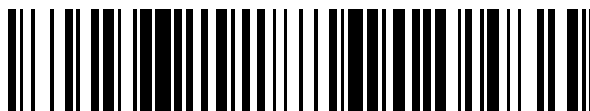


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 351**

51 Int. Cl.:

C07D 225/06 (2006.01)

C07D 211/60 (2006.01)

C07D 498/08 (2006.01)

C07F 5/02 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2004 E 04817048 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1716119**

54 Título: **Análogos de ansamicinas que contienen benzoquinona para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

23.12.2003 US 532080 P 29.01.2004 US 540142 P
23.02.2004 US 547381 P 12.04.2004 US 561718 P
03.05.2004 US 567565 P 01.09.2004 US 606283 P
09.11.2004 US 626286 P 03.12.2004 US 632858 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2013

73 Titular/es:

INFINITY DISCOVERY, INC. (100.0%)
780 MEMORIAL DRIVE
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

ADAMS, JULIAN;
GAO, YUN;
GEORGES EVANGELINOS, ASIMINA T;
GRENIER, LOUIS;
PAK, ROGER H;
PORTER, JAMES R y
WRIGHT, JAMES L

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 409 351 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de ansamicinas que contienen benzoquinona para el tratamiento de cáncer

5 **Antecedentes de la invención**

La geldanamicina es un lactamo macrocíclico que es un miembro de la familia de productos naturales de las ansamicinas que contienen benzoquinona. El aislamiento, preparación y los diversos usos de la geldanamicina se describen en la Patente de Estados Unidos N° 3.595.955. Al igual que la mayoría de los miembros de origen natural de esta clase de moléculas, la geldanamicina se produce típicamente como un producto de fermentación de *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus var. nova strain* (Journal of Antibiotics Vol. 23, Página 442 (1970)). Otros análogos y derivados de la geldanamicina se han identificado o sintetizado y su uso como agentes antitumorales se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.261.989 y 5.387.584 y en las solicitudes PCT publicadas WO 00/03737 y WO 03/072794. Un miembro de esta familia que se ha examinado con cierto detalle es 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina ("17-AAG"). Se ha demostrado que la geldanamicina y sus derivados se unen a HSP90 y antagonizan la actividad de las proteínas.

La HSP90 es una proteína muy abundante que es esencial para la viabilidad celular y presenta doble función como proteína acompañante (J. Cell Biol. (2001) 154: 267-273, Trends Biochem. Sci. (1999) 24: 136-141). Desempeña una función clave en la respuesta al estrés celular interactuando con muchas proteínas después de haberse modificado su conformación natural mediante diversos estreses ambientales tales como choque térmico, garantizando el plegamiento adecuado de la proteína e impidiendo la agregación no específica (Pharmacological Rev. (1988) 50: 493-513). Además, resultados recientes sugieren que la HSP90 también puede desempeñar una función amortiguando contra los efectos de mutaciones, presumiblemente corrigiendo el plegamiento inapropiado de proteínas mutantes (Nature (1998) 396: 336-342). Sin embargo, la HSP90 también tiene una importante función reguladora en condiciones fisiológicas normales y es responsable de la estabilidad conformacional y maduración de diversas proteínas cliente específicas, de las cuales se conocen aproximadamente 40 (véase, Expert. Opin. Biol Ther. (2002) 2(1): 3-24). Éstas pueden subdividirse en tres grupos: receptores de hormonas esteroideas, serina/treonina o tirosinas quinasas y un conjunto de proteínas aparentemente no relacionadas, incluyendo la p53 mutante y la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT. Todas estas proteínas desempeñan funciones reguladoras en procesos fisiológicos y bioquímicos en la célula.

Los antagonistas de HSP90 se están actualmente explorando en una gran cantidad de contextos biológicos en los que puede obtenerse un efecto terapéutico durante una afección o trastorno inhibiendo uno o más aspectos de la actividad de HSP90. Aunque el enfoque principal ha sido en trastornos proliferativos, tal como cánceres, otras afecciones están demostrando niveles de tratamiento usando antagonistas de HSP90. Por ejemplo, la Solicitud de Patente publicada de Estados Unidos 2003/0216369, divulga el uso de inhibidores de HSP90 para el tratamiento de trastornos virales. Los inhibidores de HSP90 también se han implicado en una amplia diversidad de otras utilidades, incluyendo su uso como agentes antiinflamatorios, agentes para el tratamiento de autoinmunidad, agentes para el tratamiento de ictus, isquemia, trastornos cardiacos y agentes útiles para promover la regeneración de nervios (Véanse, por ejemplo, los documentos WO 02/09696(PCT/US01/23640); WO 99/51223 (PCT/US99/07242); las Patentes de Estados Unidos 6.210. 974 B1 y 6.174.875). En la bibliografía existen informes en los que los trastornos fibrogenéticos que incluyen, pero sin limitación, esclerodermia, polimiositis, lupus sistémico, artritis reumatoide, cirrosis hepática, formación de queloides, nefritis intersticial y fibrosis pulmonar pueden tratarse usando inhibidores de HSP90 (Strehlow, WO 02/02123; PCT/US01/20578).

La fuerza nanomolar y la selectividad aparente de la geldanamicina para destruir células tumorales, así como el descubrimiento de que su diana principal en células mamíferos es la HSP90, ha suscitado interés en su desarrollo como un fármaco contra el cáncer. Sin embargo, la extremadamente baja solubilidad de estas moléculas y la asociación de hepatotoxicidad con la administración de la geldanamicina ha conducido a dificultar el desarrollo de un agente aprobable para aplicaciones terapéuticos. En particular, la geldanamicina es poco soluble en agua, haciendo que sea difícil de administrar en dosis terapéuticamente eficaces.

Más recientemente, la atención se ha centrado en derivados 17-amino de geldanamicina, en particular la 17-AAG, que presenta hepatotoxicidad reducida conservando al mismo tiempo la unión a HSP90. Véanse las Patentes de Estados Unidos Nos 4.261.989; 5.387.584; y 5.932.566. Al igual que la geldanamicina, la 17-AAG tiene una solubilidad acuosa muy limitada. Esta propiedad requiere el uso de un vehículo solubilizante, por ejemplo, fosfolípido de huevo con DMSO, o Cremophore® (BASK Aktiengesellschaft), un aceite de ricino polietoxilado; en algunos pacientes, la presencia de cualquiera de estos vehículos produce graves reacciones secundarias. Por consiguiente, aún existe una necesidad de descubrir análogos más solubles de ansamicinas que contienen benzoquinona y procedimientos específicos y generales para crearlas, particularmente geldanamicina y sus análogos, tales como 17-AAG.

El documento WO 95/01342 describe derivados de ansamicina, sales y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos son útiles inhibiendo productos oncogénicos y como agentes antitumorales y anticancerosos.

El documento WO 03/013430 describe análogos de ansamicina que contienen benzoquinona útiles para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades o afecciones caracterizadas por proliferación celular o hiper proliferación no deseada.

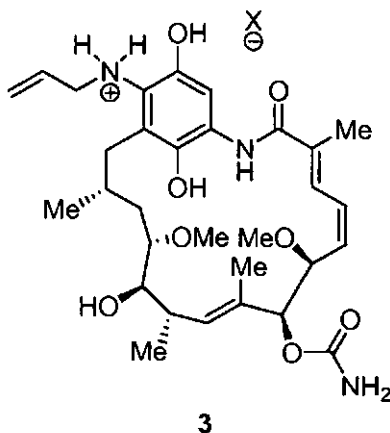
- 5 El documento GB 2.106.111 describe derivados de macbeina y su producción. Los derivados son útiles como agentes antibacterianos, antifúngicos o antiprozoarios.

10 El documento WO 93/14215 describe un proceso para la fermentación y aislamiento de la 4,5-dihidrogeldanicina y su hidroquinona. Se espera que los compuestos sean útiles contra determinados microorganismos y que tengan utilidad como agentes inmunosupresores contra enfermedades autoinmunes.

Sumario de la invención

15 La presente divulgación proporciona formas reducidas de ansamicinas que contienen benzoquinona, y sales de las mismas en forma aislada y en preparaciones farmacéuticas y usos de las mismas para el tratamiento y modulación de trastornos, tales como el cáncer, asociados con hiper proliferación. Generalmente, la presente divulgación proporciona formas farmacológicas estables, solubles, de ansamicinas que contienen benzoquinona. La presente divulgación proporciona análogos reducidos de ansamicinas que contienen benzoquinona, tales como análogos 17-amino sustituidos de geldanicina en forma aislada y en preparaciones farmacéuticas, donde la benzoquinona está reducida a una hidroquinona y atrapada en una forma estable al aire y aislada, tal como una sal de HCl o H₂SO₄. Como alternativa, las hidroquinonas pueden atraparse como co-sales con un aminoácido tal como glicina. Dichos análogos son extraordinariamente solubles en agua (1-3 órdenes de magnitud más solubles que la forma no reducida, por ejemplo, 35 µg/ml para la 17-AAG frente a 1-3 mg/ml para la hidroquinona de 17-AAG y > 200 mg/ml para sales de derivados de hidroquinona de 17-AAG) y estables; y también pueden aislarse y formularse para la administración a seres humanos sin los problemas asociados con la formulación, conservación e inestabilidad de las formas precursoras no reducidas y otras formulaciones de ansamicinas.

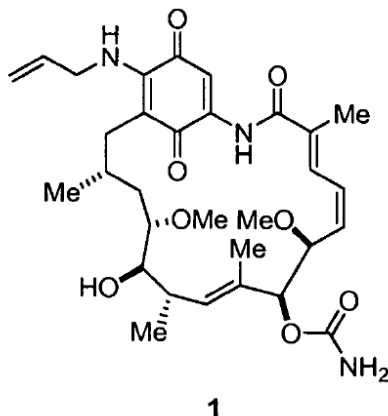
En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto puro y aislado de: fórmula 3:



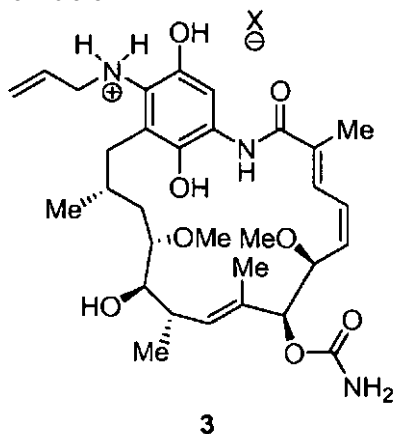
30 donde X- es una base conjugada de un ácido farmacéuticamente aceptable.

En una realización, X- se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro, bromuro, yoduro, H₂PO₄⁻, HSO₄⁻, metilsulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, trifluorometilsulfonato y 10-alcanforsulfonato, naftalen-1-ácido sulfónico-5-sulfonato, etan-1-ácido sulfónico-2-sulfonato, sal del ácido ciclámico, sal del ácido tiocianico, naftalen-2-sulfonato y oxalato.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar un compuesto de fórmula 3 que comprende: combinar un compuesto de fórmula 1:



5 con un agente reductor en un disolvente de reacción, seguido de tratamiento con un ácido farmacéuticamente aceptable para dar dicho compuesto de fórmula 3:



donde

X- es una base conjugada de un ácido farmacéuticamente aceptable.

10 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co Acetato de Dimetilamino de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

15 La **Figura 2** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co Acetato de Dimetilamino de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

La **Figura 3** representa un espectro de RMN ¹H de la sal-Co α-Aminoisobutirato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

20 La **Figura 4** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co de α-Aminoisobutirato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

25 La **Figura 5** representa un espectro de masas de un análisis LCMS de la sal-Co de α-Aminoisobutirato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

La **Figura 6** representa un espectro de RMN ¹H de la sal-Co β-Alanina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

30 La **Figura 7** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co de β-Alanina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

La **Figura 8** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co de β-Alanina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

35 La **Figura 9** representa un espectro de RMN ¹H de la sal-Co N-Metil Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG

preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 6.

La **Figura 10** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co de N-Metil Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 6.

5 La **Figura 11** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co de N-Metil Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 6.

10 La **Figura 12** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co Carboxilato de Piperidina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

La **Figura 13** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co Carboxilato de Piperidina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

15 La **Figura 14** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co Carboxilato de Piperidina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

20 La **Figura 15** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co Carboxilato de Piperidina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

La **Figura 16** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 8.

25 La **Figura 17** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 8.

La **Figura 18** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 8.

30 La **Figura 19** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co 2-Amino-2-etil-butirato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

35 La **Figura 20** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co 2-Amino-2-etil-butirato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

La **Figura 21** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co 2-Amino-2-etil-butirato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

40 La **Figura 22** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co 1-Amino-Ciclopropanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 10.

La **Figura 23** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co 1-Amino-Ciclopropanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 10.

45 La **Figura 24** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co 1-Amino-Ciclopropanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 10.

50 La **Figura 25** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co Carboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 11.

La **Figura 26** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co Carboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 11.

55 La **Figura 27** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co Carboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 11.

La **Figura 28** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co 1-Amino-ciclopentanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 12.

60 La **Figura 29** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co 1-Amino-ciclopentanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 12.

La **Figura 30** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co 1-Amino-ciclopentanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 12.

65 La **Figura 31** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co N-Metil Piperidincarboxilato de la Hidroquinona de

17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 13.

La **Figura 32** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal-Co N-Metil Piperidinacarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 13.

5

La **Figura 33** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la sal-Co N-Metil Piperidinacarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 13.

La **Figura 34** representa un espectro de RMN ^1H de la sal-Co N,N,N-Trimetilamonio Acetato de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 14.

10

La **Figura 35** representa un espectro de RMN ^1H de los derivados de Hidroquinona estables en aire de Geldanamicina 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 15.

15

La **Figura 36** representa un espectro de RMN ^1H de la sal de HCl del Derivado de Hidroquinona de Geldanamicina 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 17.

La **Figura 37** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la sal de HCl de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 17.

20

La **Figura 38** representa un espectro de RMN ^1H de la sal de H_2SO_4 del Derivado de Hidroquinona de Geldanamicina 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 18.

La **Figura 39** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la Sal de H_2SO_4 de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 18.

25

La **Figura 40** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal de H_2SO_4 de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 18.

La **Figura 41** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la Sal del ácido *p*-Toluenosulfónico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.

30

La **Figura 42** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal del ácido *p*-Toluenosulfónico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.

35

La **Figura 43** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal del Ácido *p*-Toluenosulfónico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.

La **Figura 44** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la Sal del Ácido *d*-Alcanforsulfónico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 20.

40

La **Figura 45** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal del Ácido *d*-Alcanforsulfónico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 20.

La **Figura 46** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal del Ácido *d*-Alcanforsulfónico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 20.

45

La **Figura 47** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal del Ácido *d*-Alcanforsulfónico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 20.

50

La **Figura 48** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la Sal de H_3PO_4 de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 21.

La **Figura 49** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal de H_3PO_4 de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 21.

55

La **Figura 50** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la Sal de MeSO_3H de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 22.

La **Figura 51** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal de MeSO_3H de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 22.

60

La **Figura 52** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la Sal de PhSO_3H de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 23.

65

La **Figura 53** representa espectros de masas de un análisis LCMS de la Sal de PhSO_3H de la Hidroquinona de

17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 23.

La **Figura 54** representa un espectro de RMN ^1H del carbamato cíclico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 25.

La **Figura 55** representa cromatogramas de un análisis LCMS del carbamato cíclico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 25.

La **Figura 56** representa un espectro de masas de un análisis LCMS del carbamato cíclico de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 25.

La **Figura 57** representa un espectro de RMN ^1H de la lactama de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 26.

La **Figura 58** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la lactama de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 26.

La **Figura 59** representa un espectro de masas de un análisis LCMS de la lactama de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 26.

La **Figura 60** representa un espectro de RMN ^1H de un derivado de 17-amino de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 27.

La **Figura 61** representa cromatogramas de un análisis LCMS de un derivado de 17-amino de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 27.

La **Figura 62** representa un espectro de masas de un análisis LCMS de un derivado de 17-amino de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 27.

La **Figura 63** representa un espectro de RMN ^1H de un derivado de 17-(3-amin-propano-1,2-diol) de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 28.

La **Figura 64** representa cromatogramas de un análisis LCMS de un derivado de 17-(3-amin-propano-1,2-diol) de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 28.

La **Figura 65** representa un espectro de masas de un análisis LCMS de un derivado de 17-(3-aminopropano-1,2-diol) de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 28.

La **Figura 66** representa cromatogramas de un análisis LCMS de un derivado de BODIPY de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 29.

La **Figura 67** representa un espectro de masas de un análisis LCMS de un derivado de BODIPY de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 29.

La **Figura 68** representa un espectro de RMN ^1H de la Sal de HBr de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 31.

La **Figura 69** representa cromatogramas de un análisis LCMS de la Sal de HBr de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 31.

La **Figura 70** representa un espectro de masas de un análisis LCMS de la Sal de HBr de la Hidroquinona de 17-AAG preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 31.

Descripción detallada de la invención

Generalidades

La presente descripción proporciona formas reducidas, puras y aisladas, de análogos de ansamicinas que contienen benzoquinona, sus sales y productos intermedios. La presente descripción también proporciona métodos para el uso de estos compuestos en el tratamiento de enfermedades o afecciones caracterizadas por híper proliferación celular no deseada, tales como cánceres, así como otras afecciones y trastornos asociados con actividad no deseada de HSP90 o en la que la HSP90 desempeña una función en las células implicada en causar el trastorno. La presente divulgación proporciona análogos reducidos de ansamicinas que contienen benzoquinona donde la benzoquinona se reduce a una hidroquinona y preferentemente una forma salina aislada y purificada. En una realización alternativa un compuesto de la presente divulgación está co-cristalizado con una sal de aminoácido. Dichos análogos, con o sin la sal de aminoácido son extraordinariamente solubles en agua (1-3 órdenes de magnitud mayor de solubilidad que la

forma no reducida, por ejemplo, 35 µg/ml para la 17-AAG frente a 1-3 mg/ml para la hidroquinona de 17-AAG y >200 mg/ml para la sal de la hidroquinona) y estables a temperatura ambiente; y pueden aislarse y formularse para la administración en seres humanos sin los problemas asociados con la formulación, conservación e inestabilidad de las formas precursoras no reducidas y otras formulaciones de ansamicinas.

5

Definiciones

Las definiciones de los términos usados en el presente documento pretenden incorporar las definiciones del presente estado de la técnica reconocidas para cada término en los campos de la química y la farmacéutica. Cuando es conveniente, se proporciona una ilustración. Las definiciones se aplican a los términos según se usan a lo largo de la presente memoria, a menos que se limiten de otra forma en casos específicos, tanto individualmente o como parte de un grupo más grande.

10

Quando la estereoquímica no se indica específicamente, todos los estereoisómeros de los compuestos de la invención se incluyen dentro del alcance de la invención, en forma de compuestos puros o como mezclas de los mismos. A menos que se indique otra cosa, todos los enantiómeros individuales, diastereómeros, isómeros geométricos y combinaciones y mezclas de los mismos están incluidos por la presente invención. Las formas cristalinas polimórficas y solvatos también están abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

15

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a moléculas que contiene un resto de ácido carboxílico y un resto amino. Los restos ácido carboxílico y amino son como se definen a continuación. Los aminoácidos que aparecen en la naturaleza y los derivados sintéticos están incluidos en el alcance de la presente invención.

20

Como se usa en el presente documento, la expresión "benzoquinona ansamicina" se refiere a un compuesto que comprende una lactama macrocíclico, comprendiendo además una sola lactama en el anillo y un resto de benzoquinona en el anillo, donde dicho resto de benzoquinona tiene al menos un sustituyente nitrógeno, donde al menos uno de dichos sustituyentes de nitrógeno es parte de ese resto de amida único mencionado en el anillo lactama. Los ejemplos específicos de benzoquinona ansamicinas que aparecen en la naturaleza que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, geldanamicina y herbimicina. La expresión "análogo de geldanamicina" se refiere a una ansamicina benzoquinona que puede obtenerse a partir de geldanamicina por ejemplo, por manipulación química; por ejemplo 17-allamin-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) o 17-(2-dimetilaminoetil)amin-17-demetoxi-geldanamicina (17-DMAG).

30

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" en relación con un compuesto de la presente invención significa que el compuesto no está en una célula u organismo y que el compuesto está separado de algunos o de todos los componentes que típicamente lo acompañan en la naturaleza.

35

Como se usa en el presente documento, el término "puro" en relación con una muestra aislada de un compuesto de la presente invención significa que la muestra aislada tiene al menos un 60% en peso del compuesto. Preferiblemente, la muestra aislada contiene al menos un 70% en peso del compuesto. Más preferiblemente, la muestra aislada contiene al menos un 80% en peso del compuesto. Incluso más preferiblemente, la muestra aislada contiene al menos un 90% en peso del compuesto. Más preferiblemente, la muestra aislada contiene al menos un 95% en peso del compuesto. La pureza de una muestra aislada de un compuesto de la presente invención puede evaluarse por una diversidad de métodos o una combinación de los mismos; por ejemplo, cromatografía de capa fina, preparativa o ultrarrápida, análisis de espectrometría de masas, HPLC, RMN y similares.

40

45

Ciertos compuestos contenidos en las composiciones de la presente invención pueden existir en formas geométricas particulares o estereoisoméricas. Además, los polímeros de la presente invención también pueden ser ópticamente activos. La presente invención contempla todos estos compuestos, incluyendo isómeros *cis* y *trans*, enantiómeros *R* y *S*, diastereómeros, (D)-isómeros, (L)-isómeros, las mezclas racémicas de los mismos y otras mezclas de los mismos, puesto que entran dentro del alcance de la invención. Pueden estar presentes átomos de carbono asimétricos adicionales en un sustituyente, tal como un grupo alquilo. Todos estos isómeros, así como mezclas de los mismos, pretenden incluirse en la presente invención.

50

55

Si, por ejemplo, se desea un enantiómero en particular de un compuesto de la presente invención, puede prepararse por síntesis asimétrica o por derivación con un auxiliar quiral, donde la mezclas diastereoméricas resultantes se separa y el grupo auxiliar se escinde para proporcionar los enantiómeros puros deseados. Como alternativa, cuando la molécula contiene un grupo funcional básico, tal como amino, o un grupo funcional ácido, tal como carboxilo, se forman sales diastereoméricas con un ácido o base opcionalmente activo adecuado, seguido de resolución de los diastereómeros formados de esta manera por cristalización fraccionada o medios cromatográficos bien conocidos en la técnica, y posterior recuperación de los enantiómeros puros.

60

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal" se refiere a una sal de uno o más compuestos. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos incluyen sales de adición de ácidos que pueden, por ejemplo, formarse mezclando una solución del compuesto con una solución de un ácido farmacéuticamente

65

aceptable, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido carbónico o similares. Cuando los compuestos portan uno o más restos ácidos, pueden formarse sales farmacéuticamente aceptables por tratamiento de una solución del compuesto, con una solución de una base farmacéuticamente aceptable, tal como

5 hidróxido de litio, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de tetraalquilamonio, carbonato de litio, carbonato sódico, carbonato potásico, amoníaco, alquilaminas o similares.

La expresión "ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a ácidos orgánicos o inorgánicos que no muestran una toxicidad sustancial. Los ejemplos de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación ácido

10 clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fenilsulfónico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido benzoico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido carbónico y similares.

El término "sal-Co" o "co-cristal" se refiere a composiciones en las que está presente la forma de sal reducida de la ansamicina, con al menos otra sal, tal como una sal de un aminoácido.

15

El término "sujeto" como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, típicamente a un mamífero o a un ser humano, que será o ha sido objeto de tratamiento, observación y/o experimentación. Cuando el término se usa junto con la administración de un compuesto o fármaco, entonces el sujeto ha sido objeto de tratamiento,

20 observación y/o administración del compuesto o fármaco.

Las expresiones "co-administración" y "co-administrando" se refieren a administración simultánea (administración de dos o más agentes terapéuticos al mismo tiempo) y a administración variada con el tiempo (administración de uno o más agentes terapéuticos en un momento diferente al de la administración de un agente o agentes terapéuticos

25 adicionales), siempre que los agentes terapéuticos estén presentes en el paciente a cierto nivel al mismo tiempo.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca una respuesta biológica o medicinal en un cultivo celular, sistema tisular, animal, o ser humano que busca un investigador, veterinario, especialista clínico o facultativo, que

30 incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno a tratar.

El término "composición" pretende incluir un producto que comprenda los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, particularmente co-sales tales como la sal de

35 ansamicina reducida (por ejemplo, sulfato) con una sal de un aminoácido (por ejemplo, glicina).

La expresión "trastorno mediado por HSP90" o "trastorno mediado por células que expresan HSP90" se refiere a afecciones patológicas y enfermedades en las que la HSP90 desempeña una función. Dichas funciones pueden relaciones directamente con la afección patológica o pueden relacionarse indirectamente con la afección. La característica común con esta clase de afecciones es que la afección puede mejorarse inhibiendo la actividad,

40 función o asociación con otras proteínas de HSP90.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que se usa para preparar una forma de dosificación deseada un compuesto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o más disolventes, diluyentes u otros vehículos líquidos; auxiliares de dispersión o suspensión; agentes tensioactivos; agentes isotónicos; agentes espesantes o emulsionantes; conservantes; aglutinantes sólidos; lubricantes y similares. El documento Remington's Pharmaceutical Sciences, décimoquinta Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, Tercera Edición, A. H. Kibbe ed. (American Pharmaceutical Assoc. 2000), describe diversos vehículos usados en la formulación de composiciones

45 farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación.

50

Descripción de determinadas realizaciones preferidas

La presente invención aborda la necesidad de generar formas solubles de ansamicinas, particularmente miembros de las familias que contienen benzoquinona, tal como geldanamicina. Los miembros de estas clases de moléculas macrocíclicas tienden a ser muy insolubles, lo que conduce a malos perfiles como posibles fármacos (por ejemplo, la 17-AAG tiene una solubilidad de sólo 100 µg/ml en una solución acuosa). La presente invención resuelve estos problemas proporcionando esquemas de reacción generales que pueden usarse para crear análogos de estas moléculas que tienen solubilidad mejorada. Los esquemas de reacción incluyen la reducción de la quinona de dichas moléculas para formar una hidroquinona y atraparla como una sal, tal como una sal de HCl o H₂SO₄. De manera

55 extraordinaria, por ejemplo, la sal HCl de hidroquinona de 17-AAG tiene una solubilidad > de aproximadamente 200 mg/ml.

60

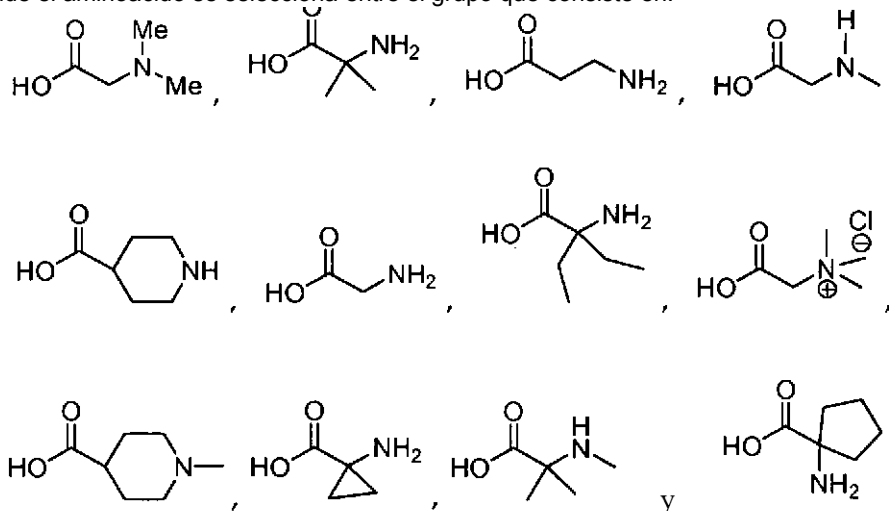
Compuestos

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto mencionado anteriormente y las consiguientes definiciones, donde X- es cloruro.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto mencionado anteriormente y las consiguientes definiciones, donde X- es bromuro.

10 En una realización, la presente invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de uno cualquiera de los mencionados anteriormente y un aminoácido.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y las consiguientes definiciones, donde el aminoácido se selecciona entre el grupo que consiste en:



15 Las composiciones de la presente invención existen en forma de sales de la ansamicina reducida, por ejemplo, sales de HCl o H₂SO₄. En otra realización los compuestos están co-cristalizados con otra sal, tal como un aminoácido, por ejemplo, glicina. En general, en estas realizaciones, la proporción de aminoácido con respecto a ansamicina puede variar, pero es preferiblemente de 2:1 a 1:2 de aminoácido:ansamicina.

Composiciones y Formulaciones

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, comprendiendo adicionalmente un antioxidante.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, comprendiendo adicionalmente un agente tamponante.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, comprendiendo adicionalmente un quelante metálico.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, comprendiendo adicionalmente un antioxidante; y un agente tamponante.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, comprendiendo adicionalmente un antioxidante; y un quelante metálico.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, comprendiendo adicionalmente un agente tamponante; y un quelante metálico.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, comprendiendo adicionalmente un antioxidante; un agente tamponante; y un quelante metálico.

- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde dicho antioxidante es ascorbato, clorhidrato de cisteína, bisulfito sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico, tioglicerol, mercaptoacetato sódico, sulfoxilato de formaldehído sódico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo o alfa-tocoferol.
- 5 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde dicho antioxidante es ascorbato.
- 10 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde dicho agente tamponante es citrato, ascorbato, fosfato, bicarbonato, carbonato, fumarato, acetato, tartarato, malato, succinato, lactato, maleato, glicina u otro α - o β -aminoácido natural.
- 15 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las definiciones consiguientes, donde dicho agente tamponante es citrato.
- 20 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde dicho quelante metálico es ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y su sal, DTPA (ácido dietilen-triamin-penta-acético) y su sal, EGTA y su sal, NTA (ácido nitriloacético) y su sal, sorbitol y su sal, ácido tartárico y su sal, N-hidroxiiminodiacetato y su sal, ácido hidroxietil-etilendiamin-tetraacético y su sal, ácido 1- y 3-propanodiamin tetra acético y sus sales, ácido 1- y 3-diamin-2-hidroxi propano tetra-acético y sus sales, gluconato sódico, ácido hidroxietano difosfónico y su sal, o ácido fosfórico y su sal.
- 25 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde dicho quelante metálico es EDTA.
- 30 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde dicho agente tamponante es citrato, dicho antioxidante es ascorbato y dicho metal quelante es EDTA.
- 35 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1.
- 40 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05.
- 45 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1.
- 50 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está presente en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1.
- 55 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho citrato con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2.
- 60 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho citrato con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1.
- 65 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1; y la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1.
- En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05; y la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está presente en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto 3 de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1; la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1; la proporción molar de dicho citrato con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05; la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está presente en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1; la proporción molar de dicho citrato con respecto a dicho compuesto de fórmula 3 está en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de una cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, comprendiendo adicionalmente un agente solubilizador.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición mencionada anteriormente y a las consiguientes definiciones, donde dicho agente solubilizador es ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, estearatos de polioxietileno, alcohol bencílico, alcohol etílico, polietilenglicoles, propilenglicol, glicerina, ciclodextrina o poloxámeros.

Métodos de Fabricación

Pueden adaptarse una diversidad de metodologías para generar los compuestos de la presente invención. En general, las etapas implican (1) convertir la ansamicina en un análogo de 17-demetoxy-17-amino (por ejemplo, 17-AAG), (2) reducir la benzoquinona en la ansamicina para dar una hidroquinona, y (3) tratar dicha hidroquinona con un ácido de Bronsted, proporcionando así un compuesto de la presente invención.

Una molécula macrocíclica que contiene benzoquinona, puede obtenerse por fermentación de una cepa, produciendo el compuesto (por ejemplo, véase el documento WO 03/072794 y la Patente de Estados Unidos 3.595.955). Como alternativa, puede usarse metodología sintética o semisintética para producir la ansamicina (véase Patente de Estados Unidos 5.387.584 y documento WO 00/03737). Además, existen proveedores comerciales de materiales de fermentación aislados, tales como geldanamicina; por tanto, dichos materiales están fácilmente disponibles.

En realizaciones preferidas, se usa metodología sintética para crear análogos de un producto natural aislado de un organismo usando métodos conocidos. Por ejemplo, se aísla geldanamicina a partir de un cultivo de fermentación de un microorganismo adecuado y pueden derivatizarse usando una diversidad de reacciones de funcionalización conocidas en la técnica. Los ejemplos representativos incluyen reacciones de acoplamiento catalizadas por metal, oxidaciones, reducciones, reacciones con nucleófilos, reacciones con electrófilos, reacciones pericíclicas, instalación de grupos protectores, retirada de grupos protectores y similares. En la técnica, se conocen muchos métodos para generar análogos de diversas ansamicinas de benzoquinona (por ejemplos, véanse Patentes de Estados Unidos Nº. 4.261.989; 5.387.584; y 5.932.566 y J. Med. Chem. 1995, 38, 3806-3812). Estos análogos se reducen fácilmente, usando los métodos indicados a continuación, para producir los derivados 18,21-dihidro de la presente invención.

Una vez obtenido el material de partida, la benzoquinona se reduce para formar una hidroquinona y después se hace reaccionar con un ácido, por ejemplo HCl, para generar una ansamicina de hidroquinona amónica C-17 en una forma de sal estable en aire. En una realización alternativa, la base libre de hidroquinona se hace reaccionar con un haluro de ácido de un aminoácido, en lugar de un ácido de Bronsted para generar derivado sal-Co de ansamicina de hidroquinona amónica C-17 estables en aire. Este método se ilustra en el Ejemplo 3.

Puede usarse una diversidad de métodos y condiciones de reacción para reducir la porción de benzoquinona de la ansamicina. Puede usarse hidrosulfito sódico como agente reductor. Otros agentes de reducción que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, polvo de cinc con anhídrido acético o ácido acético, ácido ascórbico y reducciones electroquímicas.

La reducción del resto benzoquinona del derivado de ansamicina puede completarse usando hidrosulfito sódico en una mezcla de reacción bifásica. Típicamente, el análogo de geldanamicina se disuelve en un disolvente orgánico, tal como EtOAc. Otros disolventes orgánicos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, diclorometano, cloroformo, dicloroetano, clorobenceno, THF, MeTHF, éter dietílico, diglima, 1,2-dimetoxietano, MTBE, THP, dioxano, 2-etoxibutano, metil butil éter, acetato de metilo, 2-butanona, agua y mezclas de los mismos. Después, se añaden dos o más equivalentes de hidrosulfito sódico en forma de una solución en agua (5-30% (m/v), preferiblemente 10% (m/v)), al recipiente de reacción a temperatura ambiente. Las soluciones acuosas de hidrosulfito sódico son inestables y por tanto, y por tanto necesitan prepararse en el momento justo antes de su uso. La agitación vigorosa de la mezcla bifásica asegura tasas de reacción razonables.

La reacción puede seguirse en esta etapa por inspección visual puesto que el material de partida 17-AAG tiene un color púrpura que desaparecerá según la reacción avance al producto dihidro-17AAG, que es de color amarillo. Sin embargo, pueden usarse HPLC/UV u otros métodos analíticos para supervisar la reacción.

5 Después de que se complete la reducción, el producto en bruto de la mezcla de reacción puede usarse en la siguiente etapa sin purificación para minimizar la oxidación de la hidroquinona. Sin embargo, puede realizarse purificación, preferiblemente por recristalización, si las condiciones se supervisan para mantener la forma reducida de la benzoquinona.

10 La ansamiacina que contiene hidroquinona es inestable y, en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno u otros oxidantes, el resto hidroquinona puede oxidarse rápidamente en las especies de quinona. Notablemente, la hidroquinona puede convertirse en una especie estable en aire por reacción con un ácido, o por reacción con un haluro de ácido de un aminoácido. En los Ejemplos, el grupo alilamino C-17 se protona para generar una diversidad de análogos de hidroquinona geldamicina sal de amonio C-17 estables en aire. Además, las hidroquinonas de sal de amonio C-17 formadas tienen el beneficio añadido de ser altamente solubles en soluciones acuosas (>200 mg/ml), a diferencia de 17-AAG (<100 µg/ml).

20 La hidroquinona de sal de amonio se forma mediante la adición de una solución de un ácido, tal como HCl, en un disolvente orgánico, tal como EtOAc, DCM, IPA o dioxano, para dar la ansamicina que contiene hidroquinona en una solución orgánica; los disolventes orgánicos pueden ser independientemente acetona, diclorometano, cloroformo, dicloroetano, clorobenceno, THF, MeTHF, éter dietílico, diglima, 1,2-dimetoxietano, MTBE, THP, dioxano, 2-etoxibutano, metil butil éter, acetato de metilo, 2-butanona, en una atmósfera de nitrógeno.

25 La sal de amonio de la hidroquinona se recoge por filtración en casos en los que el producto se precipita de la solución. En casos en los que la sal amonio de hidroquinona no se precipita, la solución de reacción se concentra a presión reducida para producir el producto.

30 Pueden sintetizarse una diversidad de hidroquinonas ansamicinas de sal de amonio estables en aire usando ácidos orgánicos o inorgánicos. Algunos ácidos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación HCl, HBr, H₂SO₄, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifílico, ácido alcanforsulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, ácido etan-1,2-disulfónico, ácido ciclámico, ácido tiocianico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido oxálico y similares. Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19. Preferiblemente, el ácido usado debe tener un pKa suficiente para protonar el nitrógeno de la anilina. Por lo tanto, cualquier ácido un pKa entre aproximadamente -10 y aproximadamente 7, preferiblemente entre aproximadamente -10 y aproximadamente 4, más preferiblemente entre aproximadamente -10 y aproximadamente 1, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente -10 y aproximadamente -3 puede usarse para generar la hidroquinona de sal de amonio.

40 La presente invención también proporciona métodos para recristalizar los compuestos de la presente invención. En dichos métodos, se consigue recristalización disolviendo el compuesto en la cantidad mínima de un disolvente orgánico polar inerte, tal como MeOH, EtOH, o IPA, y añadiendo lentamente un disolvente orgánico miscible, tal como un éter alifático, acetato de etilo, acetato de metilo, cloroformo o DCM, causando que la solución se vuelva turbia. Después, la mezcla se deja reposar durante un periodo de tiempo adecuado, y opcionalmente se enfría, y el sólido resultante se recoge por filtración, se lava y se seca a presión reducida.

45 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, en el que dicho agente de reducción es hidrosulfito sódico, cinc, ácido ascórbico o una reducción electroquímica.

50 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho agente de reducción es hidrosulfito sódico.

55 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho disolvente de reacción es diclorometano, cloroformo, dicloroetano, clorobenceno, THF, 2-MeTHF, éter dietílico, diglima, 1,2-dimetoxietano, MTBE, THP, dioxano, 2-etoxibutano, metil butil éter, acetato de etilo, acetato de metilo, 2-butanona, agua o mezclas de los mismos.

En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho disolvente de reacción es una mezcla de acetato de etilo y agua.

60 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido tiene un pKa entre aproximadamente -10 y aproximadamente 7 en agua.

En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido tiene un pKa entre aproximadamente -10 y aproximadamente 4 en agua.

65

En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido tiene un pKa entre aproximadamente -10 y aproximadamente 1 en agua.

5 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido tiene un pKa entre aproximadamente -10 y aproximadamente -3 en agua.

10 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido es HCl, HBr, H₂SO₄, ácido metanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido trifílico, ácido alcanforsulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, ácido etan-1,2-disulfónico, ácido ciclámico, ácido tiocianico, ácido naftalen-2-sulfónico o ácido oxálico.

En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido es HCl.

15 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido es HBr.

En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido se añade en forma de gas.

20 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho ácido se disuelve en un disolvente orgánico.

25 En una realización, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, donde dicho disolvente orgánico es EtOAc, DCM, IPA o dioxano, para dar la ansamicina que contiene hidroquinona en una solución orgánica, tal como acetona, diclorometano, cloroformo, dicloroetano, clorobenceno, THF, 2-MeTHF, éter dietílico, diglima, 1,2-dimetoxietano, MTBE, THP, dioxano, 2-etoxibutano, metil butil éter, acetato de metilo o 2-butanona.

Composiciones farmacéuticas

30 Cuando los compuestos de la Fórmula 3 y sus sales farmacéuticamente aceptables se usan como agentes antiproliferativos, tales como agentes anticancerosos, éstos pueden administrarse a un mamífero bien en solitario o en combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Los compuestos pueden administrarse por vía oral o parenteral, preferentemente por vía parenteral. La administración parenteral incluye administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea y tópica, siendo la administración intravenosa el método preferido.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos anteriormente (Fórmula 3), formulado junto con uno o más vehículos (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; y (2) administración oral, por ejemplo, brebajes (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, los dirigidos para absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicar en la lengua. El método preferido de administración de los compuestos de la presente invención es la administración parenteral (intravenosa).

50 Como se ha expuesto anteriormente, ciertas realizaciones de los presentes compuestos pueden contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino, y son, por tanto, capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácido farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" a este respecto, se refiere a las sales de adición de ácidos orgánicos e inorgánicos, relativamente no tóxicas de compuestos de la presente invención de. Estas sales pueden prepararse *in situ* en el proceso de fabricación del vehículo de administración o la forma de dosificación, o por separado haciendo reaccionar un compuesto de la invención purificado en forma de su base libre, con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal formada de esta manera durante la siguiente purificación. Las sales representativas incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19).

60 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los compuestos, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos, tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotiónico y similares.

65

En otros casos, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. Las expresiones "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos, se refiere a las sales de adición de bases orgánicas o inorgánicas, relativamente no tóxicas de los compuestos de la invención. De la misma forma, estas sales pueden prepararse *in situ* en el proceso de fabricación del vehículo de administración o la forma de dosificación, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre, con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria, farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérricas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares. Las aminas orgánicas representativas, útiles para la formación de las sales de adición de bases, incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al., mencionado anteriormente).

En las composiciones también pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saporíferos y perfumantes, conservantes, agentes solubilizantes, tampones y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfito sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico, tioglicerol, mercaptoacetato sódico y sulfoxilato de formaldehído sódico; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol.

Los ejemplos de agentes tamponantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, citrato, ascorbato, fosfato, bicarbonato, carbonato, fumarato, acetato, tartarato y malato.

Los ejemplos agentes solubilizadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán (incluyendo polisorbato 80), estearatos de polioxietileno, alcohol bencílico, alcohol etílico, polietilenglicoles, propilenglicol, glicerina, ciclodextrina y poloxámeros.

Los ejemplos de agentes complejantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, ciclodextrinas (alfa, beta, gamma), especialmente, ciclodextrinas beta sustituidas, tales como 2-hidroxipropil-beta, dimetil beta, 2-hidroxietil beta, 3-hidroxipropil beta, trimetil beta.

Como ejemplos de agentes quelantes metálicos farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero sin limitación, ácido cítrico, ácido etilendiamina tetra-acético (EDTA) y su sal, DTPA (ácido dietileno-triamina-penta-acético) y su sal, EGTA y su sal, NTA (ácido nitriloacético) y su sal, sorbitol y su sal, ácido tartárico y su sal, N-hidroxi iminodiacetato y su sal, ácido hidroxietil-etileno diamina-tetraacético y su sal, ácido 1- y 3-propanodiamina tetra-acético y sus sales, ácido 1- y 3-diamino-2-hidroxi propano tetra-acético y sus sales, gluconato sódico, ácido hidroxil etano difosfónico y su sal y ácido fosfórico y su sal.

Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos (formulación líquida), vehículos líquidos seguido de liofilización (formulación en polvo para su reconstrucción con agua estéril o similar) o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si fuera necesario, dar forma o envasar el producto.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones estériles inyectables justo antes de su uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacterioestáticos, agentes quelantes, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. En los ejemplos, los ingredientes activos se ponen en solución junto con los vehículos farmacéuticamente aceptables y después se liofilizan para proporcionar un polvo seco. El polvo seco se envasa en forma de dosificación unitaria y después se reconstituye para administración parenteral añadiendo al polvo a una solución estéril, tal como agua o solución salina normal.

Como ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas de los mismos adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede conservarse la fluidez apropiada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones, y utilizando tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos sobre los compuestos de la presente invención puede garantizarse incluyendo diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En las composiciones también puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede realizarse incluyendo agentes que retrasen la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable disminuir la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede conseguirse mediante el uso de una suspensión líquida de material amorfo o cristalino que es poco soluble en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retrasada de un fármaco administrado por vía parenteral se consigue disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleaginoso.

Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral”, como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcutilar, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intrasternal.

Las frases “administración sistémica”, “administrado por vía sistémica”, “administración periférica” y “administrado por vía periférica” como se usa en el presente documento significa la administración de un compuesto, fármaco u otro material, distinta de la directamente en el sistema nervioso central, de tal manera que se introduce en el sistema del paciente y, de esta manera, se somete al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Una formulación preferida para los compuestos de la presente invención es un tampón acuoso que contiene ácido cítrico (de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 250 mM, preferentemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM), ácido ascórbico (de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 250 mM, preferentemente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM) y edetato (ácido etilendiamina tetraacético EDTA, disódico-cálcico, de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 20 mM, preferentemente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM) ajustándose al pH a aproximadamente 3,1 con hidróxido de sodio. Los componentes de la formulación actúan como agente tamponante, antioxidante y quelante metálico, respectivamente.

Para las formulaciones de los compuestos de la presente invención es importante proporcionar solubilidad y estabilidad redox a esta sal de hidroquinona. Los compuestos de la presente invención son significativamente solubles a un pH menor cuando la amina está protonada. La distribución de especies es importante dado que la forma ionizada es más soluble mientras que la base libre (forma no ionizada) es menos soluble. Por lo tanto, controlando el pH de la solución se optimizará una formulación. Un agente tamponante, tal como citrato, que tiene una alta capacidad tamponante a un intervalo de pH preferido, es un componente preferido de dicha formulación. Preferentemente los agentes tamponantes tamponarán la formulación entre un pH de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5,0, más preferentemente entre un pH de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 3,5 e incluso más preferentemente entre un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 3,3.

Los análogos de hidroquinona de la presente invención pueden oxidarse permaneciendo de manera prolongada en solución. Los metales pesados, tales como hierro y cobre, pueden catalizar reacciones de oxidación y pueden encontrarse en cantidades traza en reactivos y productos de cristal de laboratorio típicos. La protección de la naturaleza oxidante de los metales pesados puede proporcionarla los quelantes metálicos tales como EDTA (ácido etilendiamina tetraacético). Otros quelantes conocidos son, por ejemplo, ácido cítrico, DTPA (ácido dietilendiamina-penta-acético) y su sal, EGTA y su sal, NTA (ácido nitriloacético) y su sal, sorbitol y su sal, ácido tartárico y su sal, N-hidroxi iminodiacetato y su sal, ácido hidroxietil-etilendiamina-tetraacético y su sal, ácido 1- y 3-propanodiamin tetraacético y sus sales, ácido 1- y 3-diamino-2-hidroxi propano tetraacético y sus sales, gluconato sódico, ácido hidroxietano disfosfónico y su sal y ácido fosfórico y su sal.

Otro método importante para la prevención de la oxidación es añadir un antioxidante. Un antioxidante preferido es el ácido ascórbico (ascorbato). Este reactivo protege a los compuestos del efecto oxidante del oxígeno molecular disuelto en medios acuosos. En determinadas realizaciones, el ascorbato se usa como un componente en las formulaciones de los análogos de hidroquinona de la presente invención.

Las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones que pueden autoconservarse tales como formulaciones usadas para administración directa a un paciente. Específicamente, las composiciones/formulaciones farmacéuticas de la presente invención se proporcionan en una forma más concentrada que la adecuada para la administración directa a un paciente. Dicha composición se diluye típicamente en una bolsa IV para la administración a un paciente.

Es importante en dicho uso que la formulación contenida en la bolsa IV sea estable durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas, más preferentemente estable durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, más preferentemente estable durante aproximadamente 2 horas. Las necesidades de estabilidad pueden mantenerse a lo largo del periodo en el que se administra el fármaco.

Adicionalmente, es importante que la capacidad tamponante de la formulación diluida contenida en la bolsa IV sea suficiente para conseguir estabilidad mientras que no sea una concentración demasiado alta para producir una reacción adversa en el paciente. Si hay demasiado tampón pueden producirse diversos efectos no deseados en el paciente.

Métodos de terapia y tratamiento

La presente invención proporciona compuestos solubles en agua que contienen hidroquinona que se oxidan rápidamente a análogos 17-amino sustituidos de geldanamicina que contiene benzoquinona (por ejemplo, 17-AAG) *in vitro* e *in vivo* a pH fisiológico. Como tales, los análogos de hidroquinona de la presente invención presentan actividades biológicas y perfiles terapéuticos como los de los análogos 17-amino sustituidos de geldanamicina y pueden usarse para todas las indicaciones terapéuticas conocidas en las que los análogos 17-amino sustituidos de geldanamicina son útiles en el tratamiento. Los análogos 17-amino sustituidos de geldanamicina, y en particular la 17-AAG, son inhibidores muy fuertes y selectivos de HSP90.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento, mejora de uno o más de los síntomas y reducción de la gravedad de trastornos híper proliferativos, es decir cáncer, así como otras afecciones o trastornos mediados por HSP90. Dado que las composiciones de la presente invención son más solubles que las formas de benzoquinona oxidadas, las composiciones se administran más fácilmente produciendo mejores resultados clínicos para cualquiera de los usos conocidos de las moléculas precursoras.

Los métodos de tratamiento implican administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención a un sujeto que padece un trastorno o una afección mediada por HSP90, tal como cáncer. En el presente documento se proporcionan descripciones de las composiciones, formulaciones, dosificación, modos de administración y tratamiento.

Se han sintetizado determinados análogos 17-amino sustituidos de geldanamicina y su uso como agentes antitumorales se describe en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.261.989 y 5.387.584, 5.932.566 y en las solicitudes PCT publicadas WO 00/03737 y WO 03/072794. Las relaciones de actividad estructural de los análogos 17-amino sustituidos de geldanamicina han arrojado más luz sobre las características químicas necesarias para la inhibición de HSP90 (véase, por ejemplo, J. Med. Chem. (1995) 38: 3806-3812, J. Med. Chem. (1995) 38: 3813-3820, y Clin. Cancer Res. (1999) 5: 3781).

Entre los análogos 17-amino sustituidos de geldanamicina más satisfactorios se encuentra la 17-AAG, que ha mostrado tener una amplia actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* y se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I/II múltiples. La 17-AAG presenta citotoxicidad diferencial contra a un amplio intervalo de tipos tumorales en el papel de la línea celular tumoral NCI 60. El valor CI_{50} medio sobre todas las líneas celulares en el panel es de 120 nM (Developmental Therapeutics Program Website: <http://dtp.nci.nih.gov/>, mean graph for compound S330507).

Además, se ha demostrado que la 17-AAG tiene actividad contra diversas líneas celulares, incluyendo, pero sin limitación, melanoma (Anti-Cancer Drugs (2004) 15: 377-388), cáncer de próstata (Clin. Cancer Res. (2002) 8: 986-993), cáncer de mama (Cancer Res. (2001) 61: 2945-2952), cáncer no microcítico pulmonar (Ann. Thorac. Surg. (2000) 70: 1853-1860), leucemias (Cancer Res. (2001) 61: 1799-1804), y cáncer de colon (J. Natl. Cancer Inst. (2003) 95: 1624-1633).

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos anteriormente mencionados; o una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas.

En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que dicho cáncer es un cáncer del sistema hematopoyético, sistema inmunitario, sistema endocrino, sistema pulmonar, sistema gastrointestinal, sistema músculo esquelético, sistema reproductor, sistema nervioso central o sistema urológico.

En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que el cáncer se localiza en los tejidos mieloides, tejidos linfoides, tejidos pancreáticos, tejidos tiroideos, tejidos pulmonares, del colon, tejidos rectales, tejidos anales, tejidos hepáticos, piel, hueso, tejidos de ovario, tejidos uterinos, tejidos de cuello uterino, de mama, próstata, testiculares, de cerebro, tronco cerebral, tejido de las meninges, renal o de vejiga de mamíferos.

En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que el cáncer se localiza en los tejidos mieloides, linfoides, de mama, pulmón, ovario o próstata de mamíferos.

5 En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que dicho cáncer es cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de próstata, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, carcinoma de células renales, melanoma maligno, cáncer pancreático, cáncer pulmonar, carcinoma colorrectal, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer tiroideo, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino o síndrome mielodisplásico.

10 En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que dicho cáncer de mamífero es cáncer de mama, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer de próstata.

15 En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que dicho mamífero es un primate, equino, canino, felino o bovino.

20 En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que dicho mamífero es un ser humano.

En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que dicho modo de administración de dicho compuesto es por inhalación, por vía oral, intravenosa, sublingual, ocular, transdérmica, rectal, vaginal, tópica, intramuscular, intra-arterial, intratecal, subcutánea, bucal o nasal.

25 En una realización, la presente invención se refiere al método anteriormente mencionado, en el que modo de administración es intravenoso.

Terapia de combinación

30 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento en el que los compuestos y composiciones de la invención se usan a niveles sub-citotóxicos en combinación con al menos otro agente para conseguir una actividad selectiva en el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, los compuestos de la presente invención se usan para reducir los niveles celulares de proteínas cliente HSP90 correctamente plegadas, que después se inhiben eficazmente por el segundo agente o cuya degradación en el proteasoma se inhibe usando un inhibidor de proteasoma, por ejemplo Velcade. La unión de las proteínas cliente a HSP90 estabiliza las proteínas cliente y las mantiene en una forma soluble, inactiva, lista para responder a estímulos activadores. La unión de un análogo de ansamicina que contiene benzoquinona de la presente invención a HSP90 produce el direccionamiento de la proteína cliente hacia el proteasoma y su posterior degradación. Usando un agente que conduzca e inhiba el proteasoma se bloquea la degradación del proteasoma conduciendo a un aumento de la apoptosis celular y muerte celular.

45 Algunos ejemplos de agentes antineoplásicos que pueden usarse en combinación con los métodos de la presente invención incluyen, en general, agentes alquilantes; agentes anti-angiogénicos, anti-metabolitos, epidofilotoxina; una enzima antineoplásica; un inhibidor de topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; complejos de coordinación de platino; anti-mitóticos; modificadores de respuesta biológica e inhibidores del crecimiento; agentes terapéuticos hormonales/anti-hormonales y factores de crecimiento hematopoyéticos.

50 Como clases de agentes antineoplásicos ejemplares se incluyen adicionalmente la familia de fármacos de antraciclina, los fármacos vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos de las epotilonas, discodermolida, pteridina, diinenos y podofilotoxinas.

55 Como miembros particularmente útiles de estas clases se incluyen, por ejemplo, carminomicina, daunorrubicina, aminopterina, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, mitomicina C, porfiromicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, gemcitabina, arabinósido citosina, podofilotoxina o derivados de podofilotoxina tales como etopósido, fosfato de etopósido o tenipósido, melfalan, vinblastina, vincristina, leurosina, Velcade, doxorubicina, vindesina, leurosina, mesilato de imatinib, paclitaxel, taxol y similares. En una realización preferida, el agente antineoplásico es Velcade, doxorubicina, taxotere, docetaxel, paclitaxel, cis-platino, mesilato de imatinib o gemcitebina. En una realización preferida, el agente antineoplásico es Velcade o doxorubicina.

60 Otros agentes antineoplásicos útiles incluyen estramustina, carboplatino, ciclofosfamida, bleomicina, gemcitabina, ifosamida, melfalan, hexametil melamina, tiotepa, citarabina, idatrexato, trimetrexato, dacarbazina, L-asparaginasa, camptotecina, CPT-11, topotecán, ara-C, bicalutamida, flutamida, leuprolida, derivados de piridobenzoindol, interferones e interleucinas.

65 El agente quimioterapéutico y/o radioterapia puede administrarse de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Para los expertos en la técnica será obvio que la administración del agente

quimioterápico y/o radioterapia puede modificarse dependiendo de la enfermedad que vaya a tratarse y de los efectos conocidos del agente quimioterápico y/o radioterapia de esa enfermedad. Además, de acuerdo con el conocimiento del especialista clínico experto, los protocolos terapéuticos (por ejemplo, cantidades de dosificación y tiempos de administración) pueden modificarse a la vista de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados (es decir, agente antineoplásico o radiación) en el paciente, y a la vista de las respuestas observadas de la enfermedad con respecto a los agentes terapéuticos administrados.

Además, en general, los compuestos de la presente invención y el agente quimioterápico no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica, y pueden, debido a diferentes características físicas y químicas, administrarse por vías diferentes. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía intravenosa para generar y mantener buenos niveles sanguíneos, mientras que el agente quimioterápico puede administrarse por vía oral. La determinación del modo de administración y la conveniencia de la administración, cuando sea posible, en la misma composición farmacéutica, se encuentra bien dentro del conocimiento del experto clínico en la materia. La administración inicial puede realizarse de acuerdo con protocolos establecidos conocidos en la técnica y después, el especialista clínico experto, basándose en los efectos observados, la dosificación, modos de administración y tiempos de administración puede modificarla.

En particular, la elección del agente quimioterápico o radiación dependerá del diagnóstico del médico tratante y de la valoración de la afección del paciente y del protocolo de tratamiento adecuado.

Un compuesto de la presente invención, y agente quimioterápico y/o radiación, puede administrarse a la vez (por ejemplo, simultáneamente, esencialmente simultáneamente o dentro del mismo protocolo de tratamiento) o secuencialmente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad proliferativa, de la afección del paciente y de la elección real del agente quimioterápico y/o radiación a administrar junto con (es decir, en un solo protocolo de tratamiento) un compuesto de la presente invención.

Si un compuesto de la presente invención, y el agente quimioterápico y/o radiación, no se administran simultáneamente o esencialmente simultáneamente, entonces el orden óptimo de administración del compuesto de la presente invención, y el agente quimioterápico y/o radiación, pueden ser diferentes para diferentes tumores. Por tanto, en determinadas situaciones, el compuesto de la presente invención puede administrarse primero seguido de la administración del agente quimioterápico y/o radiación; y en otras situaciones el agente quimioterápico y/o radiación puede administrarse primero seguido de la administración de un compuesto de la presente invención. Esta administración alternativa puede repetirse durante un solo periodo de tratamiento. La determinación del orden de administración, y el número de repeticiones de administración de cada agente terapéutico durante un protocolo del tratamiento, se encuentra bien dentro del conocimiento del médico experto después de evaluar la enfermedad que va a tratarse y la afección del paciente. Por ejemplo, el agente quimioterápico y/o radiación puede administrarse primero, especialmente si es un agente citotóxico, y después el tratamiento continúa con la administración de un compuesto de la presente invención, seguido de, cuando se determine que resulta ventajoso, la administración del agente quimioterápico y/o radiación y así hasta completar el protocolo del tratamiento.

Por tanto, de acuerdo con la experiencia y el conocimiento, a medida que continúa el tratamiento, el médico tratante puede modificar cada protocolo para la administración de un componente (agente terapéutico, es decir, compuesto de la presente invención, agente quimioterápico o radiación) del tratamiento de acuerdo con las necesidades individuales del paciente.

Dosificación

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como agentes farmacéuticos a seres humanos y a animales, estos pueden proporcionarse como tal o como una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, del 0,1 al 90% (más preferentemente, del 10 al 30%) del ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse para obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para conseguir una respuesta terapéutica deseada en un paciente, particularmente una composición y un modo de administración que no sea tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o su sal, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción o metabolismo del compuesto particular que se está empleando, la tasa y el grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto en particular empleado, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico anterior del paciente que se esté tratando y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Un médico o un veterinario que tenga experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o el veterinario puede comenzar

con dosis de los compuestos de la invención empleados en las composiciones farmacéuticas a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

- 5 En general, una dosis adecuada de un compuesto de la invención será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja inocua y eficaz para producir un agente terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Generalmente, para un paciente, la dosis intravenosas de los compuestos de la presente invención variará de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg por metro² administrada dos veces a la semana, preferentemente entre aproximadamente 75 mg a 750 mg por metro² administrada dos veces a la semana, e incluso más preferentemente de 100 mg a 500 mg por metro² administrada dos veces a la semana.

Aunque es posible que administrar en solitario un compuesto de la presente invención, se prefiere administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

- 15 El paciente que recibe este tratamiento es cualquier animal que lo necesite, incluyendo primates, en particular seres humanos y otros mamíferos tales como caballos, vacas, cerdos y ovejas; y en general aves de corral y animales de compañía.

A las formulaciones descritas anteriormente pueden añadirse uno o más de otros compuestos activos para proporcionar formulaciones para terapia de combinación contra el cáncer.

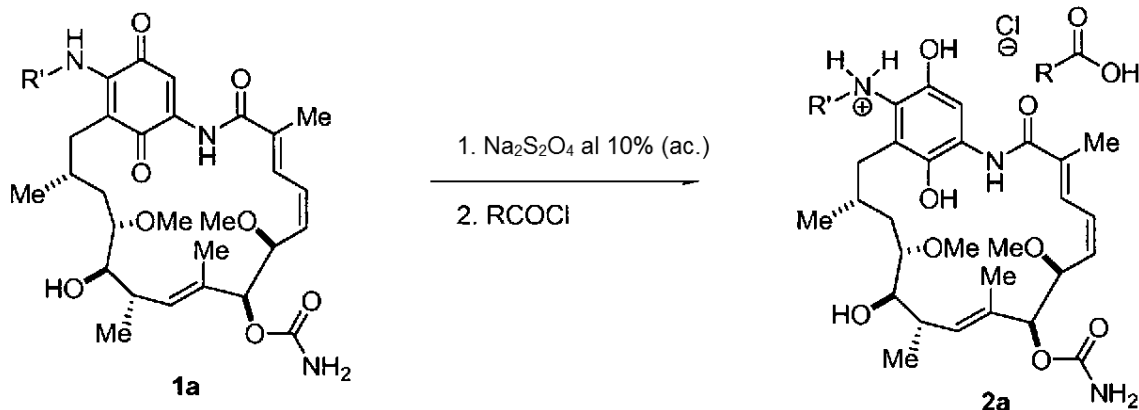
Ejemplos

25 Ahora, la invención se describirá de forma general, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con propósitos de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención. Además, los aminoácidos se representan en forma zwitteriónica y también pueden protonarse adicionalmente y existir en forma de la sal.

Ejemplo 1

30

Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina



Esquema de Reacción 1

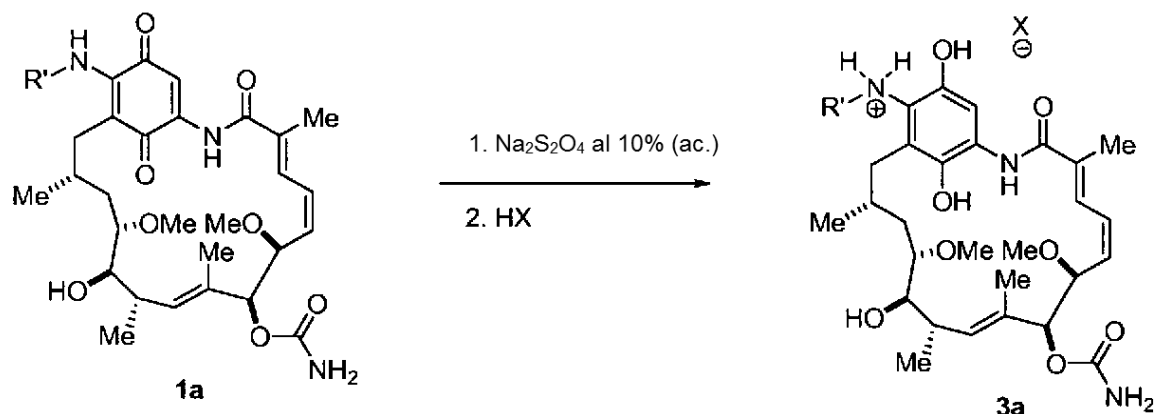
35

El compuesto de Fórmula (**1a**) (1,0 equiv.) se disuelve en diclorometano (0,02 M) y se agita con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1:1; DCM:solución acuosa). La solución se agita durante 30 minutos. Después, la capa orgánica se retira mediante una jeringa y la solución acuosa se extrae una vez más con diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavan con salmuera y después se añaden directamente a una solución de un cloruro de ácido (1,0 equiv.) en diclorometano (0,001 M). La mezcla de reacción se agita durante 12 h y se vierte en una solución de diclorometano. Después, la capa orgánica se lava con más cantidad de agua (2,0 ml); después, las capas acuosas combinadas se liofilizan para producir el producto.

40

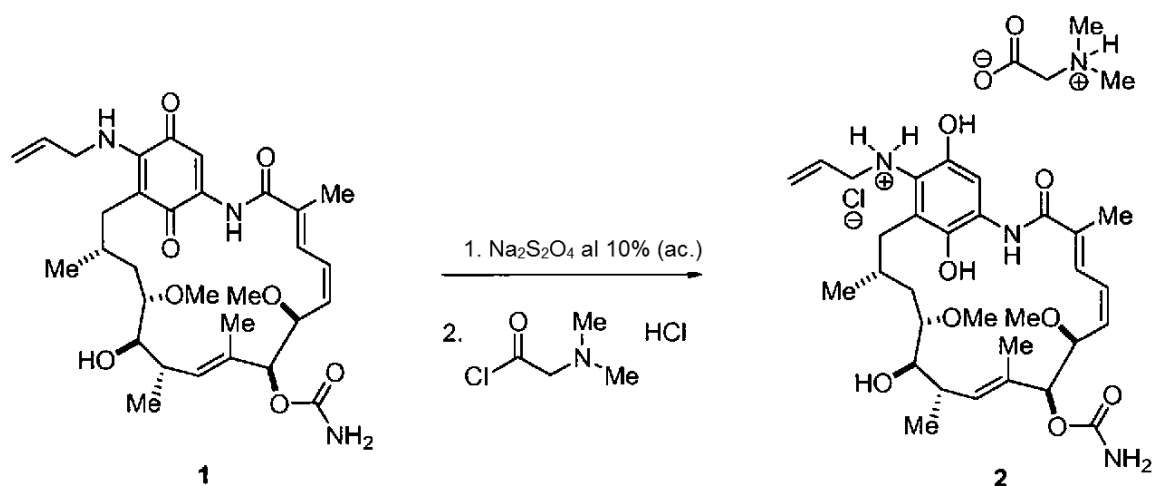
Ejemplo 2

Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina



5

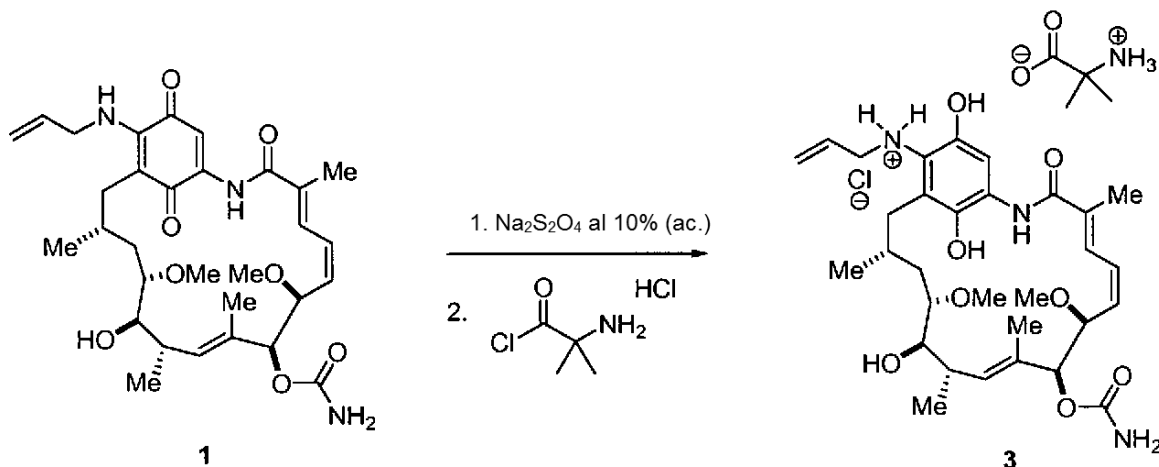
El compuesto de Fórmula (1a) (0,25 mmol, 1,0 equiv.) se disuelve en diclorometano (3 ml) y se agita con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1,5 ml). La solución se agita durante 30 minutos. Después, la capa orgánica se retira mediante una jeringa y la solución acuosa se extrae una vez más con diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se diluyen con 3 ml de EtOAc, se lavan con salmuera y se secan adicionalmente por retirada azeotrópica del agua residual y EtOAc a presión reducida (3 ml de disolvente totales retirados a presión reducida). A esta solución se le añade una solución de un ácido en un disolvente orgánico. Después, la solución resultante se enfría a -5 °C y se añade un ácido (0,25 mmol) en tolueno (0,2 ml). Lentamente, un sólido se fracciona de la solución. Después, se añade MTBE (3 ml) y la mezcla resultante se deja calentar a TA y se agita a esta temperatura durante 50 minutos. Después, el sólido se recoge por filtración por filtración al vacío, se lava con MTBE (2 x 3 ml) y se seca a presión reducida para producir el producto.

20 **Ejemplo 3** Preparación de sal-Co de Acetato de Dimetilamino de la Hidroquinona de 17-AAG

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (9,1 mg, 0,016 mmol, 1,0 equiv.) en 1,0 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1,0 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución de clorhidrato de cloruro ácido de dimetilaminoacetilo (2,5 mg, 0,016 mmol, 1,0 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 2 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (7,1 mg, 0,011 mmol, 66% de rendimiento). El material se analizó por RMN ¹H en D₂O y LC-MS.

25

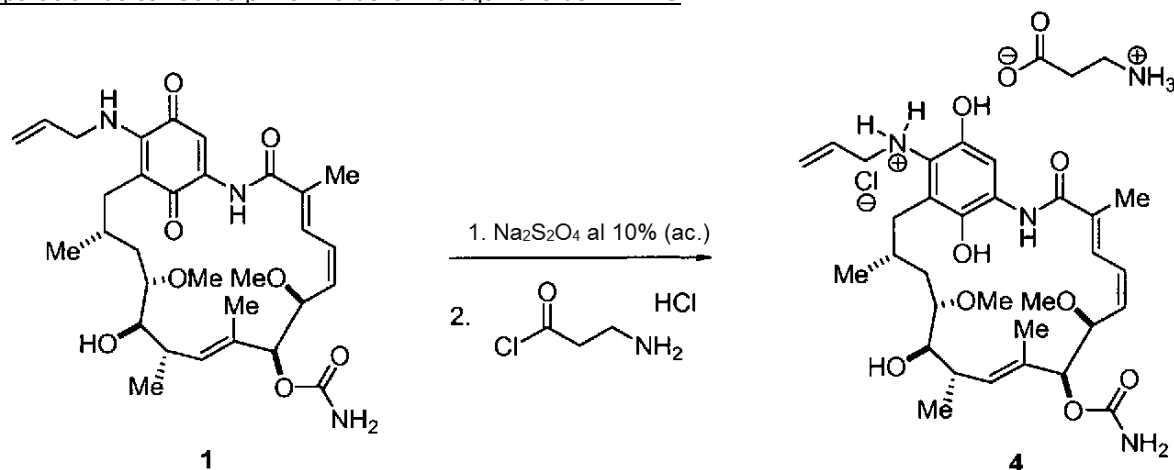
30

Ejemplo 4Preparación de sal-Co de α -Aminoisobutirato de la Hidroquinona de 17-AAG

5

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (16,7 mg, 0,0285 mmol, 1,0 equiv.) en 1,5 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1,5 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución de clorhidrato de cloruro ácido (4,4 mg, 0,0314 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 3 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (15,1 mg, 0,0224 mmol, 79% de rendimiento). El material se analizó por RMN ^1H en D_2O y LC-MS.

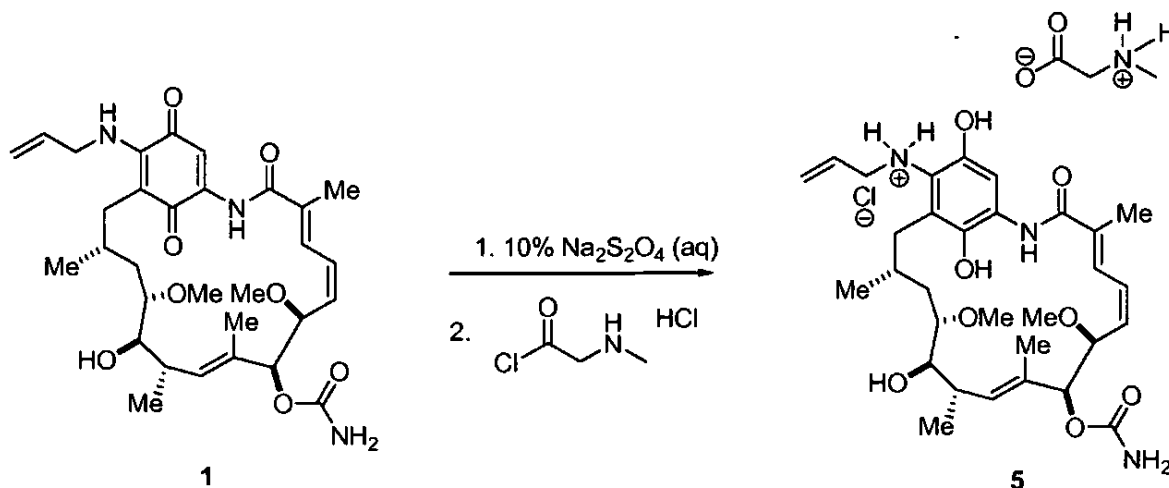
15

Ejemplo 5Preparación de sal-Co de β -Alanina de la Hidroquinona de 17-AAG

20

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (16,7 mg, 0,0285 mmol, 1,0 equiv.) en 1,5 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1,5 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (4,52 mg, 0,0314 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 4 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (12 mg, 0,0237 mmol, 83% de rendimiento). El material se analizó por RMN ^1H en D_2O y LC-MS.

30

EjemploPreparación de sal-Co de N-Metil Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG

5

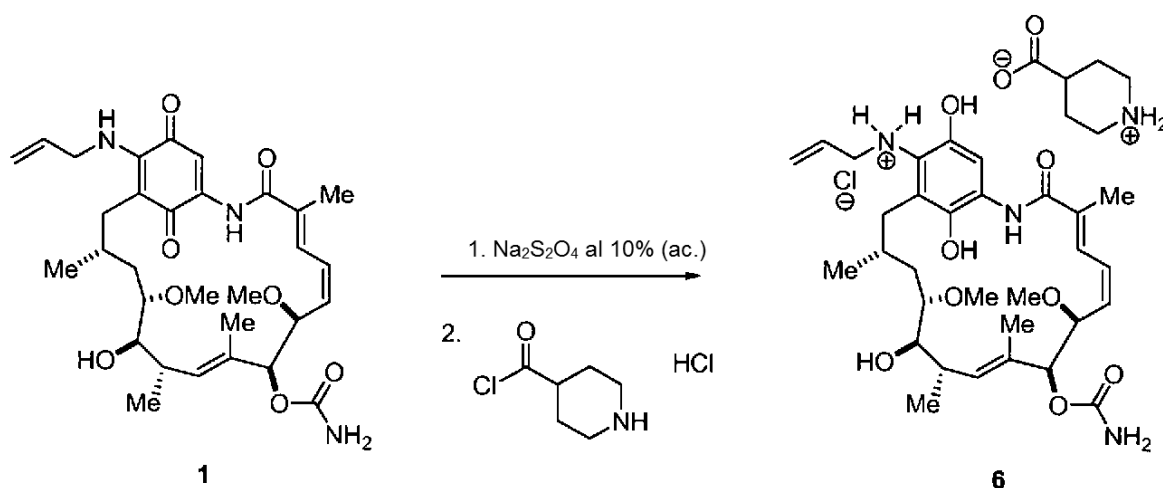
Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (15,1 mg, 0,0258 mmol, 1,0 equiv.) en 1,5 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1,5 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (3,7 mg, 0,0258 mmol, 1,0 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 5 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (15,4 mg, 0,0234 mmol, 91% de rendimiento). El material se analizó por RMN ^1H en D_2O y LC-MS.

10

15

Ejemplo 7Preparación de sal-Co de Carboxilato de Piperidina de la Hidroquinona de 17-AAG

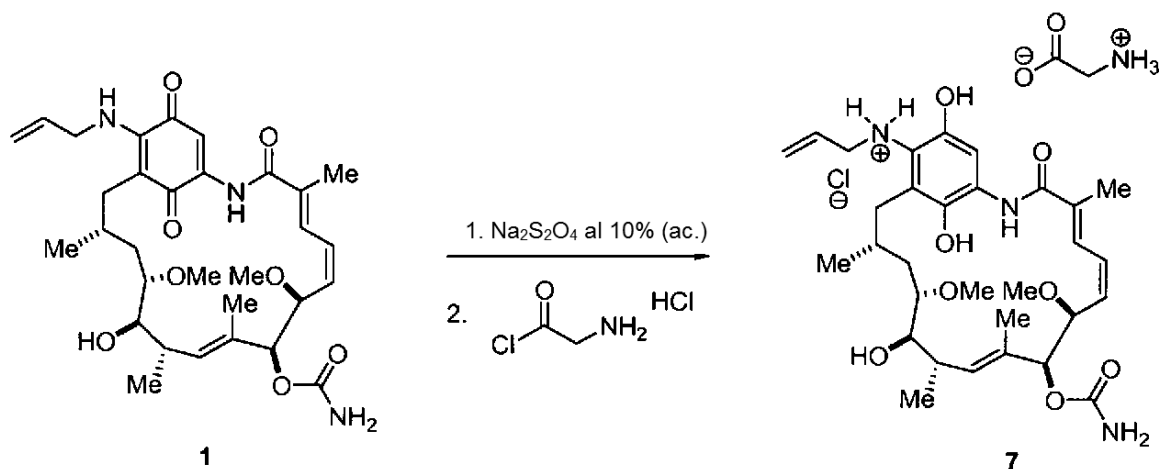
20



25

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (16 mg, 0,027 mmol, 1,0 equiv.) en 1,5 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1,5 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,25 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (5,5 mg, 0,03 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 6 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (11,4 mg, 0,019 mmol, 60% de rendimiento). El material se analizó por RMN ^1H en D_2O y LC-MS.

30

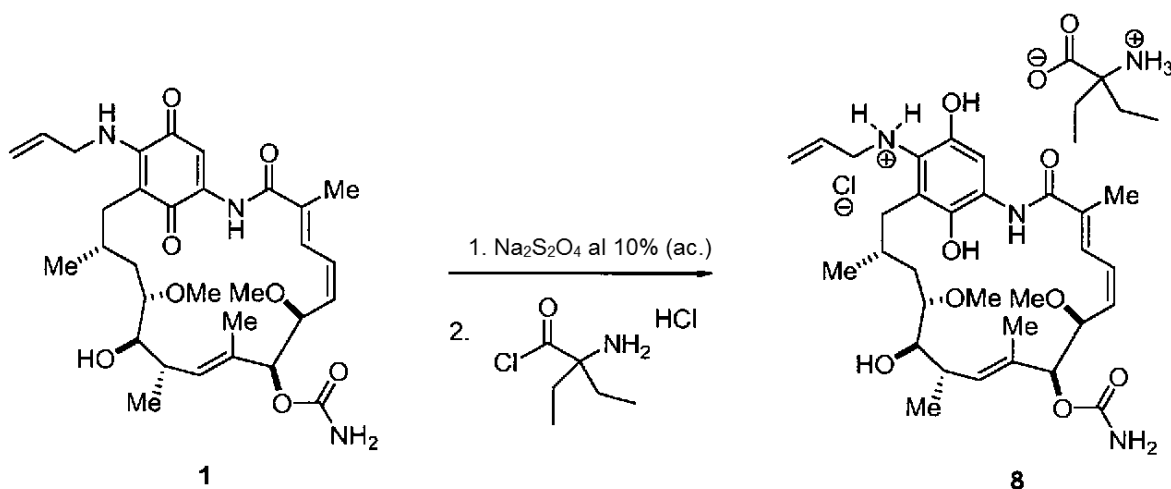
Ejemplo 8Preparación de sal-Co de Glicina de la Hidroquinona de 17-AAG

5

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (16,2 mg, 0,028 mmol, 1,0 equiv.) en 1,5 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (1,5 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (3,4 mg, 0,03 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 7 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (3,1 mg, 0,0051 mmol, 19% de rendimiento, mezclas 3:1 de regioisómeros de fenol). El material se analizó por RMN ^1H en D_2O y LC-MS.

10

15

Ejemplo 920 Preparación de 2-Amino-2-etil-butirato sal-Co de la Hidroquinona de 17-AAG

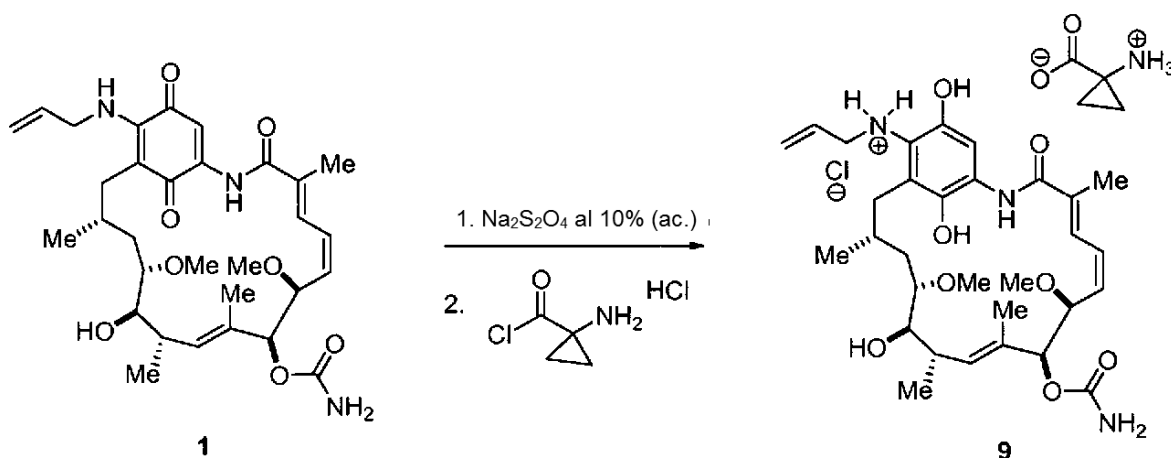
25

30

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (48 mg, 0,082 mmol, 1,0 equiv.) en 4,8 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (4,8 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 1 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (16,8 mg, 0,09 mmol, 1,1 equiv.) en 1 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 8 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (24,7 mg, 0,034 mmol, 41% de rendimiento). El material se analizó por RMN ^1H en D_2O y LC-MS.

Ejemplo 10

Preparación de sal-Co de 1-Amino-Ciclopropanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG



5

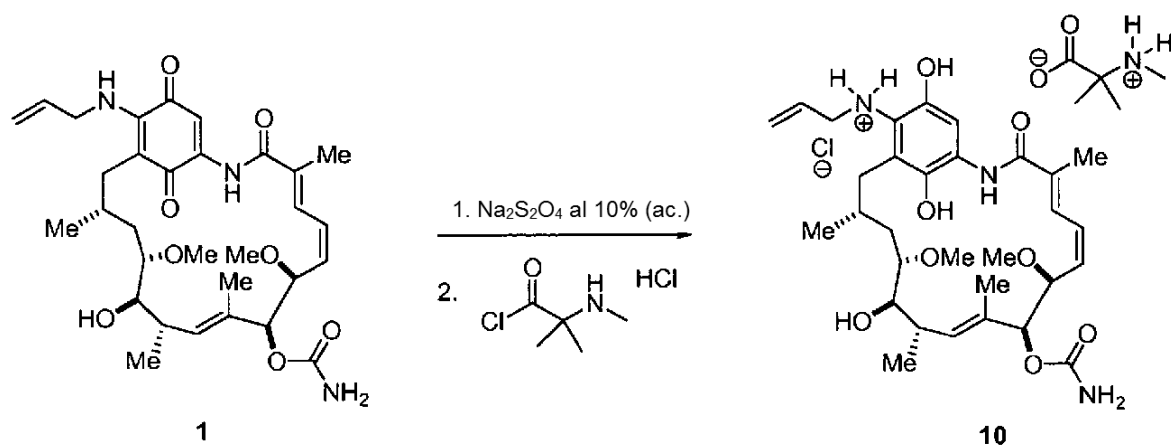
Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (**1**) (48 mg, 0,082 mmol, 1,0 equiv.) en 4,8 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (4,8 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 1 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (14,1 mg, 0,09 mmol, 1,1 equiv.) en 1 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir **9** en forma de un polvo esponjoso de color blanco (36,2 mg, 0,051 mmol, 62% de rendimiento). El material se analizó por RMN ¹H en D₂O y LC-MS.

10

15

Ejemplo 11

Preparación de Carboxilato sal-Co de la Hidroquinona de 17-AAG



20

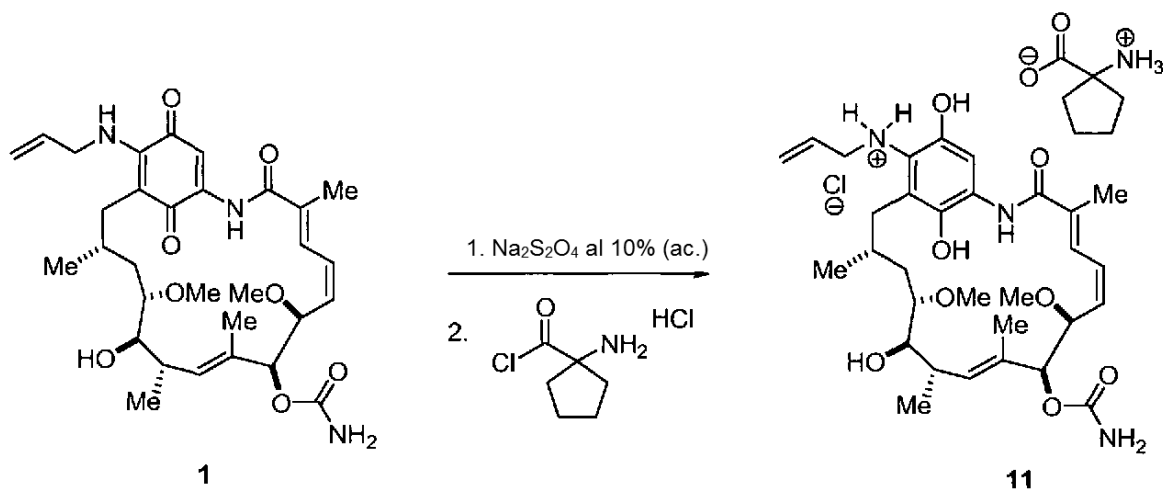
25

30

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (**1**) (24 mg, 0,041 mmol, 1,0 equiv.) en 2,4 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (2,4 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (7,8 mg, 0,045 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir **10** en forma de un polvo esponjoso de color blanco (25,8 mg, 0,038 mmol, 92% de rendimiento). El material se analizó por RMN ¹H en D₂O y LC-MS.

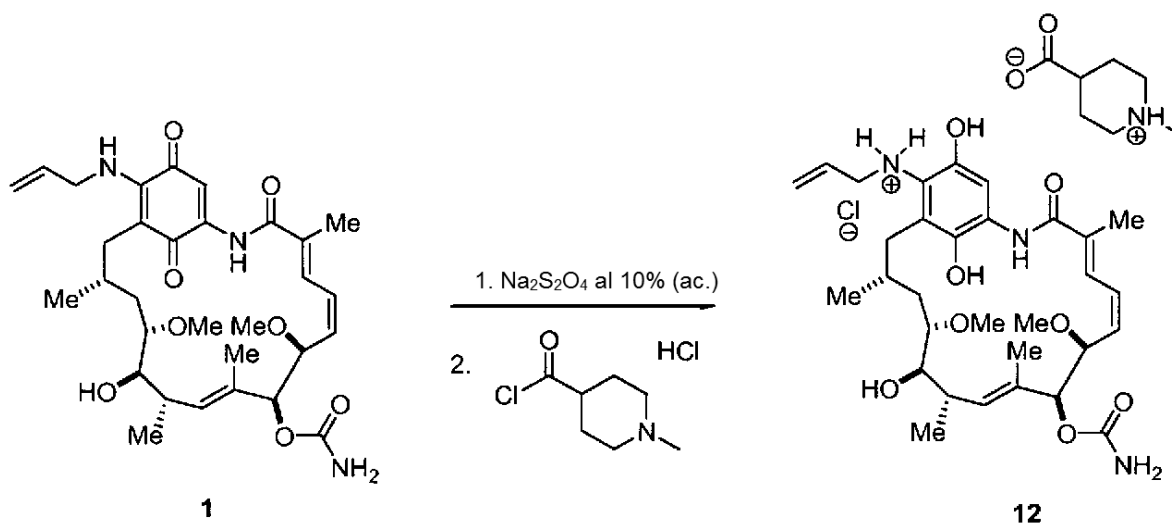
Ejemplo 12

Preparación de sal-Co de 1-Amino-ciclopentanocarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG



5

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (**1**) (48 mg, 0,082 mmol, 1,0 equiv.) en 4,8 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (4,8 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (17 mg, 0,09 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir **11** en forma de un polvo esponjoso de color blanco (34,3 mg, 0,049 mmol, 60% de rendimiento). El material se analizó por RMN ¹H en D₂O y LC-MS.

20 **Ejemplo 13** Preparación de sal-Co de N-Metil Piperidinacarboxilato de la Hidroquinona de 17-AAG

Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (**1**) (21,8 mg, 0,038 mmol, 1,0 equiv.) en 2 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (2 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (8,1 mg, 0,041 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua.

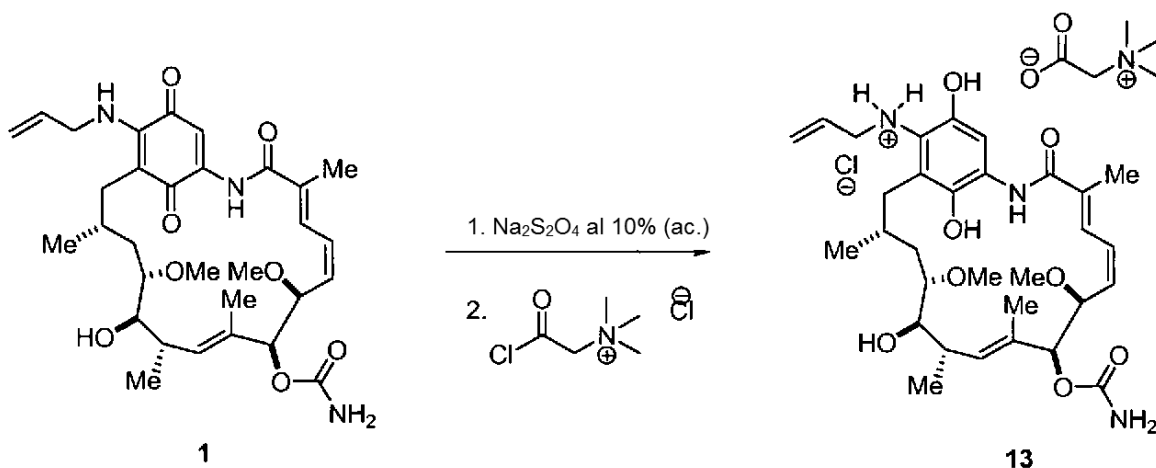
30

Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 12 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (15,2 mg, 0,0213 mmol, 56% de rendimiento). El material se analizó por RMN ^1H en D_2O y LC-MS.

Ejemplo 14

5

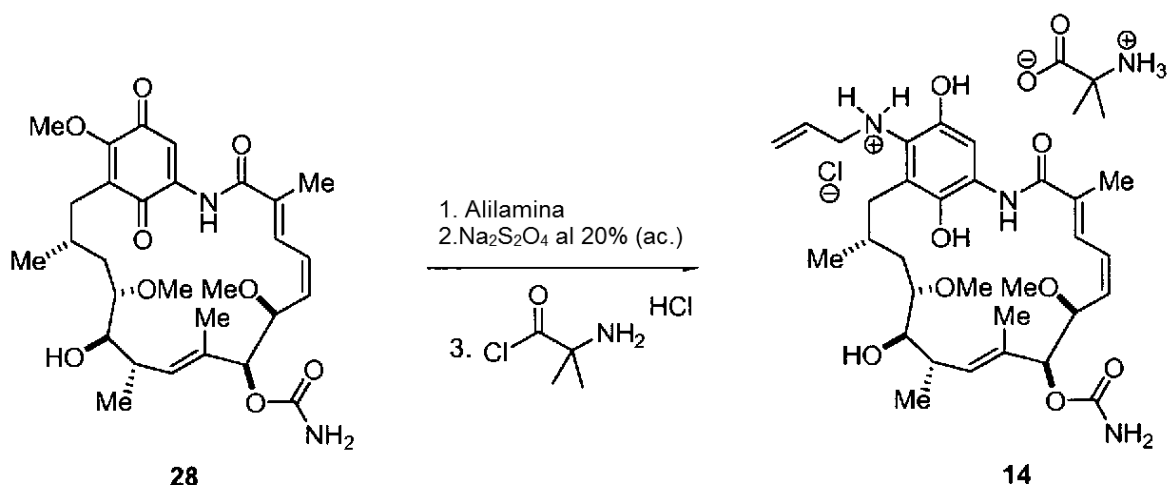
Preparación de sal-Co de Acetato de *N,N,N*-Trimetilamonio de la Hidroquinona de 17-AAG



- 10 Se disolvió 17-alilaminogeldanamicina (1) (113 mg, 0,19 mmol, 1,0 equiv.) en 2 ml de diclorometano y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (2 ml). La solución de color púrpura intenso se volvió de color amarillo después de 5 min y la mezcla se agitó durante 25 min más. La capa orgánica se retiró mediante una jeringa y la solución acuosa se extrajo con 0,30 ml más de diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1,0 ml) y después se añadieron directamente a una solución del clorhidrato de cloruro ácido (33 mg, 0,21 mmol, 1,1 equiv.) en 0,20 ml de diclorometano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se vertió en un embudo de decantación con 3,0 ml de agua. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con 2,0 ml más de agua. Las capas acuosas combinadas se liofilizaron para producir 13 en forma de un polvo esponjoso de color blanco (78 mg, 0,11 mmol, 57% de rendimiento). El material se analizó por RMN ^1H en $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ deuterado (6:1) y LC-MS.

Ejemplo 15

Preparación de Derivados Estables en aire de Hidroquinona de 17-AAG a partir de Geldanamicina



- 25 Se añadió geldanamicina (28) (0,14 g, 0,25 mmol, 1,0 equiv.) a un vial de 10 ml, seguido de una solución de alilamina (0,075 ml, 1,0 mmol, 4 equiv.) en MeTHF (0,625 ml). La suspensión resultante se calentó a 40°C en una atmósfera de nitrógeno durante 10 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con 1,0 ml de MeTHF, se lavó con una solución saturada de NH_4Cl (1,5 ml) y NaCl saturado (1,5 ml).
- 30 Después, la capa orgánica se recogió y se trató con una solución acuosa recién preparada de hidrosulfito sódico (1 ml, 20% (m/m)) con agitación vigorosa, en una atmósfera de nitrógeno durante 45 minutos. Después, la capa acuosa

se retiró y después la capa orgánica se lavó con 1,5 ml de agua desgasificada. Después, la solución orgánica se secó por retirada azeotrópica de agua, usando MeTHF. Esto se consiguió mediante la adición de 2 ml de MeTHF y después de concentración (aproximadamente 2 ml) de la solución resultante a presión reducida a 70 °C. Después, la solución resultante se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y después se añadió clorhidrato de cloruro de ácido α -aminoisobutírico (0,04 g, 0,25 mmol, 1,0 equiv.) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas, momento en el que el sólido se recogió por filtración y se lavó con MeTHF (2 x 2 ml). Después, el sólido se secó a presión reducida para producir el producto en forma de un polvo de color amarillo (171 mg, 0,2425 mmol, 97% de rendimiento total).

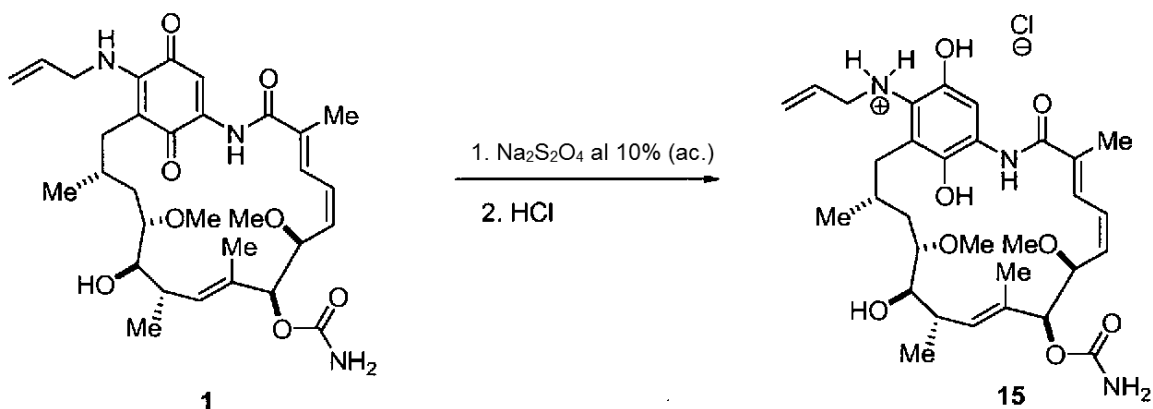
10 Ejemplo 16

Cristalización de Formas de sal-Co de Hidroquinona de 17-AAG

15 El compuesto 7 se disolvió en la cantidad mínima de MeOH y después se añadió lentamente, gota a gota, EtOAc hasta que persistió la turbidez. Después, la mezcla se dejó reposar durante 14 horas y después el sólido se retiró por filtración, se lavó con EtOAc y se secó a presión reducida.

Ejemplo 17

20 Preparación de Derivados estables al aire de Hidroquinona de la Familia de Moléculas de Geldanamicina

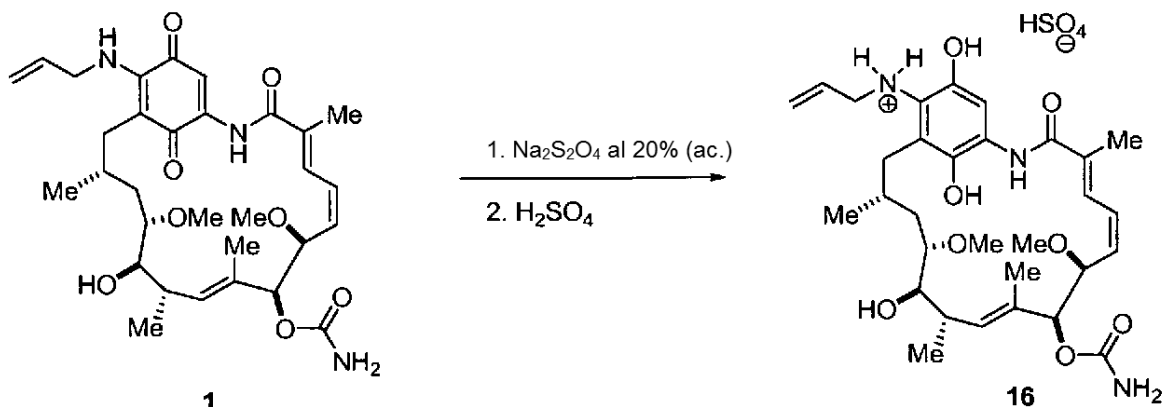


25 El compuesto de Fórmula (1) (0,450 g, 0,768 mmol, 1,0 equiv.) se disolvió en diclorometano (50 ml) y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (50 ml). La solución se agitó durante 30 minutos. La capa orgánica se recogió, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se transfirió a un matraz de fondo redondo. A esta solución se le añadió una solución de HCl en dioxano (4 N, 0,211 ml, 1,1 equiv.). La mezcla resultante se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. Se fraccionó lentamente de la solución un sólido de color amarillo. El sólido de color amarillo se purificó por recristalización en MeOH/EtOAc para producir 0,386 g del IPI-504 (15).

30

Ejemplo 18

Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina

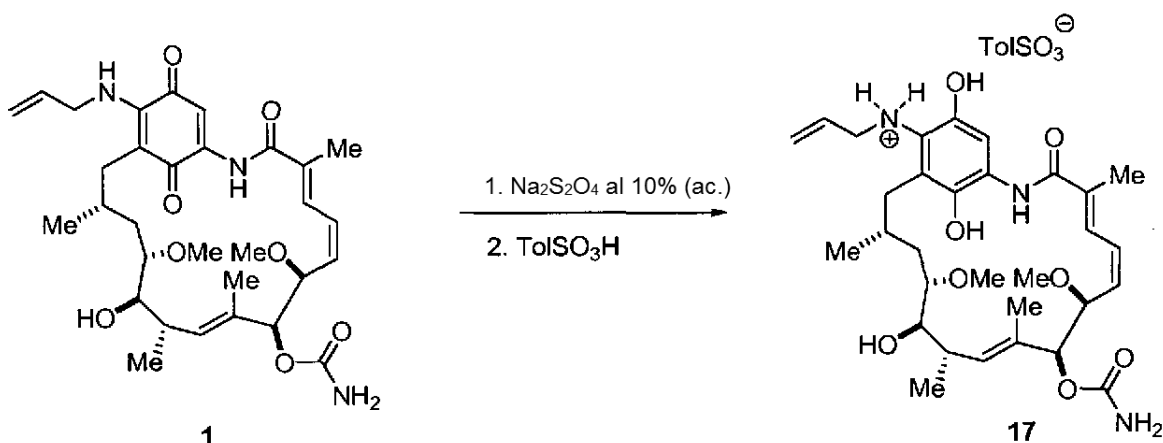


35

El compuesto de Fórmula (1) (0,30 g, 0,5 mmol, 1,0 equiv.) se disolvió en MTBE (3 ml) y se agitó con una solución acuosa al 20% de hidrosulfito sódico (2 ml). La solución se agitó durante 60 minutos. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera y se transfirió a un matraz de fondo redondo. Esta solución se enfrió -5 °C y se puso en una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se le añadió gota a gota una solución de H₂SO₄ en etanol deuterado (0,50 mmol de H₂SO₄ en 0,5 ml de EtOH). La mezcla resultante se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno y se calentó a TA. La suspensión de color amarillo se agitó durante 30 minutos más a TA y después se concentró. Se añadió MTBE (7 ml) y la suspensión se filtró. El sólido de color amarillo que se recogió, se lavó con MTBE y se secó a presión reducida para producir 0,30 g del producto deseado.

10 Ejemplo 19

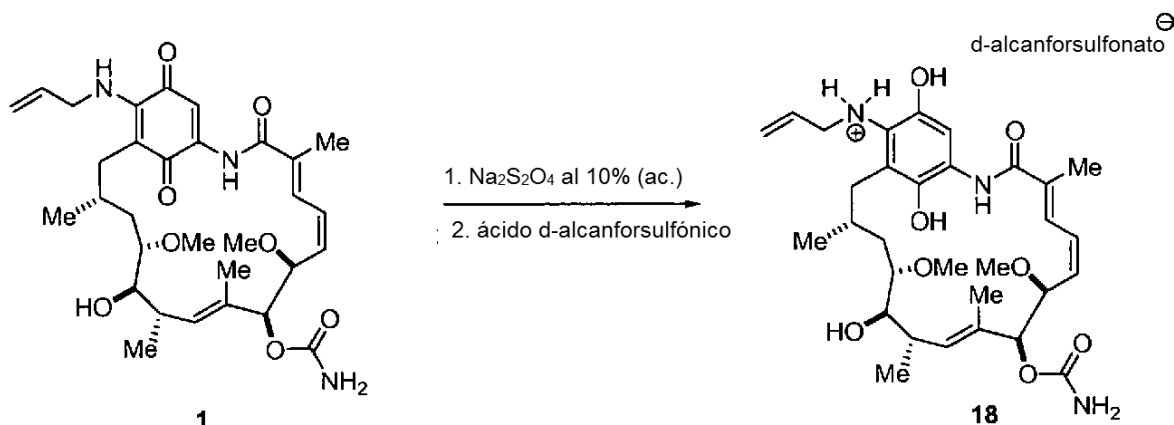
Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina



El compuesto de Fórmula (1) (0,30 g, 0,5 mmol, 1,0 equiv.) se disuelve en DCM (6 ml) y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (3,5 ml). La solución se agitó durante 60 minutos. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera y se transfirieron 1,2 ml (*calc* 0,1 mmol de hidroquinona) a un matraz de fondo redondo. Esta solución se puso en una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se le añadió gota a gota una solución de ácido p-toluenosulfónico en IPA deuterado (0,100 mmol de p-toluenosulfónico en 0,25 ml de IPA). La mezcla resultante se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora, momento en el que la mezcla se concentró y la masa en bruto se suspendió de nuevo en EtOAc/MTBE. El sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida para producir 0,068 g del producto deseado.

25 Ejemplo 20

Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina



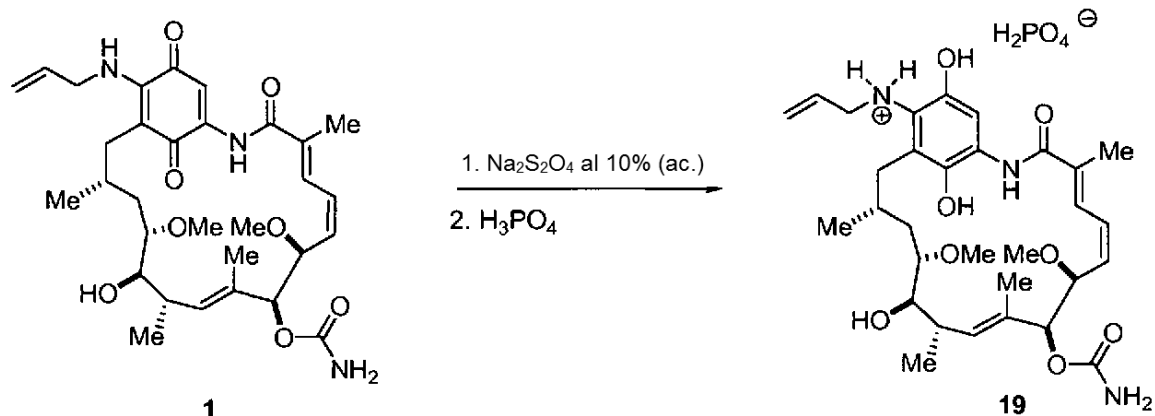
El compuesto de Fórmula (1) (0,30 g, 0,5 mmol, 1,0 equiv.) se disolvió en DCM (6 ml) y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (3,5 ml). La solución se agitó durante 60 minutos. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera y se transfirieron 1,2 ml (*calc* 0,1 mmol de hidroquinona) a un matraz de fondo redondo. Esta solución se puso en una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se le añadió gota a gota una solución de ácido d-alcanforsulfónico en IPA deuterado (0,100 mmol de ácido d-alcanforsulfónico en 0,25 ml de IPA). La mezcla resultante se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora, momento en el que la mezcla se

concentró y la masa en bruto se suspendió de nuevo en EtOAc/MTBE. El sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida para producir 0,051 g del producto deseado.

Ejemplo 21

5

Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina

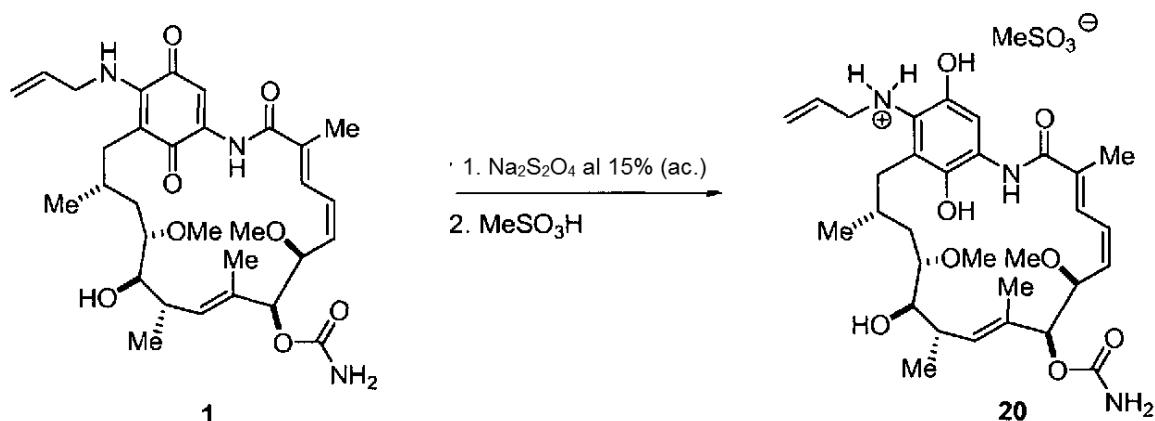


- 10 El compuesto de Fórmula (1) (0,30 g, 0,5 mmol, 1,0 equiv.) se disolvió en DCM (6 ml) y se agitó con una solución acuosa al 10% de hidrosulfito sódico (3,5 ml). La solución se agitó durante 60 minutos. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera y se transfirieron 1,2 ml (*calc* 0,1 mmol de hidroquinona) a un matraz de fondo redondo. Esta solución se puso en una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se le añadió gota a gota una solución de H₃PO₄ en IPA deuterado (0,100 mmol de H₃PO₄ en 0,25 ml de IPA). La mezcla resultante se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora, momento en el que la mezcla se concentró y la masa en bruto se suspendió de nuevo en EtOAc/MTBE. El sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida para producir 0,050 g del producto deseado.

Ejemplo 22

20

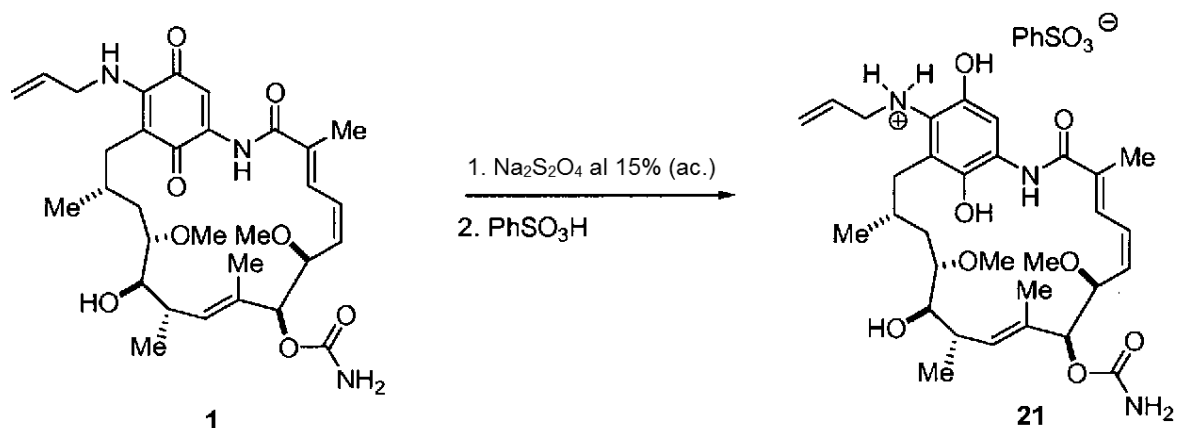
Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina



- 25 El compuesto de Fórmula (1) (0,50 g, 0,8 mmol, 1,0 equiv.) se disolvió en DCM (8 ml) y se agitó con una solución acuosa al 15% de hidrosulfito sódico (4 ml). La solución se agitó durante 60 minutos. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera y se transfirieron 2 ml (*calc* 0,2 mmol de hidroquinona) a un matraz de fondo redondo. Esta solución se puso en una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se le añadió gota a gota una solución de MeSO₃H en IPA deuterado (0,200 mmol de MeSO₃H en 0,4 ml de IPA). La mezcla resultante se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora, momento en el que la mezcla se concentró y la masa en bruto se suspendió de nuevo en EtOAc. El sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida para producir 0,112 g del producto deseado.

Ejemplo 23

Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina



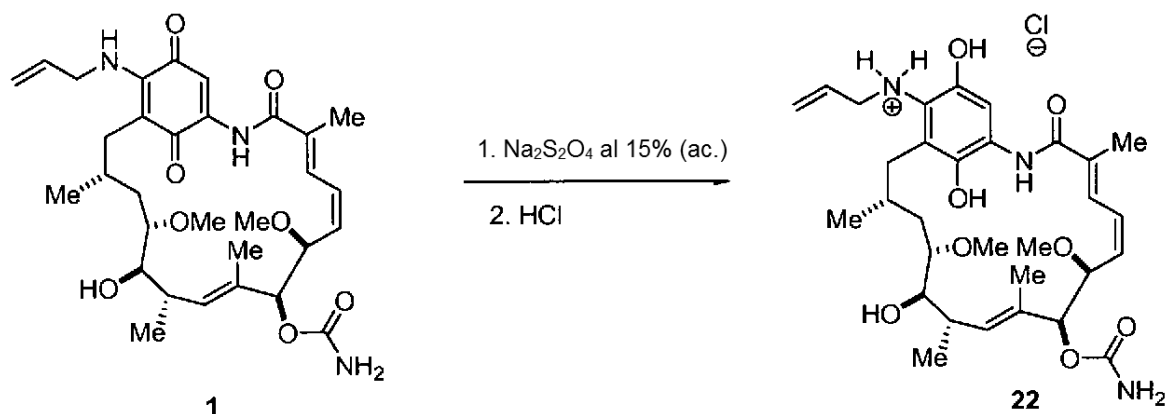
5

El compuesto de Fórmula (1) (0,50 g, 0,8 mmol, 1,0 equiv.) se disolvió en DCM (8 ml) y se agitó con una solución acuosa al 15% de hidrosulfito sódico (4 ml). La solución se agitó durante 60 minutos. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera y se transfirieron 2 ml (*calc* 0,2 mmol de hidroquinona) a un matraz de fondo redondo. Esta solución se puso en una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se le añadió gota a gota una solución de PhSO₃H en IPA deuterado (0,200 mmol de PhSO₃H en 0,4 ml de IPA). La mezcla resultante se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora, momento en el que la mezcla se concentró y la masa en bruto se suspendió de nuevo en EtOAc. El sólido se recogió por filtración y se secó a presión reducida para producir 0,118 g del producto deseado.

10

Ejemplo 24

Preparación de Derivados de Hidroquinona estables en aire de la Familia de Moléculas de Geldanamicina



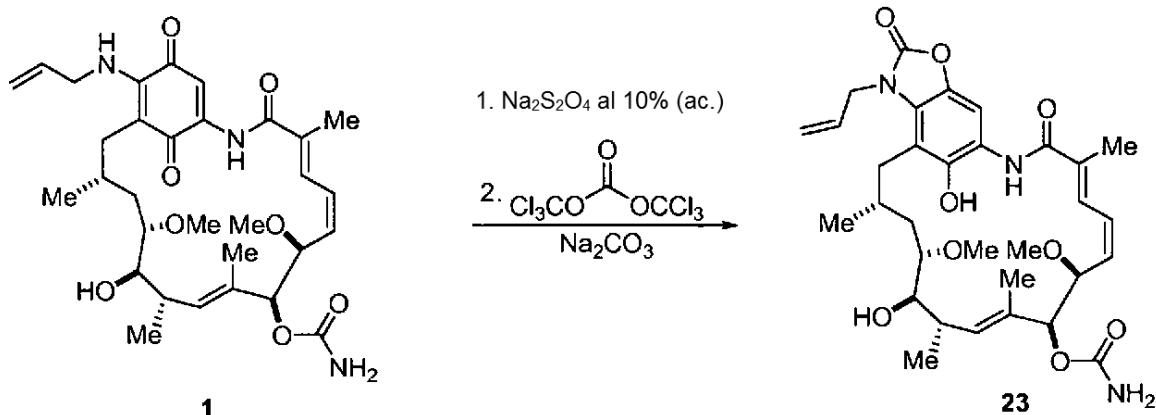
20

Se agitó vigorosamente 17-Alilamin-17-Demetoxigeldanamicina (10,0 g, 17,1 mmol) en acetato de etilo (200 ml) con una solución recién preparada de hidrosulfito sódico acuoso al 10% (200 ml) durante 2 h, a temperatura ambiente. El color cambió de púrpura oscuro a amarillo brillante, indicando una reacción completa. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio (15 g). El agente de secado se aclaró con acetato de etilo (50 ml). El filtrado combinado se acidificó con cloruro de hidrógeno 1,5 M en acetato de etilo (12 ml) a pH 2 durante 20 min. La suspensión resultante se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Los sólidos se aislaron por filtración, se aclararon con acetato de etilo (50 ml) y se secaron a 40 °C, 1 mm de Hg, durante 16 h para proporcionar 9,9 g (91%) de un sólido blanquecino. Se añadió clorhidrato de hidroquinona en bruto (2,5 g) a una solución agitada de ácido clorhídrico ac. 0,01 N al 5% en metanol (5 ml). La solución resultante se aclaró por filtración, después se diluyó con acetona (70 ml). Aparecieron sólidos después de 2-3 min. La suspensión resultante se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, después, durante 1 h a 0-5 °C. Los sólidos se aislaron por filtración, se aclararon con acetona (15 ml) y se secaron.

25

30

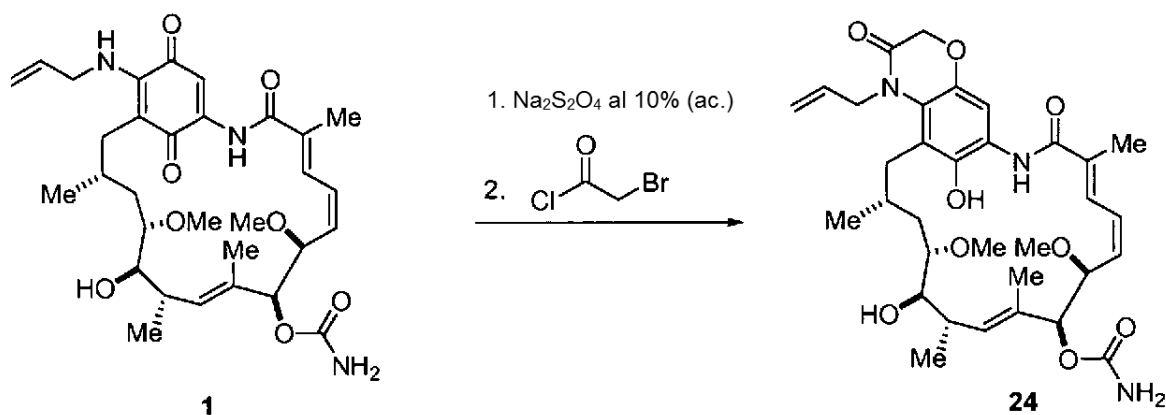
35

Ejemplo de Referencia 25

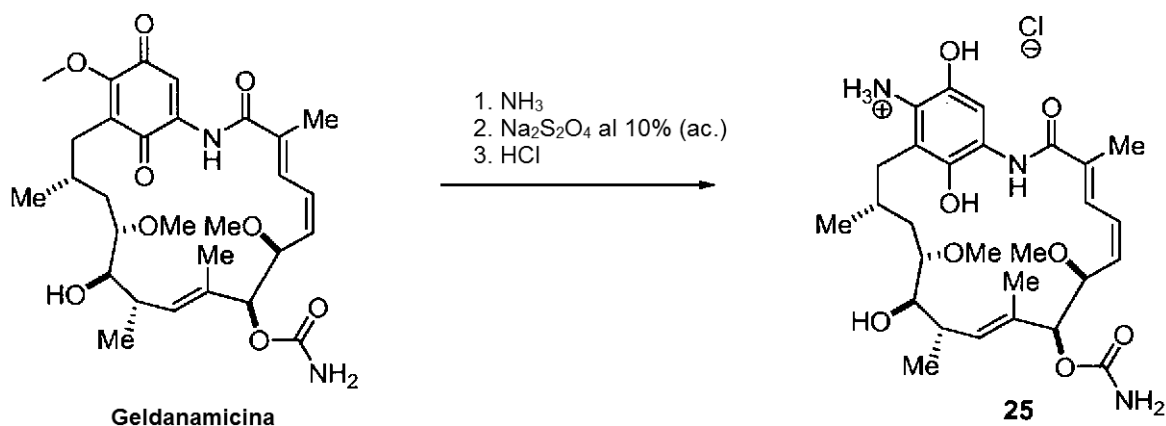
- 5 Se agitó vigorosamente 17-alilamin-17-demetoxigeldanamicina (0,350 g, 0,598 mmol) en acetato de etilo (7 ml) con una solución recién preparada de hidrosulfito sódico acuoso al 10% (7 ml) durante 1 h a temperatura ambiente. El color cambió de púrpura oscuro a amarillo claro, indicando una reacción completa. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio (1 g). El agente de secado se aclaró con acetato de etilo (1 ml). Las capas orgánicas combinadas se agitaron a temperatura ambiente y a esto, se le añadió trifosgeno (0,079 g, 0,239 mmol).
- 10 Se formó un precipitado y la mezcla resultante se dejó en agitación durante 2 h, momento en el que el sólido se retiró por filtración y la solución orgánica se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna para producir 17 mg del producto deseado.

Ejemplo de Referencia 26

15

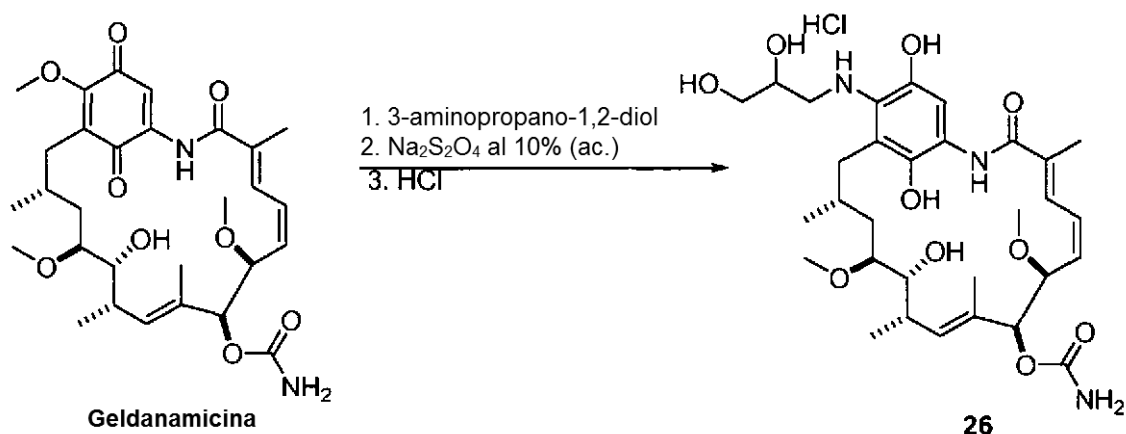


- Se agitó vigorosamente 17-alilamin-17-demetoxigeldanamicina (0,825 g, 0,141 mmol) en acetato de etilo (17,5 ml) con una solución recién preparada de hidrosulfito sódico al 10% (17,5 ml) durante 1 h a temperatura ambiente. El color cambió de púrpura oscuro a amarillo claro, indicando una reacción completa. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio (1 g). El agente de secado se aclaró con acetato de etilo (1 ml). Las capas orgánicas combinadas se agitaron a temperatura ambiente y se les añadió cloruro de bromoacetilo (0,222 g, 1,41 mmol). Se formó un precipitado y la mezcla resultante se dejó en agitación durante 12 h, momento en el que el sólido se retiró por filtración y la solución orgánica se concentró. El material en bruto se disolvió en una mezcla 1:1 de THF/Agua (16 ml). Se añadió Na_2CO_3 (10 equiv.) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 1 h. La reacción se interrumpió con NaHCO_3 saturado, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró para producir 1,1 mg del producto deseado.
- 20
- 25

Ejemplo de Referencia 27

5 Se añadió Geldanamicina (1,12 g, 2 mmol, 1 equiv.) a DCM anhidro (5 ml). Se añadió NH_3 en MeOH a esta solución (9 ml, 100 mmol, 50 equiv.) y se dejó en agitación durante 24 horas. Momento en el que la solución de reacción se diluyó con DCM y se extrajo con agua, seguido de HCl diluido. La capa orgánica se recogió, se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para producir un sólido de color púrpura. Este sólido se recrystalizó dos veces en acetona/heptanos para producir 0,239 g de 17-amin-17-demetoxigeldanamicina.

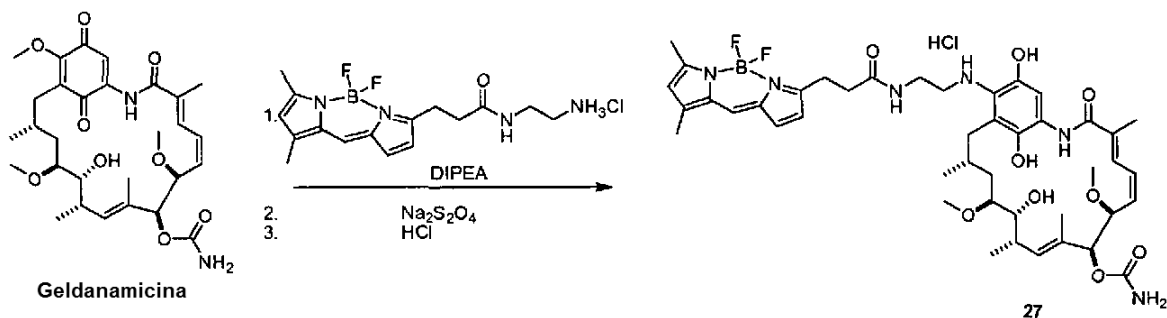
10 Se disolvió 17-amin-17-demetoxigeldanamicina (0,55 g, 1 mmol, 1 equiv.) en EtOAc (100 ml). Se añadió una solución recién preparada de hidrosulfito sódico acuoso al 10% (10 ml) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El color cambió de púrpura oscuro a amarillo claro, indicando una reacción completa. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio. El agente de secado se aclaró con acetato de etilo (2 x 10 ml). El filtrado combinado se acidificó con cloruro de hidrógeno 1,5 M en acetato de etilo (1 ml) a pH 2 durante 20 min. La suspensión resultante se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Los sólidos se aislaron por filtración, se aclararon con acetato de etilo (10 ml) y se secaron al vacío para producir el producto (0,524 g, 87% de rendimiento).

20 **Ejemplo de Referencia 28**

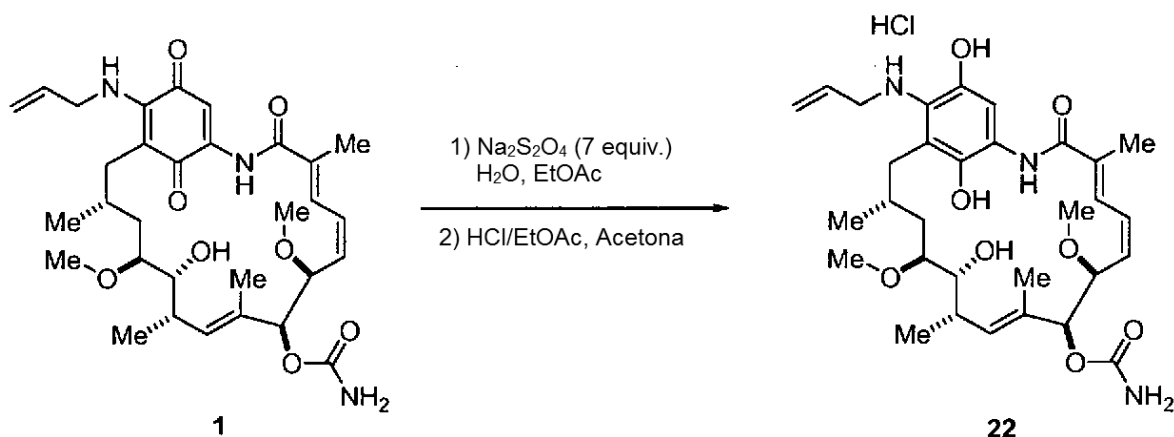
25 Se disolvió Geldanamicina (0,500 g, 0,892 mmol, 1 equiv.) en THF (10 ml) 3-amin-1,2-propanodiol (0,813 g, 8,92 mmol, 10 equiv.). La reacción se agitó durante 64 horas. Después, la reacción se detuvo con HCl diluido y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se recogió, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó usando cromatografía en columna para producir 27 mg de la geldanamicina 17-amino sustituida.

30 La 17-amino geldanamicina (0,200 g, 0,323 mmol, 1 equiv.) se disolvió en EtOAc (4 ml) y se trató con una solución recién preparada al 10% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ en agua (4 ml). Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 1 hora. Después, la capa orgánica se recogió. La capa acuosa se extrajo con 2 x 5 ml de EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con agua y se secaron sobre Na_2SO_4 . Después, la capa orgánica se trató con HCl en EtOAc (1,6 M, 0,6 ml) y se agitó durante 20 minutos. La solución de reacción se concentró a presión reducida para producir el producto (0,009 g).

35

Ejemplo de Referencia 29

- 5 Se añadieron Geldanamicina (0,022 g, 0,04 mmol, 1,5 equiv.) y BODIPY-FL-EDA-HCl (0,010 g, 0,026 mmol, 1 equiv.) a DCM anhidro (2 ml). Se añadió DIPEA (30 μ l, 0,16 mmol, 6 equiv.) y la solución de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 72 horas. Después, la reacción se diluyó con DCM, se extrajo con agua, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna para producir la benzoquinona 17-amino sustituida. Este material se disolvió en EtOAc (20 ml) y se trató con una solución recién preparada al 10% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ en agua (5 ml). Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 1 hora. Después, la capa orgánica se recogió. La capa acuosa se extrajo con 2 x 5 ml de EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con agua y se secaron sobre Na_2SO_4 . Después, la capa orgánica se trató con HCl en EtOAc (1,6 M, 0,6 ml) y se agitó durante 20 minutos. Después, la solución de reacción se concentró a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó resuspendiendo el material en EtOAc/MTBE. El sólido se lavó con MTBE y se secó a presión reducida para producir el producto (0,04 g).

Ejemplo 30

- 20 Se añadió acetato de etilo anhidro (170 ml) a un matraz, seguido de 17-AAG (8,41 g, 1,44 mmol, 1 equiv.). La mezcla de color púrpura resultante se agitó vigorosamente en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió una solución recién preparada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ac.) al 10% (1,682 g en 170 ml de agua desionizada, 10,1 mmol, 7 equiv.) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 70 min. El color cambió de púrpura a naranja, indicando una reacción completa. Se dejó que se separan las capas y la fase acuosa de fondo se retiró usando un embudo de decantación. La capa orgánica se secó con MgSO_4 . El agente de secado se retiró por filtración. El filtrado se transfirió a un matraz de evaporación rotatoria. Se usó acetato de etilo (50 ml), en porciones, para lavar el lecho de MgSO_4 y el filtrado también se lavó en el matraz de evaporación rotatoria.
- 30 La mezcla de color naranja-pardo se concentró en el evaporador rotatorio hasta un aceite. El acetato de etilo restante se retiró al vacío.

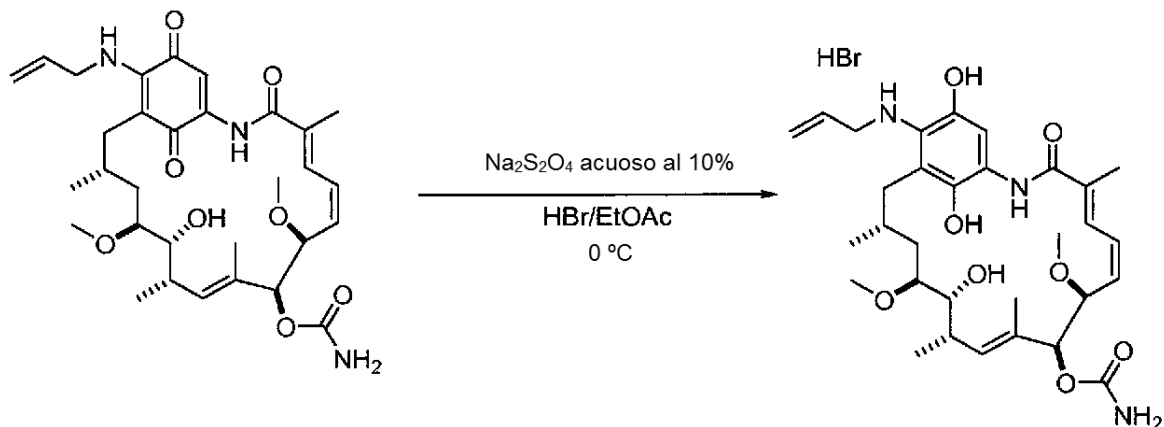
35 Mientras esta mezcla se concentraba, se preparó una solución 5,3 M de HCl en acetato de etilo. Se añadió acetato de etilo (16,8 ml) en un matraz Erlenmeyer y se burbujeó goas de HCl en la mezcla en agitación durante 1 h (con refrigeración, acetona/hielo húmedo) para conseguir la saturación. Después, la mezcla se concentró a temperatura ambiente en una cámara de aire de nitrógeno.

40 El aceite se disolvió en acetona (252 ml) y se transfirió a un matraz de reacción equipado con un embudo de adición, un agitador, un termómetro y una atmósfera de nitrógeno. El filtrado combinado y el enjuague se acidificaron durante 5 min a un pH final de 2,5. La suspensión resultante se agitó durante 18 min a temperatura ambiente y después los

sólidos por filtración y se lavaron dos veces con acetona (84 ml). Después, el sólido se secó a presión reducida para producir el producto.

Ejemplo 31

5



Se agitó vigorosamente 17-Alilamin-17-Demetoxigeldanamicina (1,0 g, 1,71 mmol) en acetato de etilo (20 ml) con una solución recién preparada de hidrosulfito sódico acuoso al 10% (2 g en 20 ml de agua) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El color cambió de púrpura oscuro a amarillo claro, indicando una reacción completa. Las capas se separaron y la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio (1 g). El disolvente de reacción se recogió y el agente de secado se aclaró con acetato de etilo (1 ml). El filtrado combinado se enfrió a 0 °C y se acidificó con bromuro de hidrógeno 1,5 M en acetato de etilo hasta que se formó un precipitado. La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los sólidos se aislaron por filtración, se aclararon con acetato de etilo (1 ml) y se secaron a 40 °C, 1 mm de Hg, durante 16 h para proporcionar 0,352 g (31%) de un sólido de color blanquecino.

10

15

Ejemplo 32

20 Preparación de Citrato 50 mM, Ascorbato 50 mM, pH 3,1, EDTA 2,44 mM Como la Formulación tampón para los Compuestos de la Presente invención

Un ejemplo de preparación de formulación:

25

Para una preparación de 1 l de tampón de formulación, se añadieron 9,6 g de ácido cítrico (USP), 8,8 g de ácido ascórbico (USP) y 1,0 g de EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético, sal disódica-cálcica, dihidrato, USP), con una barra de agitación magnética recubierta con Teflón a un matraz volumétrico de 1 l. Se añadió una aguja estéril para inyección (USP) al 90-95% del volumen final del matraz. La solución se agitó enérgicamente para disolver todos los sólidos. El pH del tampón se ajustó a 3,1 usando una solución de NaOH. Se añadió WFI al volumen final. El tampón se filtró al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 micrómetros. Antes de su uso, la solución se roció con nitrógeno durante 1-2 h. El tampón de formulación se conservó en una atmósfera de nitrógeno a 4 °C en un envase cerrado.

30

Preparación del Producto Farmacológico Formulado:

35

EL producto farmacológico se formuló a 4 °C mediante disolución controlada del compuesto sólido 15 con tampón de formulación roció con nitrógeno preenfriado en un recipiente con camisa de refrigeración por agua en una cámara de aire de nitrógeno. La solución de compuesto formulado 15 se almacenó a 4 °C en una cámara de aire de nitrógeno.

40

A continuación se ofrece un ejemplo de la preparación del producto farmacológico formulado en solución.

Un matraz volumétrico de 10 l se cargó con el compuesto sólido 15 (500 mg) y se purgó con nitrógeno. El tampón de formulación (citrato 50 mM, ascorbato 50 mM, EDTA 2,44 mM, pH 3,1) se roció con nitrógeno hasta que el contenido de oxígeno disuelto fue <0,5 mg/l y se enfrió en hielo. Una parte del tampón (aproximadamente 5-7 ml) se añadió al matraz volumétrico y se agitó enérgicamente hasta que se disolvió todo el sólido. Después, el tampón se añadió a la cámara de 10 ml en el matraz volumétrico. La solución se mantuvo fría en hielo tanto como fue posible. Se usó una jeringa de 10 ml con filtro de jeringa (Millipore, membrana Durapore, 0,2 micrómetros) para filtrar la solución transparente de color ligeramente marrón en un vial de vidrio (USP Tipo I). La solución de compuesto de fórmula 15 se conservó a 4 °C en una cámara de aire de nitrógeno.

45

50

A continuación se ofrece un ejemplo de la preparación del producto farmacológico formulado en forma sólida

Se añadieron 52,50 g de agua estéril a un matraz de 100 ml equipado con una barra de agitación magnética. Se añadieron 6,305 g de monohidrato de ácido cítrico al matraz de 100 ml y la mezcla resultante se agitó hasta que todo el ácido cítrico se disolvió en la solución. Después, se añadieron 5,284 g de ácido L-ascórbico al matraz de 100 ml y la solución se agitó hasta que todo el ácido ascórbico se disolvió en la solución. Después, se añadieron 0,600 g de edetato cálcico disódico al matraz de 100 ml y la mezcla resultante se agitó hasta que todo el edetato cálcico disódico se hubo disuelto en la solución. Después, el pH de la solución se ajustó a un pH de 3,1 añadiendo lentamente una solución de hidróxido de sodio 5M en agua. Después, la solución se roció con nitrógeno filtrado (Millipak 20, durapore de 0,22 micrómetros) durante 2 horas. Después, se enfriaron 52,04 g de la solución rociada a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno con agitación. Se añadieron 2,80 g de compuesto 15 y la mezcla resultante se agitó hasta que se disolvió todo el compuesto 15. Esta solución se filtró estéril usando un filtro Millipak 200 de Durapore con tamaño de poro de 0,22 micrómetros a 0 °C. Después, la cámara de aire del recipiente receptor se lavó abundantemente con nitrógeno filtrado (Millipak 20, durapore de 0,22 micrómetros).

Después, el recipiente receptor se puso en un liofilizador, que se había preenfriado a -40 °C. La cámara del liofilizador se mantuvo a -40 °C durante 3 horas a 1 atm. Después, la presión de la cámara del liofilizador se elevó a 100 micrómetros durante una hora. Después, la temperatura de la cámara se elevó a -20 °C durante 2 horas y el vacío se mantuvo a 100 micrómetros. Después, la temperatura de la cámara se elevó a 0 °C durante 2 horas y el vacío se mantuvo a 100 micrómetros. Después, la temperatura de la cámara se elevó a +10 °C durante 2 horas y el vacío se mantuvo a 100 micrómetros. Después, la temperatura de la cámara se elevó a +20 °C durante 2 horas y el vacío se mantuvo a 100 micrómetros. Después, la temperatura de la cámara se mantuvo a +20 °C durante 48 horas y el vacío se mantuvo a 100 micrómetros. Después, la cámara se purgó con nitrógeno y se acopló un tapón al recipiente que contenía la formulación. La formulación se conservó a -20 °C.

Ejemplo 33

Preparación de Citrato 75 mM, Ascorbato 170 mM, pH 3,0, EDTA 2,44 mM, gamma-ciclodextrina al 1% (p/v) como el Tampón de Formulación para los Compuestos de la Presente Invención

Un ejemplo de preparación de formulación:

Para una preparación de tampón de formulación de 1 l, se añadieron 14,4 g de ácido cítrico, 30 g de ácido ascórbico, 10 g de gamma-ciclodextrina (ciclooctaamilosa) y 1,0 g de EDTA con una barra de agitación magnética recubierta con Teflón un matraz volumétrico de 1 l. Se añadió agua estéril para inyección a 90-95% del volumen final del matraz. La solución se agitó vigorosamente para disolver todos los sólidos. El pH del tampón se ajustó a 3,0 usando una solución de NaOH (calidad NF). Se añadió WFI al volumen final. El tampón se filtró al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 micrómetros. Antes de su uso, la solución se roció con nitrógeno durante 1-2 h. El tampón de formulación se conservó en una atmósfera de nitrógeno a 4 °C en un recipiente cerrado.

Preparación del Producto Farmacológico Formulado

El producto farmacéutico se formuló a 4 °C por disolución controlada del compuesto 15 con tampón de formulación rociado con nitrógeno preenfriado en una cámara de nitrógeno. La solución de compuesto formulado 15 se conservó a 4 °C en una cámara de nitrógeno.

Ejemplo 34

Preparación de citrato 50 mM, ascorbato 25 mM, Polisorbato-80 al 1% (v/v), EDTA al 0,1% (p/v), pH 3,0 como el Tampón de Formulación para Compuestos de la Presente invención

Un Ejemplo de Preparación de Formulación:

Para una preparación de tampón de formulación de 1 l, se añadieron 9,6 g de ácido cítrico, 4,4 g de ácido ascórbico, 10 ml de polisorbato-80 y 1,0 g de EDTA (ácido etilenediamino-tetra-acético, sal cálcica disódica, dihidrato) con una barra de agitación magnética recubierta con Teflón a un matraz volumétrico de 1 l. Se añadió agua estéril para inyección (WFI) a 90-95% del volumen final del matraz. La solución se agitó enérgicamente para disolver todos los sólidos. El pH del tampón se ajustó a 3,0 usando una solución de NaOH. Se añadió WFI al volumen final. El tampón se filtró al vacío a través de una unidad de filtro de 0,2 micrómetros. Antes del uso, la solución se roció con nitrógeno durante 1-2 h. El tampón de formulación se almacenó en una atmósfera de nitrógeno a 4 °C en un recipiente cerrado.

Preparación de Producto Farmacológico Formulado:

El producto farmacológico se formuló por disolución controlada del compuesto sólido **15** con un tampón de formulación rociado con nitrógeno. La solución **15** de compuesto Formulado se almacenó a 4 °C en una cámara de nitrógeno.

Ejemplo 35Materiales y métodos para análisis *in vitro*Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer humano SKBr3, MV4-11, K562, SK-MEL-28, LnCAP y MDA-MB-468 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). El Dr. Teru Hideshima (Jerome Lipper Multiple Myeloma Center, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, Estados Unidos) proporcionó las células RPMI-8226 y MM1.s de mieloma múltiple. Se determinó que todas las líneas celulares carecían de micoplasmas. Las células se conservaron en medio RPMI-1640 complementado con FBS termo inactivado al 10%, 50 unidades/ml de estreptomycin y 50 unidades/ml de penicilina y se incubó a 37 °C en CO₂ al 5%. Las células adherentes se disociaron con tripsina al 0,05% y EDTA al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio antes de sembrar en placa para experimentación.

Análisis *in vitro*Citotoxicidad de células MM1.s

Ensayo con azul Alamar. Se incubaron células MM1.s (50.000/pocillo) durante 72 h con concentraciones en aumento del compuesto de ensayo. Se añadió azul Alamar a los pocillos y se midió la fluorescencia 4 h después de la incubación a 37 °C.

Citotoxicidad de células SKBr3

Se incubaron células SKBr3 durante 72 h con concentraciones en aumento del compuesto de ensayo. Para los estudios de viabilidad se añadió azul Alamar y después de 6h de incubación se realizó la lectura de los pocillos.

Citotoxicidad de células MDA-MB-468

Se incubaron células MDA-MB-468 durante 72 h con concentraciones en aumento del compuesto de ensayo. Para los estudios de viabilidad se añadió azul Alamar y después de 6h de incubación se realizó la lectura de los pocillos.

Citotoxicidad de células MV4-11

Se incubaron células MV4-11 durante 3 días con concentraciones en aumento del compuesto de ensayo. La viabilidad celular se evaluó usando una lectura con azul Alamar.

Citotoxicidad de células K562

Se incubaron células K562 con concentraciones en aumento del compuesto de ensayo. La viabilidad celular se evaluó usando una lectura con azul Alamar.

Citotoxicidad de células SK-MEL-28

Se añadieron concentraciones en aumento del compuesto de ensayo a células SK-MEL-28 en cultivo durante 2, 3 o 4 días y la viabilidad de las células se midió usando azul Alamar.

Citotoxicidad de células LnCAP

Se añadieron concentraciones en aumento del compuesto de ensayo a células LnCAP en cultivo durante 4 días y la viabilidad de las células se midió usando azul Alamar.

Ejemplo 36Ensayo de unión competitiva a HSP90 para 17-AAG y el compuesto **15**Materiales

La proteína Hsp90 humana natural aislada de células HeLa (SPP-770), la Grp94 canina recombinante (SPP-766) y la Hsp70 humana recombinante (ESP-555) se adquirieron en Stressgen Biotechnologies (Victoria, BC). Los

comprimidos inhibidores de proteasa Complete™ se obtuvieron en Roche Diagnostics (Indianápolis, IN). Los productos químicos y reactivos restantes se adquirieron en Sigma-Aldrich y eran de calidad analítica o superior.

Ensayo de unión a FP -- unión de BODIPY-GDM a proteínas purificadas

5 Los procedimientos se modificaron basándose en Llauger-Bufi *et al.* (Llauger-Bufi L, Felts SJ, Huezos H, Rosen N, Chiosis G. Synthesis of novel fluorescent probes for the molecular chaperone Hsp90. *Bioorg Med Chem Lett* (2003) 13: 3975-3978) y en Kim *et al.* (Kim J, Felts S, Llauger L, He H, Huezos H, Rosen N, Chiosis G. Development of a fluorescence polarization assay for the molecular chaperone Hsp90. *J Biomol Screening* (2004) 9: 375-381). Se preparó una solución reciente de BODIPY-GDM 20 nM en tampón de ensayo de unión a FP [HEPES-KOH 20 mM, pH 7,3, EDTA 1,0 mM, cloruro de potasio 100 mM, cloruro de magnesio 5,0 mM, NP-40 al 0,01%, γ -globulina bovina (BGG) 0,1 mg/ml, DTT 1,0 mM e inhibidor de proteasa Complete™] a partir de una solución madre 20 μ M en DMSO. Diez microlitros de esta solución se dispensaron en cada pocillo de una microplaca de 384 pocillos de fondo redondo de color negro (Corning n° 3676). Después se añadió el mismo volumen de solución Hsp90 humana diluida en serie en el tampón de ensayo de unión a FP para proporcionar concentraciones finales de 10 nM de BODIPY-GDM y Hsp90 variando la concentración de 6,25 μ M a 0,10 nM. La concentración final del DMSO fue de 0,05%. Después de 3 h de incubación a 30 °C, la anisotropía de fluorescencia se midió en un lector de placa multimarcador EnVision 2100 equipado con un filtro de excitación a 485 nm y un filtro de emisión P/S de 535 nm (Perkin Elmer, Boston, MA).

20 Competición por 17-AAG y análogos

17-AAG y el compuesto **15** se disolvieron primero en DMSO para proporcionar soluciones madre a concentraciones de 5,0 y 1,0 mM. Para cada compuesto, se prepararon diluciones en serie recientes en tampón de ensayo de unión a FP de 20 μ M a 0,20 nM. También se preparó una solución que contenía BODIPY-GDM 20 nM y Hsp90 80 nM en tampón de ensayo de unión a FP (DMSO al 0,10%). En una microplaca de 384 pocillos, se mezclaron 10 μ l de la solución que contenía BODIPY-GDM y Hsp90 con el mismo volumen de las series en dilución del compuesto para proporcionar concentraciones finales de BODIPY-GDM 10 nM, Hsp90 40 nM y diversas concentraciones del compuesto específico de 10 μ M a 0,10 nM. La concentración máxima de DMSO fue de 0,25% en la mezcla de ensayo final. Después de 3 horas de incubación a 30 °C, la anisotropía de fluorescencia se midió en un lector de placa EnVision 2100.

Se realizaron ensayos con atmósfera de nitrógeno en una caja de manipulación con guantes LabMaster (M. Braun, Stratham, NH). Típicamente, 50 ml del tampón de ensayo de unión a FP se desoxigenaron mediante ciclos repetidos de evacuación y lavado abundante con argón. Las soluciones de proteína y las soluciones madre del compuesto en DMSO se llevaron a la caja de manipulación guantes como líquidos congelados. Todas las diluciones y posteriores mezclas de los componentes del ensayo se realizaron dentro de la caja de manipulación guantes como se describe anteriormente. Después de 3 h de incubación a 30 °C, la microplaca se llevó a la caja de manipulación guantes y la anisotropía de fluorescencia se midió inmediatamente en un lector de placa EnVision 2100.

40 Análisis de datos

La unión de BODIPY-GDM a Hsp90 produce aumentos simultáneos de la anisotropía de fluorescencia (AF) e intensidad de fluorescencia (IF). Para calcular la K_d , se ajustó una curva de unión de IF frente a la concentración de Hsp90 (monómero) mediante una función logística de cuatro parámetros:

$$IF = IF_{\min} + \frac{(IF_{\max} - IF_{\min})}{1 + (CE_{50}/[E]_{\text{total}})^{\text{Hill}}}$$

45 forzando el coeficiente de Hill a 1 para simplificar. A partir de los valores de IF_{\max} (ligando unido) e IF_{\min} (ligando libre), se calculó un factor Q mediante la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{IF_{\max}}{IF_{\min}}$$

50

La curva de unión de AF frente a la concentración de Hsp90 se ajustó posteriormente usando el programa SCIENTIST y las siguientes ecuaciones:

$$K_d = \frac{[E]_{\text{libre}} \times [L]_{\text{libre}}}{[EL]}$$

$$= \frac{([E]_{\text{total}} - [EL]) \times ([L]_{\text{total}} - [EL])}{[EL]}$$

y expresándose la AF como la suma pesada de las contribuciones de las formas libre y unida del ligando:

$$AF = \frac{AF_{\text{mín}} \times [L]_{\text{libre}} + AF_{\text{máx}} \times Q \times [EL]}{[L]_{\text{libre}} + Q \times [EL]}$$

$$= \frac{AF_{\text{mín}} \times ([L]_{\text{total}} - [EL]) + AF_{\text{máx}} \times Q \times [EL]}{([L]_{\text{total}} - [EL]) + Q \times [EL]}$$

5

Las curvas de unión de competencia se analizaron de una manera similar. La disminución de la IF en función del aumento de concentración del inhibidor se describe mediante la función logística:

$$IF = IF_{\text{mín}} + \frac{(IF_{\text{máx}} - IF_{\text{mín}})}{1 + ([I]_{\text{total}}/CE_{50})^{\text{Hill}}}$$

10

La curva de AF frente a concentración de inhibidor se ajustó posteriormente usando una función implícita para el equilibrio de unión competitiva para proporcionar K_i :

$$[E]_{\text{total}} = [E]_{\text{libre}} + [EL] + [EI]$$

$$= [E]_{\text{libre}} + \frac{[E]_{\text{libre}} \times [L]_{\text{total}}}{[E]_{\text{libre}} + K_d} + \frac{[E]_{\text{libre}} \times [I]_{\text{total}}}{[E]_{\text{libre}} + K_i}$$

15 proporcionándose los valores conocidos de $[E]_{\text{total}}$, $[L]_{\text{total}}$ y K_d .

Sumario

20 Este experimento demuestra que ambas ansamicinas de quinona e hidroquinona (por ejemplo, 17-AAG y el compuesto **15**) son activas como inhibidores de HSP90.

Ejemplo 37

Análisis in vivo

25

Modelo de mieloma múltiple

30 Los efectos del compuesto de ensayo se estudiaron en una línea celular de mieloma múltiple humana RPMI-8226 en ratones SCID/NOD macho. En este estudio, a ratones macho se les implantó por vía subcutánea células RPMI-8226 (1×10^7 células). Cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó 100 mm^3 , los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento (N=10-15/grupo) para recibir vehículo (citrateo 50 mM, ascorbato 50 mM, EDTA 2,4 mM ajustado a pH 3,0) o 100 mg/kg (300 mg/m^2) del compuesto de ensayo tres días consecutivos a la semana. El artículo de ensayo o vehículo se administró por vía intravenosa (IV) mediante la vena de la cola en un volumen de 0,2 ml durante aproximadamente 20 segundos (s). Los animales se sacrificaron después de 45 días y se compararon los volúmenes tumorales.

35

Modelo de carcinoma de mama

40 Se realizó un estudio en el modelo de carcinoma de mama MDA-MB-468 para evaluar la capacidad del compuesto de ensayo para reducir la carga tumoral subcutánea. En este estudio, a ratones hembra atímicos nu/nu se les implantó por vía subcutánea células MDA-MB-468 (1×10^7 células). Cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó 100 mm^3 , los animales se asignaron al azar (N=10-15/grupo) a uno de los siguientes grupos de tratamiento; vehículo

o compuesto de ensayo a 100 mg/kg (300 mg/m²) dos veces a la semana cada semana. El artículo de ensayo o vehículo se administró por vía intravenosa (IV) mediante la vena de la cola en un volumen de 0,2 ml durante aproximadamente 20 segundos (s). Los animales se sacrificaron después de 120 días y se compararon los volúmenes tumorales.

5

Modelo de carcinoma de ovario

Se realizó un estudio en el modelo de xenoinjerto de ratón de ovario SKOV-3 para evaluar la capacidad del compuesto de ensayo para reducir la carga tumoral subcutánea. En este estudio, a ratones hembra atímicos nu/un se les implantó por vía subcutánea células SKOV-3 (1 x 10⁷ células). Cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó 100 mm³, los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento (N=10-15/grupo) para recibir vehículo, el compuesto de ensayo a 100 mg/kg (300 mg/m²) dos veces a la semana. El artículo de ensayo o vehículo se administró por vía intravenosa (IV) mediante la vena de la cola en un volumen de 0,1 ml durante aproximadamente 10 segundos (s). Los animales se sacrificaron después de 88 días y se compararon los volúmenes tumorales.

15

Modelo pulmonar de Lewis murino

Se realizó un estudio en el modelo pulmonar de Lewis murino para evaluar la capacidad de los compuestos de la presente invención para reducir tanto la carga subcutánea así como la frecuencia de metástasis pulmonar. En este estudio, a ratones C57B1/6 se les implantó por vía subcutánea células pulmonares de Lewis (1 x 10⁶ células). Cuando el tamaño pulmonar promedio alcanzó 71 mm³, los animales (N=10-15/grupo) se asignaron al azar a los siguientes grupos de tratamiento: vehículo y compuesto 15, 75 mg/m² lunes, miércoles y viernes (LXV) durante 3 ciclos. Cada ciclo consistía en 5 días por semana de tratamiento. El artículo de ensayo o vehículo se administró mediante la vena de la cola en un volumen de 0,2 ml durante aproximadamente 30 segundos. Los animales se sacrificaron después de 25 días y se compararon los volúmenes tumorales.

20

Carcinoma de próstata

Se realizaron dos estudios en modelos de xenoinjerto de próstata PC-3 para evaluar la capacidad del compuesto de ensayo para reducir la carga tumoral subcutánea como un solo agente o en combinación con un patrón de tratamiento actual. En ambos estudios, a ratones macho atímicos nu/nu se les implantó por vía subcutánea células PC-3 (1 x 10⁷ células). Cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó 100 mm³, los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento (N=10-15/grupo). En el primer estudio los ratones recibieron vehículo, el compuesto de ensayo 100 mg/kg (300 mg/m²) dos veces a la semana. El artículo de ensayo o vehículo se administró mediante la vena de la cola en un volumen de 0,2 ml durante aproximadamente 20 segundos. Los animales se sacrificaron después de 64 días y se compararon los volúmenes tumorales.

30

35

Se realizó un segundo estudio en este modelo para evaluar el compuesto de ensayo en combinación con el patrón de tratamiento, Taxotere. En este estudio, cada uno de los grupos individuales de 10-15 ratones se asignaron al azar para recibir vehículo, el compuesto de ensayo 100 mg/kg (300 mg/m²) dos veces a la semana, Taxotere 5 mg/kg (15 mg/m²) una vez a la semana o una combinación del compuesto de ensayo con Taxotere. Los animales se sacrificaron después de 64 días y se compararon los volúmenes tumorales.

40

Ejemplo 38

45

Resultados biológicos

A continuación se presentan los resultados del análisis de la actividad biológica de las hidroquinonas de la invención. Todos los valores se expresan como la media ± ETM. El análisis de los datos consistió en un análisis de varianza de una vía y, si fuese apropiado, seguido de ensayo Dunnett para evaluar las diferencias entre los grupos de vehículo y tratamiento. Se considera que las diferencias son significativas a un valor p < 0,05.

50

<u>Línea celular</u>	<u>Resultados <i>in vitro</i></u>	
	<u>Compuesto 15 (CE₅₀)</u>	<u>17-AAG (CE₅₀)</u>
MM1.s	307 nM	306 nM
SKBr3	32 nM	34 nM
MDA-MB-468	335 nM	356 nM
MV4-11	25 nM	38 nM
K562	29 nM	50 nM
SK-MEL-28	200 nM	----
LnCAP	73 nM	----

55

ES 2 409 351 T3

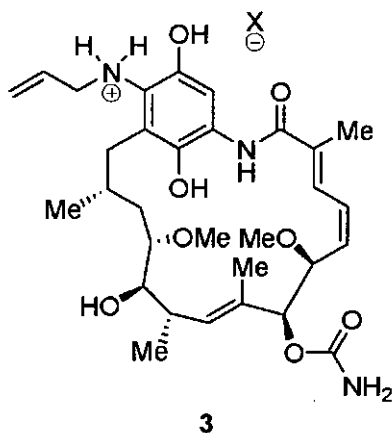
<u>Línea celular</u>	<u>Resultados <i>in vivo</i></u>	
	<u>% de crecimiento tumoral comparado con</u>	
	<u>vehículo</u>	
	<u>Compuesto 15</u>	<u>Compuesto 15 +</u>
<u>Taxotere</u>		
RPMI-8226	71%	
MDA-MB-468	76%	
SKOV-3	59%	
Células pulmonares de Lewis	60%	
PC-3	50%	84%

Unión del compuesto **15** y 17-AAG a HSP90

<u>Compuesto</u>	<u>K_i</u>
Compuesto 15	28 nM
17-AAG	67 nM

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 3:



5 donde

X⁻ es una base conjugada de un ácido farmacéuticamente aceptable.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde dicho ácido farmacéuticamente aceptable tiene un pKa entre aproximadamente -10 y aproximadamente 7 en agua.

10

3. El compuesto de la reivindicación 1, donde X⁻ se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro, bromuro, yoduro, H₂PO₄⁻, HSO₄⁻, metilsulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, trifluorometilsulfonato, 10-alcanforsulfonato, naftalen-1-ácido sulfónico-5-sulfonato, etan-1-ácido sulfónico-2-sulfonato, sal del ácido ciclámico, sal del ácido tiocianico, naftalen-2-sulfonato y oxalato.

15

4. El compuesto de la reivindicación 1, donde X⁻ es cloruro.

5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende además uno o más seleccionados entre: un antioxidante; un agente tamponante; y un quelante metálico.

25

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, donde dicho antioxidante es ascorbato, clorhidrato de cisteína, bisulfito sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico, tioglicerol, mercaptoacetato sódico, sulfoxilato de formaldehído sódico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo o alfa-tocoferol.

30

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, donde dicho agente tamponante es citrato, ascorbato, fosfato, bicarbonato, carbonato, fumarato, acetato, tartarato, malato, succinato, lactato, maleato, glicina u otros α- o β-aminoácidos naturales.

35

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, donde dicho quelante metálico es ácido cítrico, ácido etilendiamin tetraacético (EDTA) y su sal, DTPA (ácido dietilen-triamin-penta-acético) y su sal, EGTA y su sal, NTA (ácido nitriloacético) y su sal, sorbitol y su sal, ácido tartárico y su sal, N-hidroxiiminodiacetato y su sal, ácido hidroxietil-etilendiamin-tetra-acético y su sal, ácido 1- y 3-propanodiamin-tetra-acético y sus sales, ácido 1- y 3-diamin-2-hidroxi propano-tetra-acético y sus sales, gluconato sódico, ácido hidroxietano-di-fosfónico y su sal, o ácido fosfórico y su sal.

40

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, donde dicho agente tamponante es citrato, dicho antioxidante es ascorbato y dicho quelante metálico es EDTA.

45

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1.

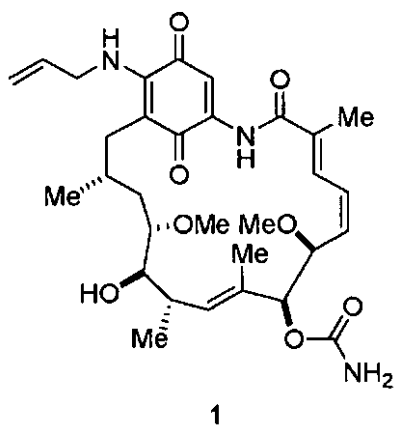
50

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1.

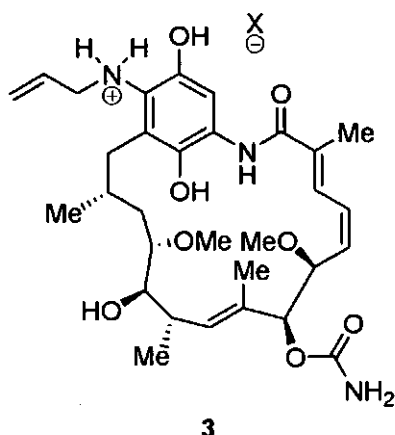
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde la proporción molar de dicho citrato con respecto a dicho compuesto está en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, donde la proporción molar de dicho EDTA con respecto a dicho compuesto está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1; y la proporción molar de dicho ácido ascórbico con respecto a dicho compuesto está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1.
- 5 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, que comprende un antioxidante y un quelante metálico.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, donde el antioxidante es ascorbato y el quelante metálico es EDTA.
- 10 17. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, comprendiendo adicionalmente un agente solubilizador.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, donde dicho agente solubilizador es ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, estearatos de polioxietileno, alcohol bencílico, alcohol etílico, polietilenglicoles, propilenglicol, glicerina, ciclodextrina o poloxámeros.
- 15 19. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 18, comprendiendo adicionalmente un agente anti-neoplásico.
- 20 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, donde dicho agente antineoplásico es docetaxel, paclitaxel, mesilato de imatinib, gemcitebina, Velcade (bortezomib), cisplatino, carboplatino o 5-fluorouracilo.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde dicho agente antineoplásico es docetaxel o paclitaxel.
- 25 22. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde dicho agente antineoplásico es docetaxel.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde dicho agente antineoplásico es paclitaxel.
- 30 24. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde dicho agente antineoplásico es mesilato de imatinib.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde dicho agente antineoplásico es Velcade (bortezomib).
- 35 26. Un compuesto o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento del cáncer.
27. Un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer, donde dicho tratamiento es junto con un agente antineoplásico, donde dicho compuesto es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 28. Un compuesto de la reivindicación 27, donde dicho agente antineoplásico es docetaxel, paclitaxel, mesilato de imatinib, gemcitebina, Velcade (bortezomib), cisplatino, carboplatino o 5-fluorouracilo.
- 45 29. Un compuesto de la reivindicación 27, donde dicho agente antineoplásico es docetaxel.
30. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, donde dicho tratamiento es por administración secuencial de dicho compuesto y dicho agente antineoplásico.
- 50 31. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, donde dicho tratamiento es por administración simultánea de dicho compuesto y dicho agente antineoplásico.
32. El compuesto de la reivindicación 26, donde dicho tratamiento es por administración de dicho compuesto mediante un modo seleccionado entre inhalación, oral, intravenoso, sublingual, ocular, transdérmico, rectal, vaginal, tópico, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutáneo, bucal o nasal.
- 55 33. El compuesto de la reivindicación 32, donde dicho modo es intravenoso.
34. El compuesto de la reivindicación 26, donde el tratamiento es junto con radioterapia.
- 60 35. Un compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde dicho cáncer es un cáncer del sistema hematopoyético, sistema inmunitario, sistema endocrino, pulmonar, sistema gastrointestinal, sistema musculoesquelético, sistema reproductor, sistema nervioso central o sistema urológico, o donde el cáncer se localiza en los tejidos mieloides del mamífero, tejidos linfoides, tejidos pancreáticos, tejidos tiroideos, pulmones, tejidos del colon, tejidos del recto, tejidos del ano, tejidos hepáticos, piel, hueso, tejidos de ovario, tejidos uterinos, tejidos de cuello uterino, mama, próstata, tejidos testiculares, cerebro, tronco cerebral, tejidos de las meninges, riñón o vejiga.
- 65

36. Un compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde dicho cáncer es cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de próstata, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, carcinoma de células renales, melanoma maligno, cáncer pancreático, cáncer pulmonar, carcinoma colorrectal, cáncer de colon, cáncer cerebral, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer tiroideo, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino o síndrome mielodisplásico.
37. Un compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer del mamífero es cáncer de mama, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, melanoma, adenoma múltiple, cáncer microcítico pulmonar, cáncer de ovario o cáncer de próstata.
38. Un compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde dicho cáncer es cáncer pulmonar.
39. Un compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde dicho cáncer es un cáncer no microcítico pulmonar.
40. El compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer es cáncer de mama.
41. El compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer es leucemia mieloide aguda.
42. El compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer es leucemia mieloide crónica.
43. El compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer es cáncer de ovario.
44. El compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer es cáncer de colon.
45. El compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer es mieloma múltiple.
46. El compuesto o composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, donde el cáncer es cáncer microcítico pulmonar.
47. Un método de preparación de un compuesto de fórmula 3 que comprende:
combinar un compuesto de fórmula 1:



- con un agente reductor, en un disolvente de reacción, seguido de tratamiento con un ácido farmacéuticamente aceptable para dar dicho compuesto de fórmula 3:



donde

X⁻ es una base conjugada de un ácido farmacéuticamente aceptable.

- 5 48. El método de la reivindicación 47, donde dicho agente de reducción es hidrosulfito sódico, cinc, ácido ascórbico, o una reducción electroquímica.
- 10 49. El método de la reivindicación 47, donde dicho disolvente de reacción es diclorometano, cloroformo, dicloroetano, clorobenceno, THF, 2-MeTHF, éter dietílico, diglima, 1,2-dimetoxietano, MTBE, THP, dioxano, 2-etoxibutano, metil butil éter, acetato de etilo, acetato de metilo, 2-butanona, agua o mezclas de los mismos.
- 15 50. El método de la reivindicación 47, donde dicho ácido es HCl, HBr, H₂SO₄, ácido metanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido triflúrico, ácido canforsulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, ácido etan-1,2-disulfónico, ácido ciclámico, ácido tiocianico, ácido naftalen-2-sulfónico o ácido oxálico.
51. El método de la reivindicación 47, donde dicho ácido se disuelve en un disolvente orgánico, seleccionado entre el grupo que comprende: EtOAc, DCM, IPA o dioxano.
52. Una sal-Co de un compuesto de la fórmula:

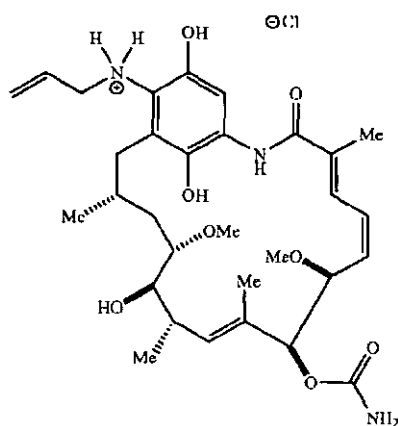


Figura 1

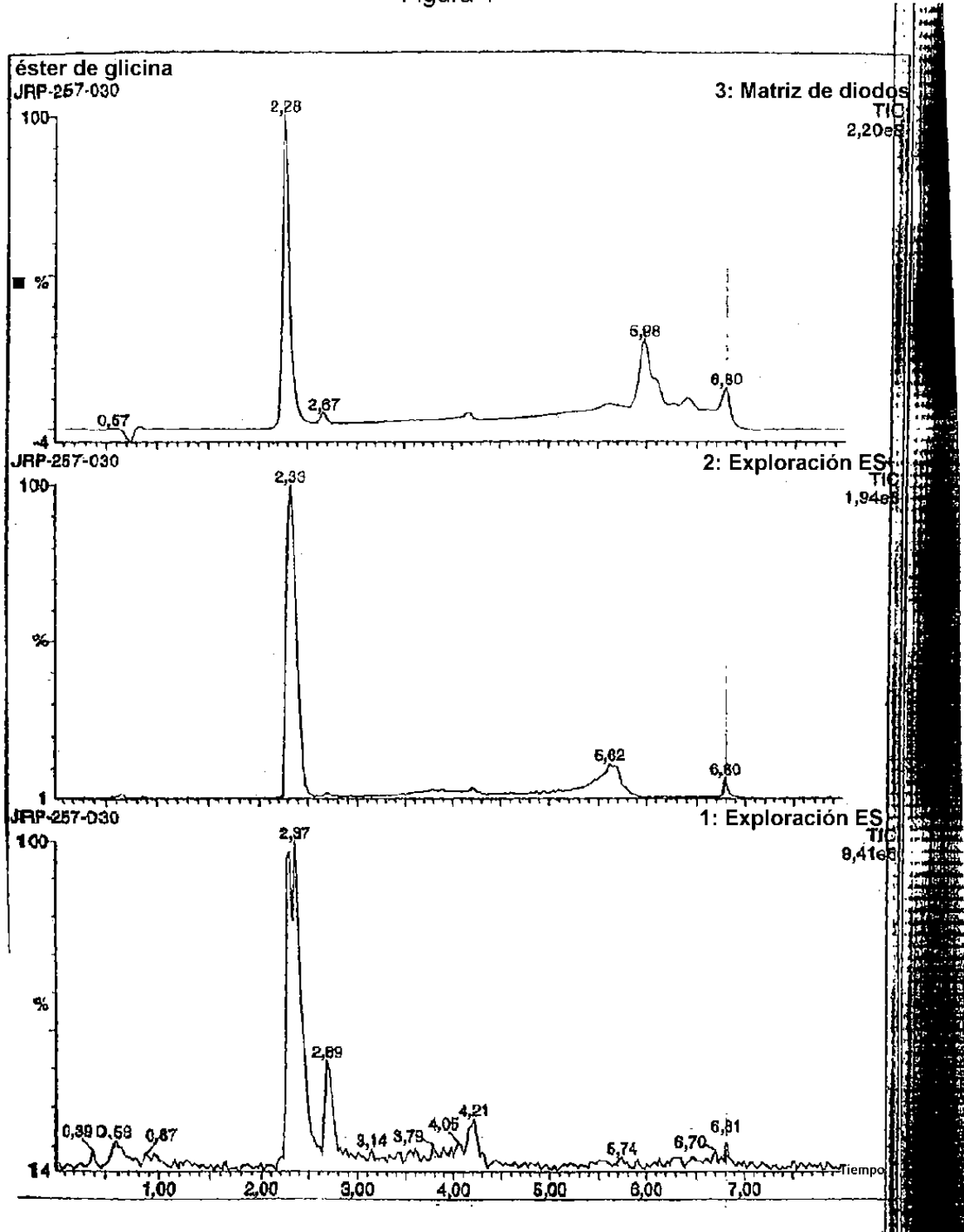


Figura 2

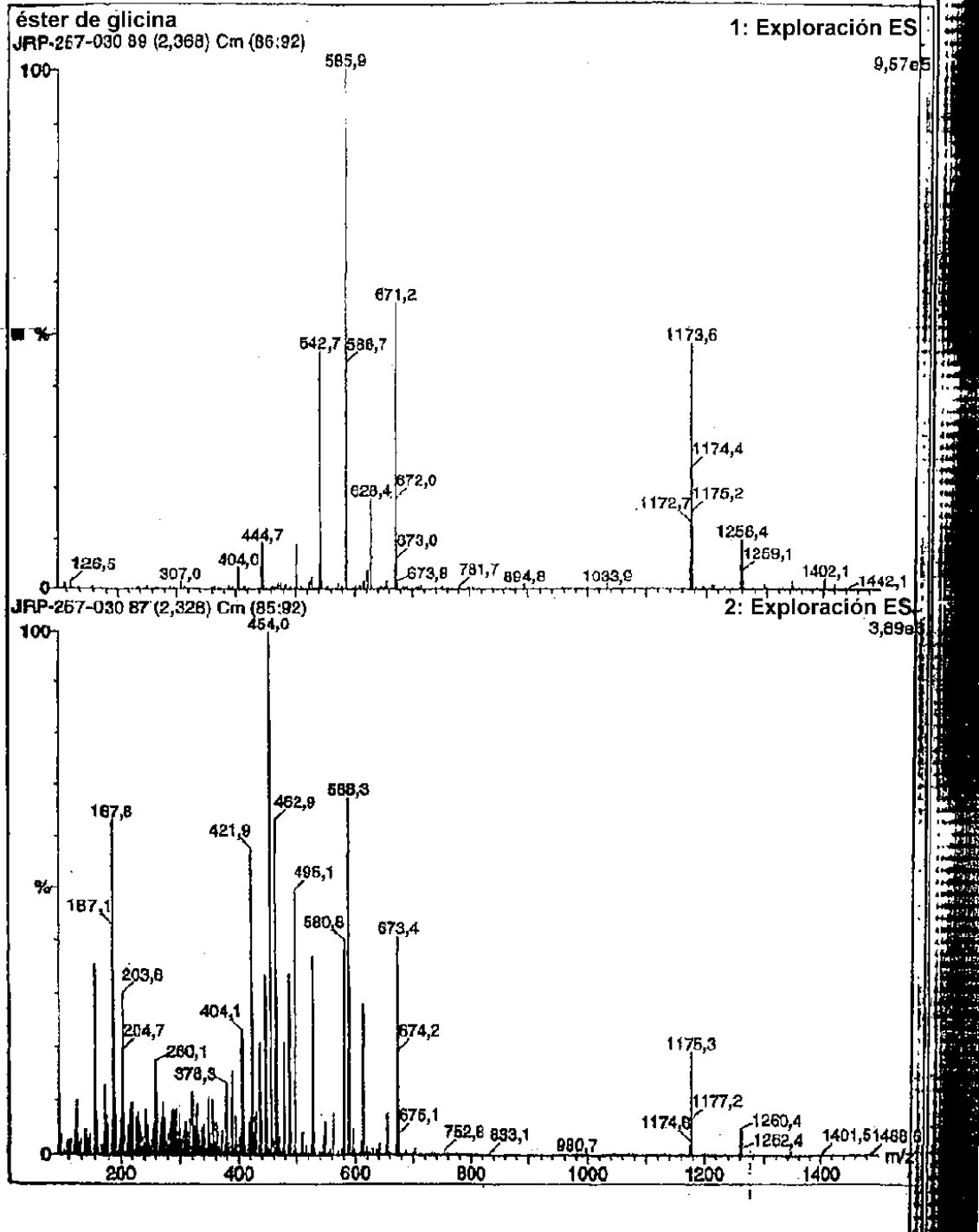


Figura 3



Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040108009
 N° EXP. 10
 N° PROC 1

F2 - Parámetros de Adquisición

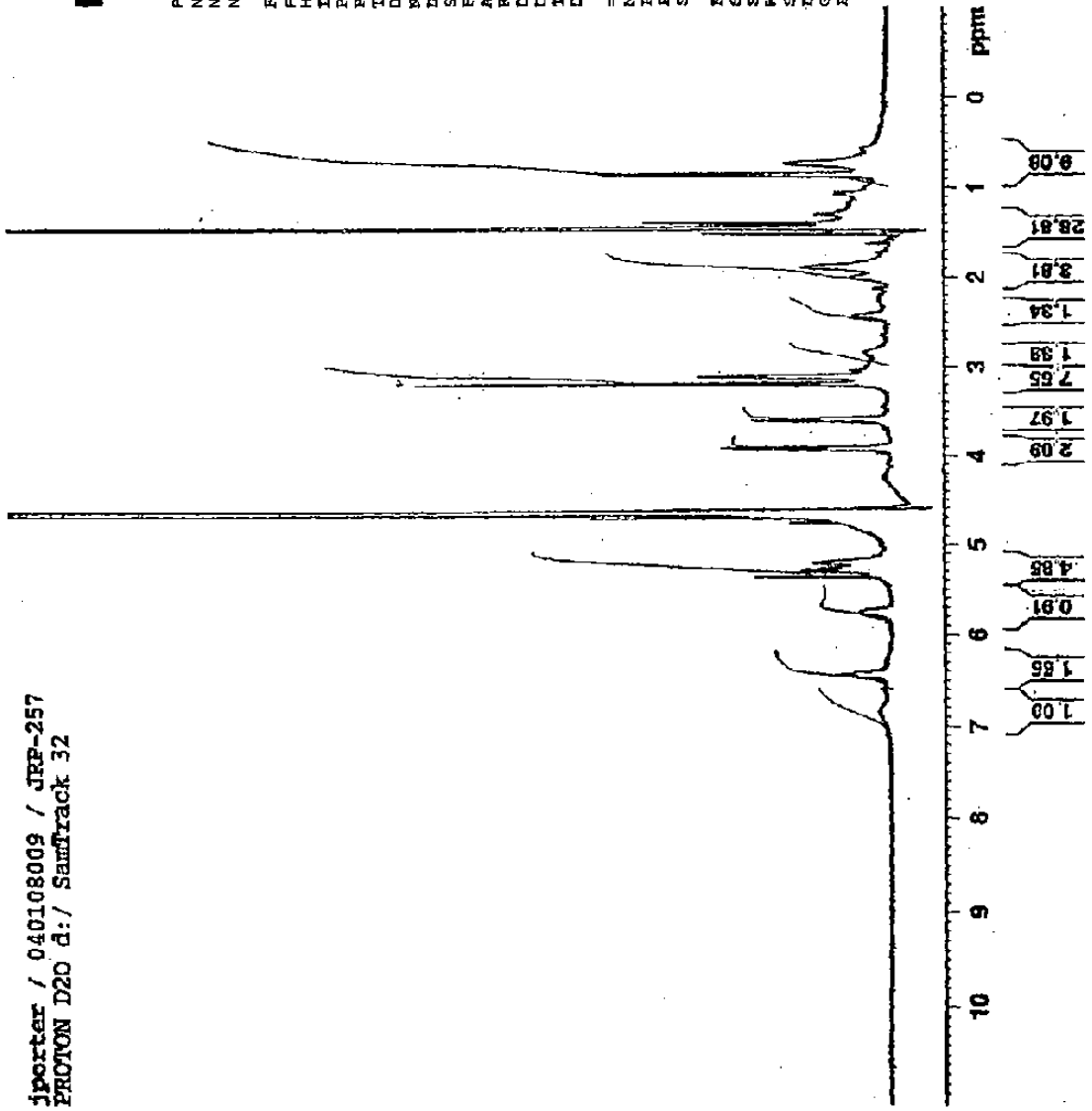
Fecha 20041018
 Hora 12.09
 INSTROM. spect
 PROBD 5 mm BEQ BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 DISOLVENTE D2O
 NS 128
 DS 2
 SWH 8278.146 HZ
 FIDRES 0.126314 HZ
 AQ 3.994243 s
 RG 406.4
 DN 60.400 MHz
 DE 6.00 us
 VE 300.0 K
 DL 1.00000000 s

CANAL f1

NUCL 1H
 P1 9.00 us
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Parámetros de procesamiento

SI 32768
 SF 300.1300068 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GE 0
 PC 1.00



jporter / 040108009 / JRF-257
 PROTON D2O d:/ SamTrack 32

Figura 4

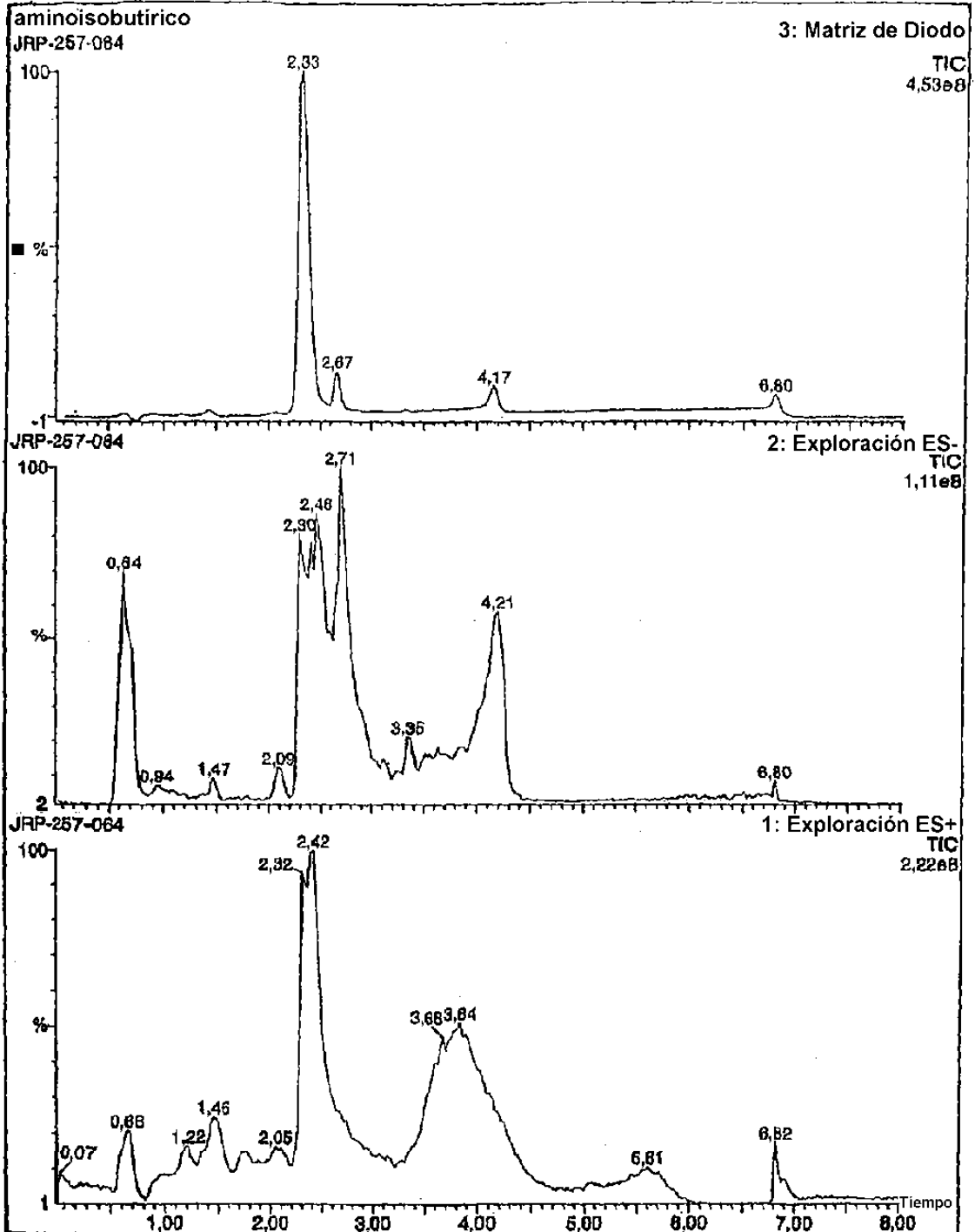


Figura 5

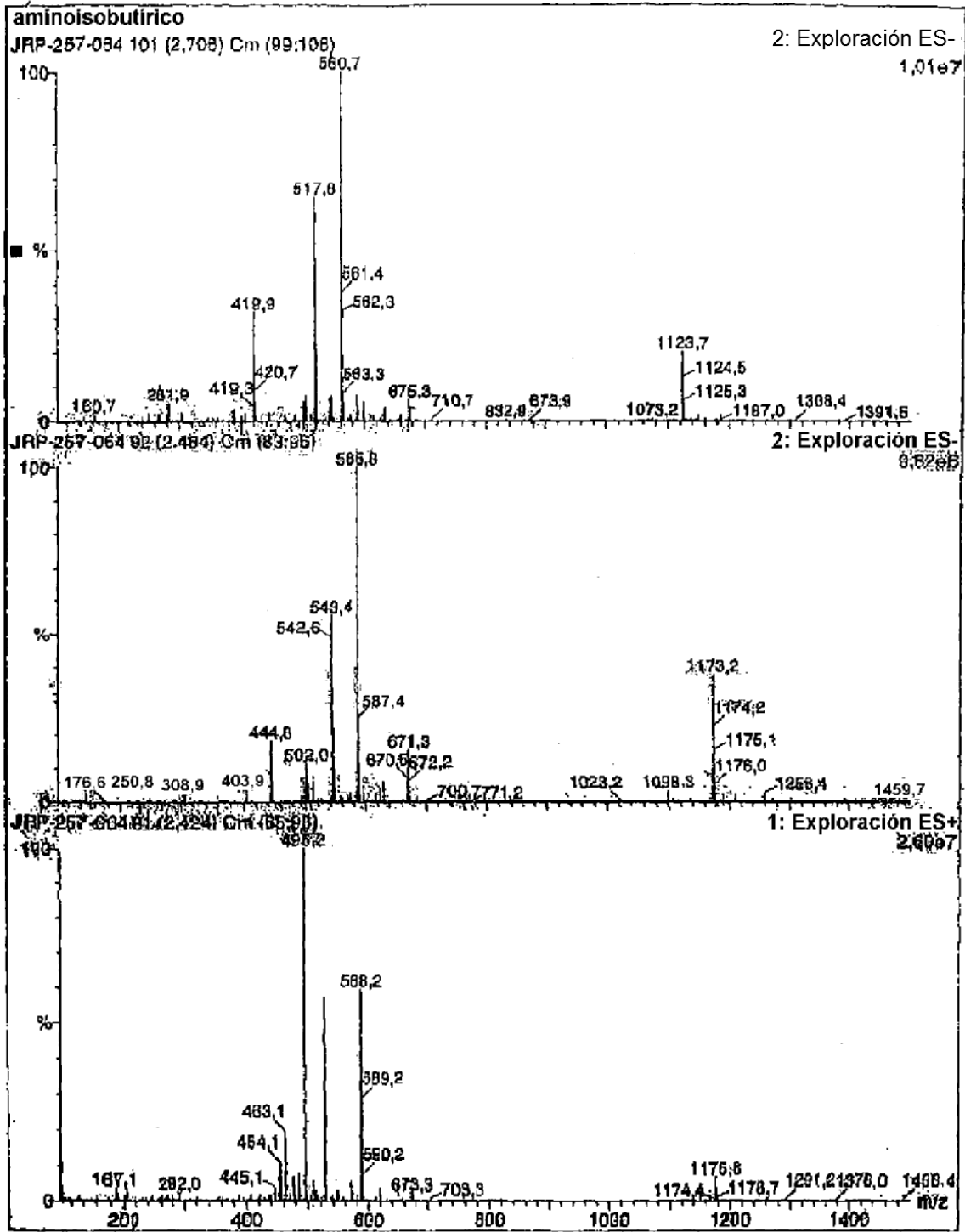
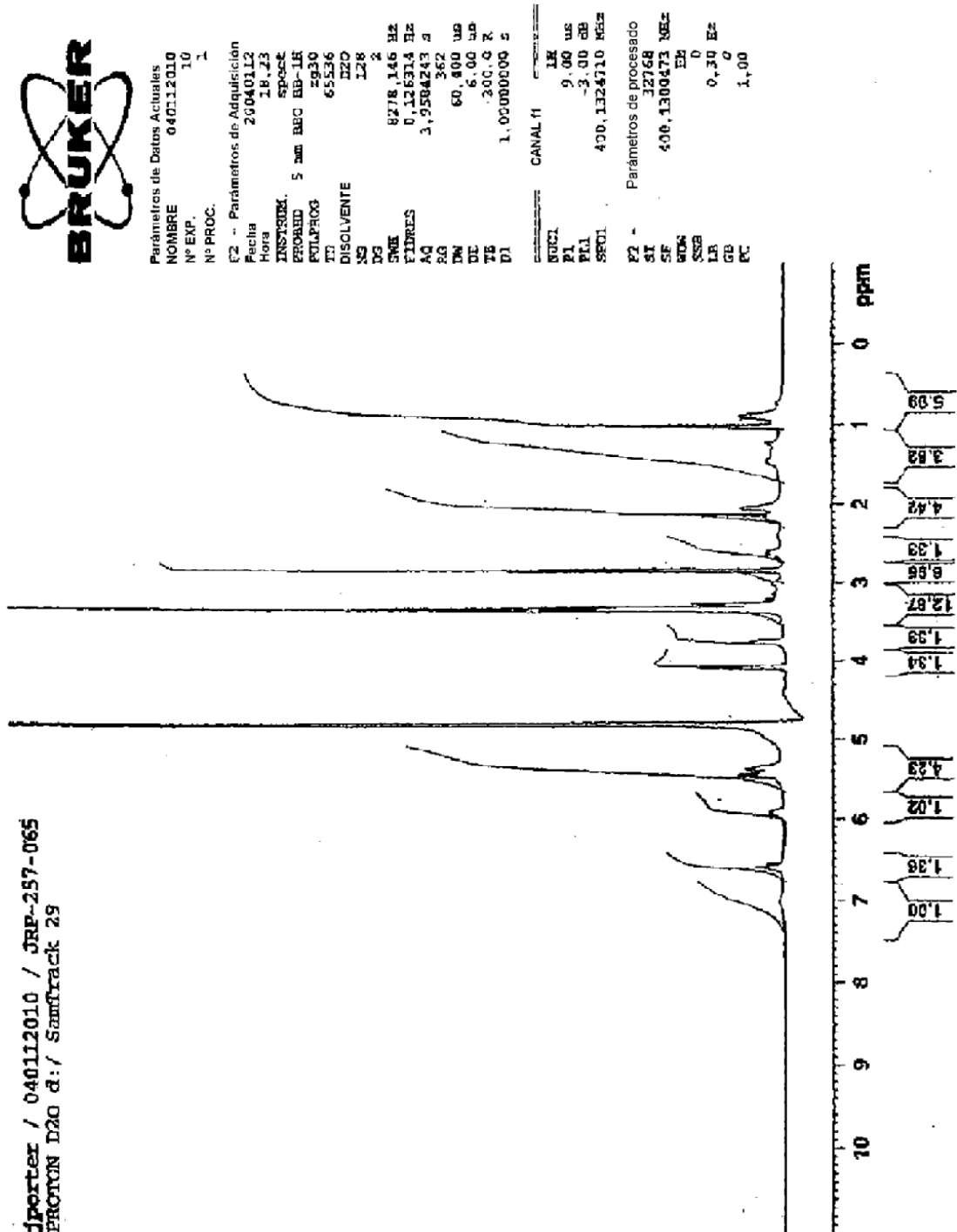


Figura 6



jporter / 040112010 / JRF-257-065
 PROTON D2O d:/ Samtrack 29

Figura 7

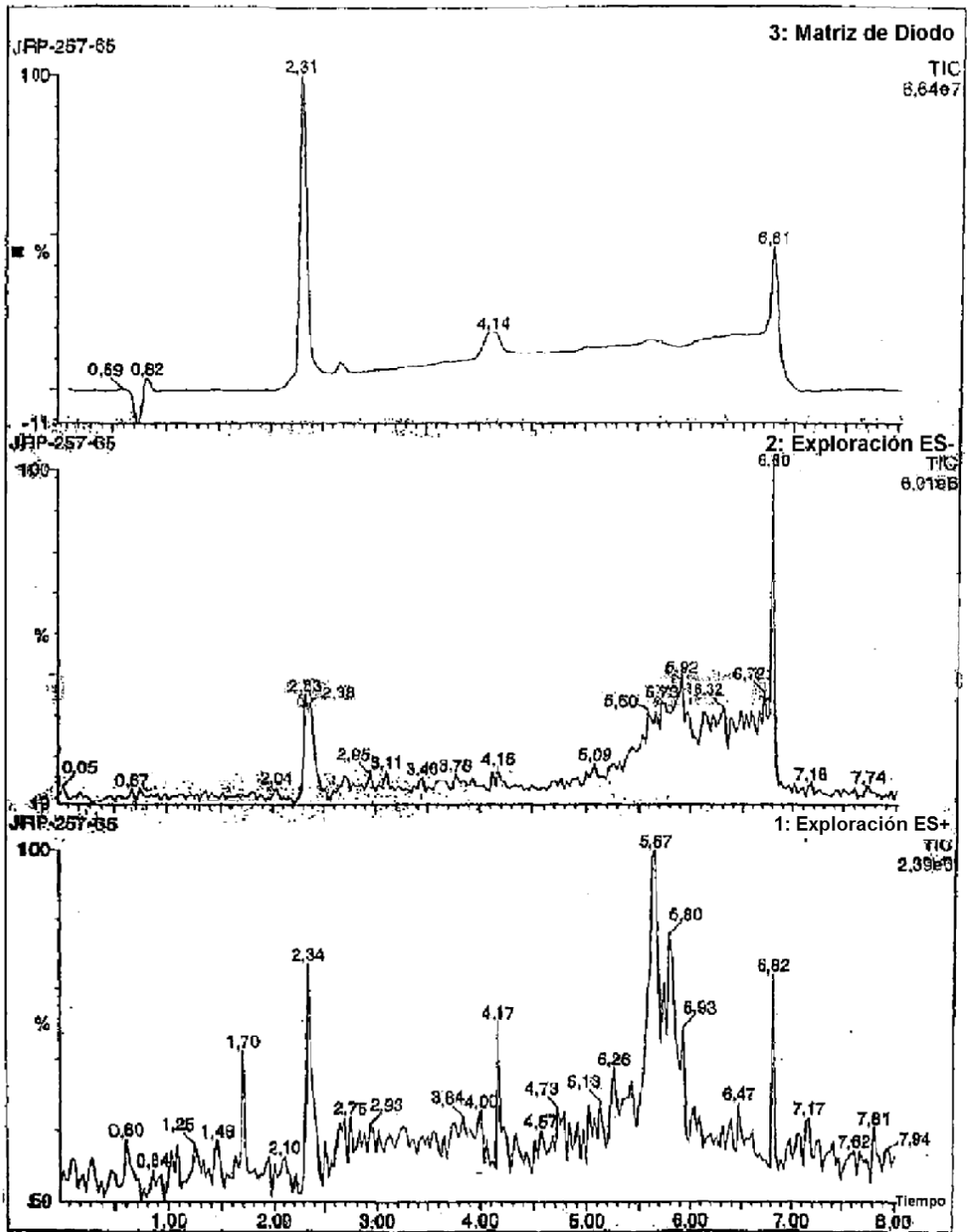


Figura 8

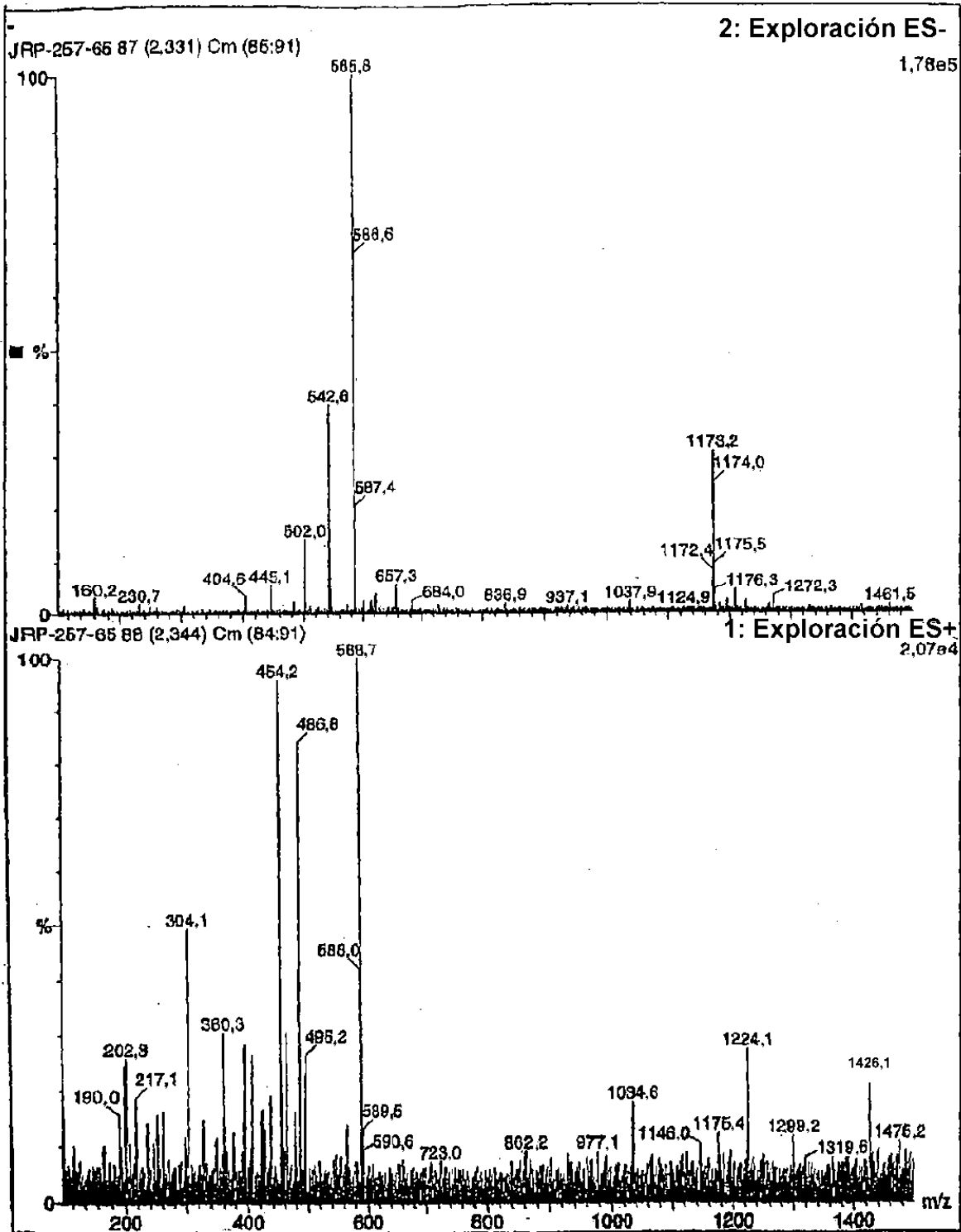


Figura 9



Reporter / 040119002 / JRP-IFI-257-71
 PROTON D2O d.:j SamTrack 51

Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040119002
 N° EXP. 10
 N° PROC. 1

F2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha 20040119
 Hora 16.09
 INSTRUM spect
 PROBRD 5 mm BBO BB-1B
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 DISOLVENTE D2O
 NS 128
 DS 2
 SWH 8278.146 Hz
 FIDRES 0.126314 Hz
 AQ 3.9584243 s
 RG 406.4
 DW 60.400 us
 DE 5.06 us
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 s

CANAL f1
 NUC1 1H
 P1 9.00 us
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz

Parámetros de procesamiento
 SI 33768
 SF 400.1300142 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LA 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

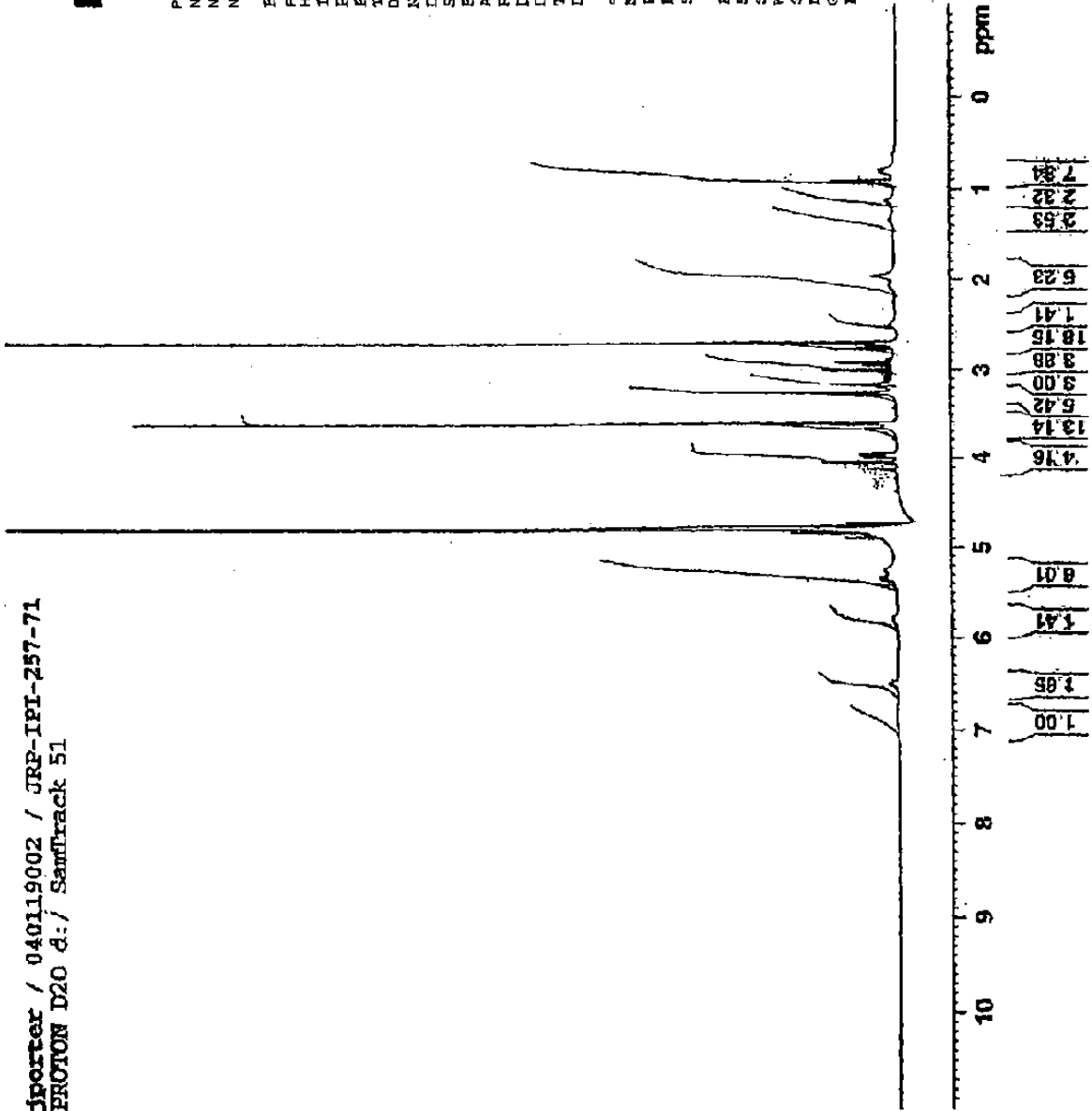


Figura 10

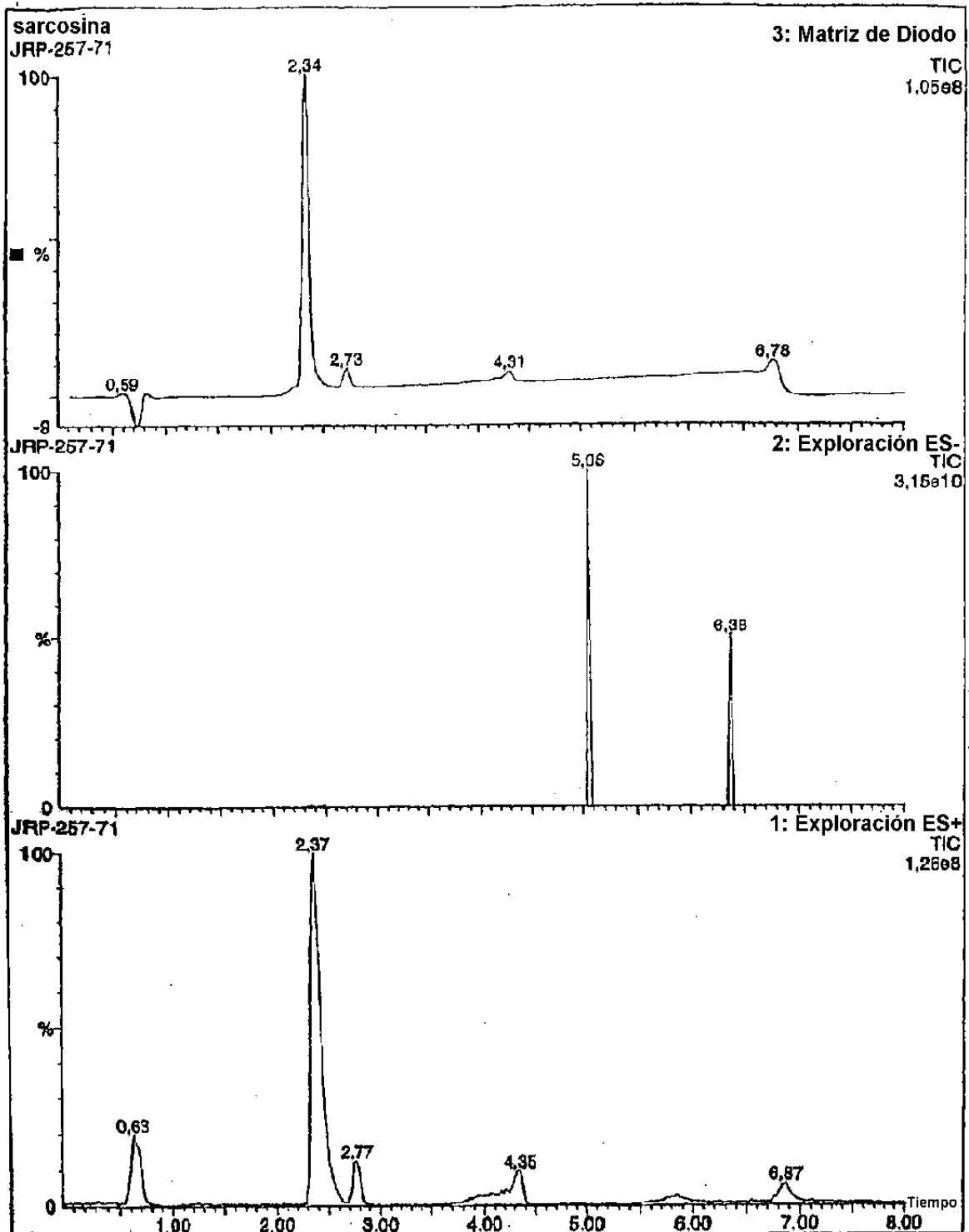


Figura 11

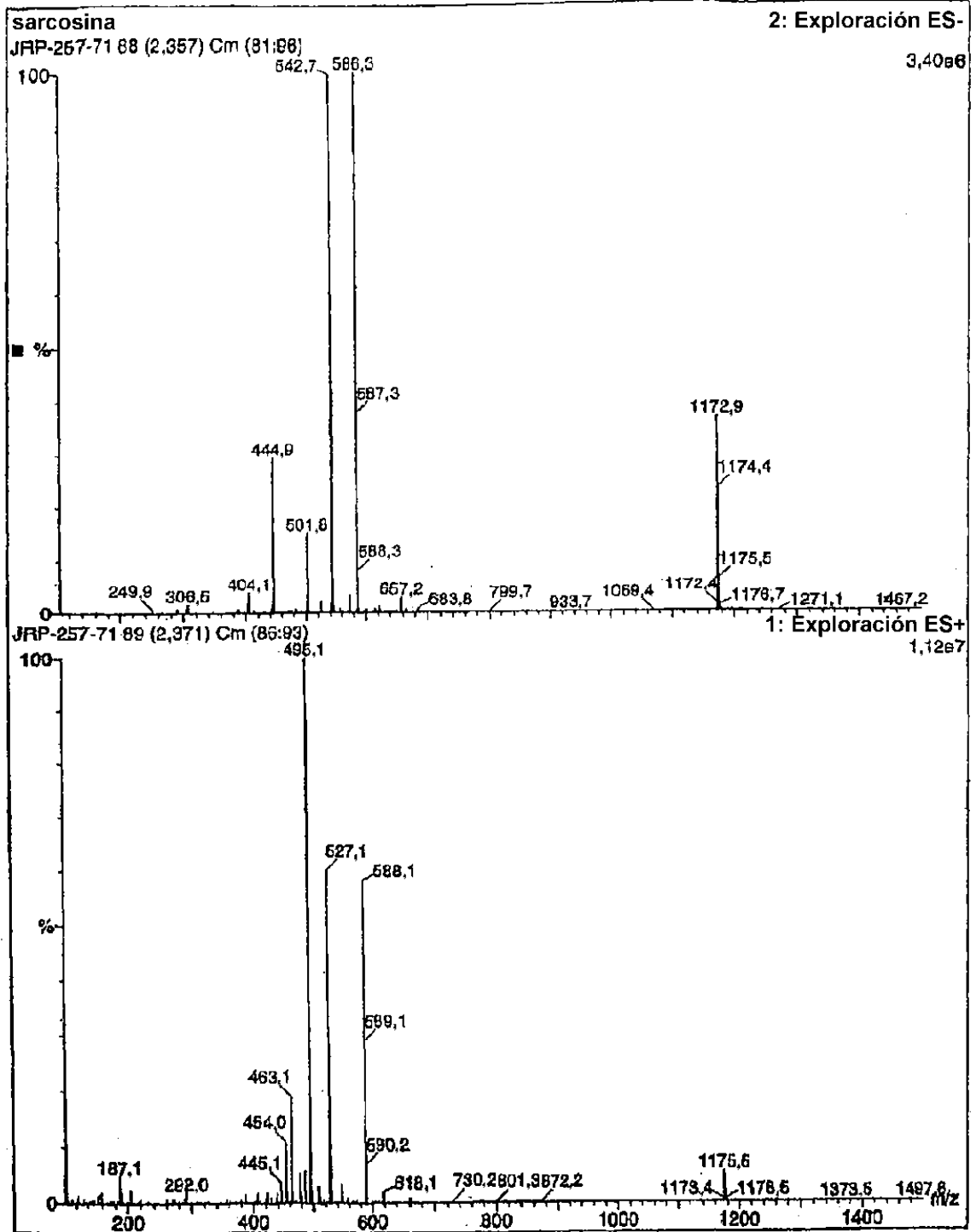


Figura 12

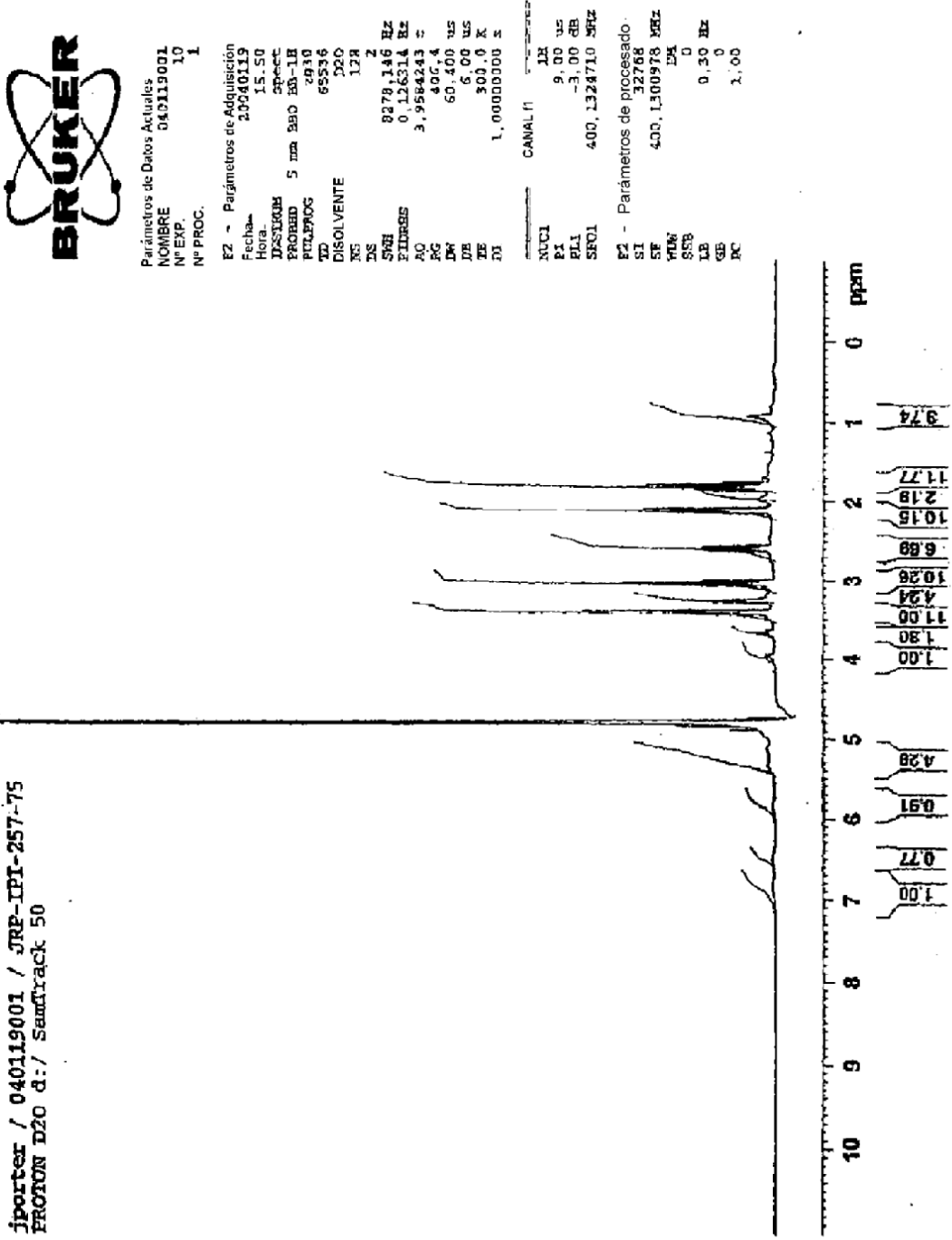


Figura 13

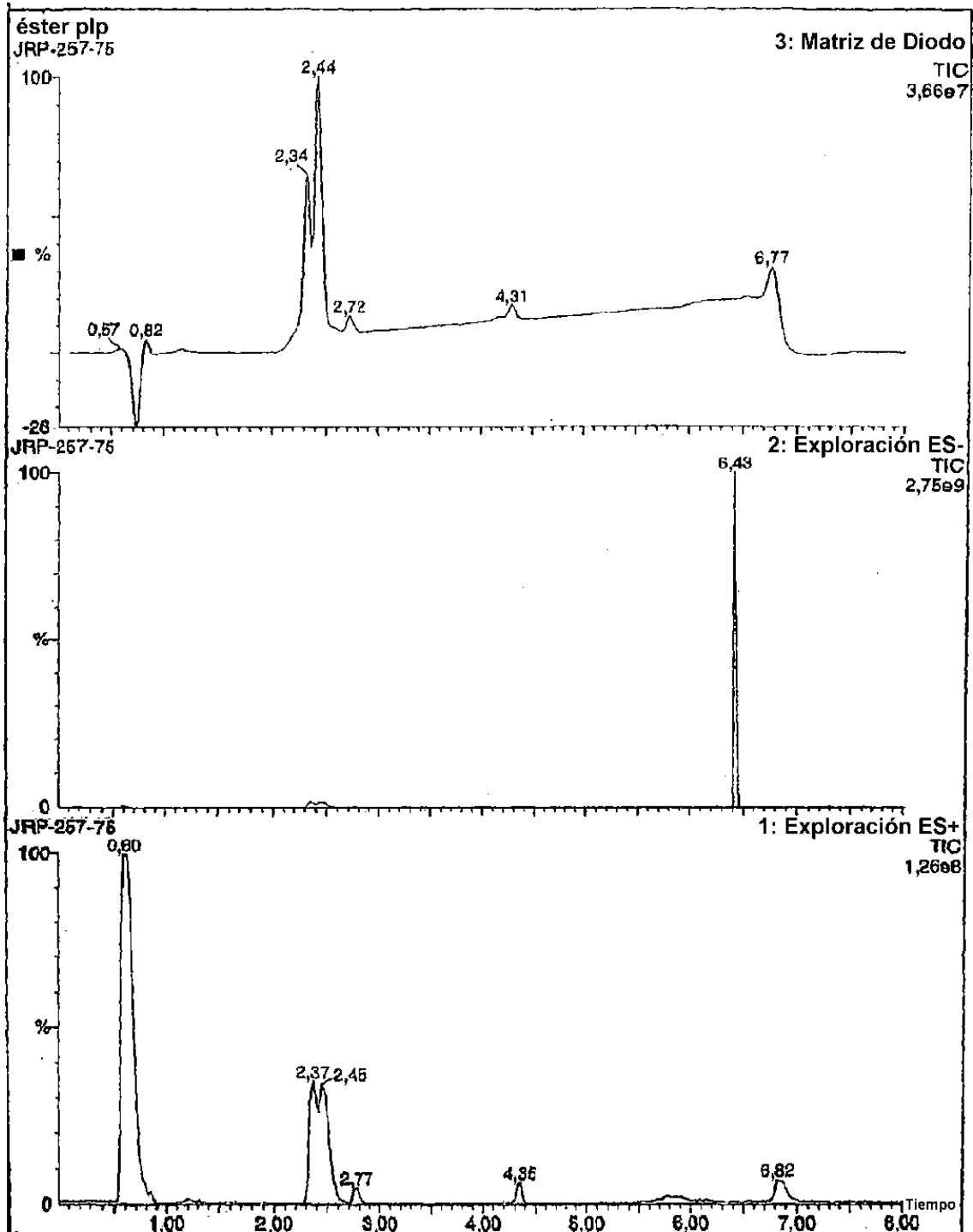


Figura 14

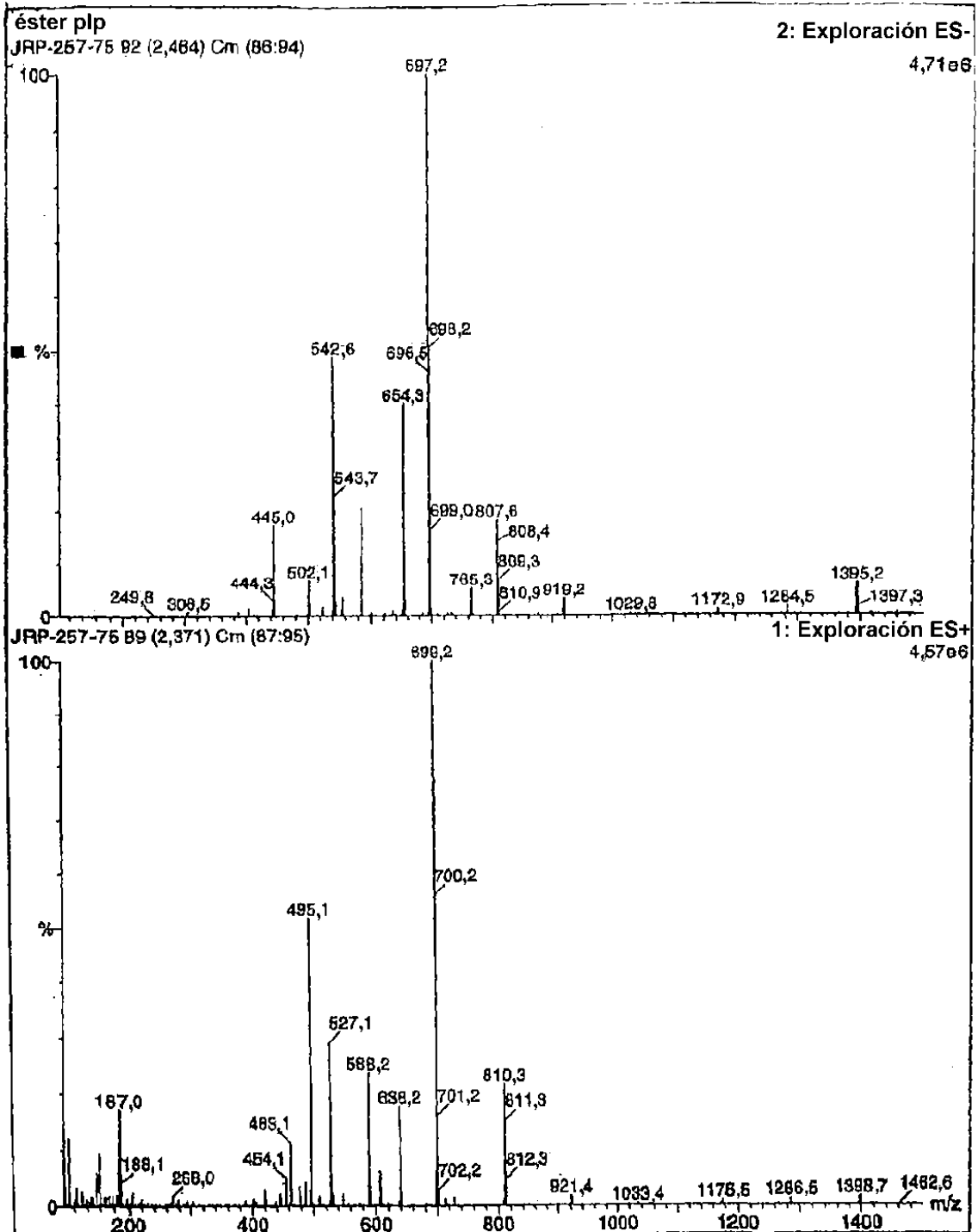


Figura 15

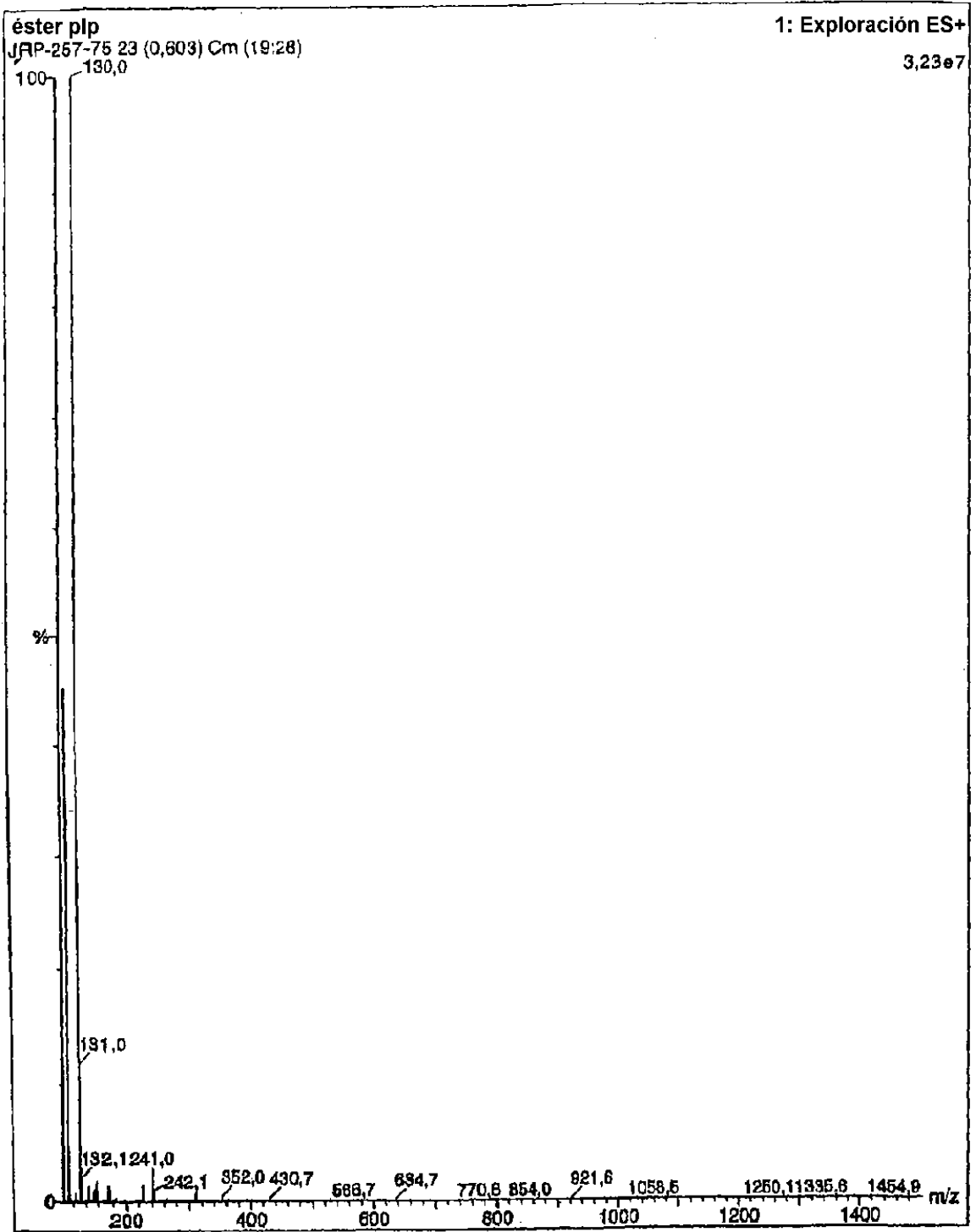


Figura 16

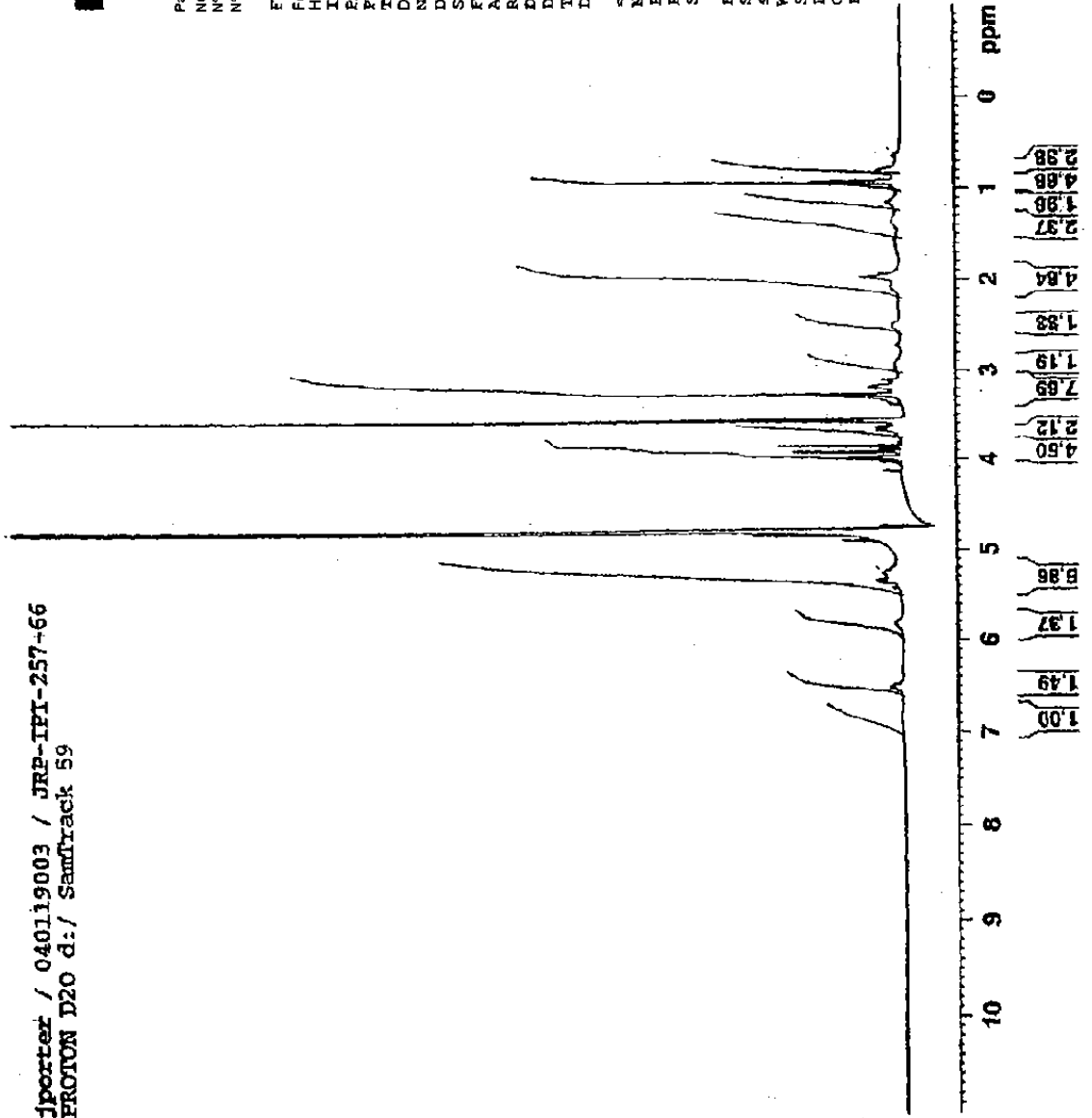


Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040119003
 N° EXP. 10
 N° PROC 1

F2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha- 20040119
 Hora 17.19
 INSTRUM spect
 PROCED 5 min EBO EB-1H
 PULZROG 2910
 TD 65536
 DISOLVENTE D2O
 NS 128
 DS 2
 SWH 6278.145 Hz
 FIDRES 0.126314 Hz
 AQ 3.5564243 s
 RG 3.62
 EM 60.400 us
 DE 6.00 us
 TR 300.0 K
 D1 1.00000000 s

CANAL f1
 NUC1 1H
 PL 9.00 us
 PL1 -3.00 dB
 SF01 400.1324710 MHz

F2 - Parámetros de procesamiento
 SI 32768
 SF 400.1300141 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



1porter / 040119003 / JRP-IPI-257-66
 PROTON D2O d:/ Samtrack 59

Figura 17

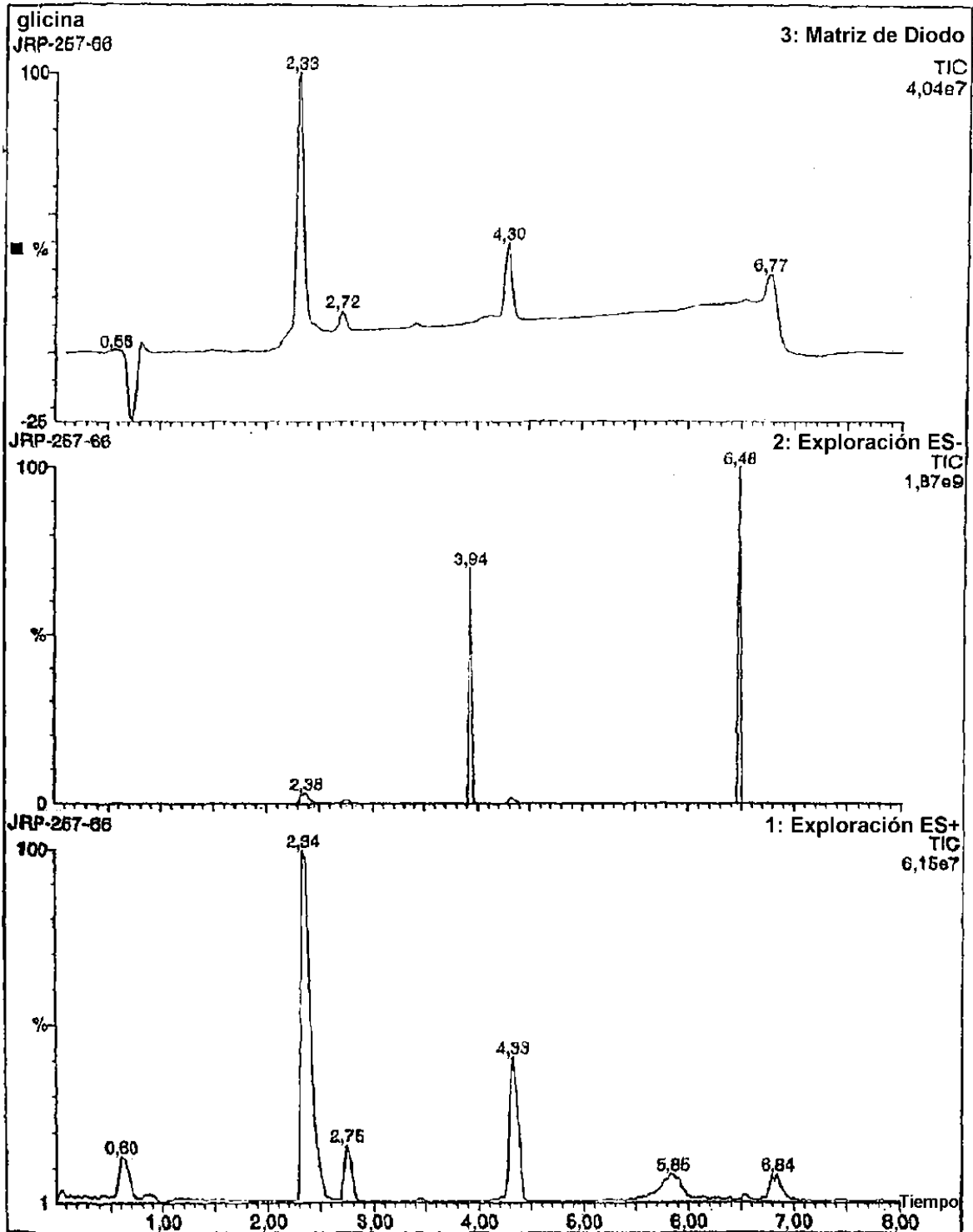


Figura 18

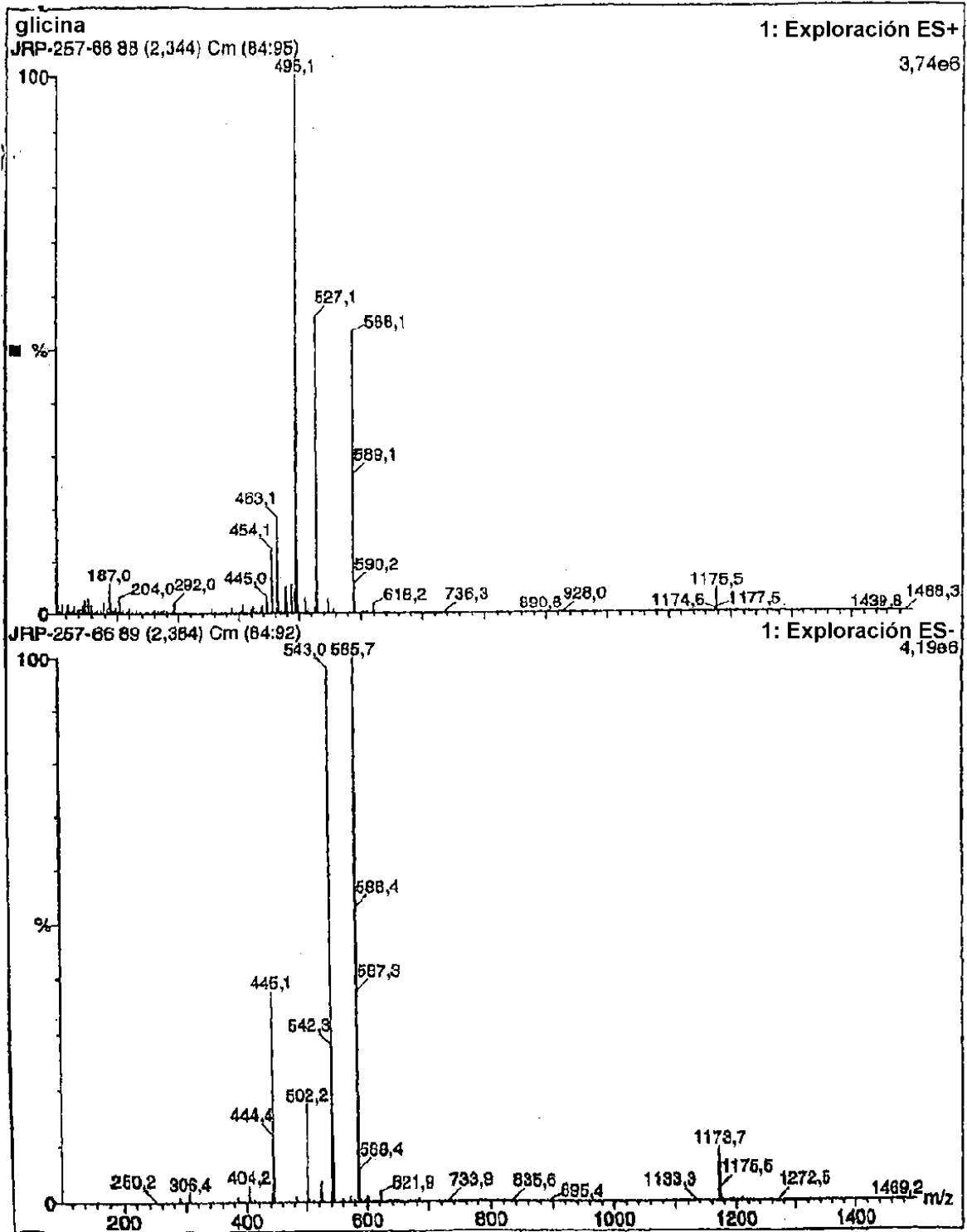
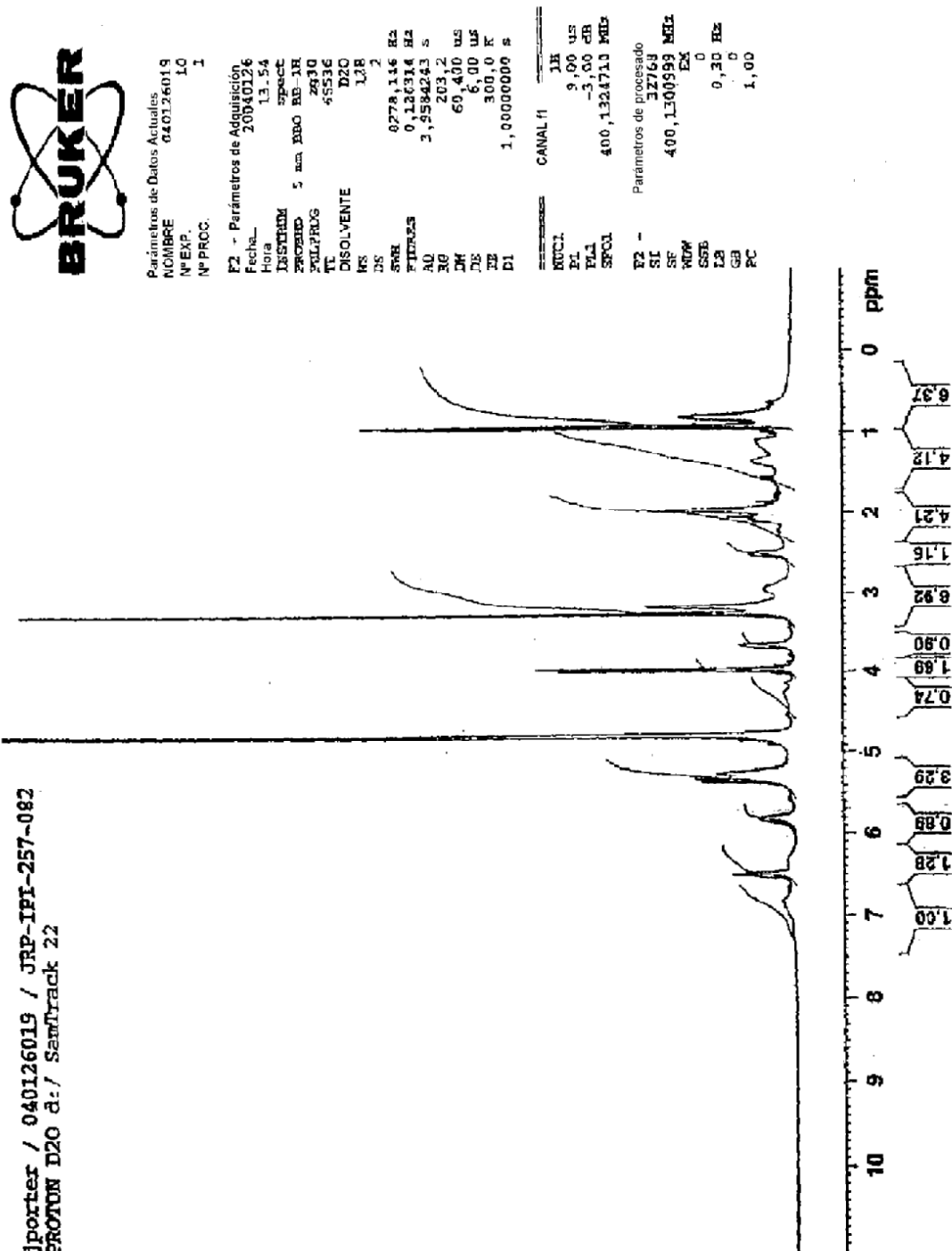


Figura 19



jporter / 040126019 / JRP-IFI-257-082
 PROTON D2O d:/ SamTrack 22

Figura 20

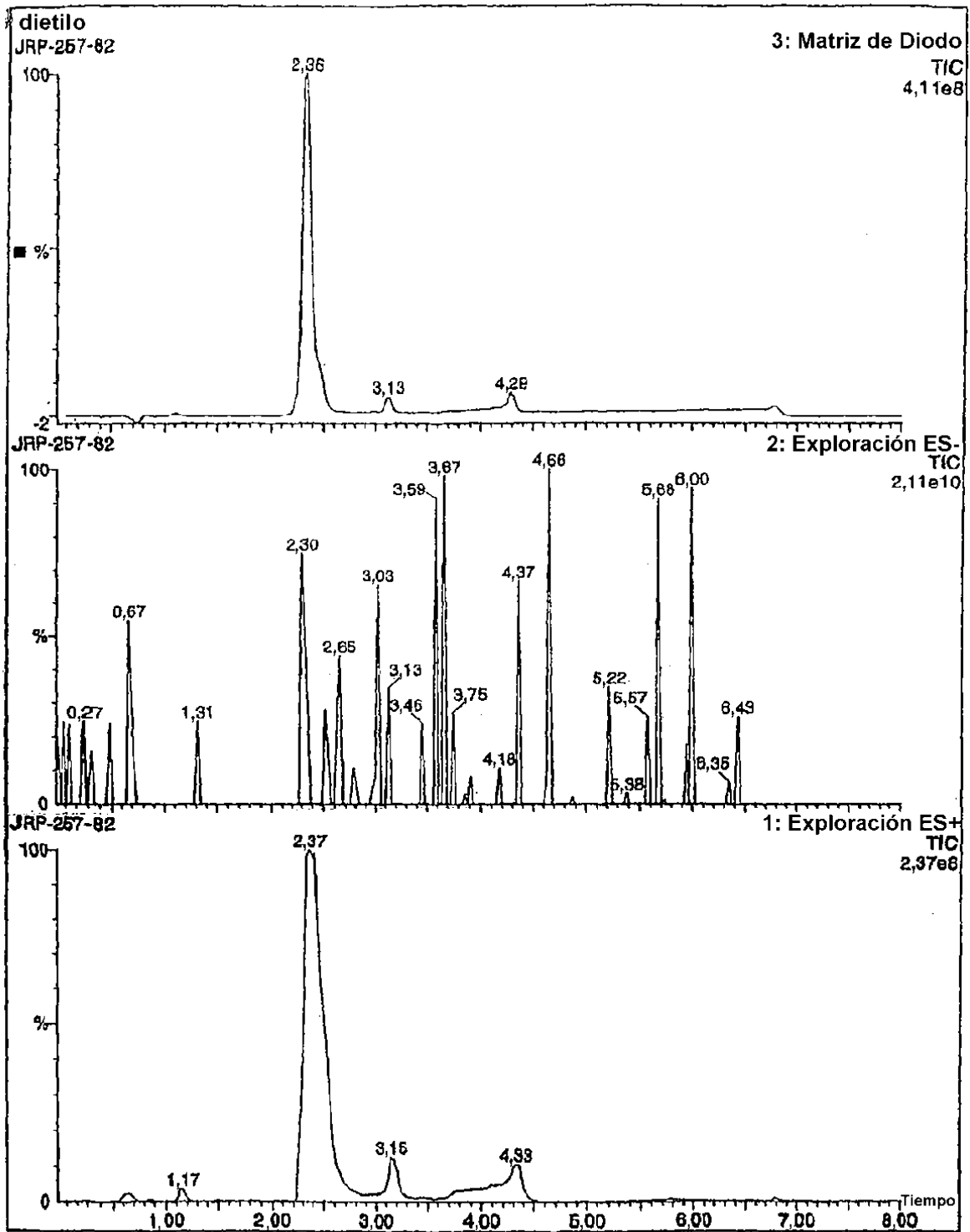


Figura 21

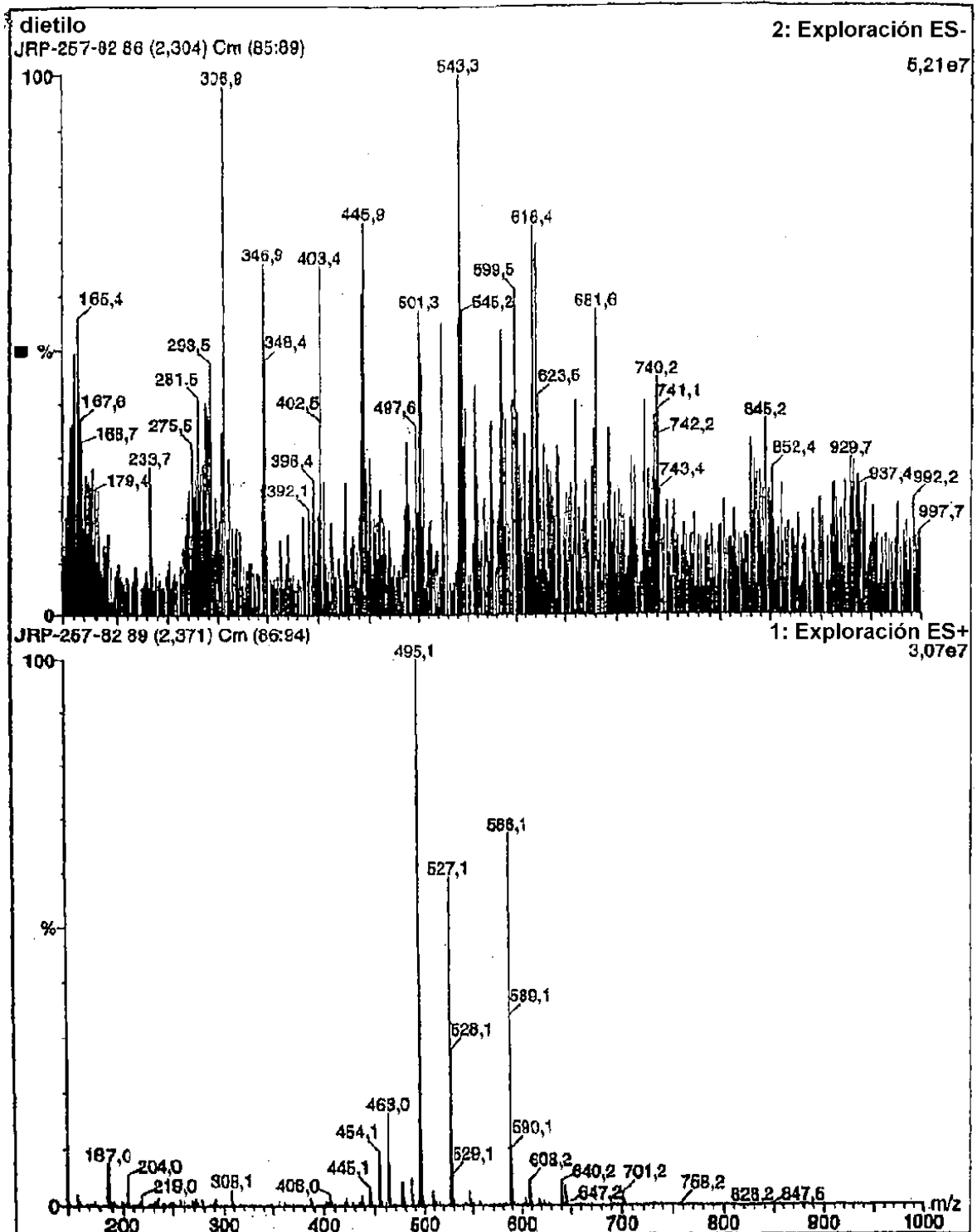


Figura 22

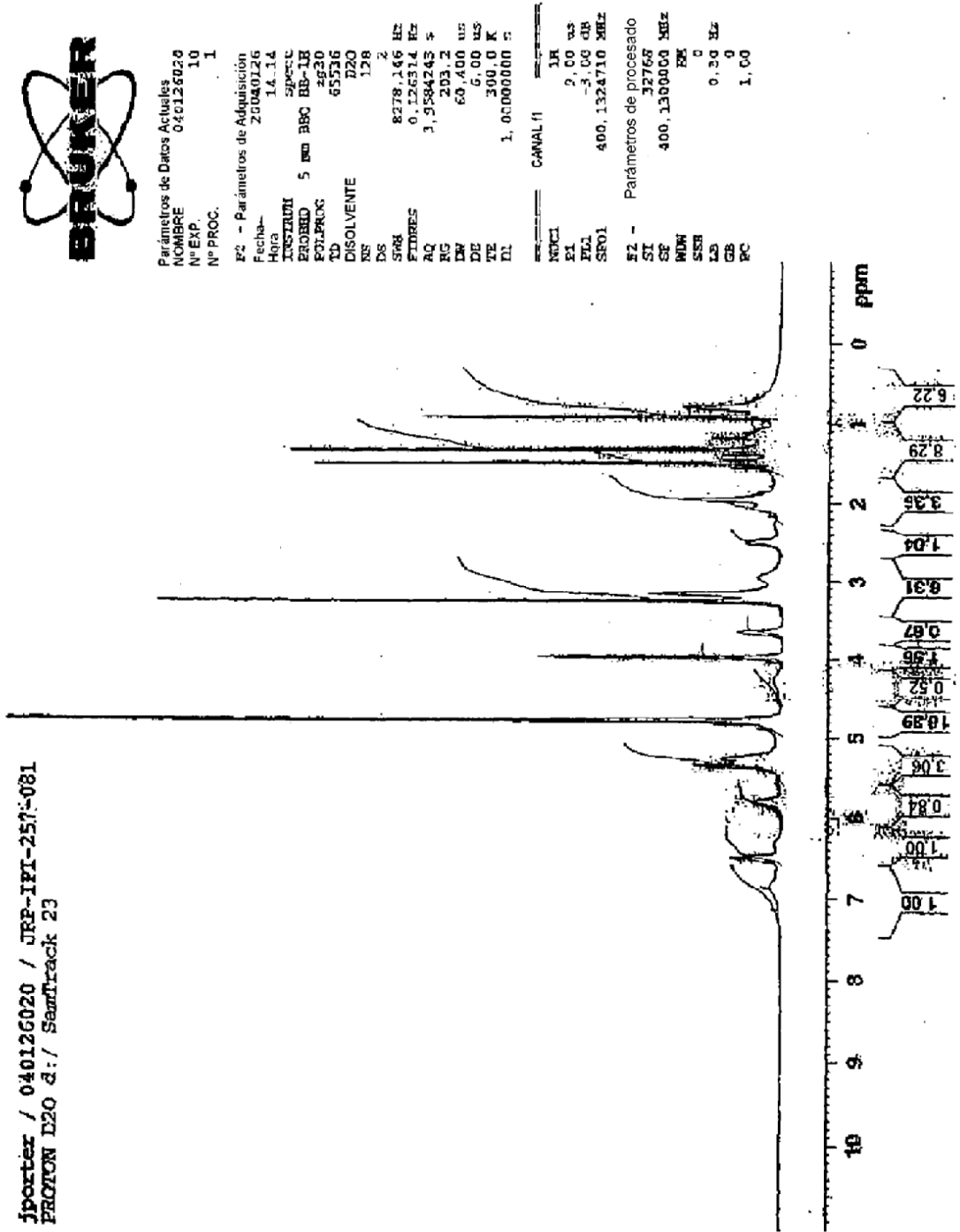


Figura 23

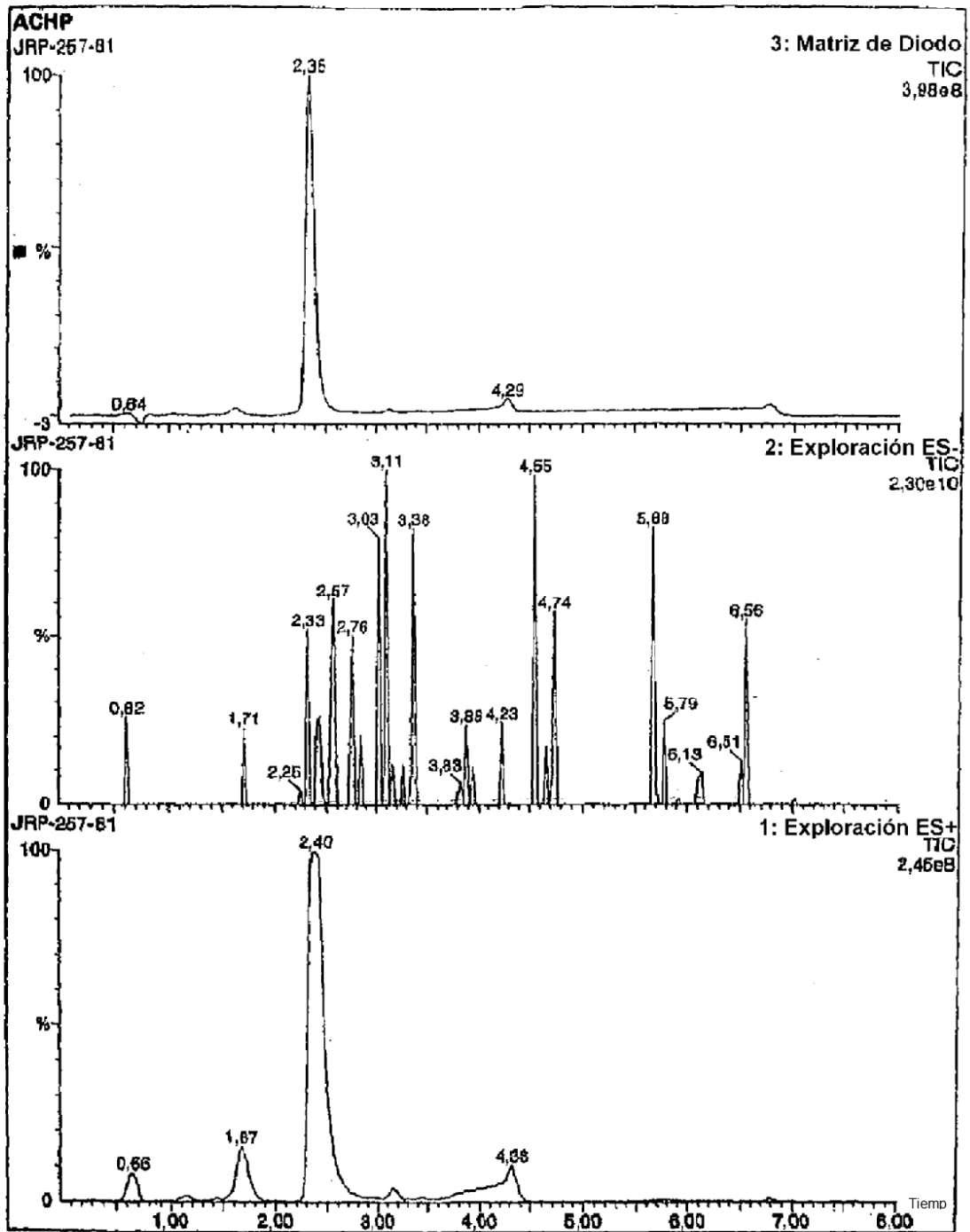


Figura 24

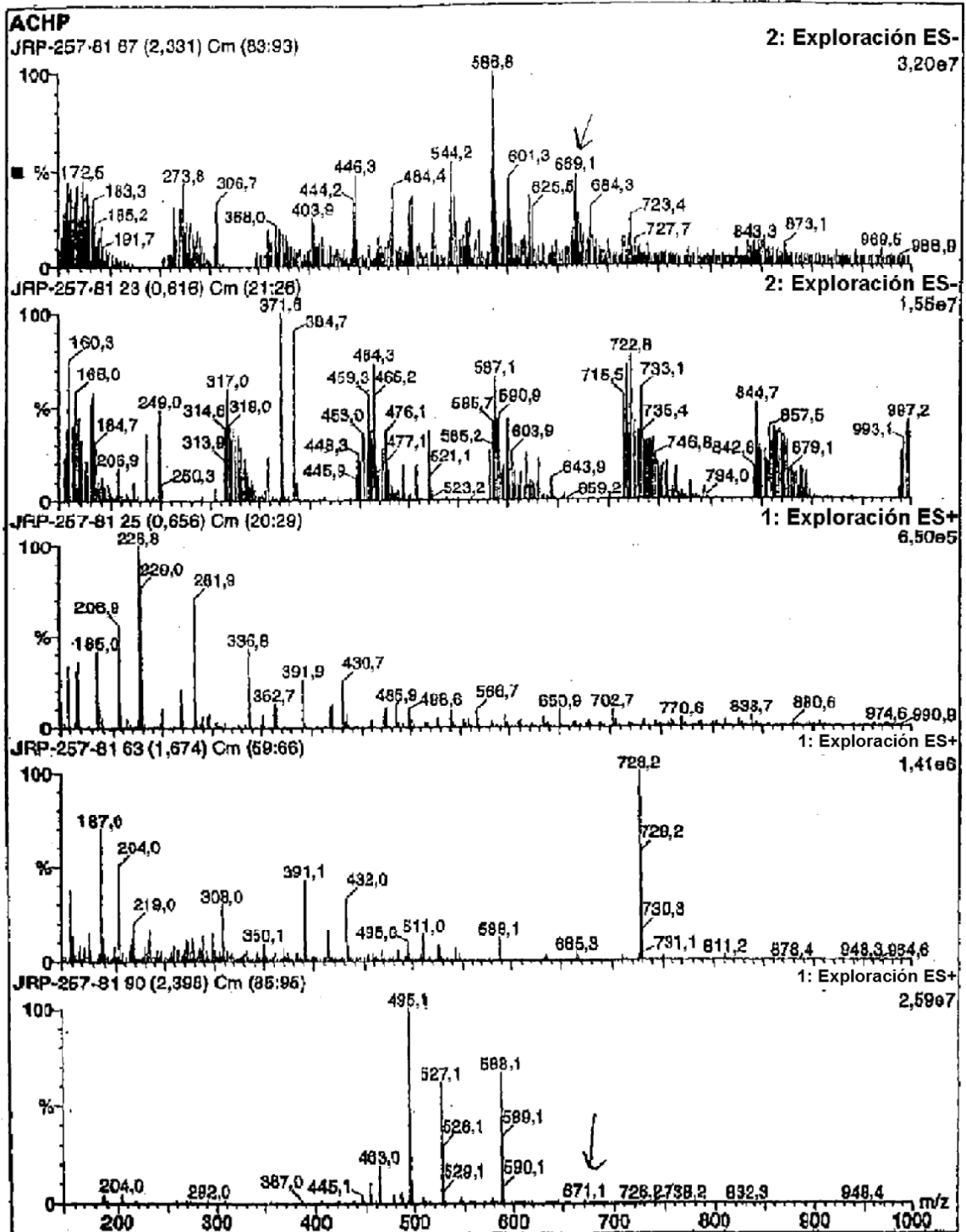


Figura 26

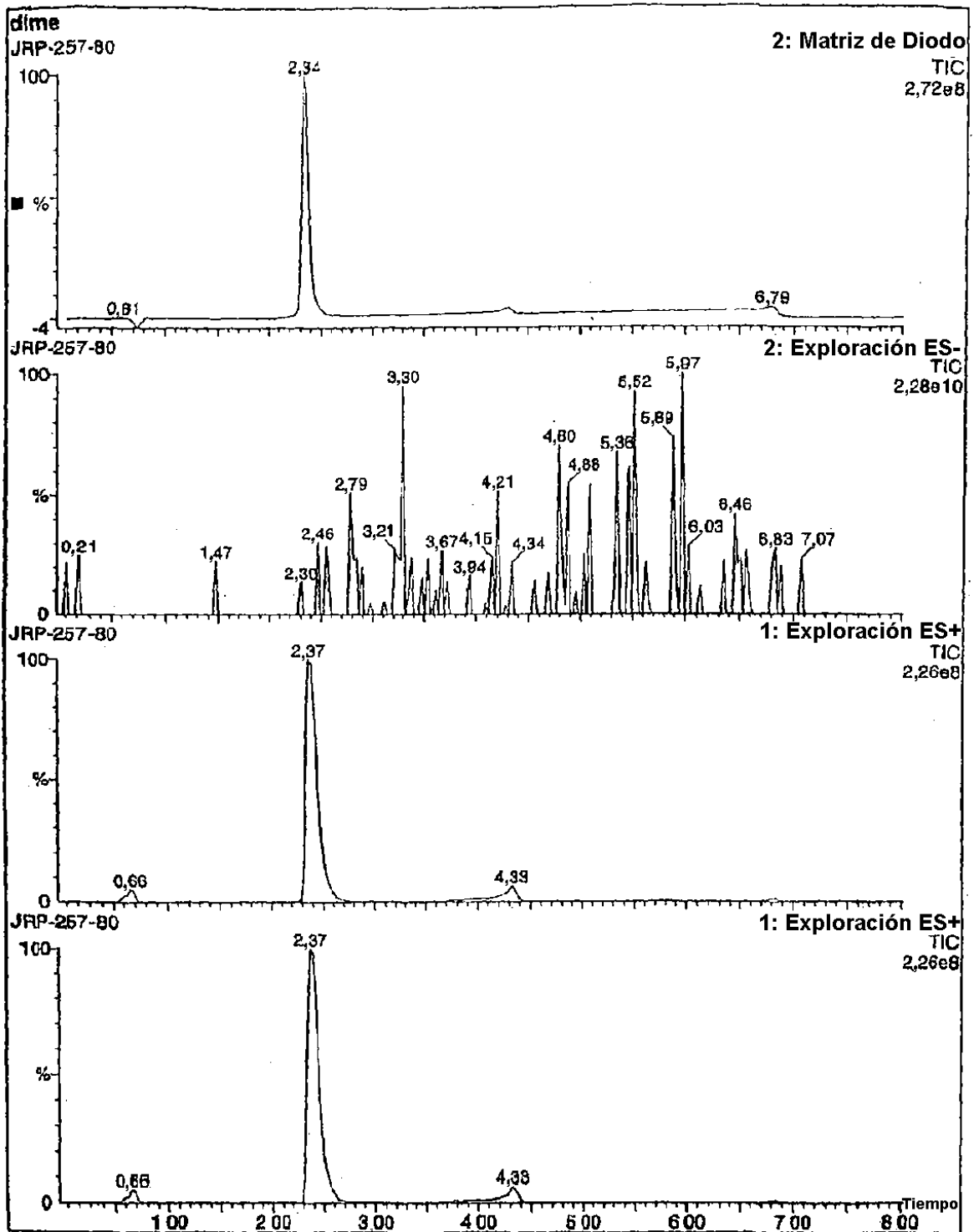


Figura 27

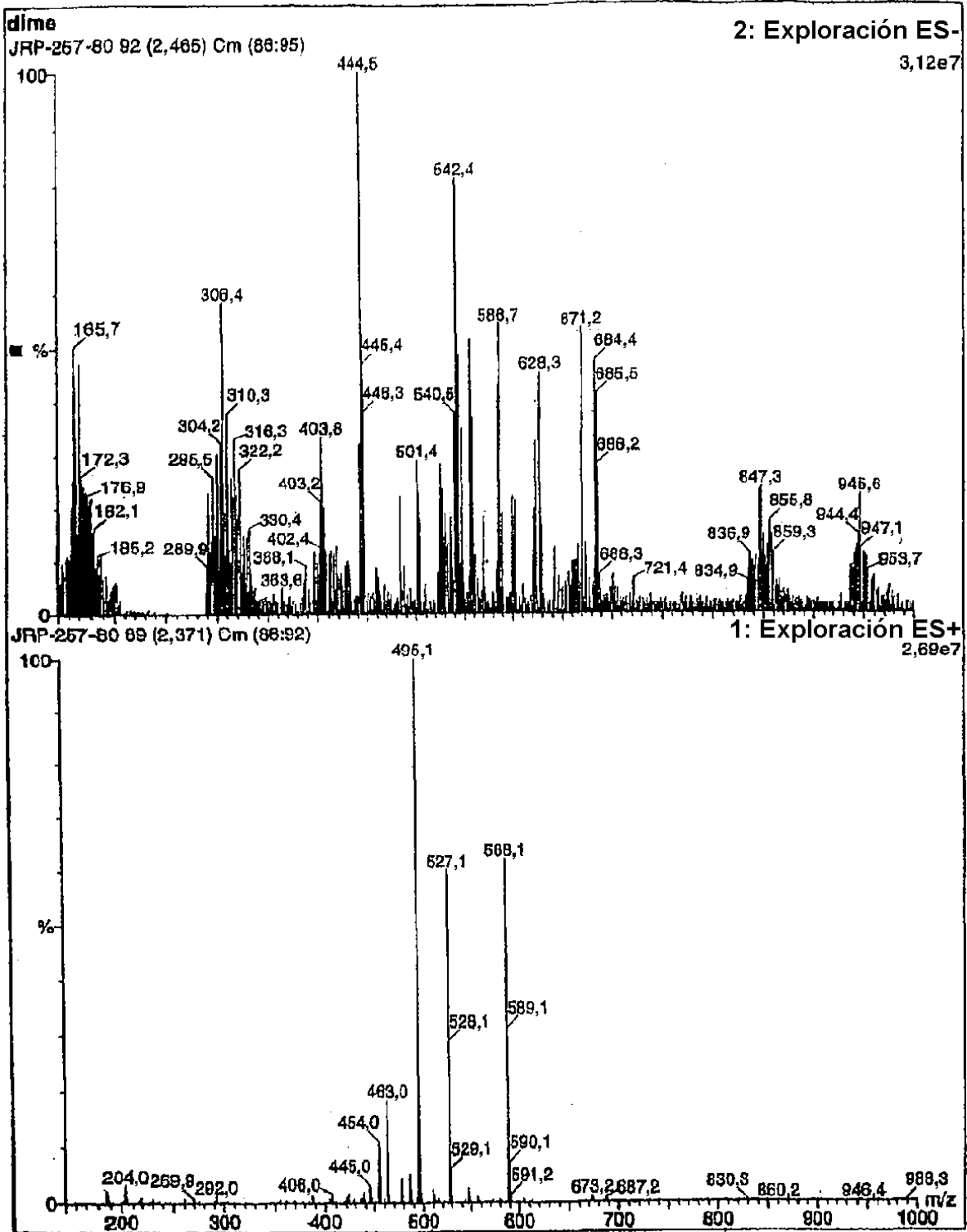


Figura 28



jporter / 040126047 / JRF-IFI-257-083
 PROTON D2O d.:/ SamTrack 5

Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040126047
 Nº EXP. 10
 Nº PROC. 1

F2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha_ 20040126
 Hora 21.15
 INSTRUM SPECT
 PROBHD 5 mm BBO RE-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 NS 1020
 DS 128
 AS 2
 SFL 8278.146 Hz
 FIDRES 0.126314 Hz
 AQ 3.9584243 s
 RG 203.2
 INW 60.400 us
 DE 6.00 us
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 s

CANAL F1
 NUC1 1H
 P1 9.00 us
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz

Parámetros de procesamiento
 SI 32768
 SF 400.1300981 MHz
 MDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

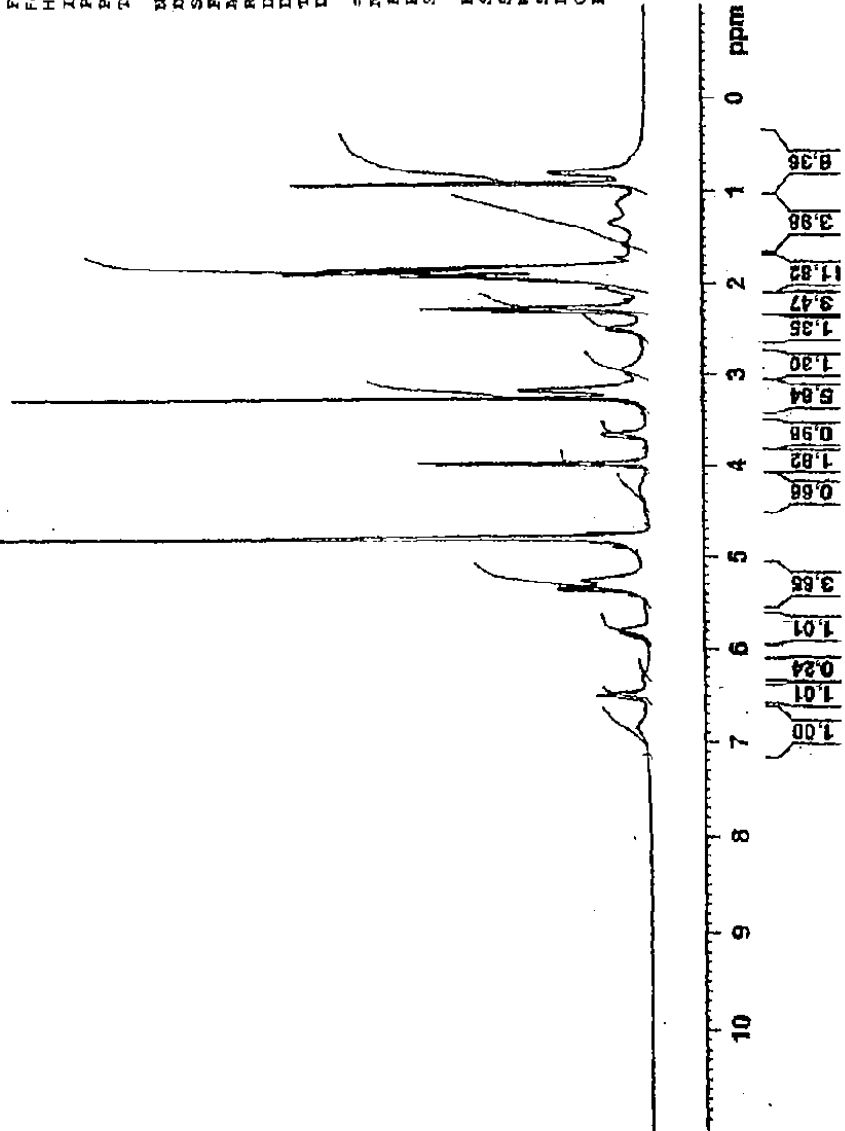


Figura 29

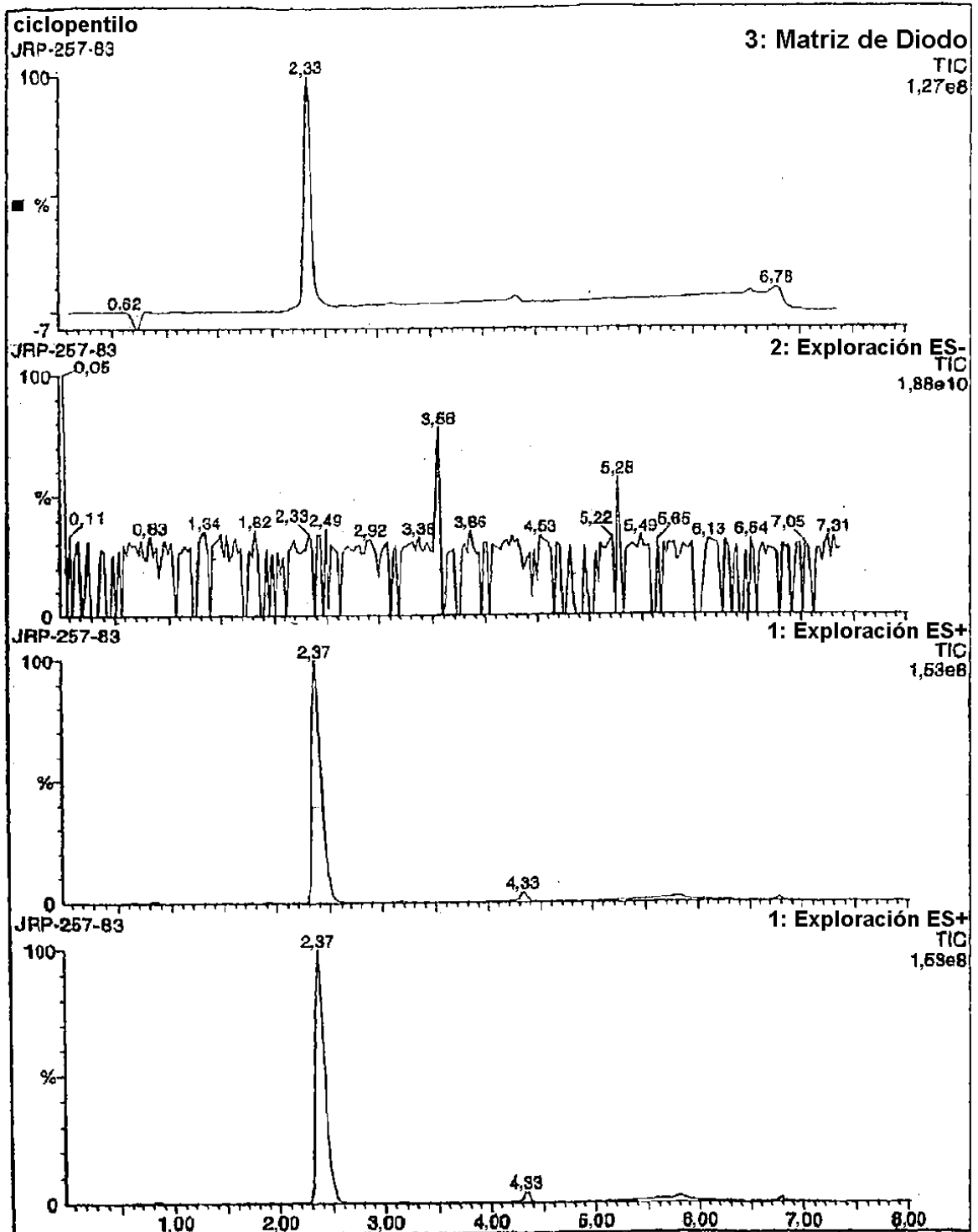


Figura 30

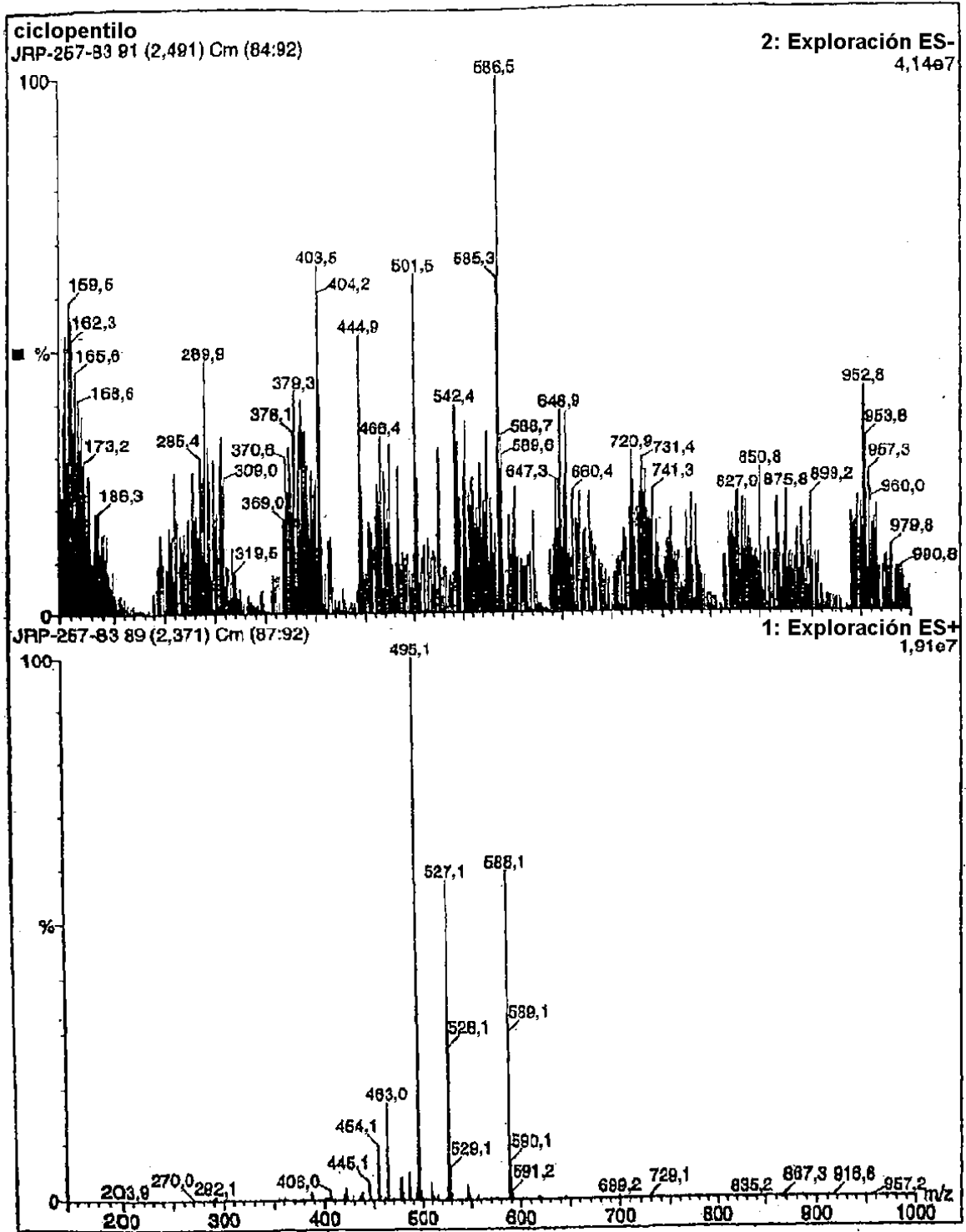


Figura 31

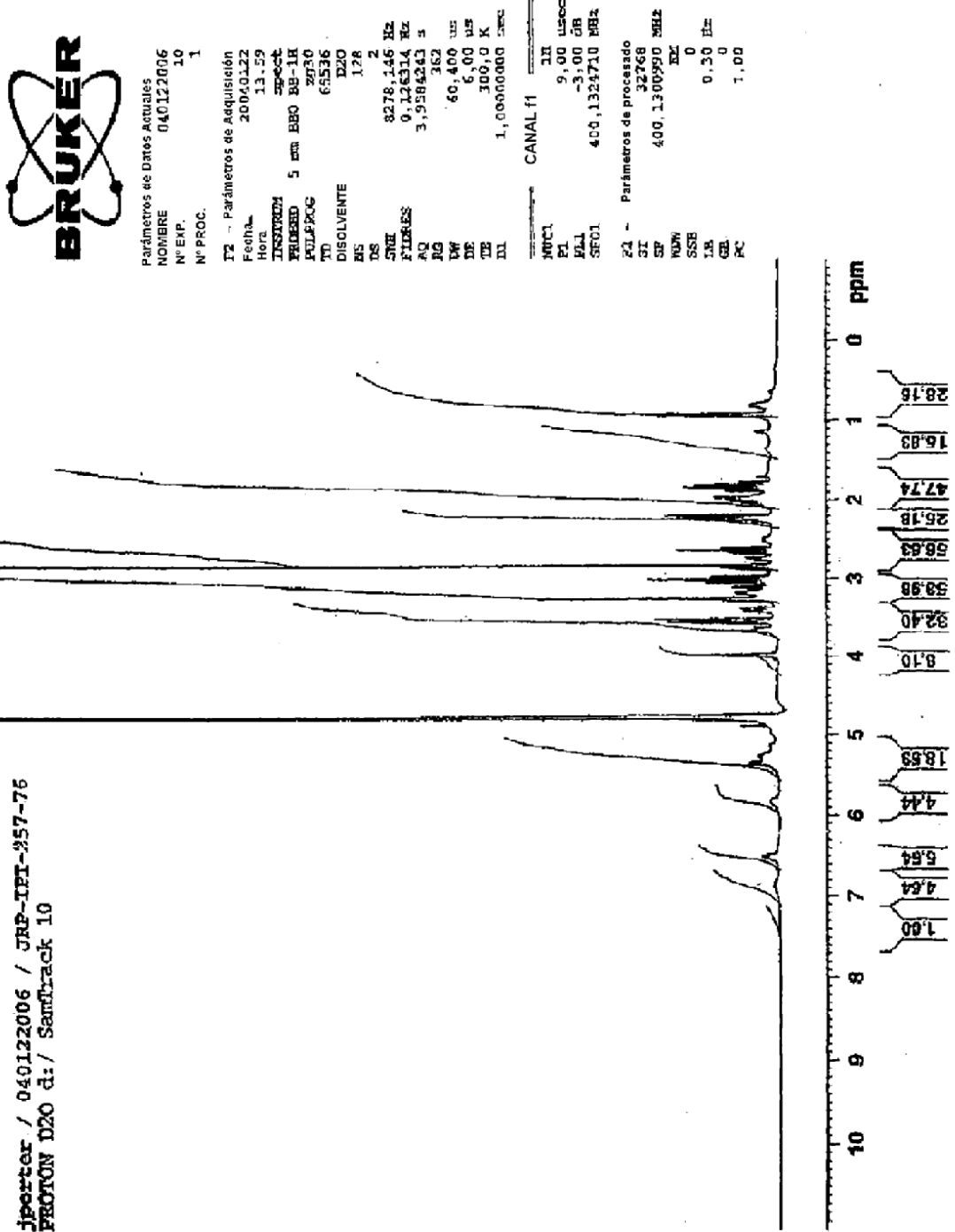


Figura 32

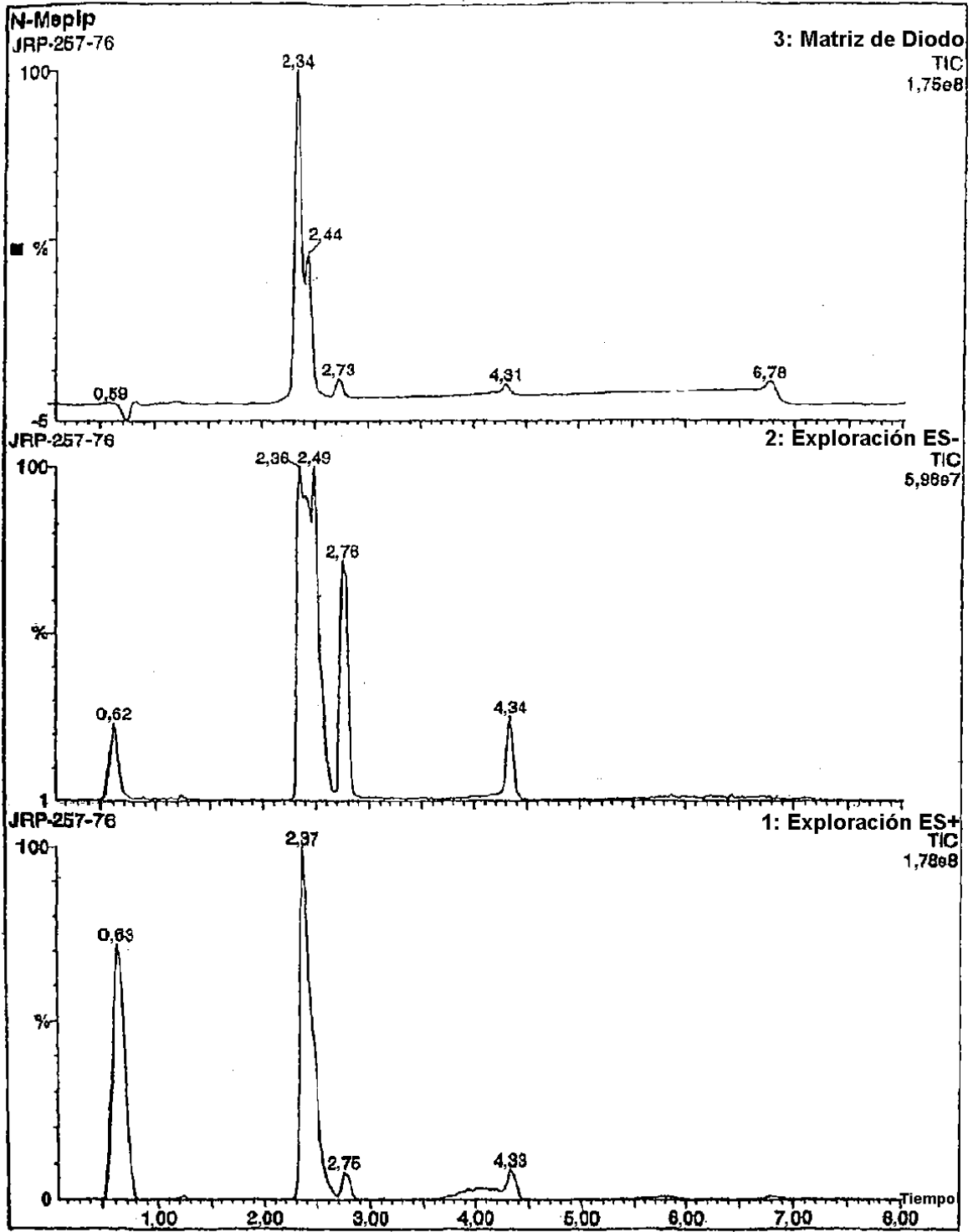


Figura 33

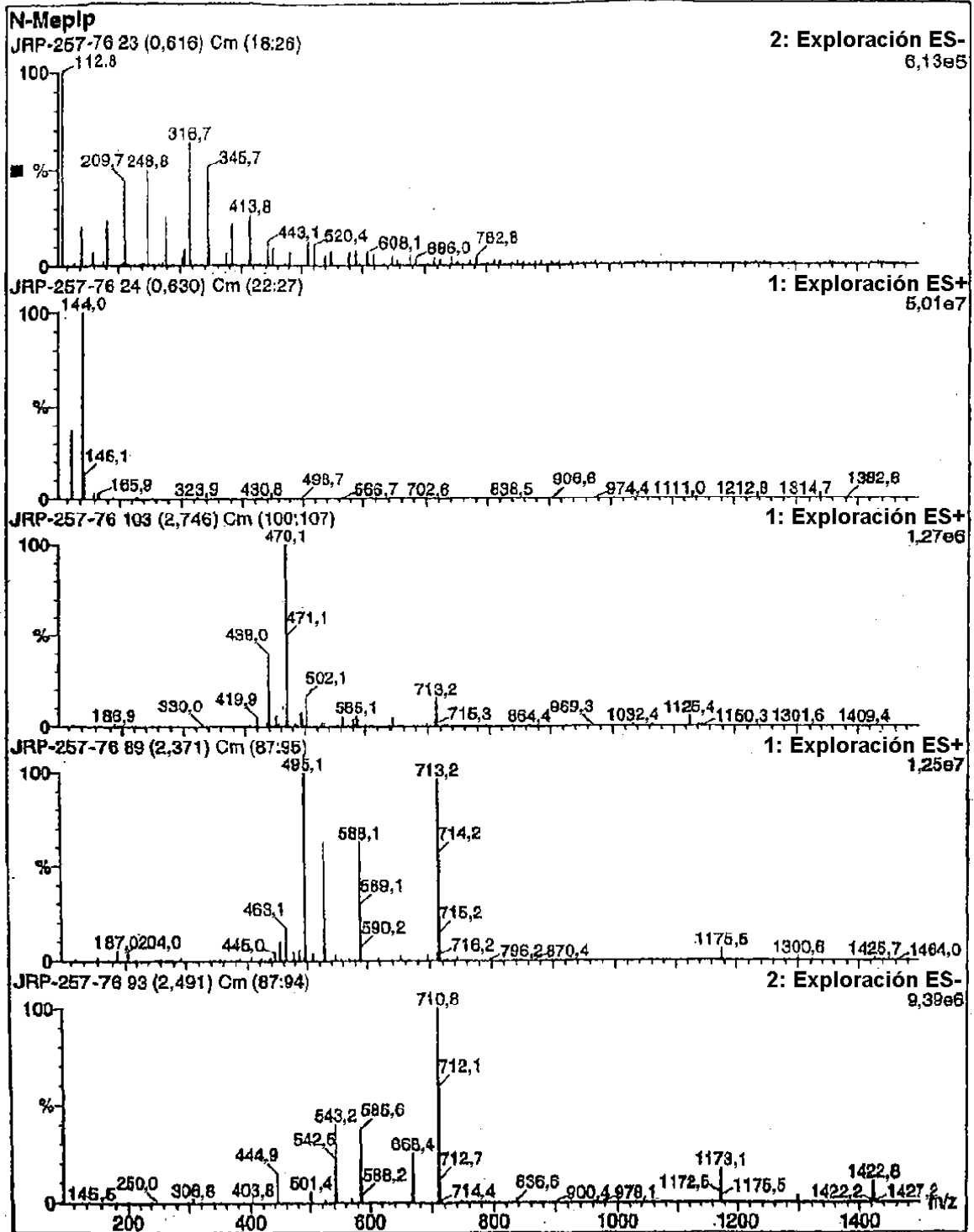


Figura 34



jporter / 040210015 / JPorter-IP1-257-95
 PROTON CDCl3 d:/ Samtrack 7

Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040210015
 Nº EXP. 10
 Nº PROC. 1

F2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha 20040210
 Hora 14.40
 INSTRUM spect
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 DISOLVENTE CDCl3
 NS 48
 DS 2
 SWH 8278.146 Hz
 FIDRES 0.126314 Hz
 AQ 3.958243 s
 RG 287.4
 D# 60.400 us
 DE 6.00 us
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 s

CANAL f1

MULTI 1K
 P1 9.00 us
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Parámetros de procesamiento
 SI 32768
 SF 400.1299321 MHz
 NEW EX
 SSB 0
 LB 0.20 Hz
 GB 0
 PC 1.00

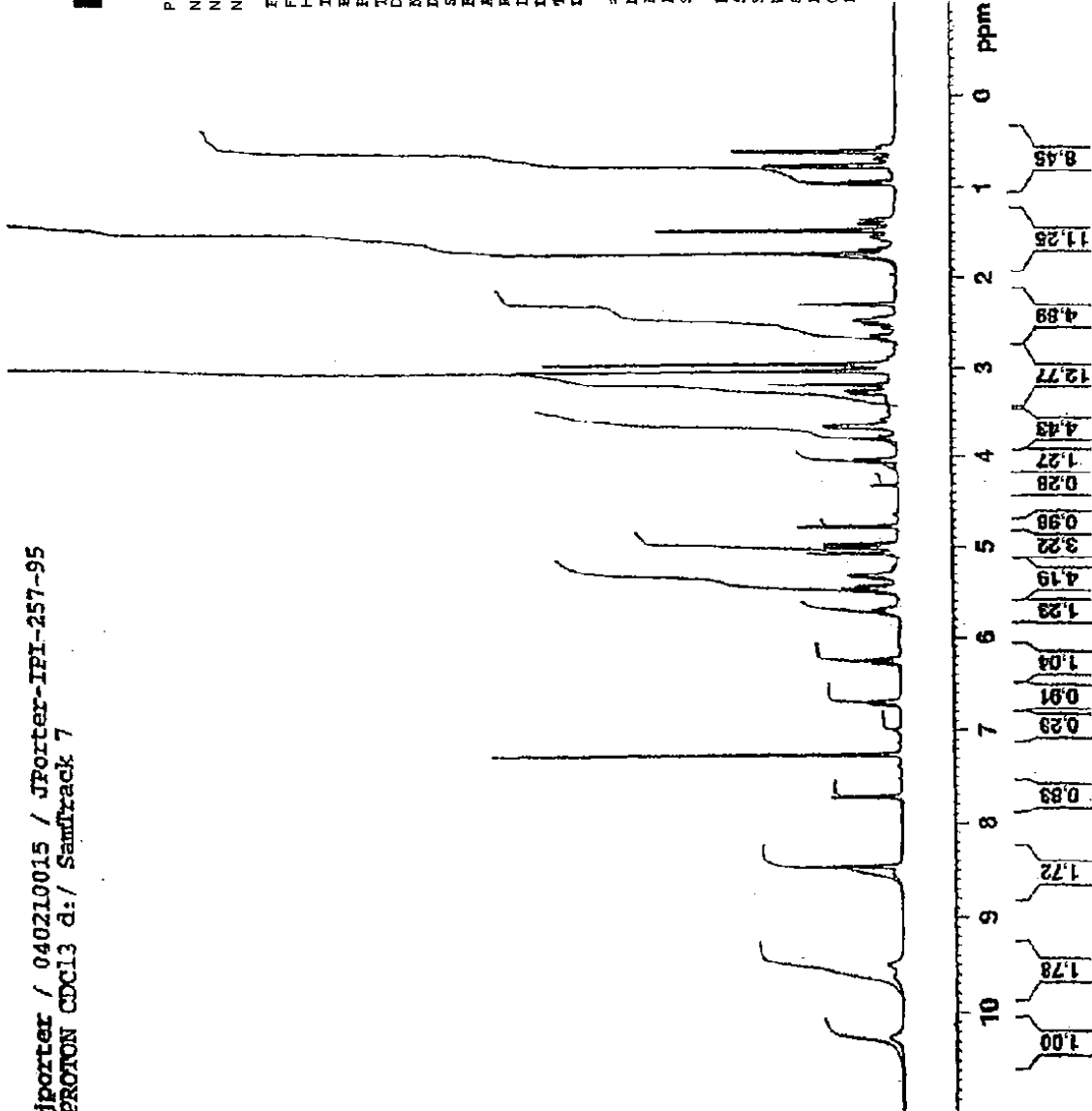


Figura 35

ygao / 040217012 / GY-IP1257-90-Prodrug
 PROTON DMSO d:/ SamTrack 38

Ejemplo 15



Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040217012
 Nº EXP. 10
 Nº PROC. 1

F2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha. 20040217
 Hora 17.17
 INSTRUM spect
 PROMOD 5 Jm EBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 DISOLVENTE DMSO
 NS 64
 DS 2
 SWH 8278.146 Hz
 FIDRES 0.126314 Hz
 AQ 3.9564243 s
 RG 128
 LW 60.400 us
 DE 6.00 us
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 s

CANAL f1
 FOC1 1H
 F1 9.00 us
 FFA -3.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Parámetros de procesamiento
 SI 32768
 SF 400.1300000 MHz
 PCW RM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

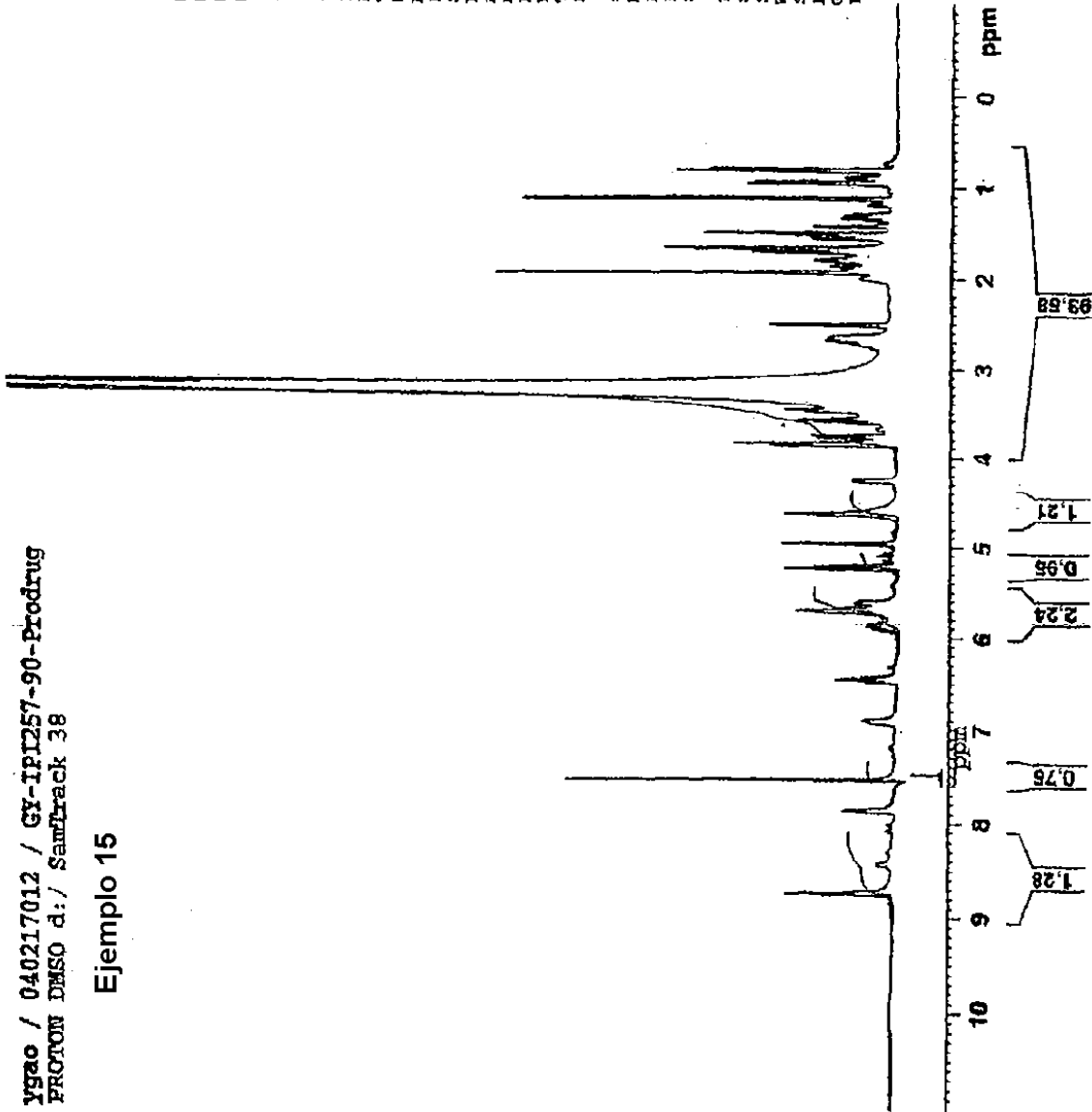


Figura 36

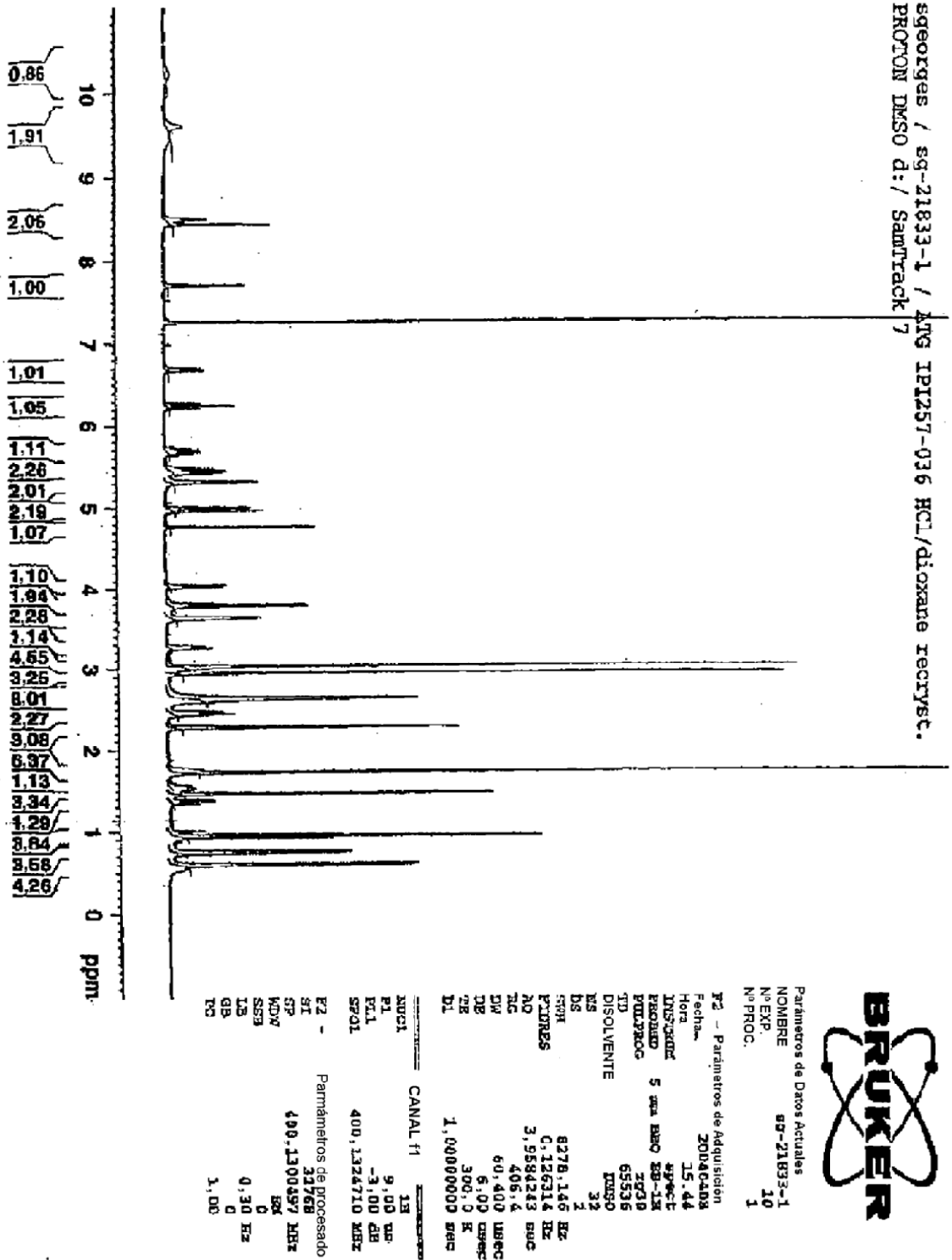


Figura 37

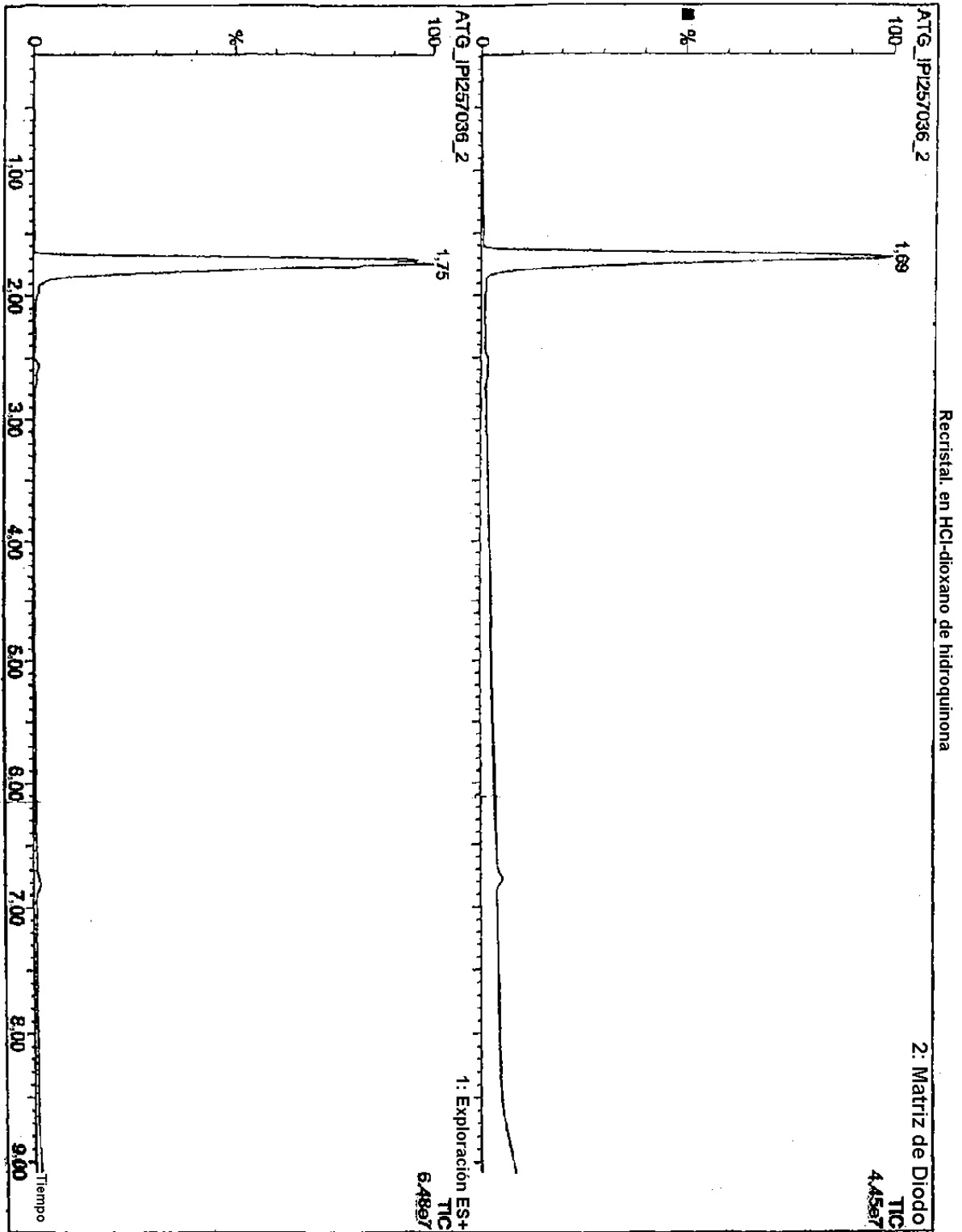


Figura 38

Ygao / 040326004 / GY-IP1257-124-1 W/M/TBE
 PROTON CDCl3 d: / SamTrack 29

17-AAG-THQ. sal de H₂SO₄



Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040326004
 Nº EXP. 10
 Nº PROC. 1

Z2 - Parámetros de Adquisición

Fecha 20040326
 Hora 14:43
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 DISOLVENTE CDCl3
 NS 64
 DS 2
 SFR 8278.146 Hz
 FIDRES 0.126314 Hz
 AQ 3.9584243 s
 RG 256
 DW 60.400 µs
 DE 6.00 µs
 TK 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

===== CANAL F1 =====
 NUC1 1H
 P1 9.00 µs
 PL1 -5.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz

V2 - Parámetros de proceso
 S1 32768
 SF 400.125309 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 FB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

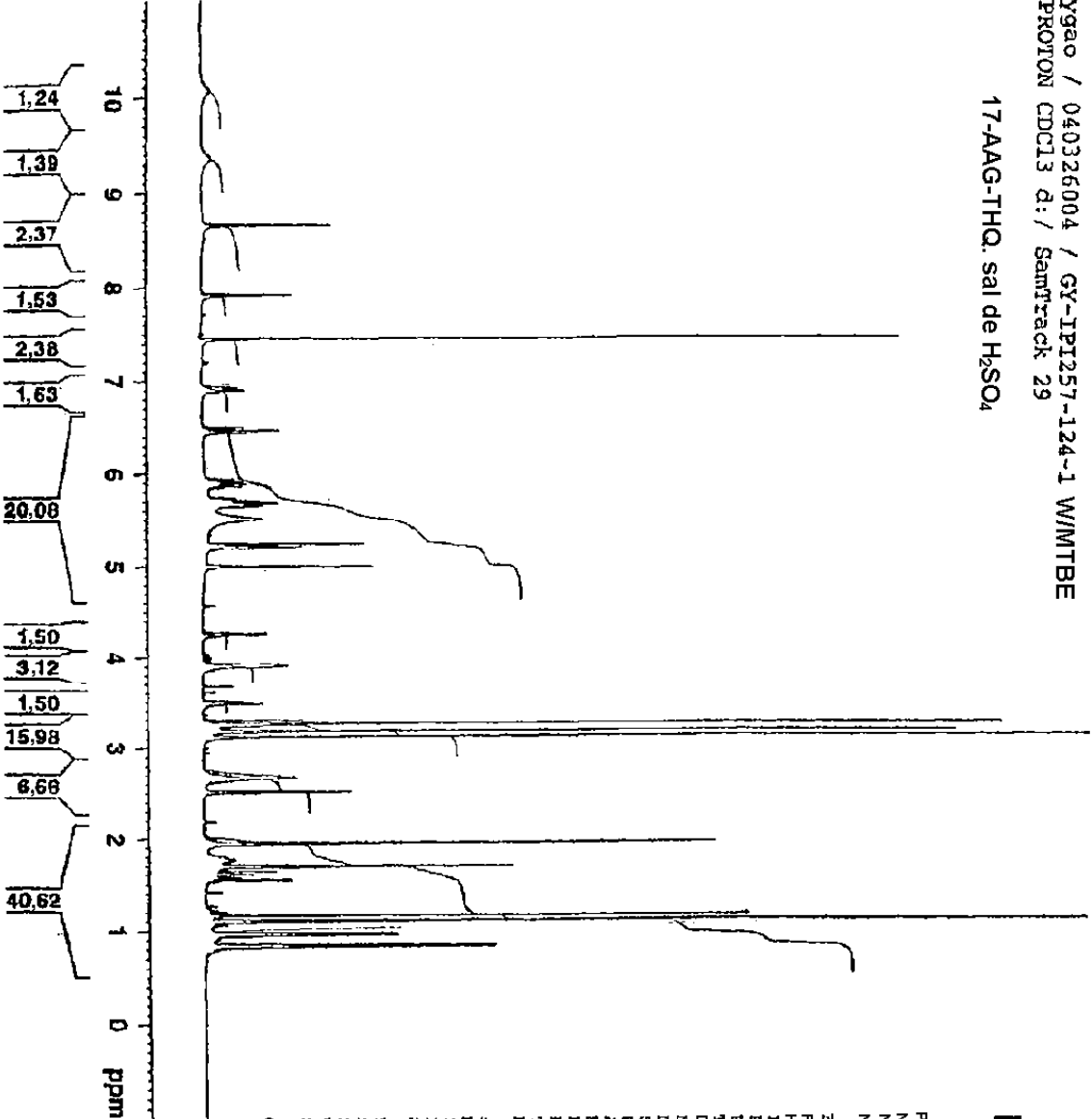


Figura 39

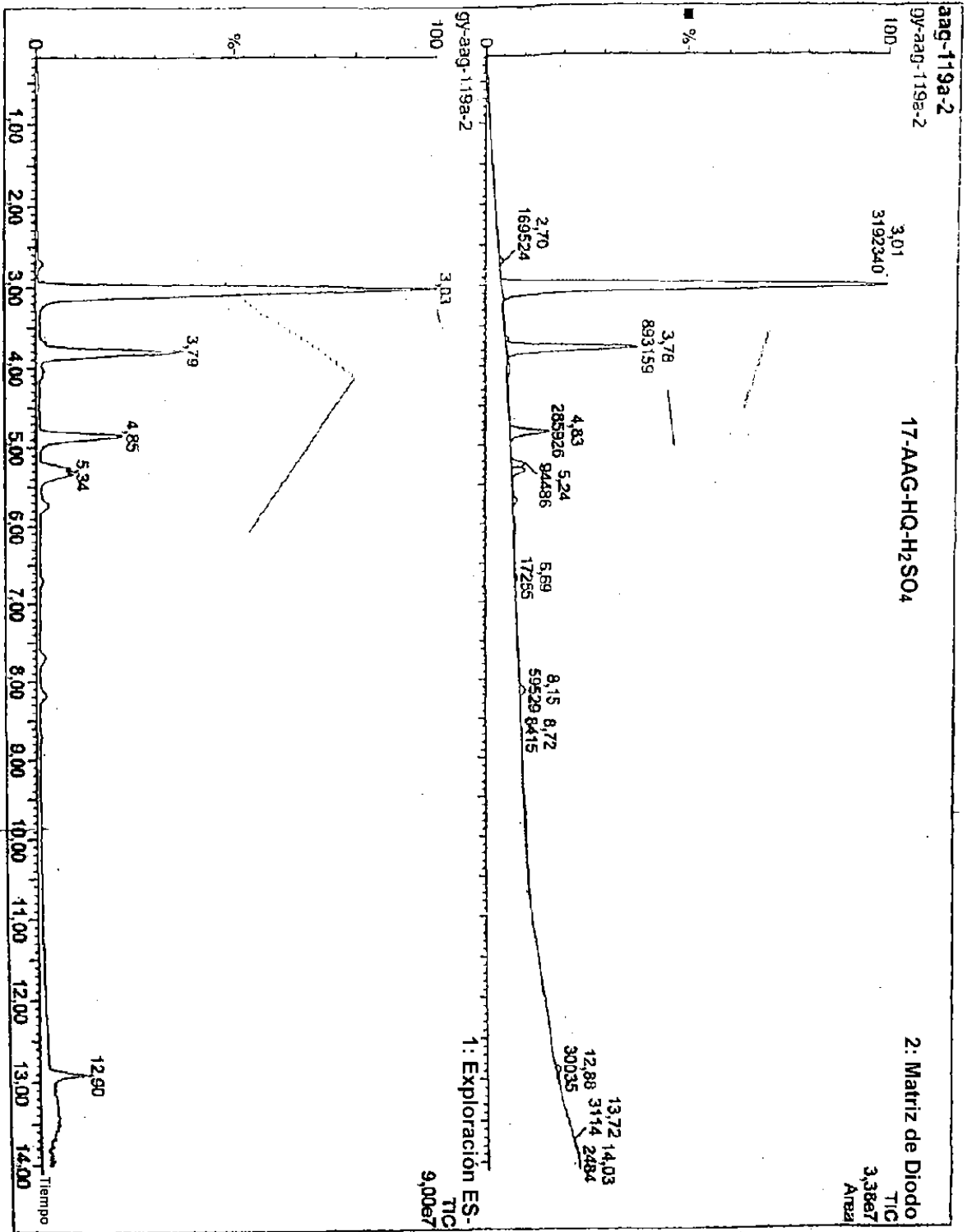


Figura 40

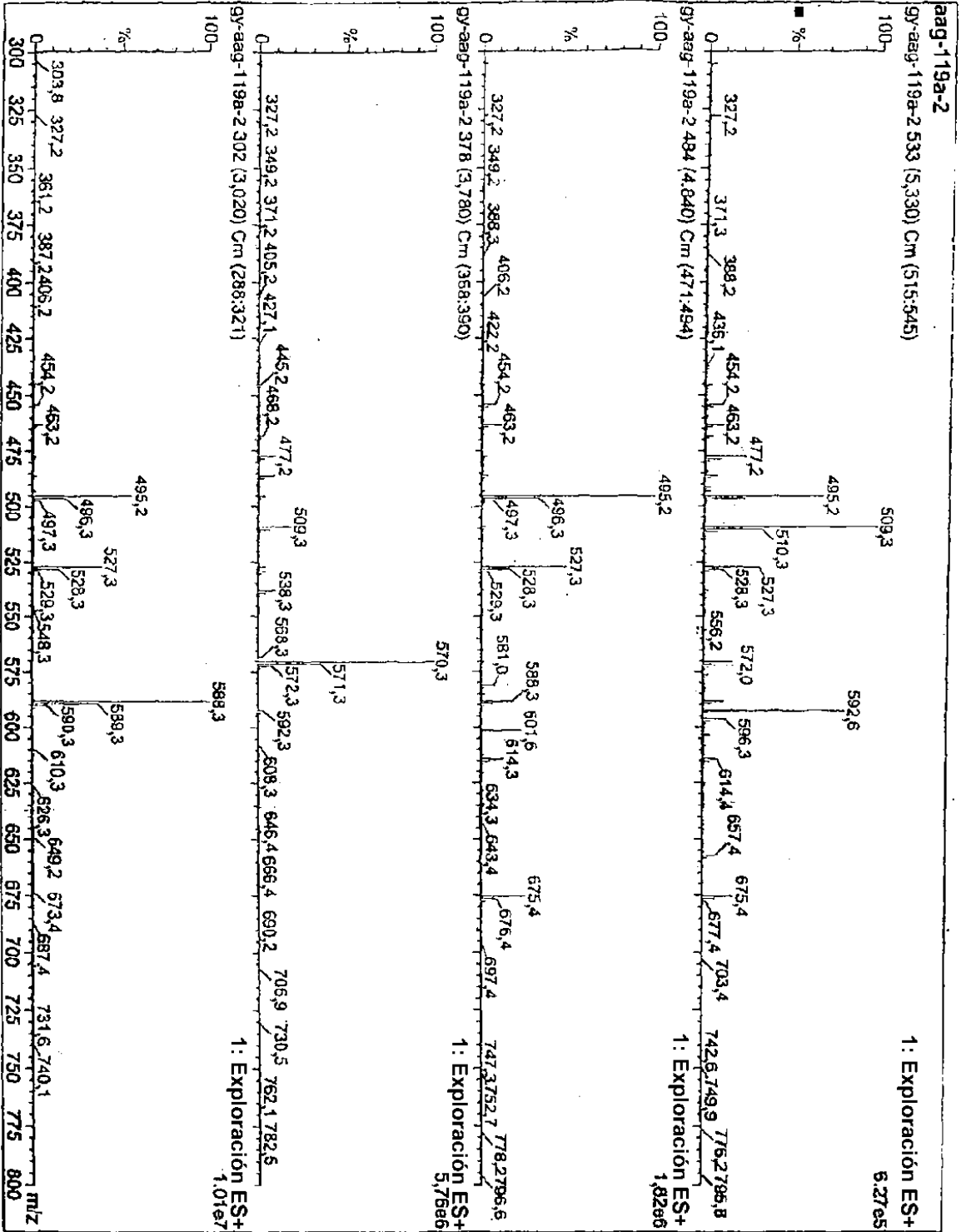


Figura 41

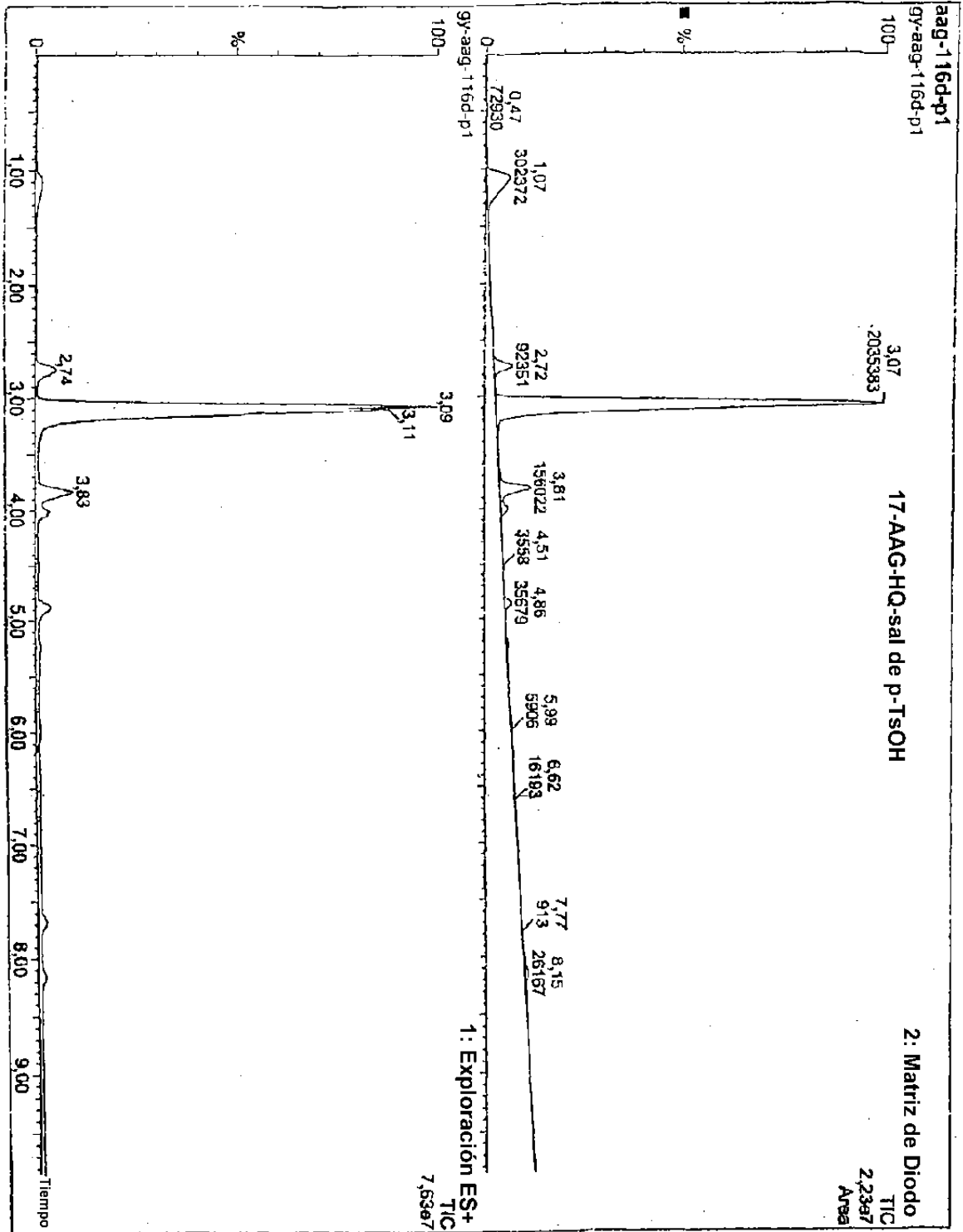


Figura 42

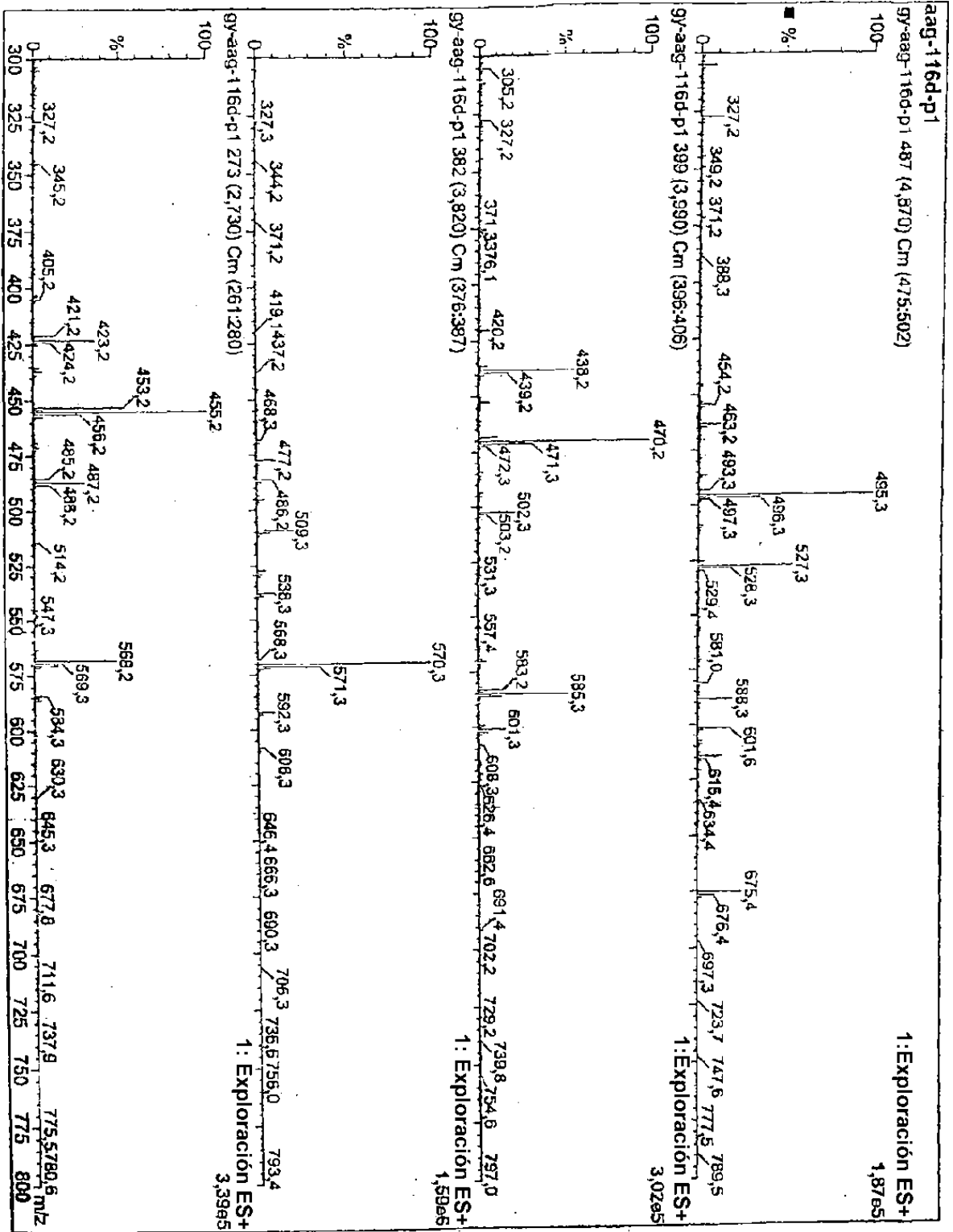


Figura 43

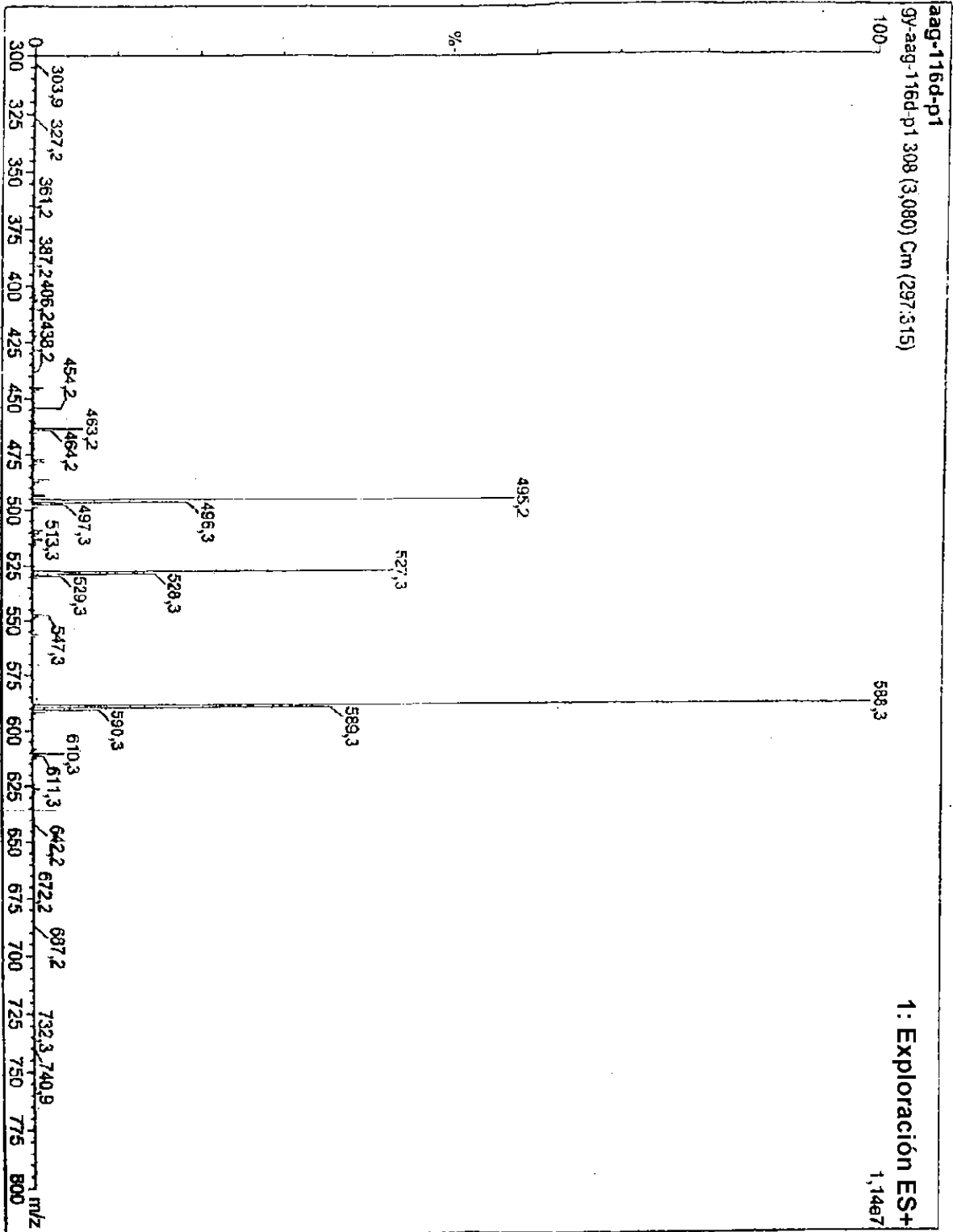


Figura 44

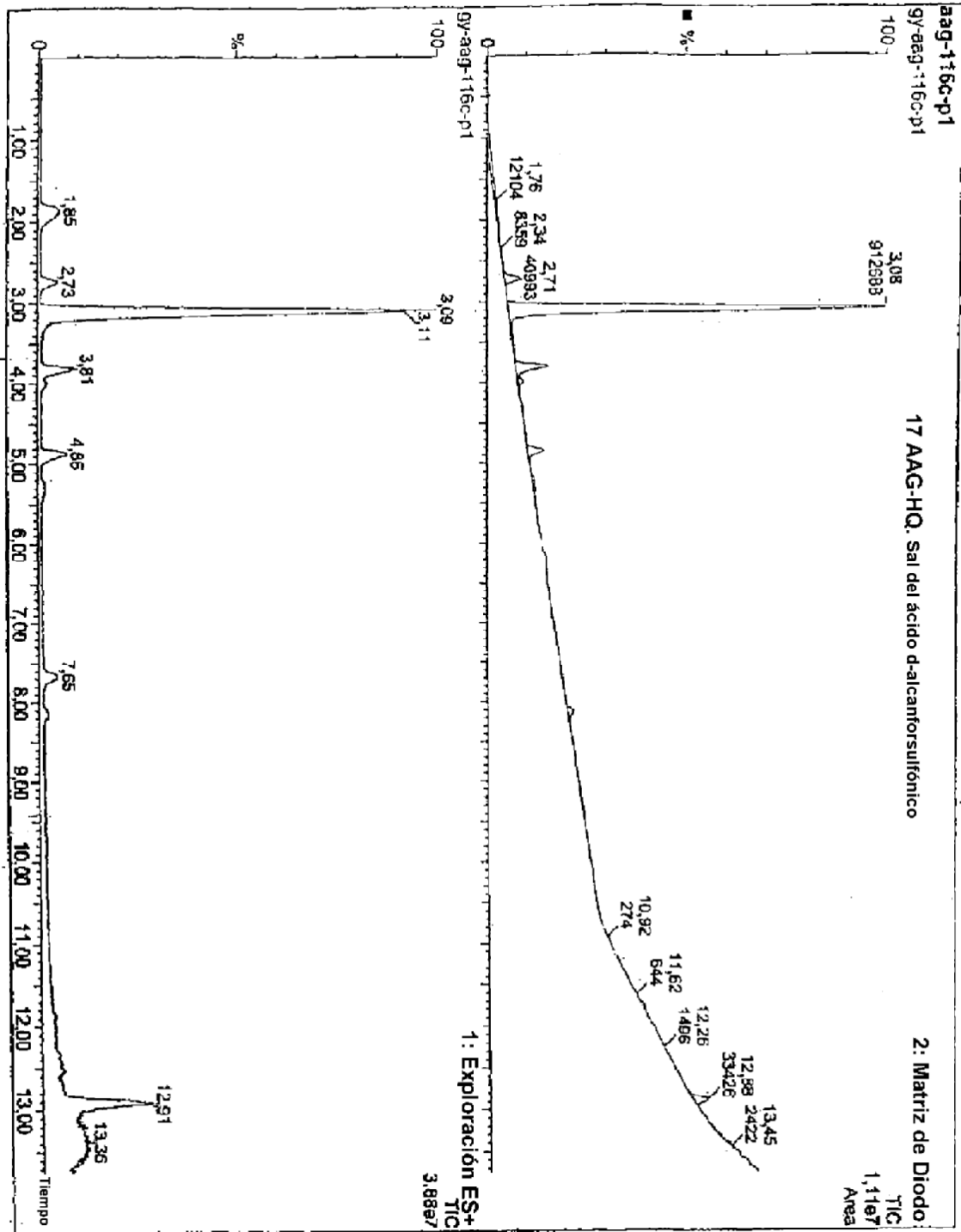


Figura 45

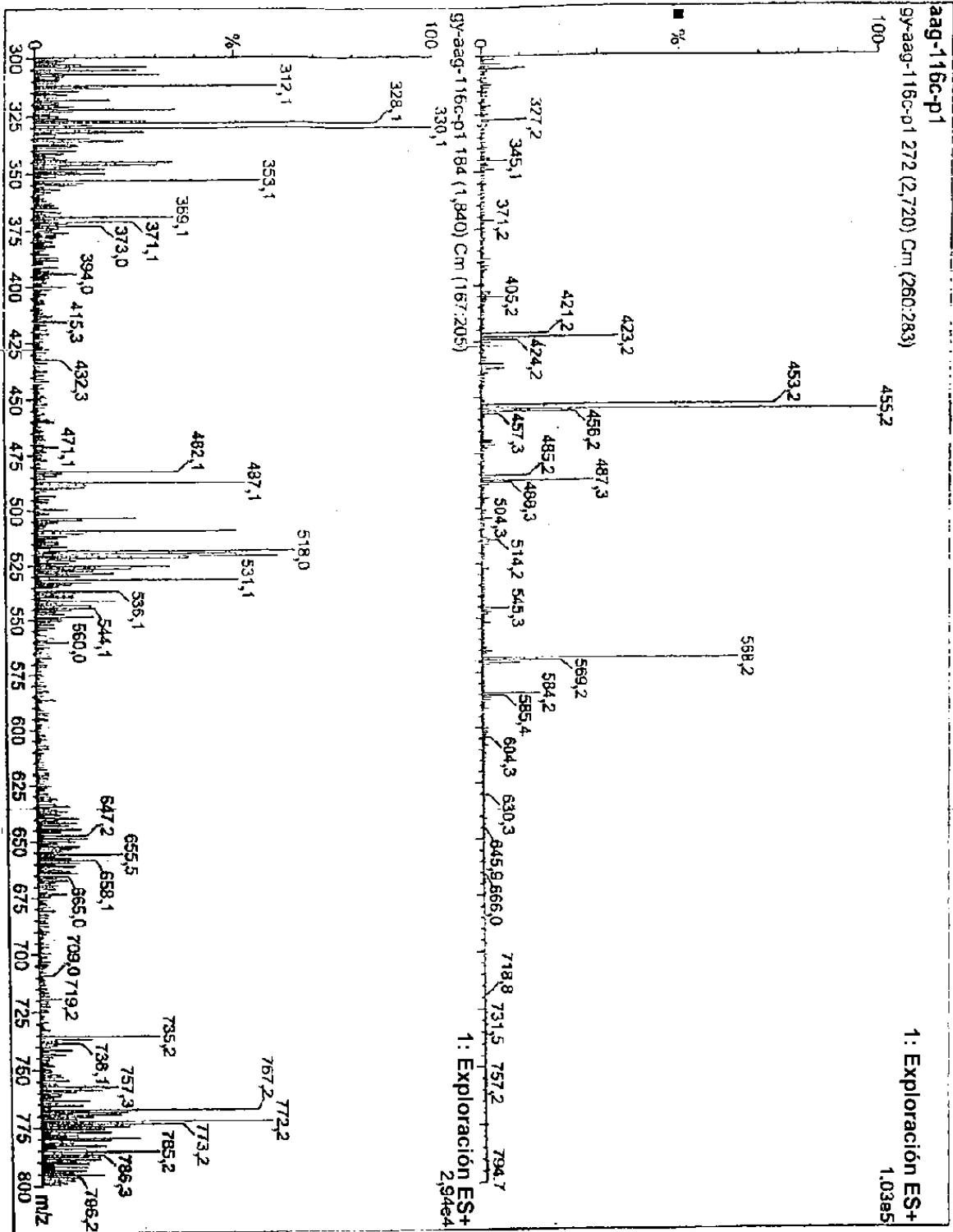


Figura 46

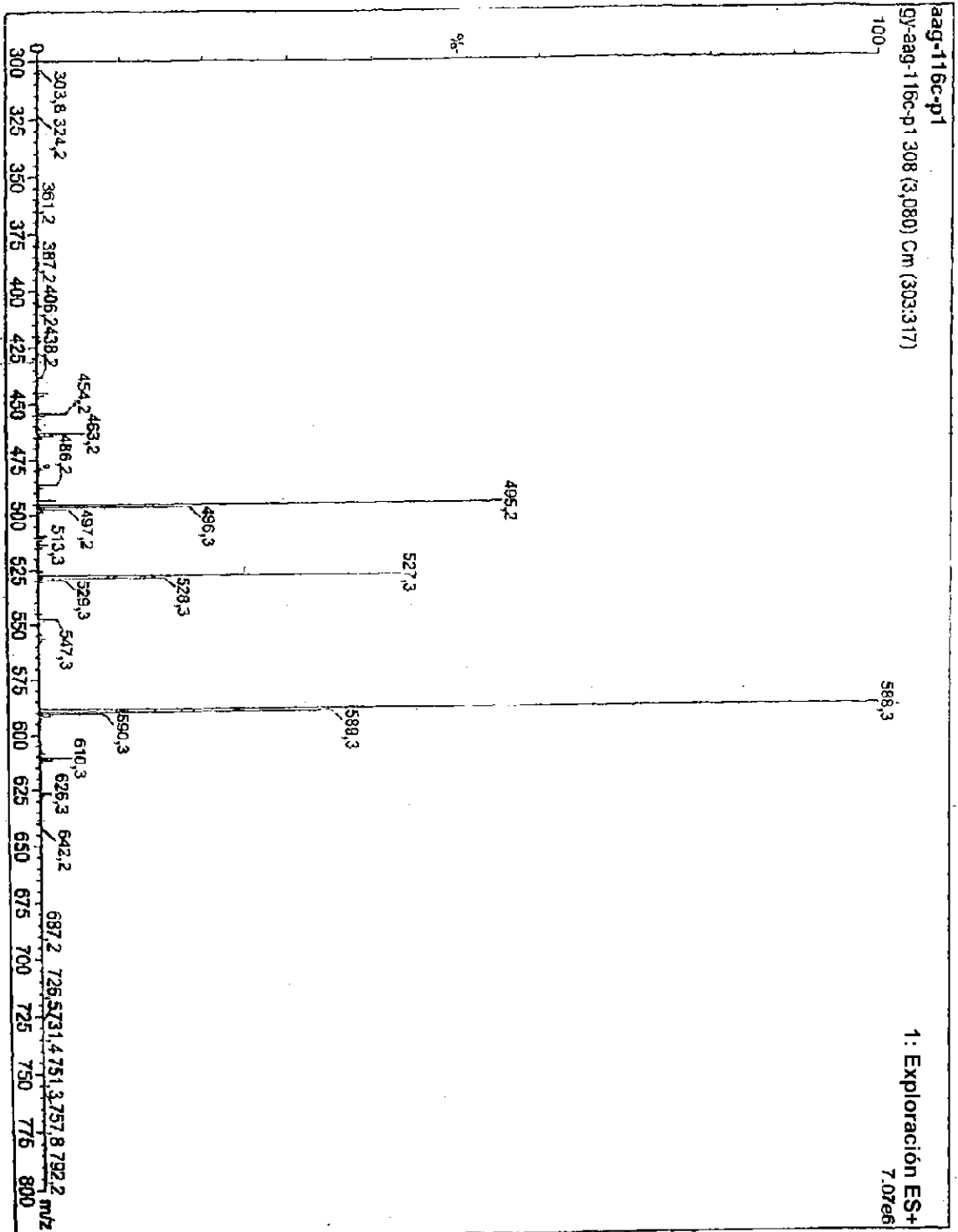


Figura 47

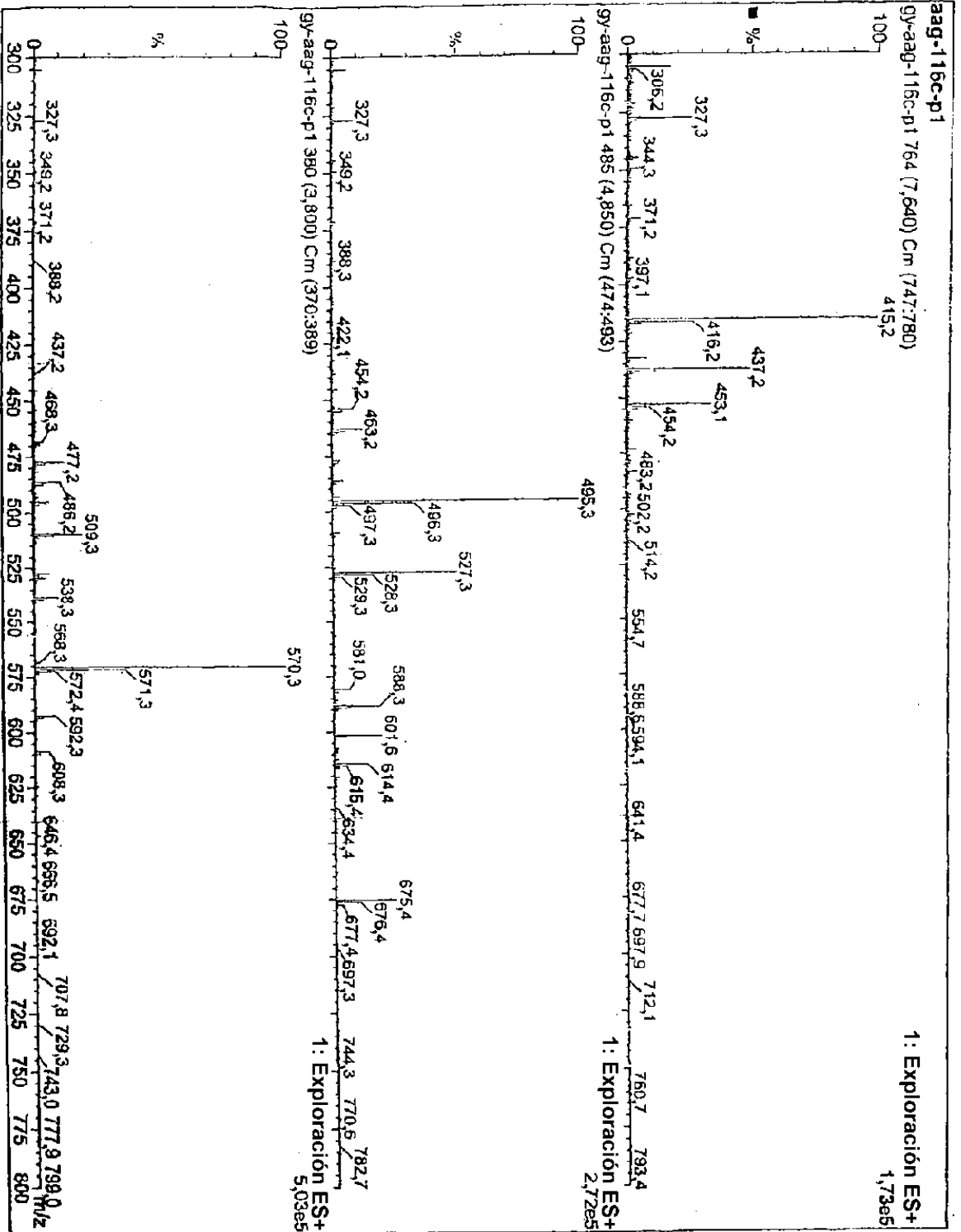


Figura 48

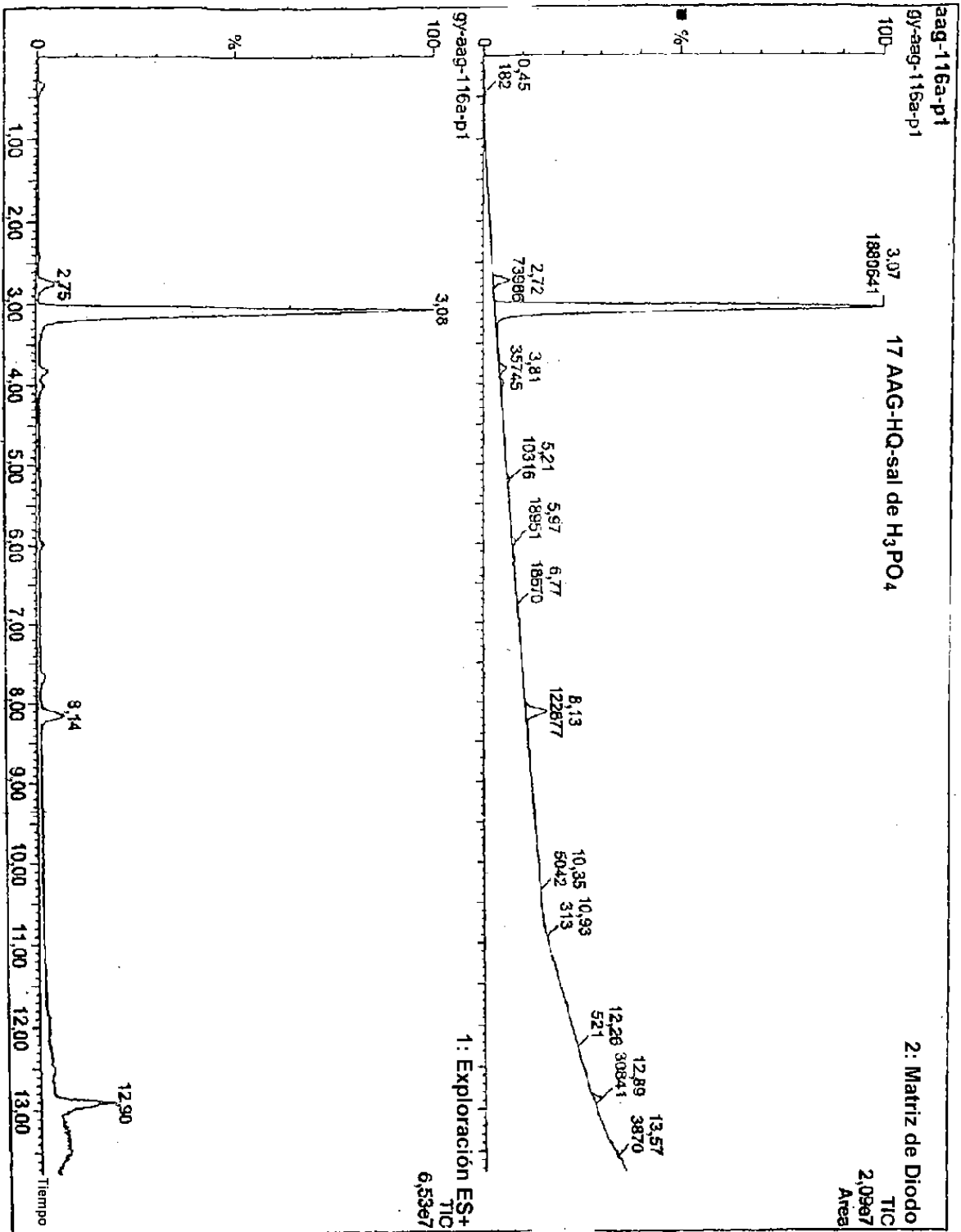


Figura 49

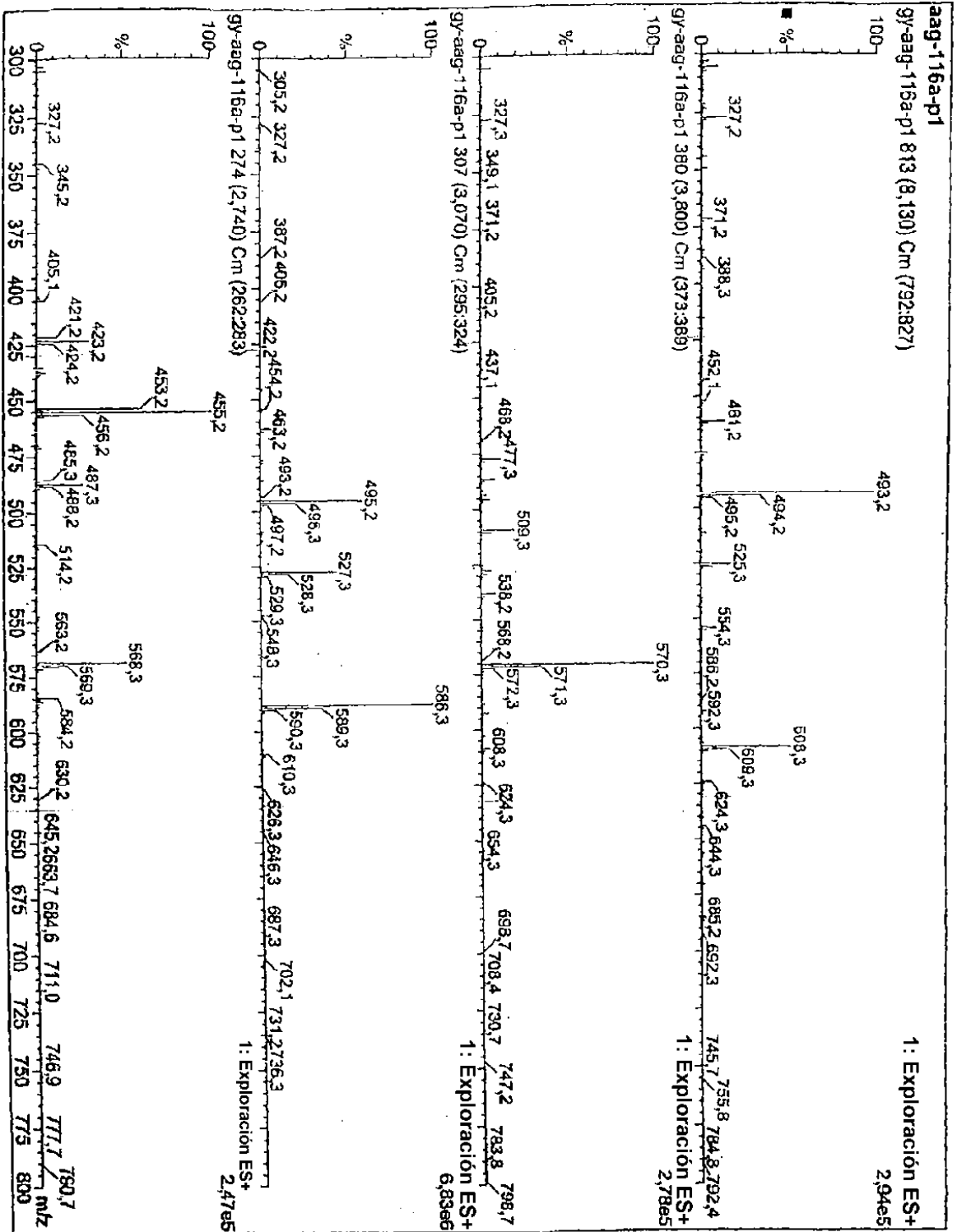


Figura 52

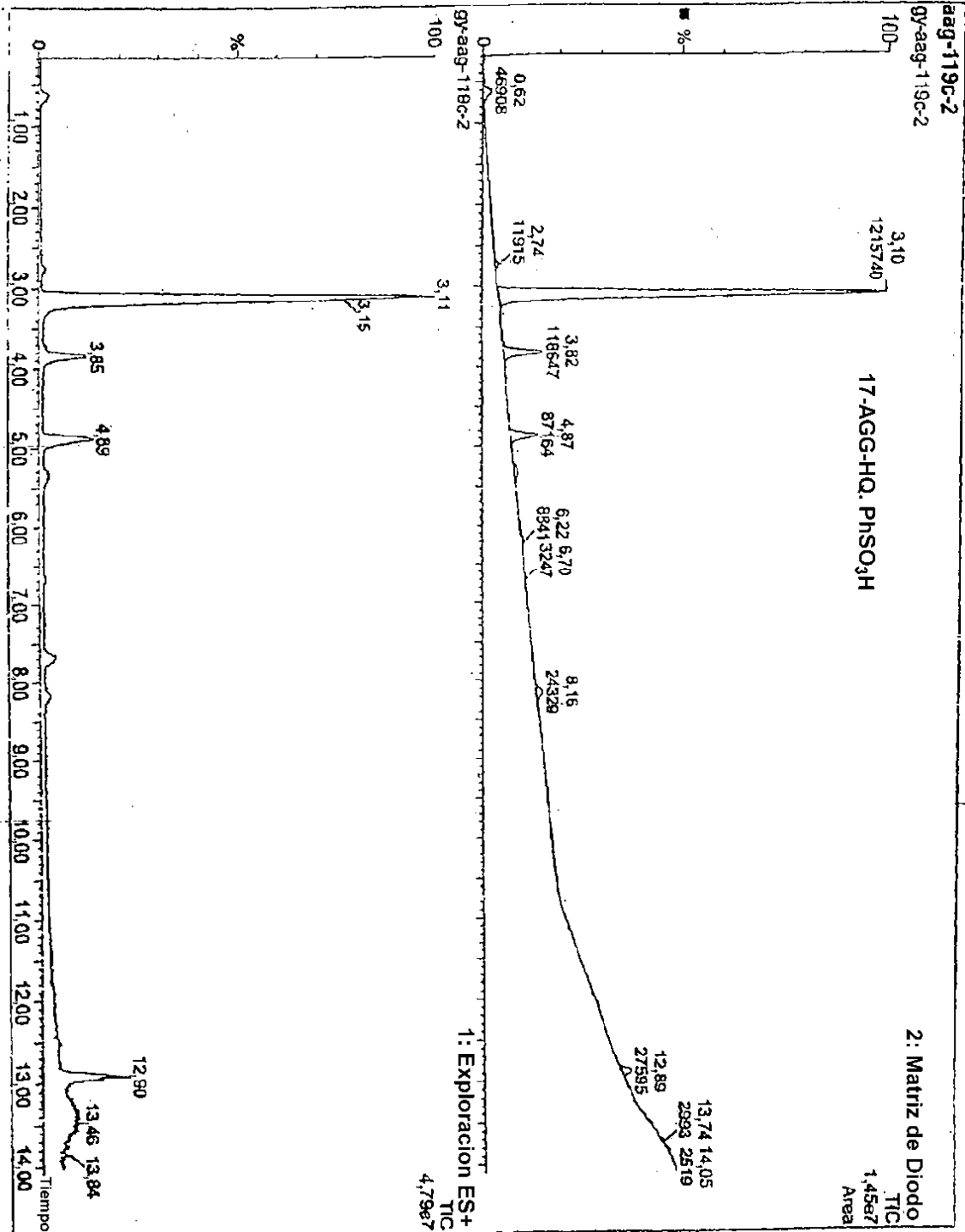


Figura 54

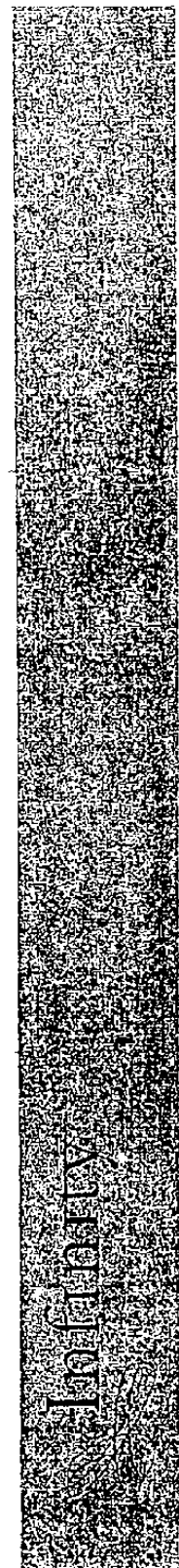
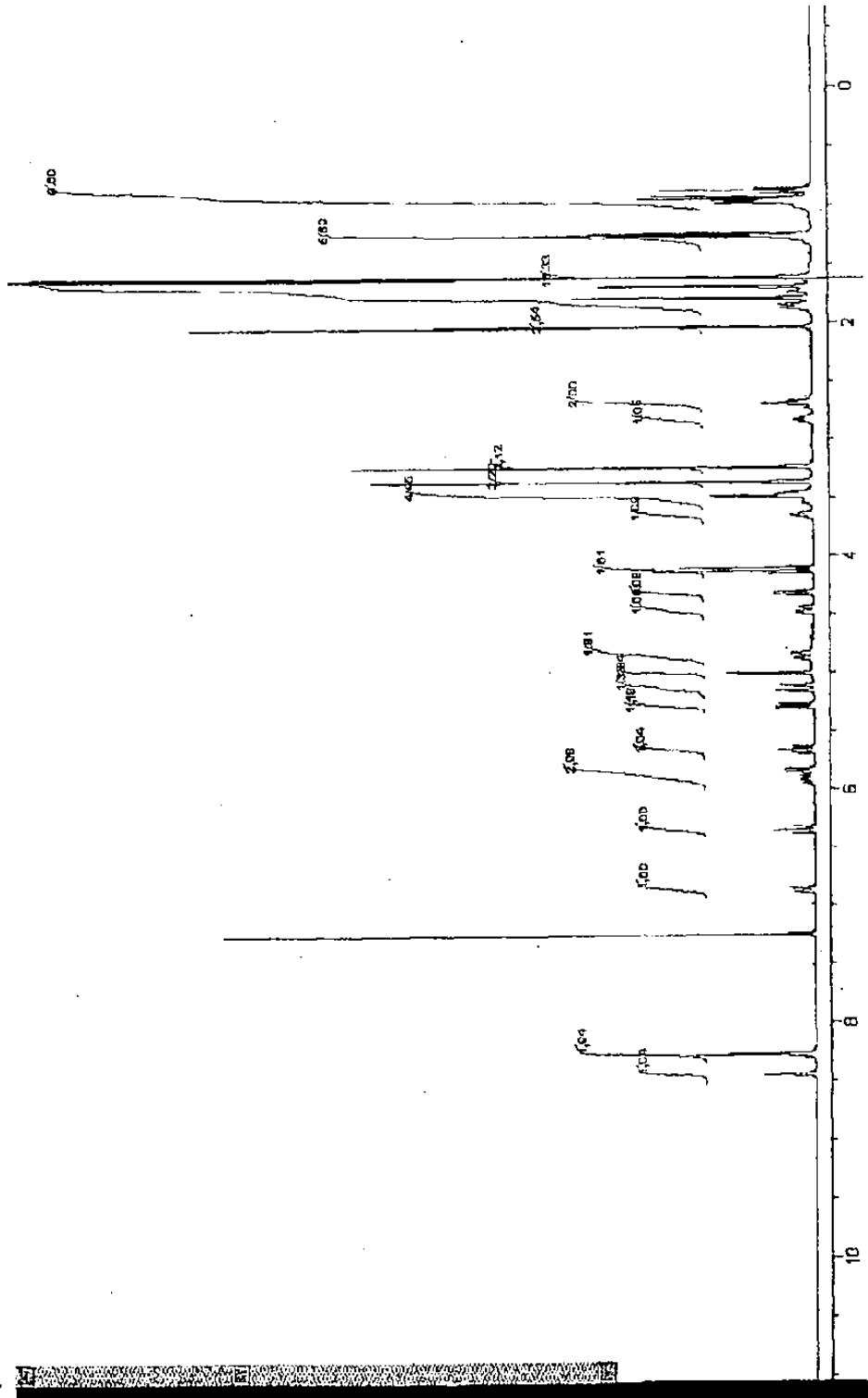


Figura 56

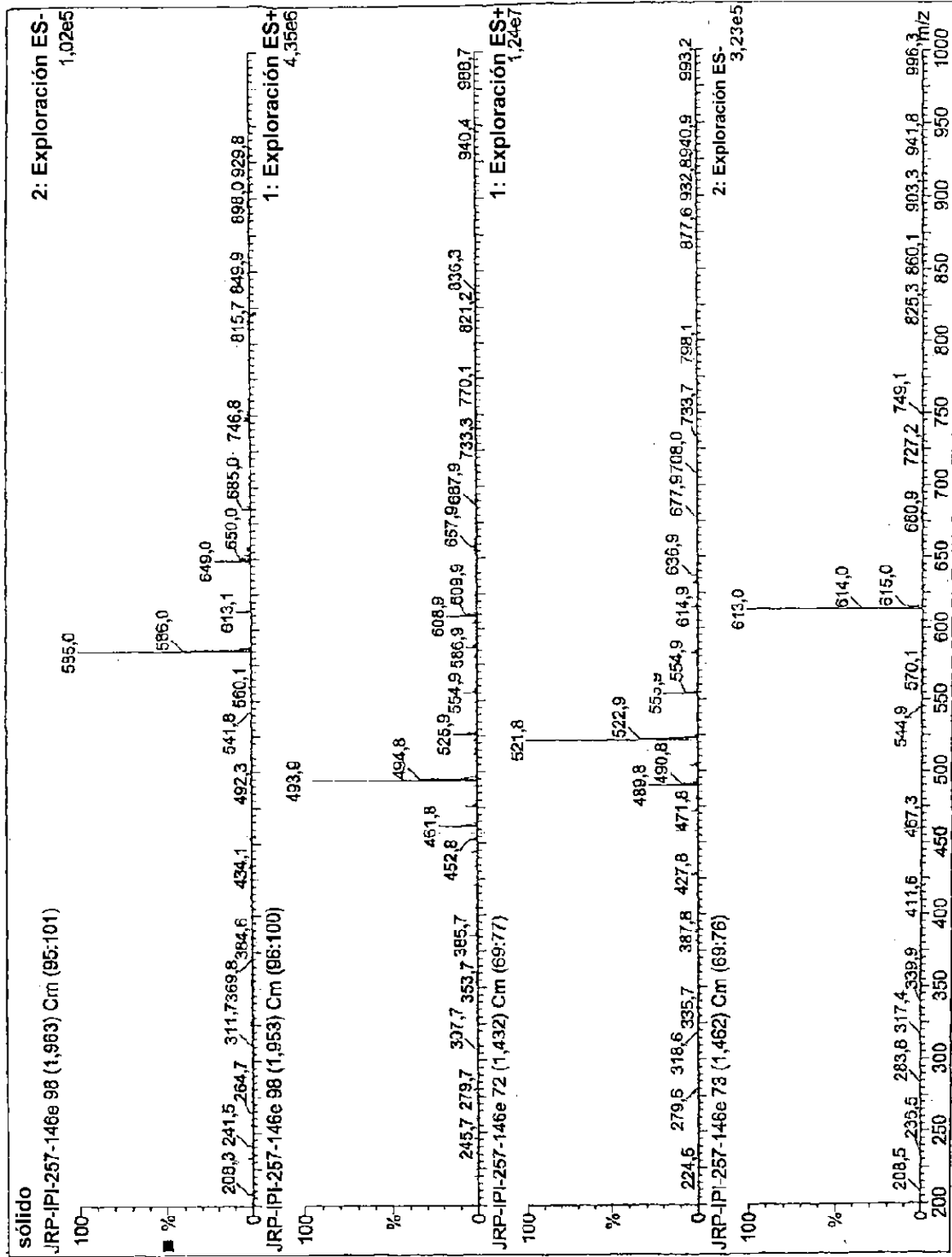


Figura 58

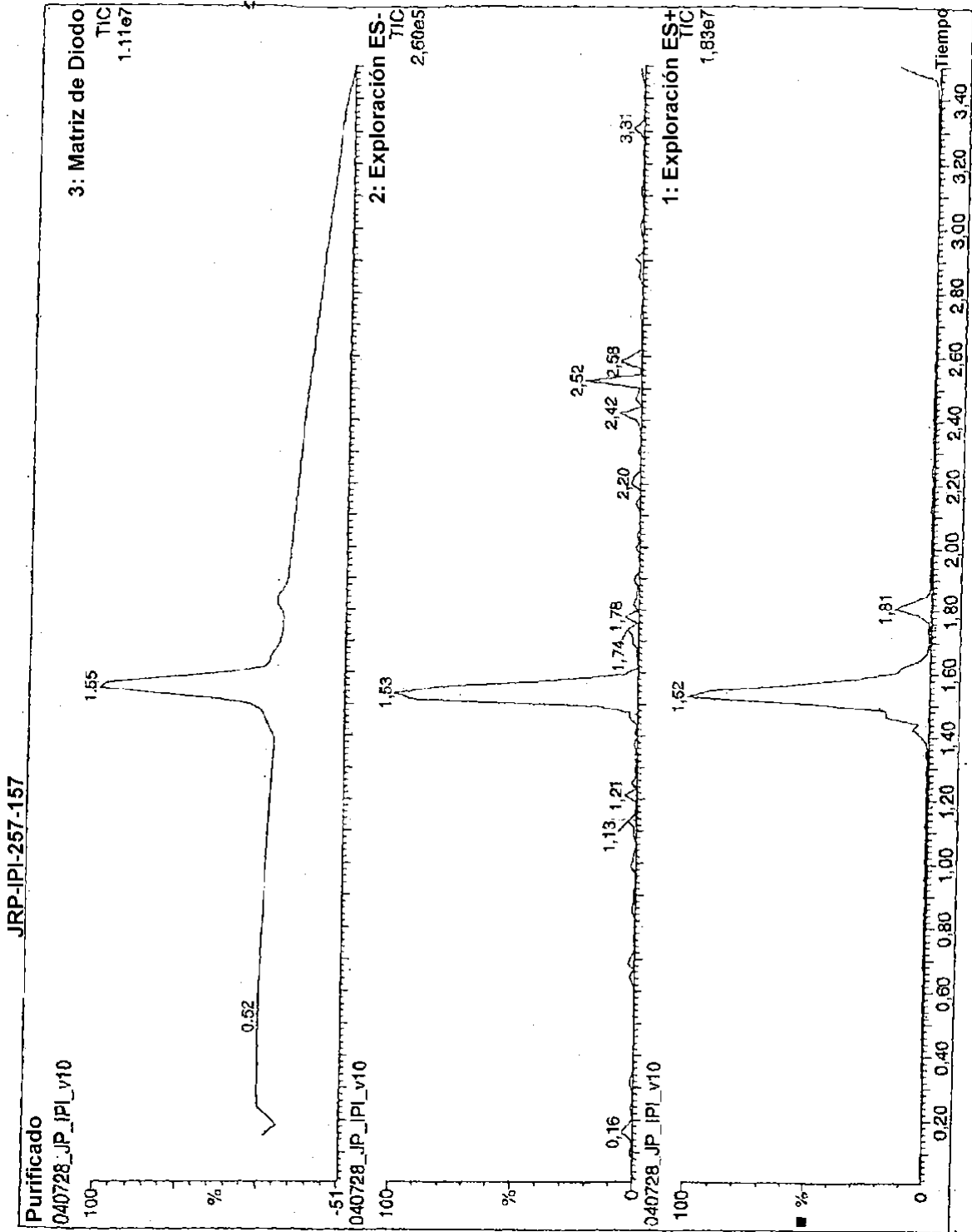


Figura 59

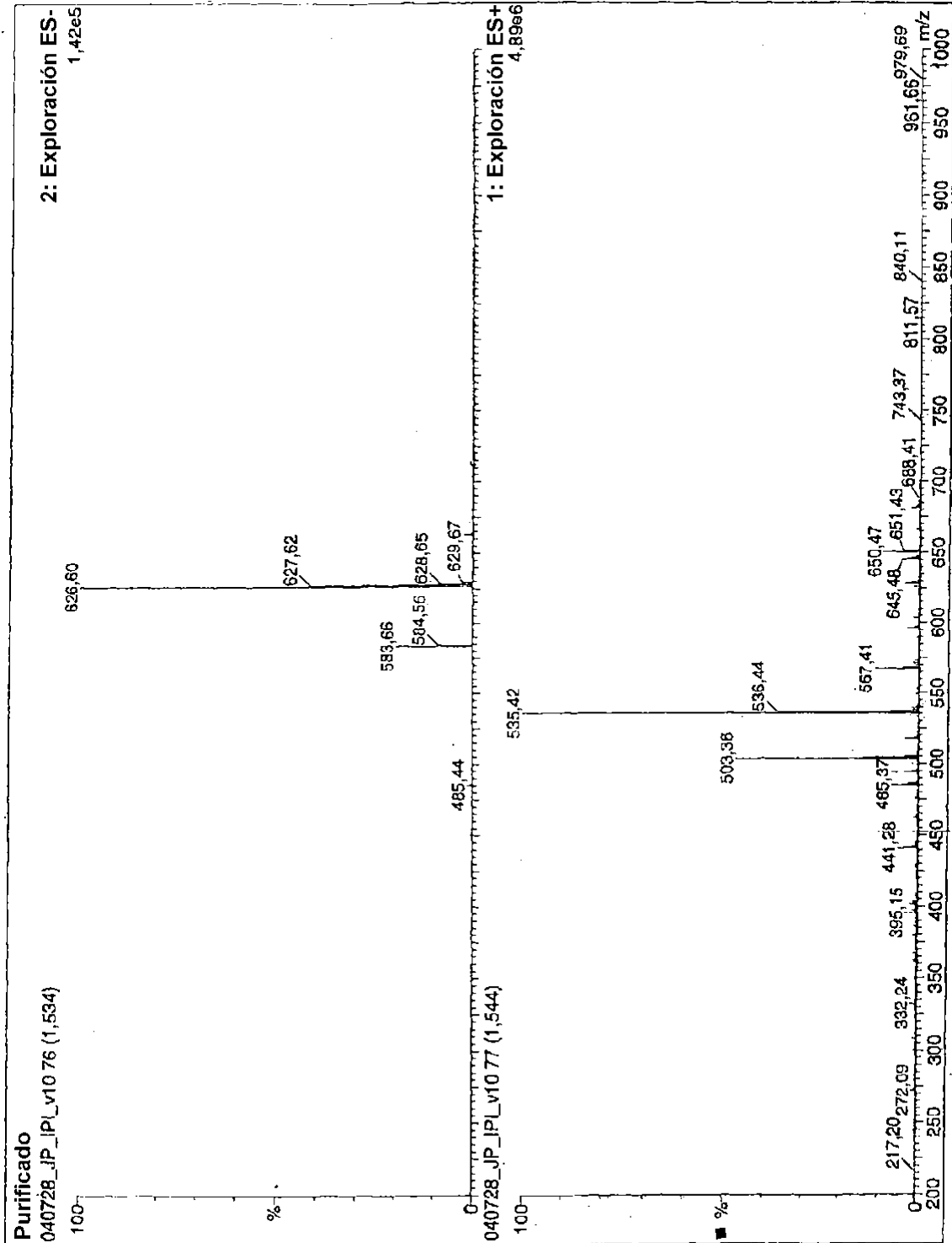


Figura 60



Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE 040604006
 N° EXP. 10
 N° PROC. 1
 F2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha, 20040604
 Hora, 13.41
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm BBO BB-3K
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 DISOLVENTE CDCl3
 NS 64
 DS 2
 SWE 3278.146 Hz
 FIDRES 0.126514 Hz
 AQ 3.5564243 s
 RG 162
 EW 60.400 us
 ER 6.000 uc
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 s
 CANAL H1
 NUCL1 1H
 PL 9.00 us
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz
 F2 - Parámetros de procesado
 SI 32758
 SF 400.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

040604006 / GY-IP1257-154P (17-AG-Hydroq-HCl)
 PROTON CDCl3 d:/ SamTrack 37
 DMSO-d6 / CDCl3 (1:6)

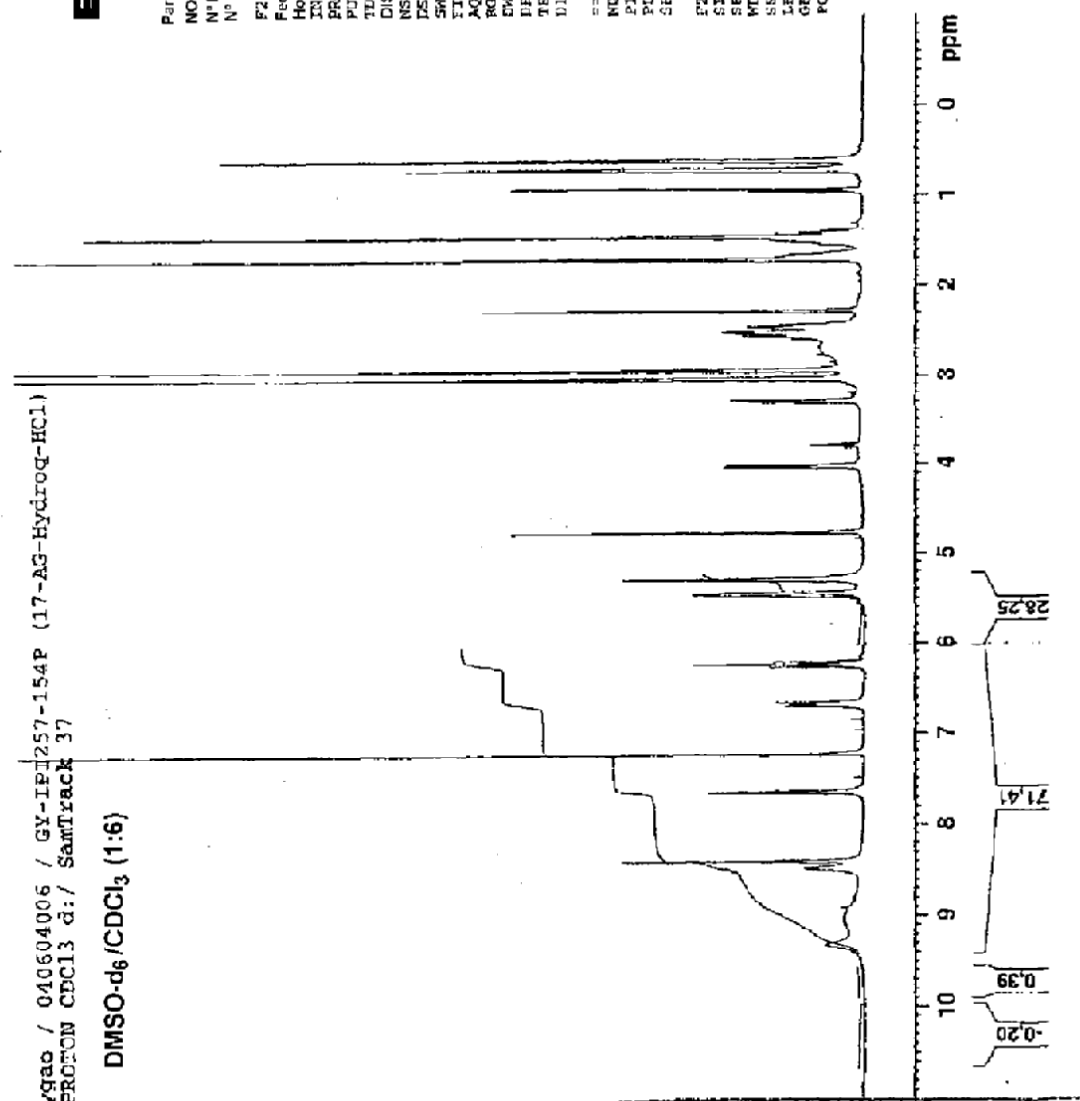


Figura 61

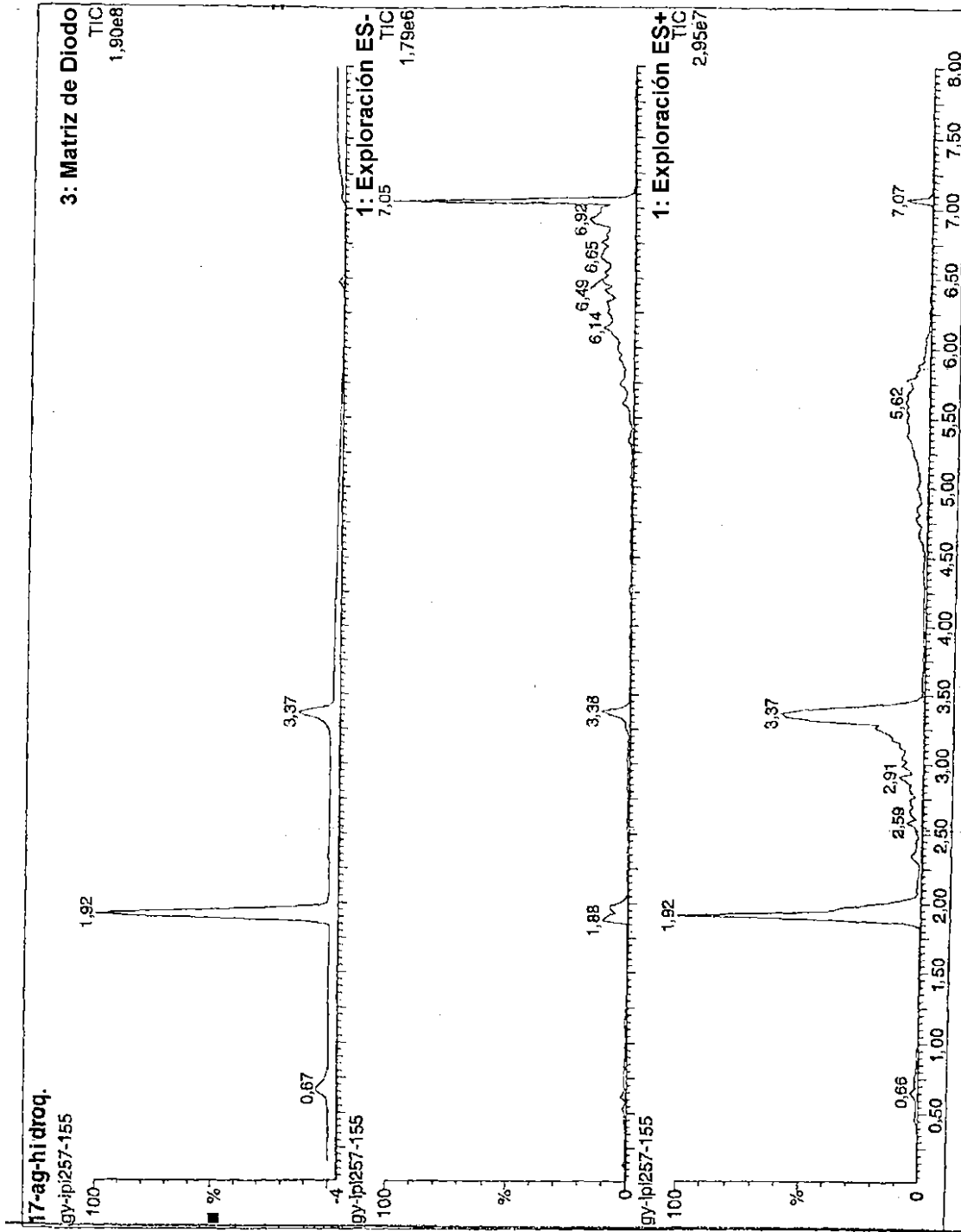


Figura 62

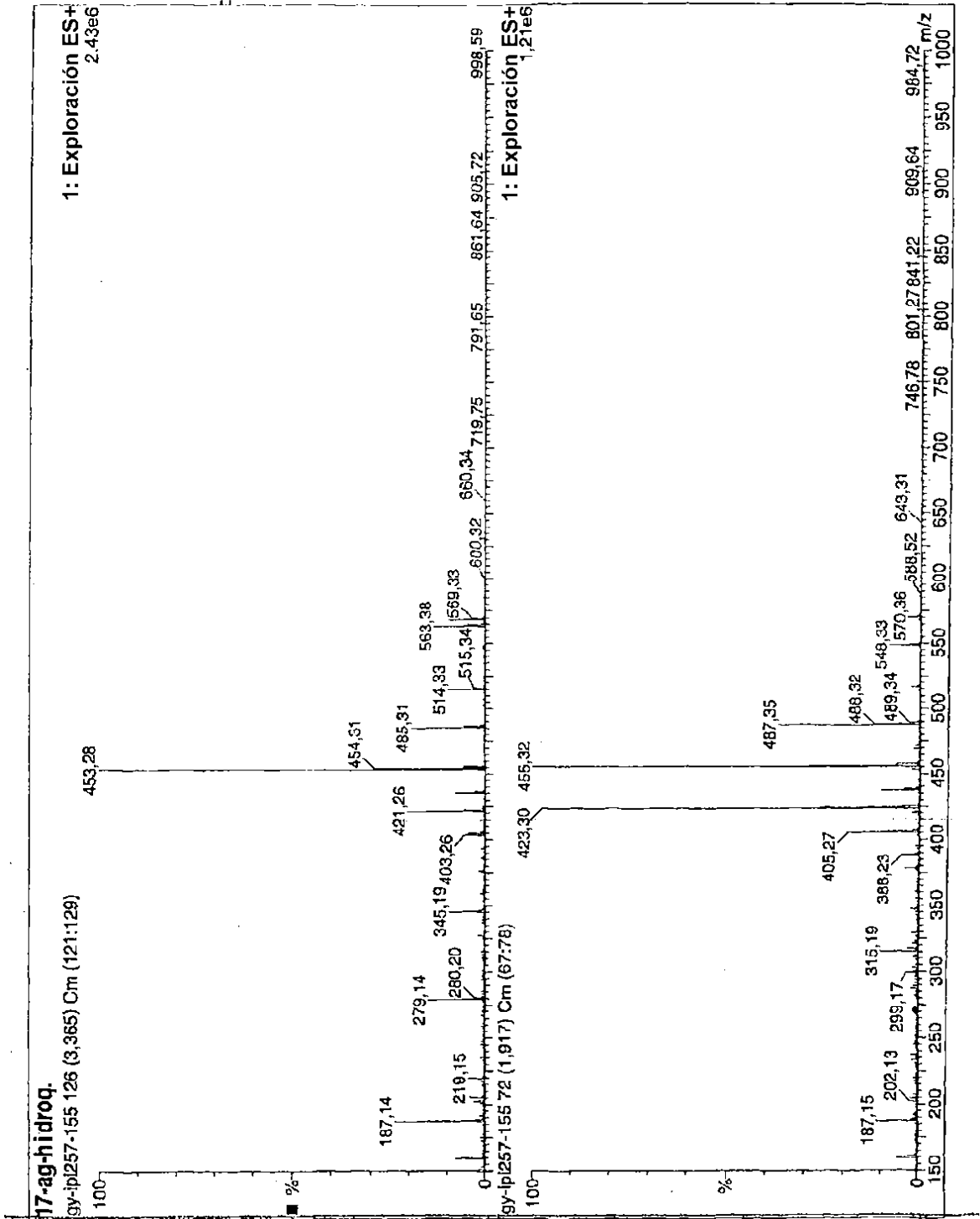


Figura 63



Parámetros de Datos Actuales
 NOMBRE jp-30478-1
 N° EXP. 10
 N° PROC. 1

P2 - Parámetros de Adquisición
 Fecha_ 20040905
 Hora 14.30
 INSTRUM spect
 PROBR 5 mm BBO BB-1R
 PULPROG zg30
 TD 65536
 DISOLVENTE CDCl3
 NS 32
 DS 2
 SVR 8276.146 HZ
 FIDRES 0.136314 HZ
 AQ 1.9584243 s
 RG 181
 DM 60.400 us
 DE 5.00 us
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 s

===== CANAL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 9.00 us
 PL1 -2.00 dB
 FFA 400.1334710 MHz

Parámetros de procesamiento
 SI 32769
 SF 400.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 HZ
 GB 0
 PC 1.00

iporter / jp-30478-1 / JRP-IPI-257-198
 PROTON CDCl3 d:/ Samtrack 74

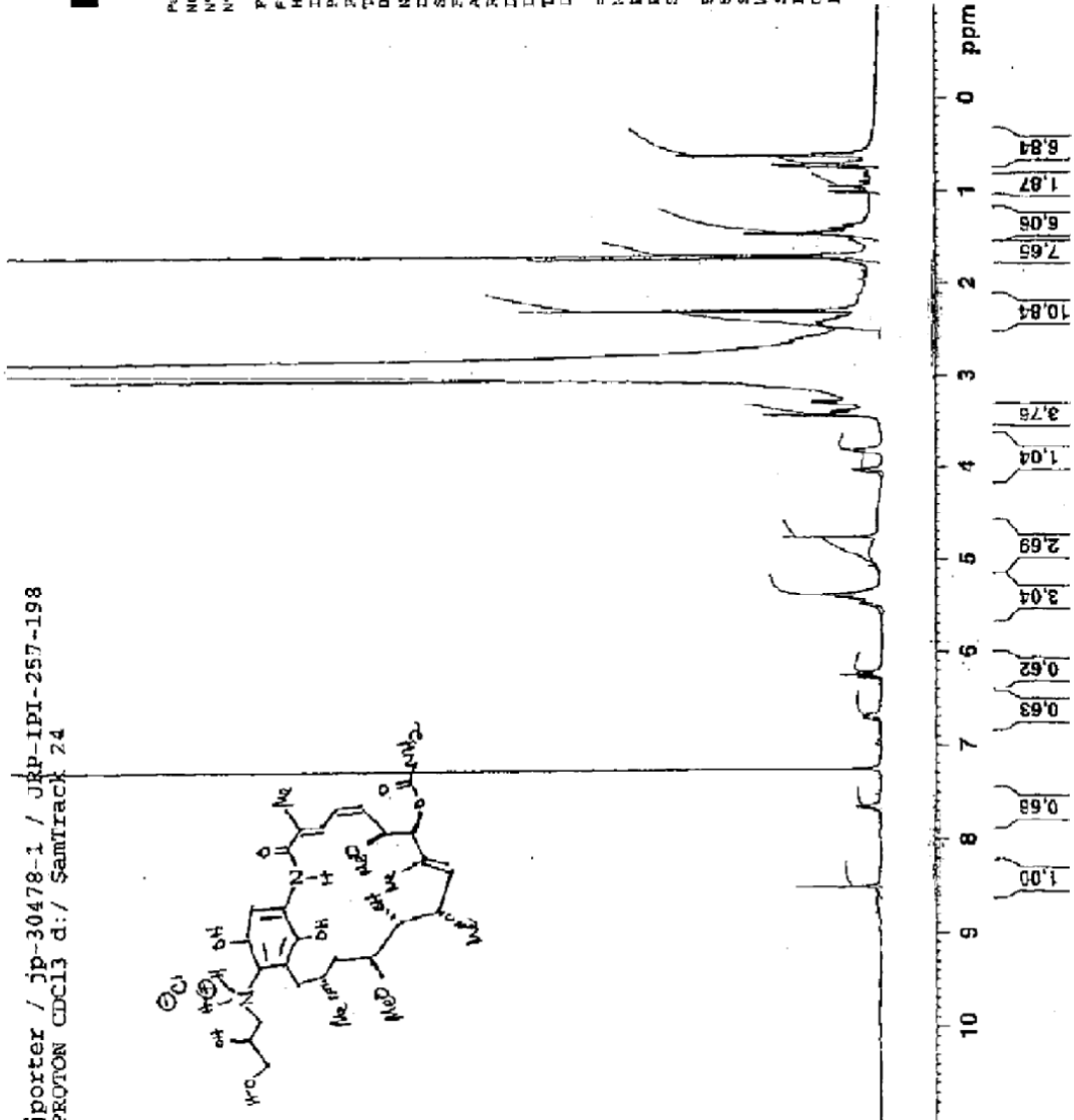
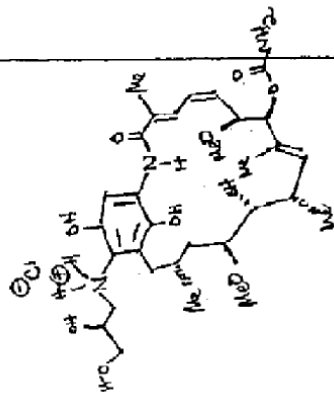


Figura 64

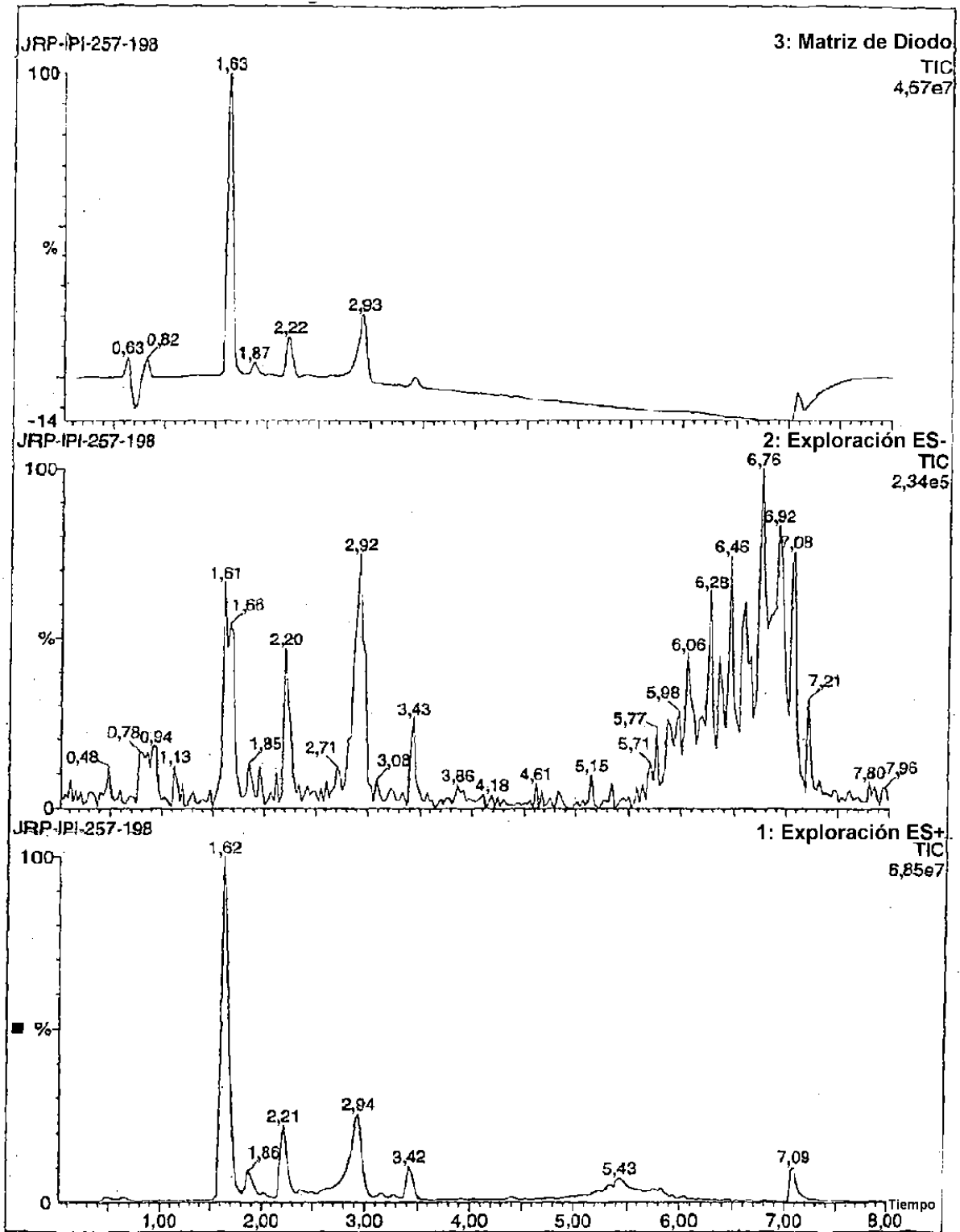


Figura 65

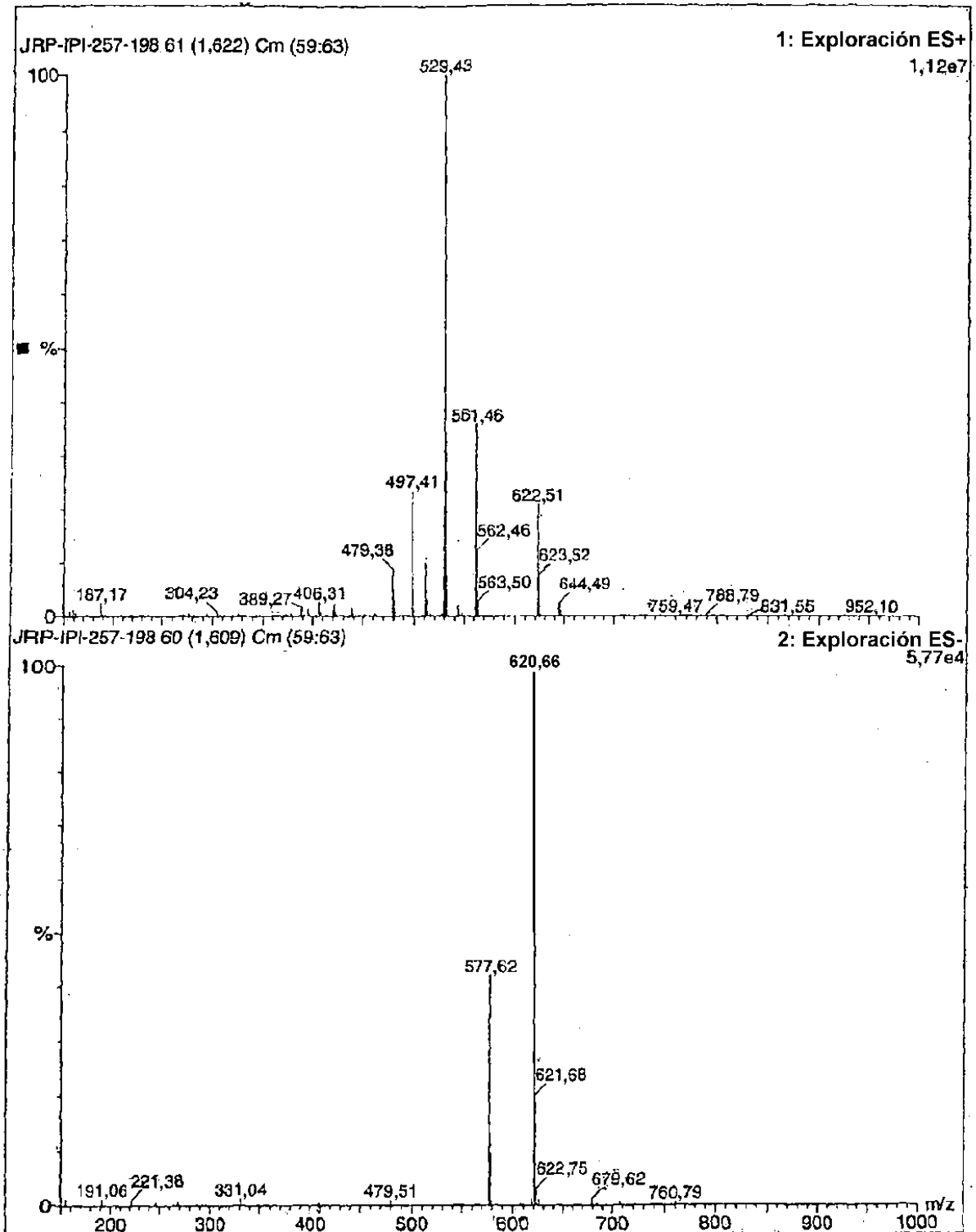


Figura 66

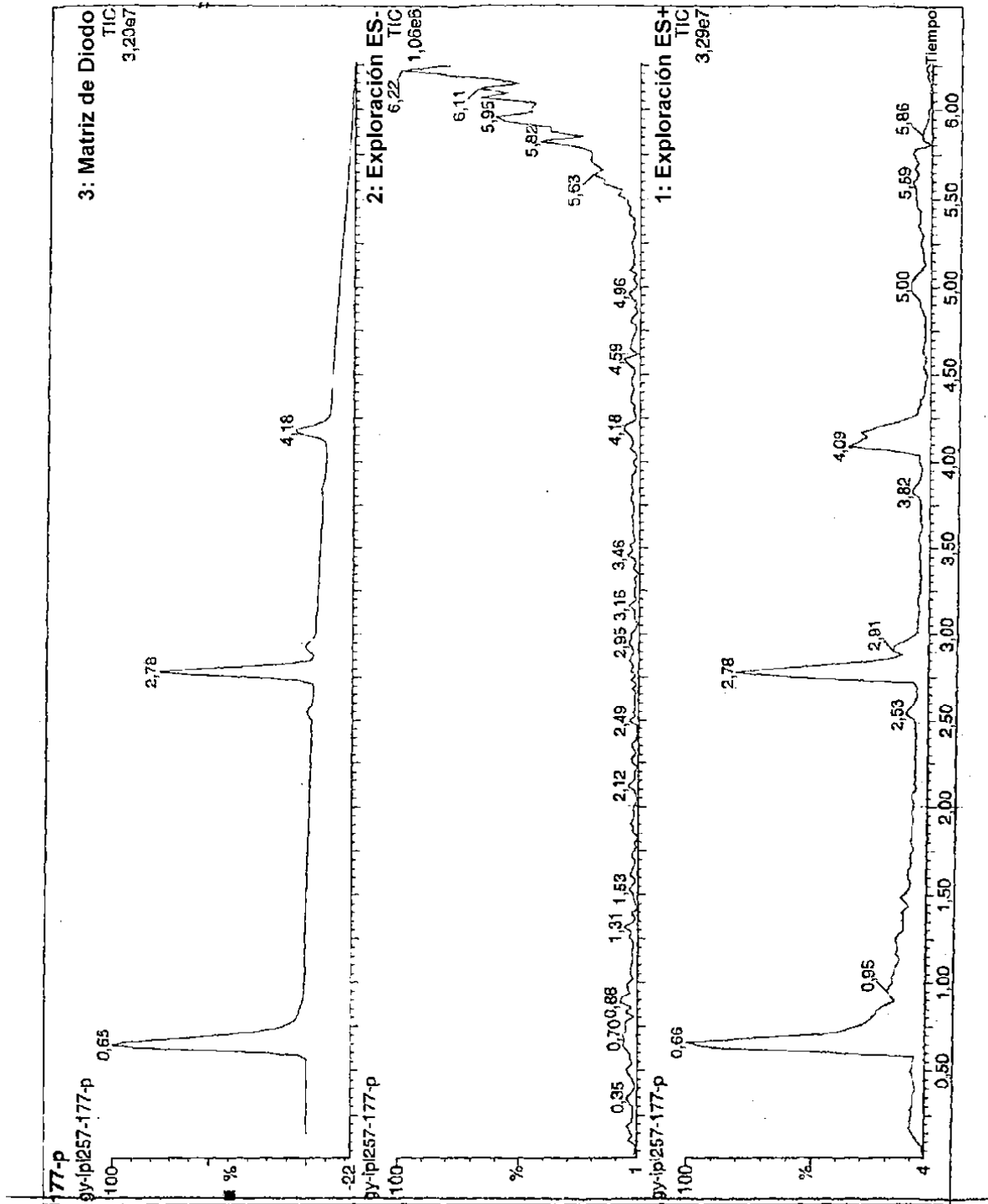


Figura 68

JRP-IP1-257-200 (sal de HBr)

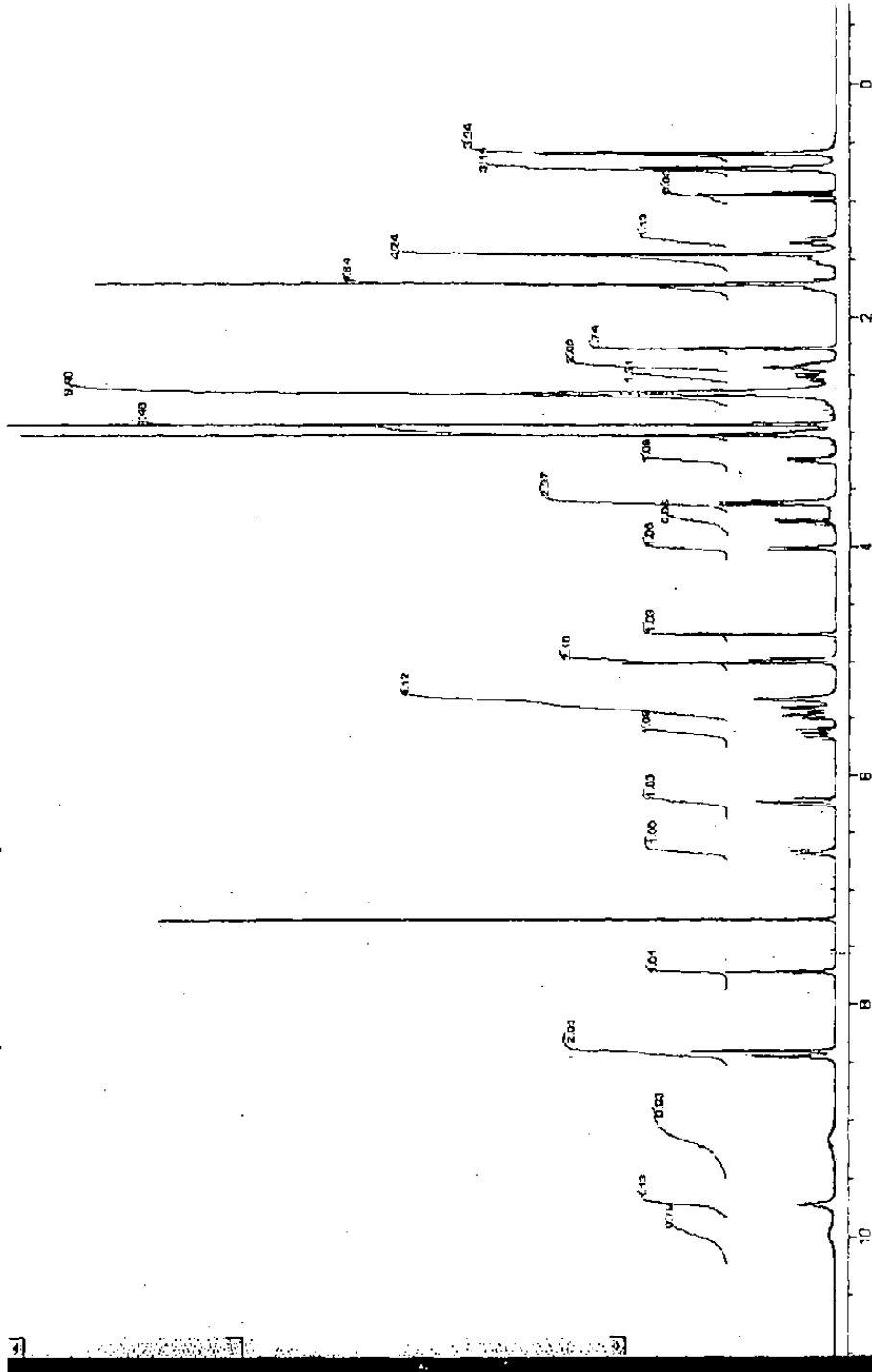
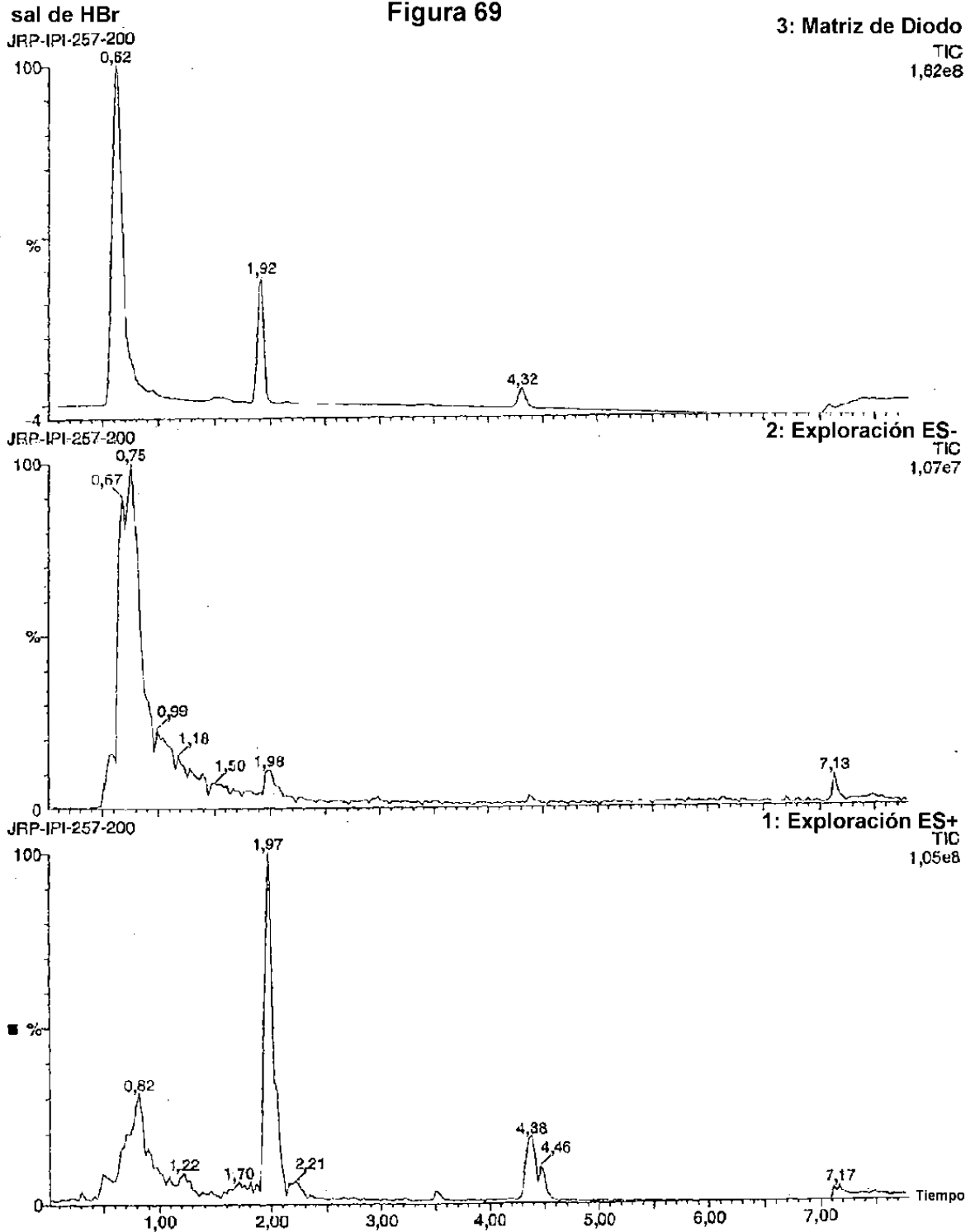


Figura 69



sal de HBr

JRP-IP1-257-200 74 (1,971) Cm (72:77)

1: Exploración ES+

8,96e6

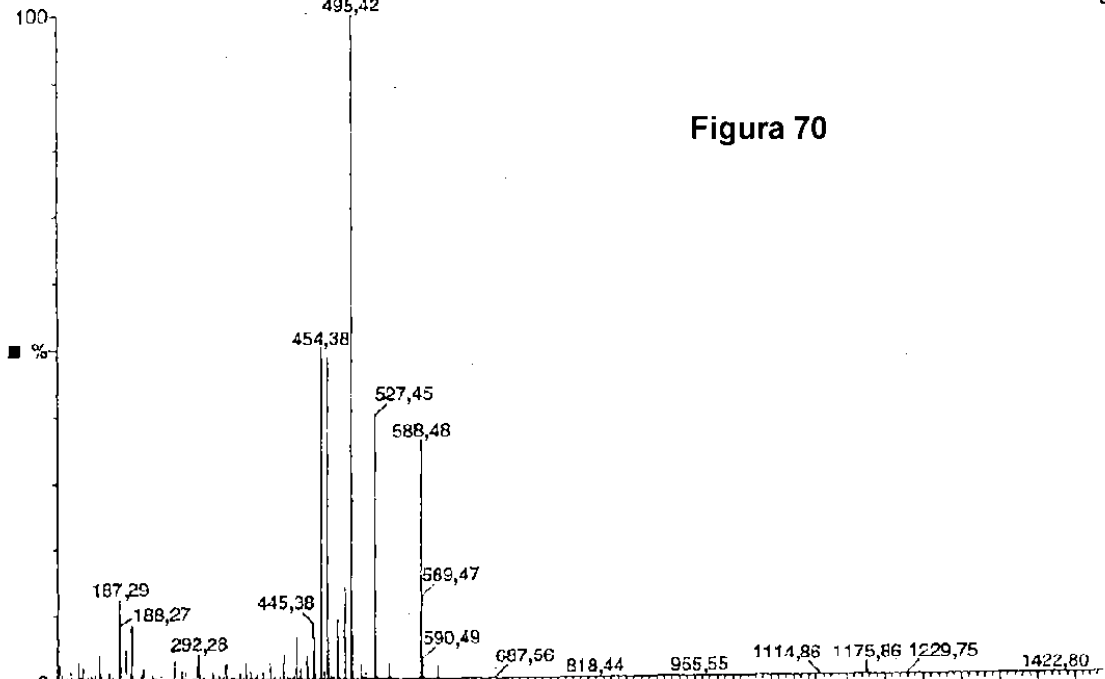


Figura 70

JRP-IP1-257-200 31 (0,818) Cm (28:33)

1: Exploración ES+

7,02e6

