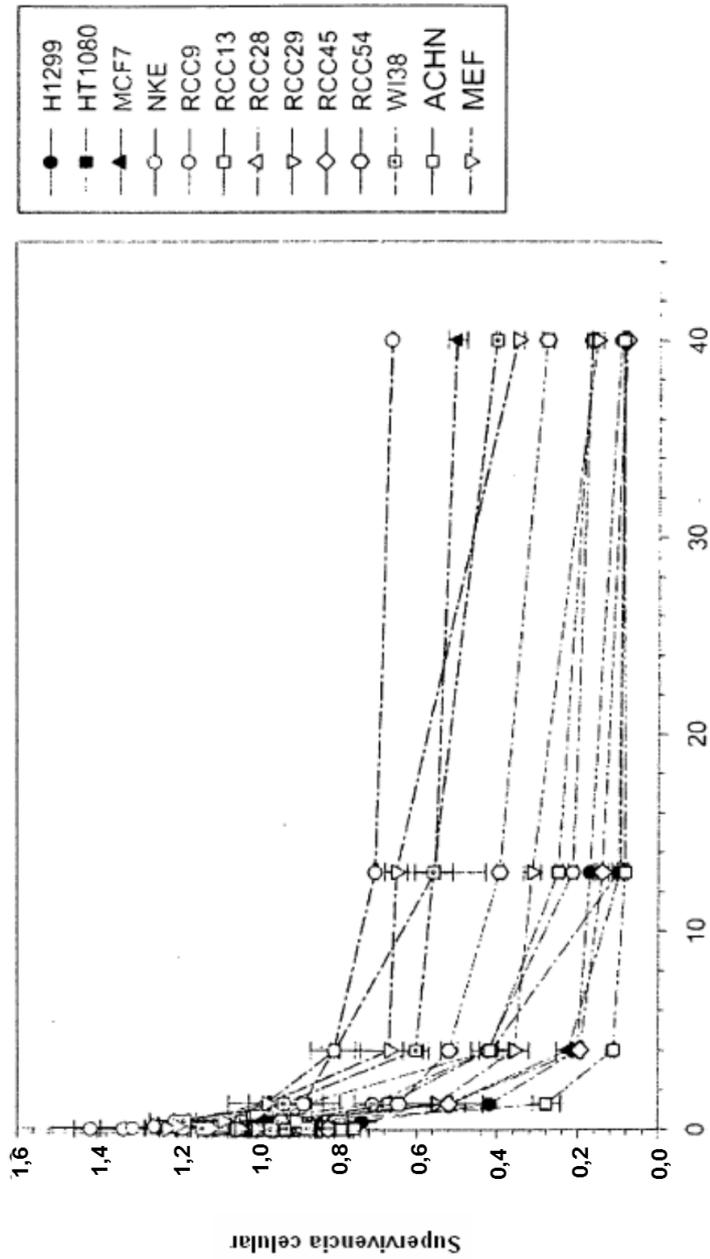


FIG. 10A



Compuesto 100 (µM)

FIG. 11

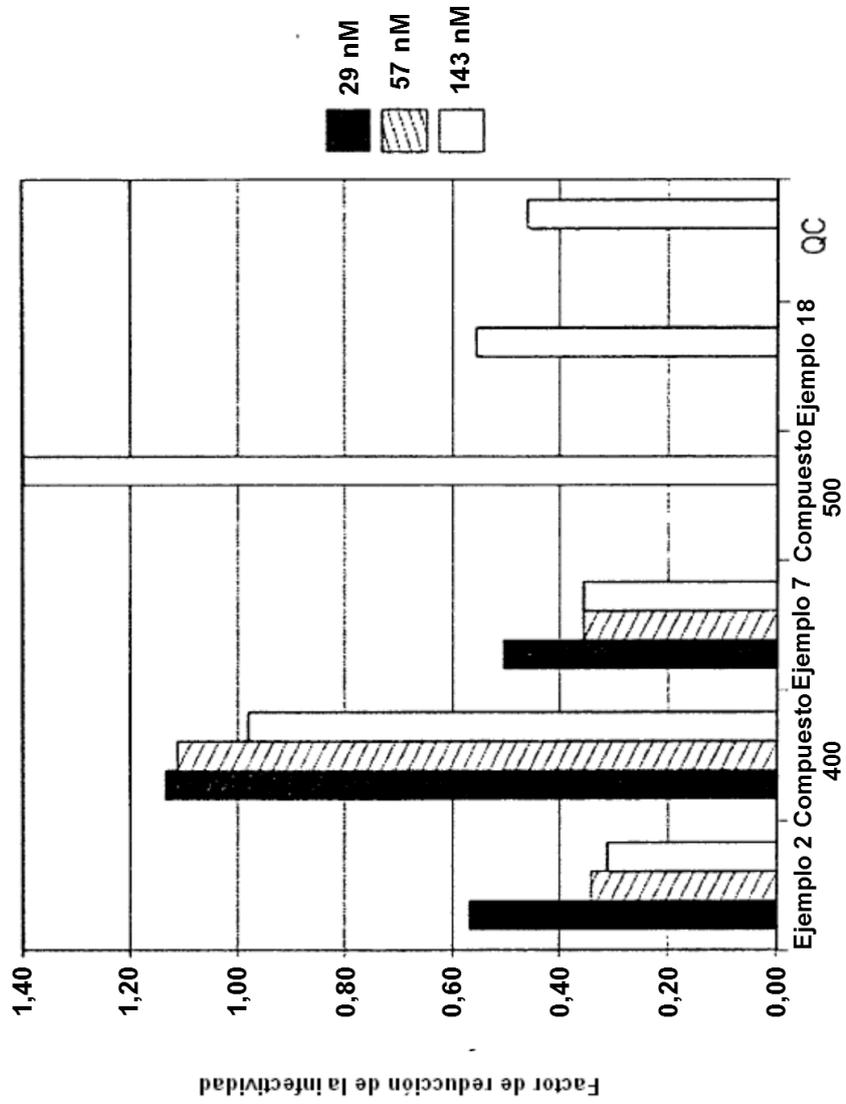


FIG. 12

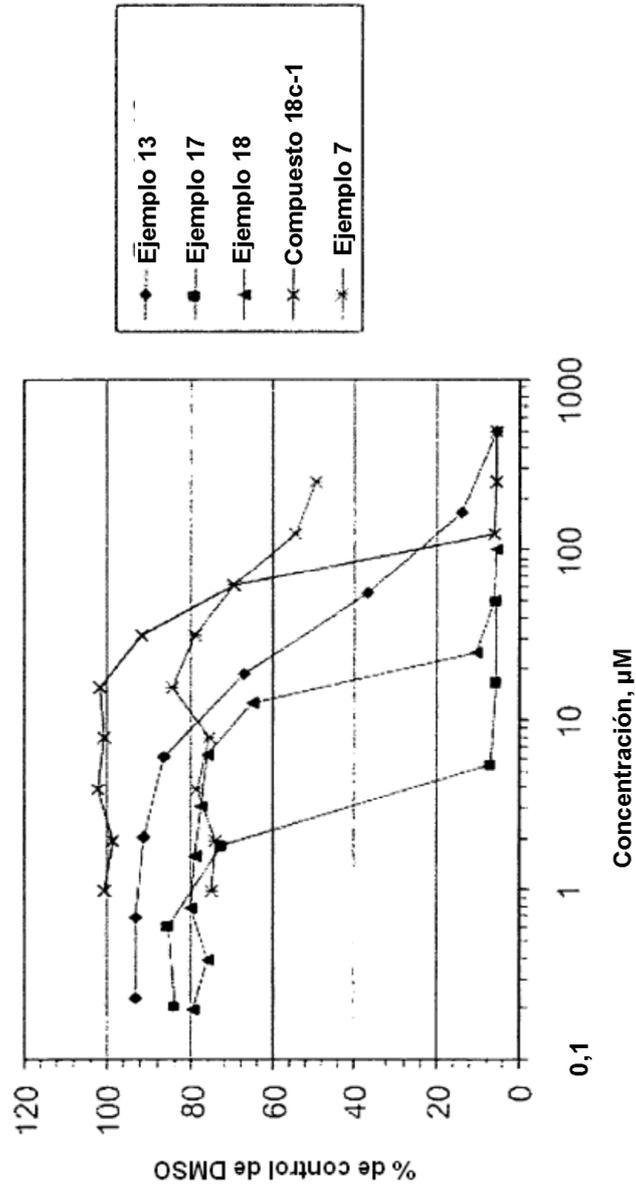


FIG. 13a

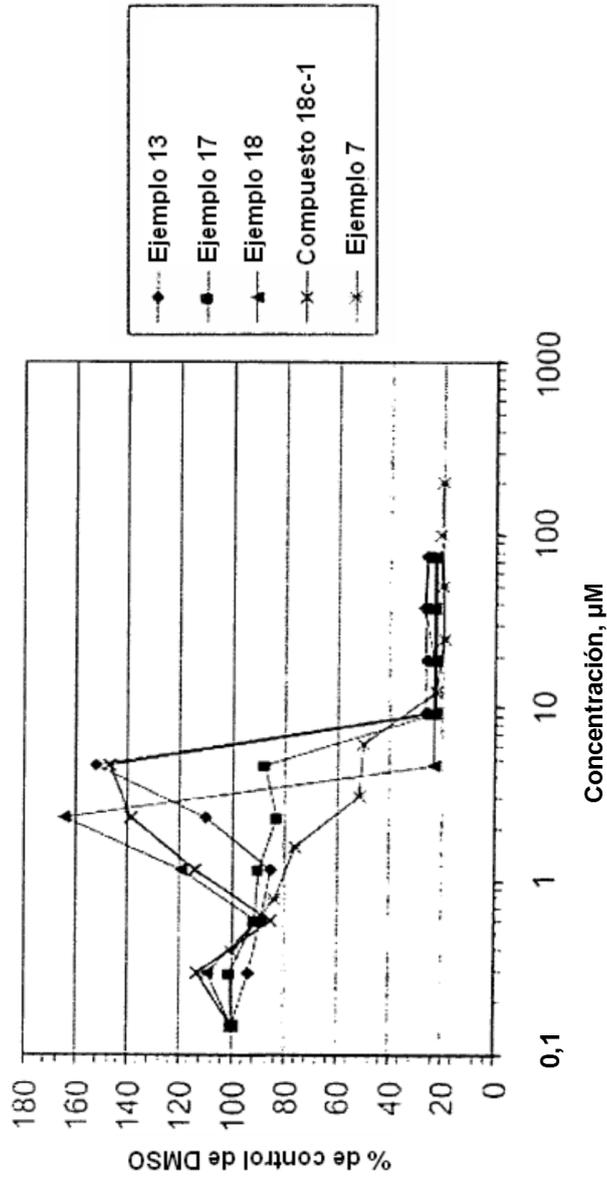


FIG. 13b