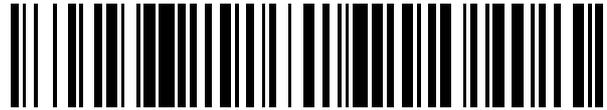


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 296**

51 Int. Cl.:

C07D 417/06 (2006.01)

C07D 413/06 (2006.01)

C07D 405/06 (2006.01)

A61K 31/427 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2003 E 09012671 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2135867**

54 Título: **Trans-9,10-dehidroepotilona C y trans-9,10-dehidroepotilona D, sus análogos y procedimientos de fabricación de las mismas**

30 Prioridad:

07.11.2002 US 425352 P
27.05.2003 US 473743

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2013

73 Titular/es:

KOSAN BIOSCIENCES INCORPORATED (100.0%)
3832 BAY CENTER PLACE
HAYWARD, CA 94545, US

72 Inventor/es:

LI, YONG;
SUNDERMANN, KURT;
TANG, LI y
MYLES, DAVID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 296 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

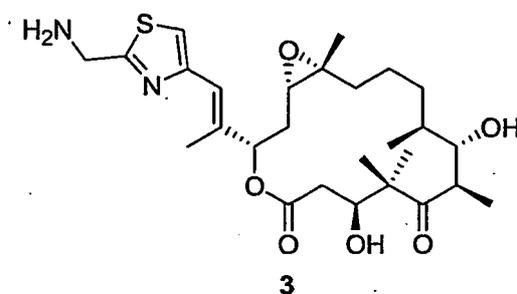
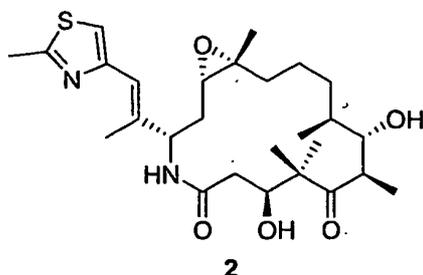
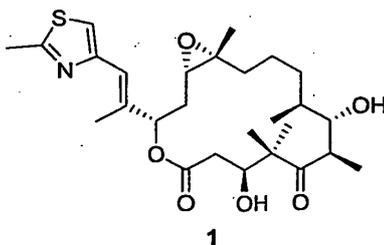
Trans-9,10-dehidroepotilona C y trans-9,10-dehidroepotilona D, sus análogos y procedimientos de fabricación de las mismas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.

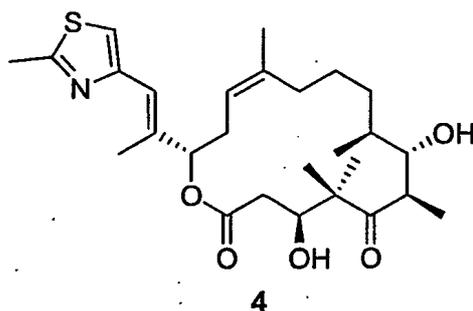
Antecedentes de la invención

10 La clase de policétidos conocidos como epotilonas ha surgido como fuente de compuestos potencialmente terapéuticos que tienen modos de acción similares al paclitaxel (Bollag y col., *Cancer Res.* 55:2325-2333 (1995); Service, *Science* 274 (5295):2009 (1996); Cowden y Paterson, *Nature* 387(6630):238-9 (1997)). El interés en las epotilonas y análogos de las epotilonas ha crecido con las observaciones de que ciertas epotilonas son activas contra tumores que han desarrollado resistencia a paclitaxel, así como menor potencial para producir efectos indeseados (Muhlradt y Sasse *Cancer Res.* 57(16): 3344-6 (1997)). Entre las epotilonas y análogos de epotilonas en las que se está investigando su eficacia terapéutica se encuentran la epotilona B **1** y los análogos semisintéticos de la epotilona B, BMS-247550 **2**, también conocida como "azaepotilona B" (Colevas y col., *Oncology (Huntingt).* 15(9):1168-9, 1172-5 (2001); Lee y col., *Clin Cancer Res.* 7(5):1429-37 (2001); McDaid y col., *Clin Cancer Res.* 8(7):2035-43 (2002); Yamaguchi y col., *Cancer Res.* 62(2):466-71 (2002)), y BMS-310705 **3**.



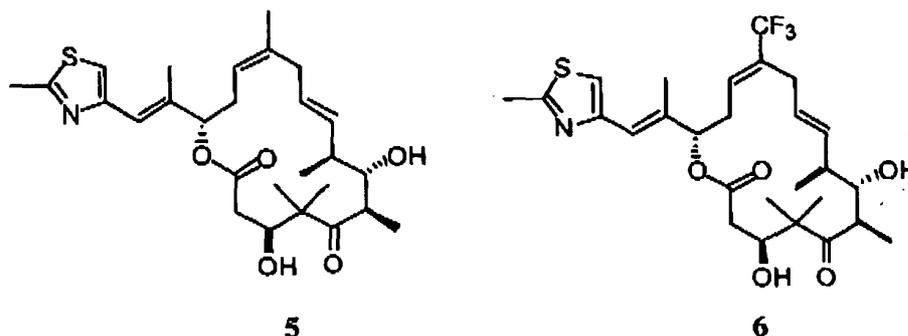
20

La desoxiepotilona B **4**, también conocida como "epotilona D", es otro derivado de epotilona que tiene prometedoras propiedades antitumorales frente a paclitaxel en el que se está investigando su eficacia terapéutica. Este compuesto también ha demostrado menor toxicidad que las epotilonas que tienen 12,13-epóxidos, tales como epotilona B o BMS-247550, probablemente debido a la falta del resto epóxido altamente reactivo.



La producción de análogos de la 9-oxo-epotilona, incluidos la 9-oxo-epotilona D y sus análogos, usando vías químicas y biotecnológicas, se ha divulgado recientemente en la publicación de solicitud PCT internacional N° WO 01/83800, publicada el 8 de noviembre de 2001.

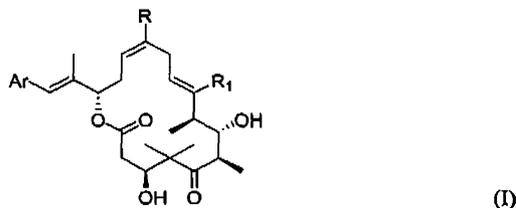
- 5 Recientemente se ha comunicado la síntesis y la evaluación preliminar de la *trans*-9,10-dehidroepotilona D (5) y la 26-trifluoro-*trans*-9,10-dehidroepotilona D (6) (Rivkin y col., J. Am. Chem. Soc. 2003,125: 2899-2901. Se ha descubierto que un informe anterior de la preparación de 5 es erróneo (White y col., J. Am. Chem. Soc. 2001, 123:5407-13; White y col., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125: 3190). Aunque estos compuestos muestran una prometedora actividad, su preparación mediante síntesis química total es larga y cara y se necesitan mejores procedimientos para su preparación.
- 10



Aunque se han descrito en la técnica varios análogos de epotilona que tienen actividad anti-tumoral, existe un interés continuo en análogos nuevos que tengan actividades estabilizantes de microtúbulos que exhiban menos efectos secundarios que el paclitaxel o las epotilonas A y B.

15 Sumario de la invención

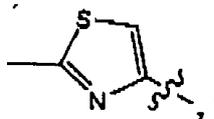
En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos nuevos que tienen actividades estabilizantes de microtúbulos y útiles en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades caracterizadas por hiperproliferación celular de la fórmula (I) siguiente:



- 20 en la que R es H, alquilo C₁-C₄ o alquilo C₁-C₄ sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, hidroxilo, amino y azido;

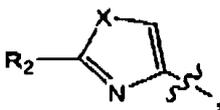
- R₁ es H, alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄, en el que el alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄ están sustituidos o no sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, hidroxilo, amino y azido; y Ar es tiazolilo, imidazolilo, piridilo, benzotiazolilo, oxadiazolilo o benzotriazolilo, y está no sustituido o está monosustituido o disustituido con sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, halo, ciano, oxo, =N-alquilo C₁-₄, =N-alcoxi C₁-₄, amino, alquilamino, dialquilamino, acilaminoalquilo, alcoxi, tioalcoxi, alquilo C₁-₄.
- 25

C₄, cicloalquilo o haloalquilo; con la condición de que cuando R es metilo o trifluorometilo y Ar es



entonces R₁ no es H.

En algunas realizaciones de la invención, Ar es



5

en la que X es S y R₂ es H o alquilo C₁-C₄ sustituido o no sustituido.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona composiciones que comprenden una cantidad de un compuesto de la invención eficaz para inhibir la hiperproliferación celular y/o interrumpir la actividad de la tubulina en un sujeto humano o animal cuando se administra al mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y compuestos de la invención para su uso en procedimientos para inhibir la hiperproliferación celular y/o interrumpir la actividad de la tubulina en un sujeto humano o animal, que comprende administrar al sujeto humano o animal una cantidad inhibidora de la hiperproliferación celular o interruptora de la actividad de la tubulina de un compuesto o composición de la invención.

10

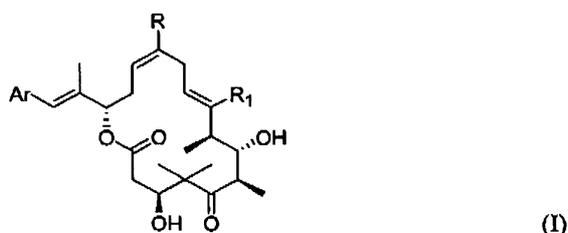
Descripción detallada de las realizaciones preferentes

En la actualidad, sorprendentemente, se ha descubierto que la actividad de la tubulina se puede interrumpir *in vitro* o *in vivo* mediante ciertos derivados a base de trans-9,10-dehidroepitilona C y trans-9,10-dehidro-epitilona D. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona nuevos compuestos y composiciones que son útiles en procedimientos de inhibición de la hiperproliferación celular y/o de estabilización de los microtúbulos *in vitro* y de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas *in vivo*.

15

Un aspecto, la presente invención proporciona compuestos nuevos de la siguiente fórmula (I):

20



(I)

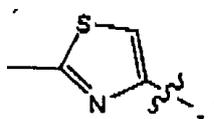
en la que R es H, alquilo inferior C₁-C₄ o alquilo inferior C₁-C₄ sustituido con uno o más grupos seleccionados de forma independiente de halo, hidroxilo, amino y azido;

en la que R es H, alquilo C₁-C₄ o alquilo C₁-C₄ sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, hidroxilo, amino y azido;

25

R₁ es H, alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄, en el que el alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄ están sustituidos o no sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, hidroxilo, amino y azido; y Ar es tiazolilo, imidazolilo, piridilo, benzotiazolilo, oxadiazolilo o benzotriazolilo, y está no sustituido o está monosustituido o disustituido con sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, halo, ciano, oxo, =N-alquilo C₁-4, =N-alcoxi C₁-4, amino, alquilamino, dialquilamino, acilaminoalquilo, alcoxi, tioalcoxi, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo o haloalquilo; con la condición de que cuando R es metilo o trifluorometilo y Ar es

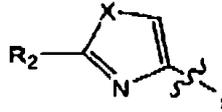
30



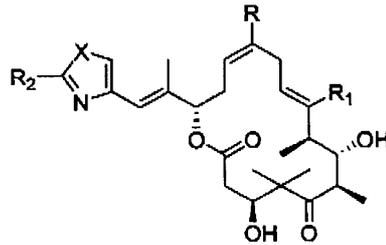
entonces R₁ no es H.

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunas realizaciones de la invención Ar es

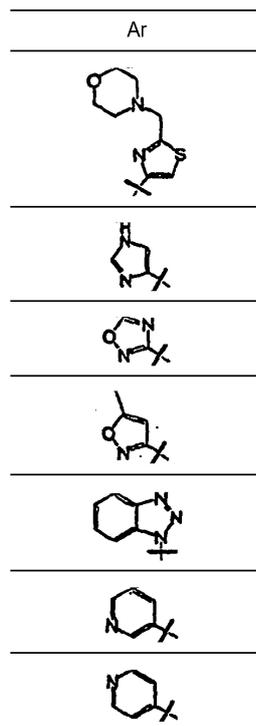


que forma compuestos de la estructura (II) siguiente:



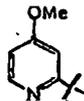
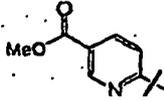
(II)

- 5 en la que X es S y R₂ es H o alquilo C₁-C₄ sustituido o no sustituido, siempre que cuando R sea metilo o trifluorometilo, X sea S y R₂ sea metilo, R₁ no sea H. En ciertas realizaciones, R₂ es metilo sustituido. En realizaciones concretas, R₂ es hidroximetilo, aminometilo, alquilaminometilo, dialquilaminometilo, azidometilo o fluorometilo.
- 10 En una realización de la invención, se proporcionan compuestos de fórmula (I) en la que Ar es 2-piridilo sustituido o no sustituido.
- En una realización de la invención, se proporcionan compuestos de fórmula (I) en la que R es metilo o trifluorometilo.
- En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos de fórmula (I) en la que R₁ es H o alquilo C₁-C₄ sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, hidroxilo y azido.
- 15 En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos de fórmula (I) en la que R es CH₃ y R₁ es H y Ar es

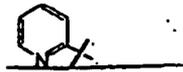


(continuación)

Ar

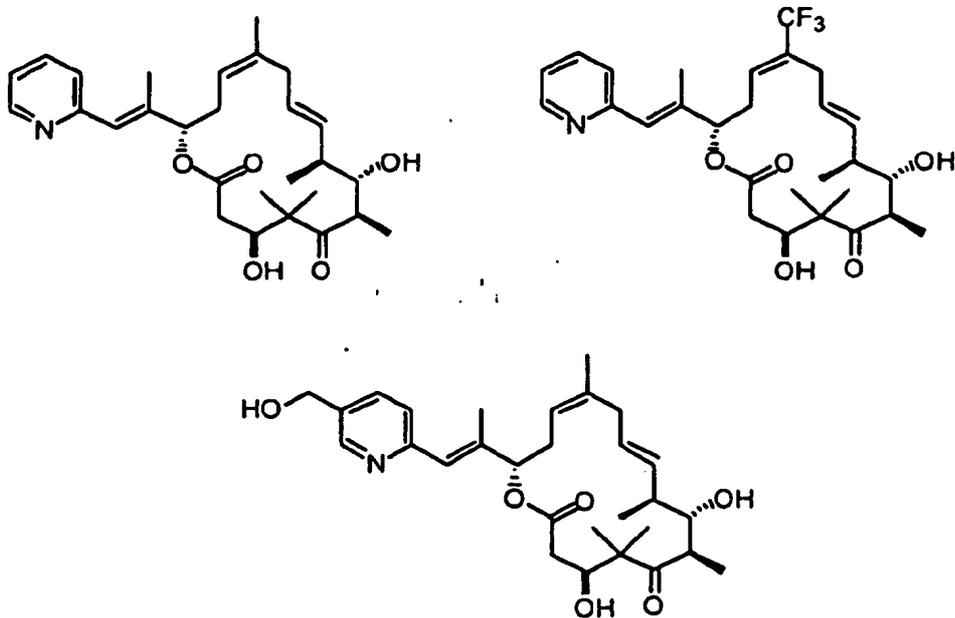


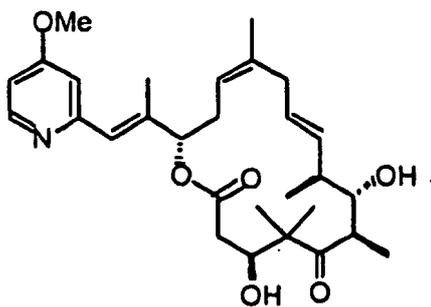
o R₁ es H, R es CF₃ y Ar es



5

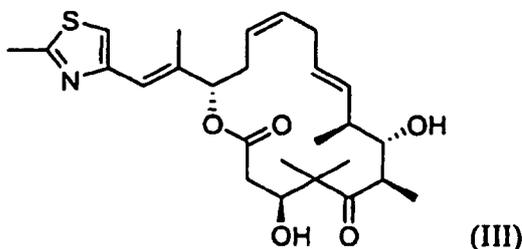
En otras realizaciones, la invención proporciona compuestos de fórmula (I) que tienen las estructuras:





..

En otra realización de la invención, se proporciona *trans*-9, 10-dehidroepotilona C (el compuesto de la estructura (II) en la que X es S, R es H y R1 es H) tal como se muestra en la estructura (III):



5 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden una cantidad de un compuesto de fórmulas (I), (II) o (III) eficaces en la inhibición de la hiperproliferación celular y/o la interrupción de la actividad de la tubulina en un sujeto humano o animal cuando se administra al mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En otras realizaciones más, la invención proporciona compuestos de la invención para su uso en procedimientos para inhibir la hiperproliferación celular y/o interrumpir la actividad de la tubulina en un sujeto humano o animal, que comprende administrar al sujeto humano o animal una cantidad de interrupción de la actividad de la tubulina de un compuesto de fórmulas (I), (II) o (III).

15 La presente invención también proporciona compuestos de la invención para su uso en procedimientos de tratamiento de sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad hiperproliferativa, tal como cáncer, que comprenden administrar al sujeto humano o animal una cantidad de interrupción de la actividad de la tubulina de un compuesto de fórmulas (I), (II) o (III), bien solo o bien en combinación con otros agentes terapéuticos activos.

En otra realización más, la presente invención proporciona además el uso de compuestos de fórmulas (I), (II) o (III), tal como se han descrito anteriormente, para su uso como productos farmacéuticos, así como procedimientos de uso de esos compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

20 Otras realizaciones de la invención incluyen endoprótesis vasculares recubiertas con un compuesto o composición de la invención y procedimientos para tratar enfermedades cardiovasculares usando dichas endoprótesis vasculares recubiertas.

En otras realizaciones más, la presente invención proporciona nuevos procedimientos para fabricar compuestos de fórmulas (I), (II) o (III), tal como se describe con detalle más adelante en el presente documento.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos siguientes tienen los significados que se definen a continuación:

“Alquilo inferior” tal como se usa en el presente documento se refiere a grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que comprenden de uno a diez átomos de carbono, preferentemente uno a seis átomos de carbono e incluso más preferentemente uno a cuatro átomos de carbono (alquilo C₁-C₄).

30 “Alquenilo inferior” tal como se usa en el presente documento se refiere a radicales de cadena lineal, ramificada o cíclicos que tienen uno o más dobles enlaces y de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente 2 a 6 átomos de carbono e incluso más preferentemente 2 a 4 átomos de carbono (alquenilo C₂-C₄).

"Alquinilo inferior" tal como se usa en el presente documento se refiere a radicales de cadena lineal, ramificada o cíclicos que tienen uno o más triples enlaces y de 2 a 10 átomos de carbono, preferentemente 2 a 6 átomos de carbono e incluso más preferentemente 2 a 4 átomos de carbono (alquinilo C₂-C₄).

5 Los restos alquilo inferior, alqueno inferior o alquinilo inferior, tal como se definen en el presente documento, pueden estar sustituidos o no sustituidos. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, la frase "alquilo inferior, alqueno inferior o alquinilo inferior sustituido o no sustituido" significa que cualquiera de estos restos puede estar no sustituido o puede estar sustituido, por ejemplo con uno o más grupos halógeno, hidroxilo, amino, azido u otros grupos, incluidos, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, neopentilo, trifluorometilo, hidroximetilo, aminometilo, azidometilo, pentafluoroetilo y similares.

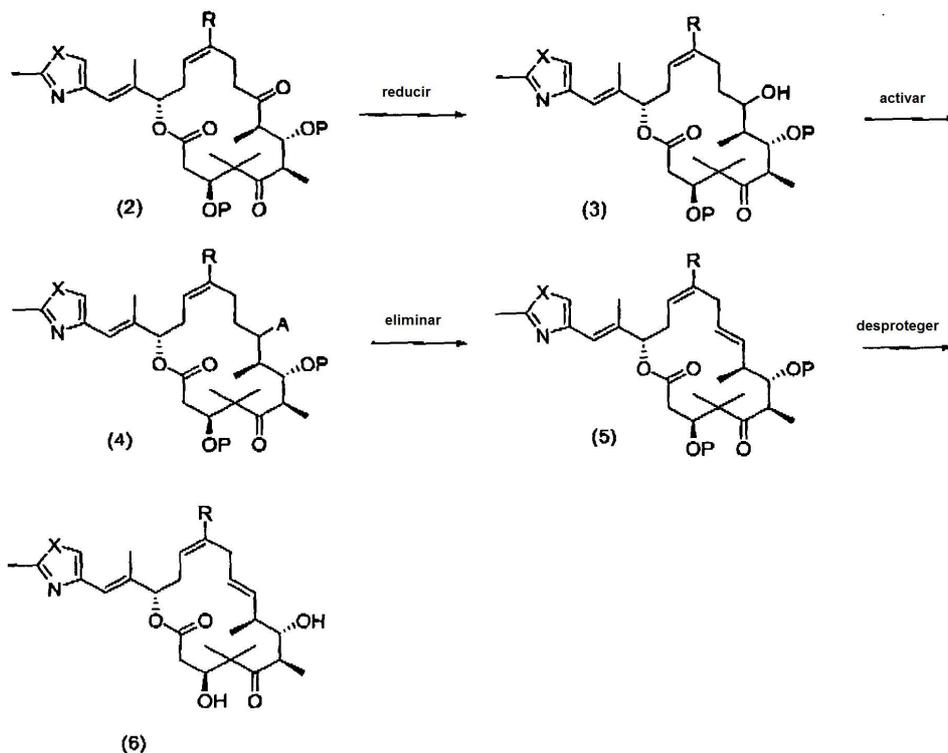
10 Las "sales farmacéuticamente aceptables" útiles en la práctica de la presente invención se pueden usar en forma de sales derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos. Estas sales incluyen, pero sin limitación, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, ciclopentano propionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxiitanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, sulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Asimismo, los grupos básicos que contienen nitrógeno se puede cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruro, bromuro y yoduro de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga, tal como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. De este modo se obtienen productos dispersables o solubles en agua o en aceite.

25 Ejemplos de ácidos que se pueden usar para formar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Se pueden preparar in situ sales de adición básicas durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de fórmula (I) o, por separado, haciendo reaccionar restos de ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco, o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero sin limitación, cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y similares, así como cationes de amonio no tóxico, amonio cuaternario y de amina, incluidos, entre otros, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperacina y similares.

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos para sintetizar los compuestos de estructuras (II) o (III), en las que X es S, a partir de 9-oxo-epotilonas C o D. Las 9-oxo-epotilonas C o D pueden obtenerse fácilmente tal y como se ha descrito en la publicación de solicitud internacional PCT N° WO 01/83800, publicada el 8 de noviembre de 2001. En general, la 9-oxo-epotilona D se produce en células huésped recombinantes del suborden *Cystobacterineae* que contiene un vector de expresión recombinante que codifica el gen de una poliketido sintasa (PKS). Como se ha descrito en el documento WO 01/83800, la inactivación del dominio KR del módulo extensor 6 de la PKS epotilona tiene como resultado una PKS capaz de producir las 9-oxo-epotilonas. Una cepa en la que el dominio KR del módulo extensor 6 se ha desactivado se ha denominado K39-164 y se ha depositado en la colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU., el 21 de noviembre de 2000, bajo los términos del tratado de Budapest y está disponible con el número de registro PTA-2716. La cepa K39-164 produce 9-oxo-epotilona D como producto principal y 9-oxo-epotilona C como producto secundario.

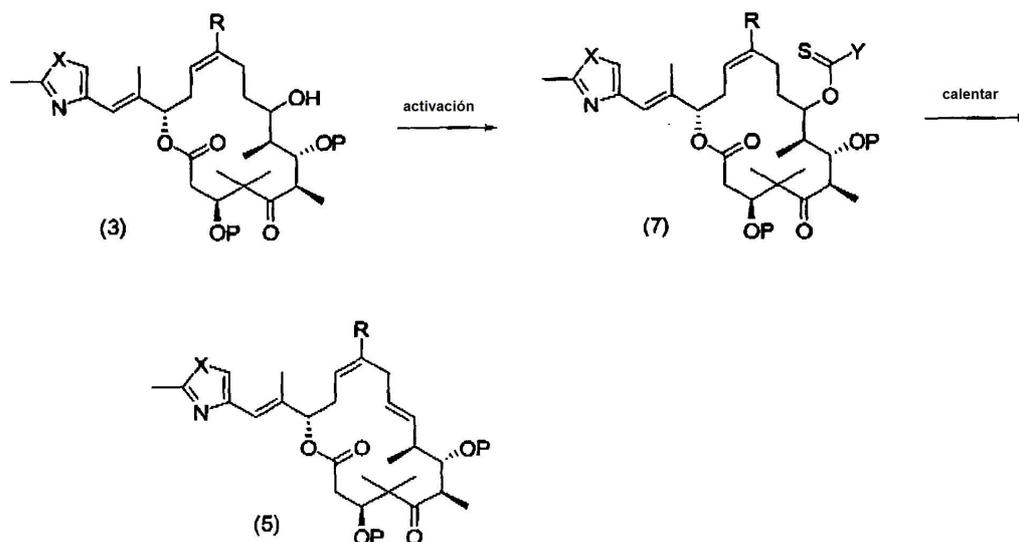
45 Con referencia al esquema de reacción 1, más adelante, los compuestos de la presente invención se pueden obtener mediante cetorreducción y eliminación, tal como mediante la protección de los grupos hidroxilo libres con un grupo protector adecuado, tal como, por ejemplo, un grupo trietilsililo, un grupo butildimetilsililo, un grupo 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo o similares; la reducción del grupo 9-oxo para obtener el correspondiente compuesto intermedio 9-hidroxilo, la activación del compuesto 9-hidroxilo tal como con anhídrido trifluoroacético, cloruro de metanosulfonilo o anhídrido trifluorometanosulfónico en presencia de una base adecuada, por ejemplo bis(trimetilsilil)amida sódica o una base de amina, tal como piridina o 4-(dimetilaminopiridino) en tetrahidrofurano ("THF") u otro disolvente adecuado para obtener el correspondiente compuesto intermedio de trifluoroacetilo, metanosulfonato o trifluorometanosulfonato; la eliminación del grupo activador para obtener la 9,10-dehidroepotilona protegida correspondiente mediante reacción con una base adecuada, por ejemplo bis(trimetilsililamida) sódica, diisopropilamida de litio o 4-(dimetilaminopiridina); y, después, desproteger el intermedio protegido para obtener la 9,10-dehidroepotilona deseada. Ejemplos representativos que utilizan esta ruta de síntesis se exponen más adelante en el presente documento en los ejemplos 1-21.

Ruta de síntesis 1: Cetorreducción y eliminación (X= S)



5 Con referencia al esquema de reacción 2, más adelante, también se pueden obtener los compuestos mediante
 10 eliminación pirolítica, tal como mediante activación de la 9-oxo-epitilona bis(protegida) con una base, tal como
 bis(trimetilsilil)amida sódica, disulfuro de carbono y yoduro de metilo de modo que se forma el éster de metilxantato, o
 con cloruro de dimetiltiocarbamilo de modo que se forma el tiocarbamato y, después, calentando el intermedio
 activado a una temperatura suficiente, tal como a aproximadamente 170 °C, durante tiempo suficiente para eliminar el
 grupo activador y obtener el correspondiente compuesto de 9,10-dehidroepitilona protegido y, después, desproteger el
 intermedio protegido para obtener la 9,10-dehidroepitilona deseada. Se pueden determinar temperaturas y tiempos
 adecuados usando procedimientos familiares para los expertos en las técnicas de química orgánica. Ejemplos
 representativos que utilizan esta ruta de síntesis se exponen más adelante en el presente documento en los ejemplos
 1-4 y 22-25.

Ruta de síntesis 2: Eliminación pirolítica (X= S)



15 Con referencia al esquema de reacción 4, más adelante, los compuestos de la presente invención también se pueden

preparar a partir de 9-oxo-epotilonas usando compuestos intermedios de anillo abierto. En una realización de la invención, una forma 3,7-protegida de la epotilona (2) se hace reaccionar con un agente reductor, por ejemplo hidruro de di(isobutil)aluminio (DiBA1-H) en condiciones en las que la lactonacarbonilo se reduce de forma selectiva. Los grupos alcohol en el intermedio (11) de anillo abierto resultante están protegidos mediante, por ejemplo, sililación usando un clorotrialkilsilano o triflato de trialkilsililo en presencia de una base tal como imidazol o 2,6-lutidina, para proporcionar el compuesto intermedio (12). En otra realización de la invención, una forma 3,7-protegida de la epotilona se hace reaccionar con un agente reductor, por ejemplo hidruro de di(isobutil)aluminio (DiBA1-H) en condiciones en las que la lactonacarbonilo y el grupo 9-oxo se reducen para proporcionar el intermedio. Los grupos 1- y 15-OH están protegidos de forma selectiva, por ejemplo como sus terc-butildimetilsililéteres mediante la reacción con su cloruro de terc-butildimetilsililo e imidazol, para proporcionar el compuesto intermedio (13). El 9-OH se puede volver a oxidar para dar la cetona usando, por ejemplo, peryodinano de Dess-Martin en diclorometano, para proporcionar el compuesto intermedio (12).

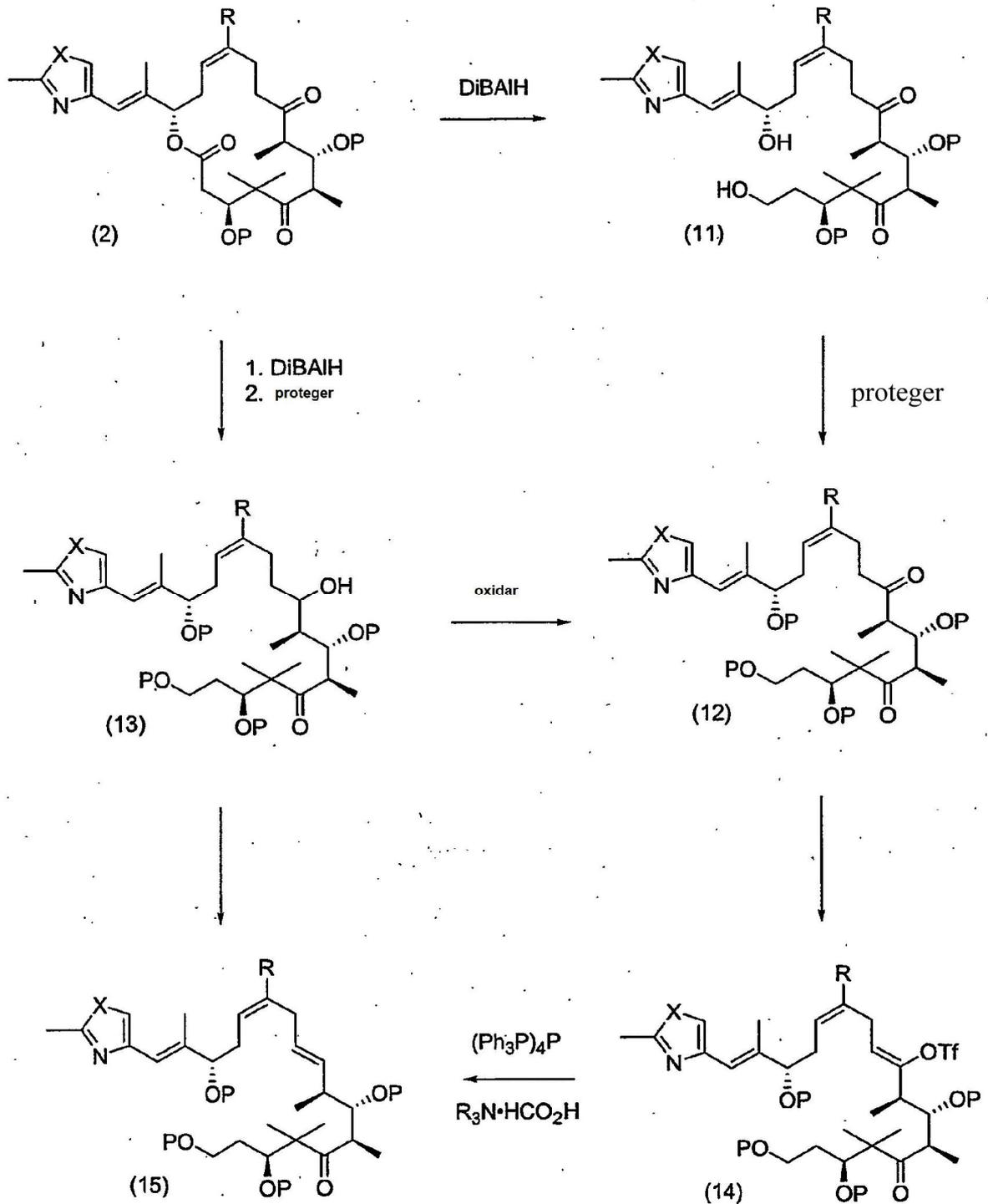
El grupo cetona del producto intermedio (12) se puede transformar en un trans-9,10-alqueno usando cualquiera de los procedimientos descritos en lo que antecede. En una realización, el compuesto intermedio (12) se hace reaccionar con un agente de triflado, tal como anhídrido trifluorometanosulfónico o una N-(2-piridil)triflimida y una base, tal como bis(trimetilsilil)amida sódica o diisopropilamida de litio, para formar el triflato de vinilo (14). El triflato de vinilo se reduce usando una fuente de hidruros, tal como una sal formiato de trialkilamonio o hidruro de trialkilestaño en presencia de un catalizador tal como tetraakis(trifenilfosfina)paladio (0) para proporcionar el compuesto intermedio (15).

En otra realización de la invención, el compuesto intermedio (13) se hace reaccionar con un reactivo para activar el grupo 9 para eliminación. Por ejemplo, el compuesto (13) se hace reaccionar con anhídrido trifluoroacético, anhídrido metanosulfónico o anhídrido trifluorometanosulfónico en presencia de una base adecuada, tal como piridina o 4-(dimetilaminopiridina), para producir el 9-O-trifluoroacetato, 9-O-metanosulfonato o 9-O-triflato, respectivamente. El posterior tratamiento con una base impedida, por ejemplo bis(trimetilsilil)amida sódica o diisopropilamida de litio produce el compuesto intermedio trans-9,10-alqueno (15).

En otra realización, el producto intermedio (13) se convierte en el xantato de metilo mediante reacción con una base tal como bis(trimetilsilil)amida, disulfuro de carbono y yoduro de metilo. El xantato intermedio se somete a pirólisis tal como se ha descrito en lo que antecede para producir el compuesto intermedio (15).

Ruta de síntesis 4 (X= S):

Esquema 4

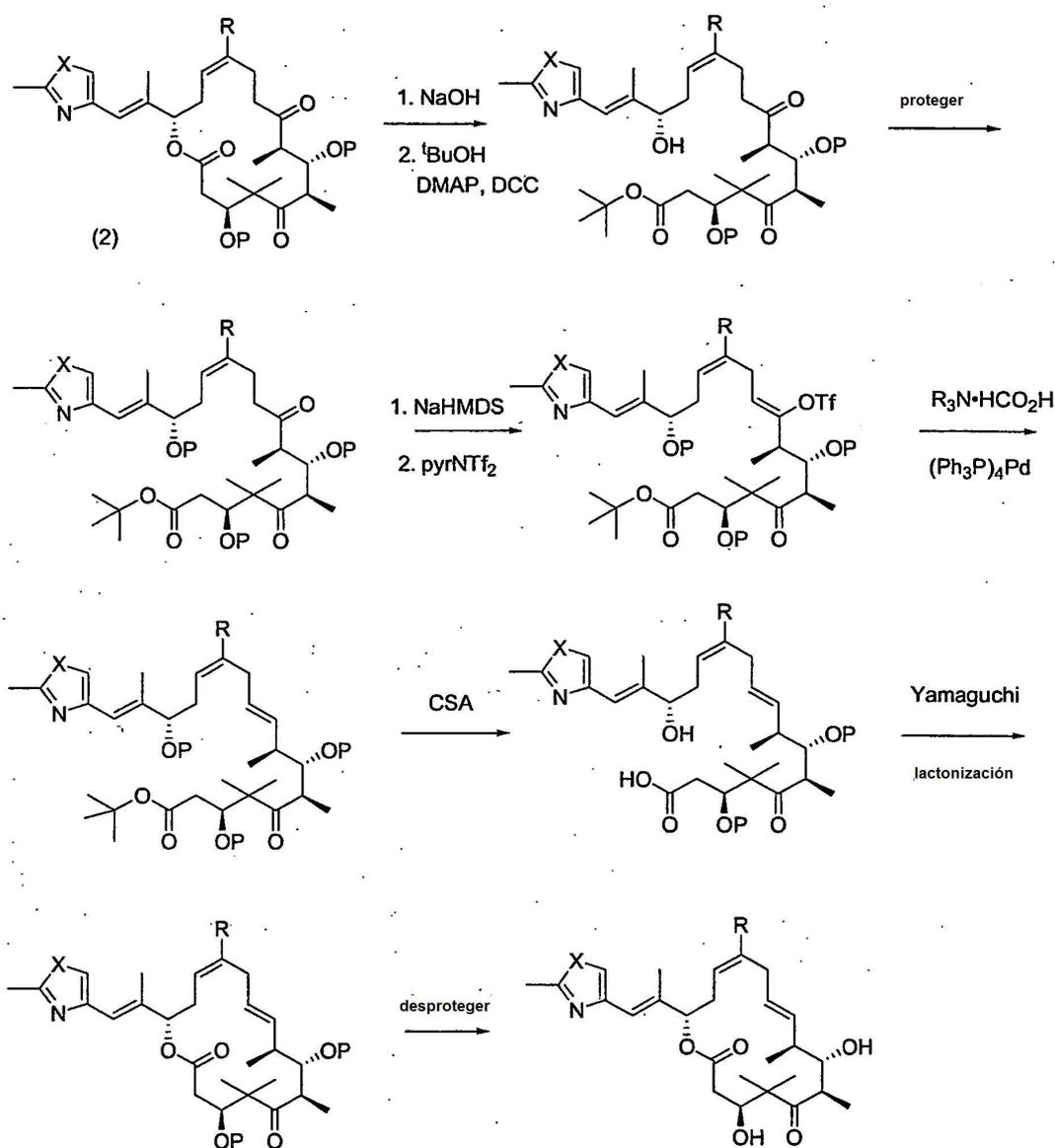


5 El compuesto intermedio (15) se puede convertir en trans-9,10-dehidroepitonas. El grupo protector sililo primario se elimina usando, por ejemplo, ácido alcanforsulfónico, y el 1-alcohol resultante se oxida en el ácido carboxílico usando, por ejemplo, un procedimiento de dos etapas en el que el alcohol se oxida primero usando un óxido de amina y peruretano de tetrapropilamonio catalítico y, después, se oxida adicionalmente hasta el ácido mediante reacción con clorito sódico (NaClO₂). El grupo 15-OH se desprotege mediante tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio en THF a

0 °C, y el macrociclo se cierra usando, por ejemplo, las condiciones de Yamaguchi (cloruro de 1,3,5-triclorobenzoilo y trietilamina en THF a 0 °C, seguido por la adición del anhídrido mixto a una solución de 4-(dimetilamino)piridina en tolueno a 75 °C) para proporcionar el compuesto intermedio (13) protegido. La desprotección proporciona la trans-9,10-dehidroepotilona.

- 5 Con referencia al esquema de síntesis 5, los compuestos se pueden preparar usando intermedios de epotilonas de anillo abierto preparados mediante saponificación. En una realización, la epotilona protegida (2) se convierte en el seco-ácido protegido mediante, por ejemplo, tratamiento con hidróxido o una esterasa. El ácido se convierte en el éster de terc-butilo usando, por ejemplo, alcohol terc-butílico, una carbodiimida tal como dicitohexilcarbodiimida y 4-(dimetilamino)piridina como catalizador. El 15-OH se protege mediante, por ejemplo, siliación, y la 9-cetona se convierte en el triflato de vinilo tal como se ha descrito en lo que antecede. El triflato de vinilo se reduce como se ha descrito en lo que antecede y el intermedio está parcialmente desprotegido usando ácido alcanforsulfónico para proporcionar la 3,7-protegida-seco-9,10-dehidroepotilona. La lactonización de acuerdo con el procedimiento de Yamaguchi, seguido por desprotección, proporciona la trans-9,10-dehidroepotilona.
- 10

Ruta de síntesis 5 (X= S):

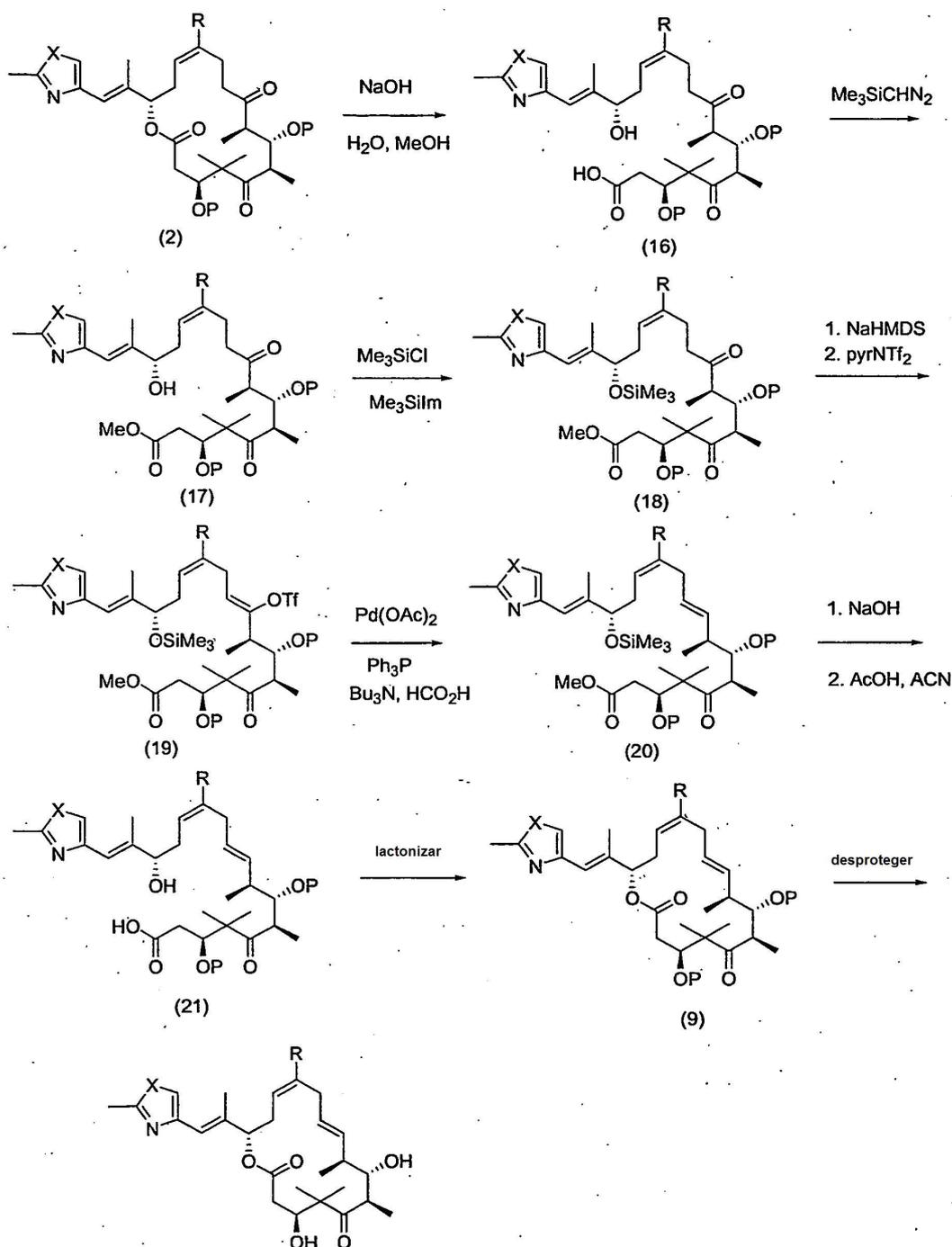


15

La forma 3,7-protegida de las epotilonas (2) se puede convertir en trans-9,10-dehidroepotilonas. La ruta de la síntesis implica la saponificación inicial del derivado de epotilona (2) para proporcionar un intermedio de epotilona de anillo abierto, que se modifica para incluir el grupo 9,10-trans-alqueno y, después, se lactoniza para proporcionar la trans-9,10-dehidroepotilona. Un esquema sintético representativo se ilustra en la ruta de síntesis 6.

Con referencia a la ruta de síntesis 6, la epotilona 3,7-protégida (2) se saponifica con hidróxido sódico en metanol acuoso para proporcionar el hidroxiaácido correspondiente (16). El hidroxiaácido (16) se convierte en su éster metílico (17) mediante reacción con diazometano de trimetilsililo. El grupo hidroxilo del éster metílico (17) se protege mediante tratamiento con cloruro de trimetilsililo/trimetilsilil-imidazol para proporcionar trimetilsililéter (18). La 9-cetona del trimetilsililéter (18) se transforma en un trans-9,10-alqueno mediante la reacción con N-(2-piridil)triflimida y bis(trimetilsilil)amida sódica para producir triflato de vinilo (19). La reducción del triflato de vinilo (19) con acetato de paladio (II), trifenilfosfina, tributilamina y ácido fórmico proporciona trans-9,10-alqueno (20). El grupo protector trimetilsililo y el grupo éster de metilo del compuesto intermedio (20) se eliminan mediante tratamiento con hidróxido sódico, seguido por tratamiento con ácido acético, que da hidroxiaácido (21) que después se lactoniza para proporcionar la epotilona 3,7-protégida (9). La desprotección proporciona la trans-9,10-dehidroepotilona.

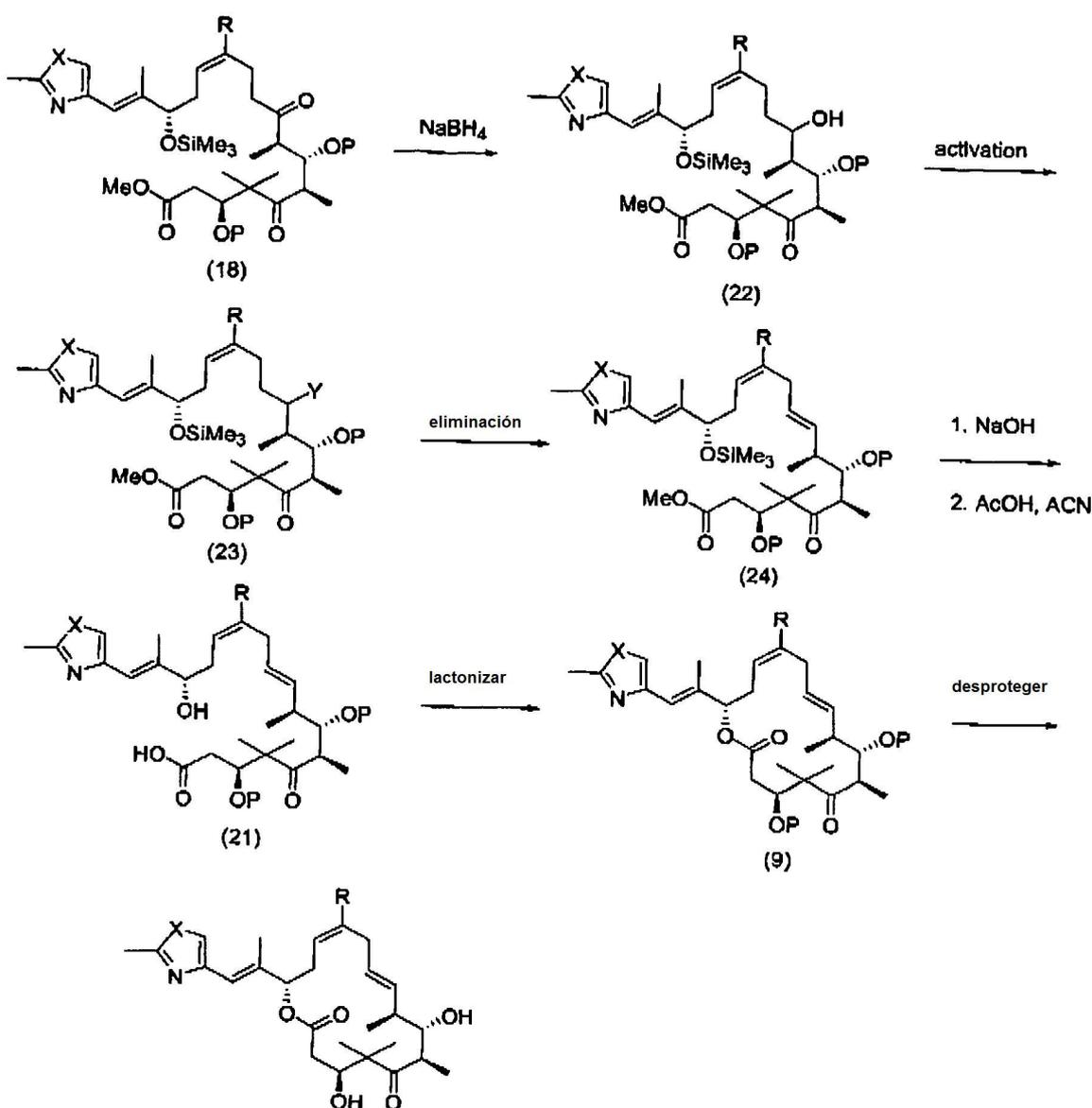
Ruta de síntesis 6 (X= S):



El trimetilsililéter (18) de anillo abierto preparado tal como se ha descrito en lo que antecede y como se muestra en la ruta de síntesis 6 puede ser el punto de partida de otra ruta a las trans-9,10-dehidroepotilonas. La ruta de síntesis implica la reducción del grupo 9-cetona del compuesto intermedio (18), seguida por eliminación para proporcionar el grupo trans-9,10-alqueno y, después, en última instancia, lactonización para proporcionar la trans-9,10-dehidroepotilona. Un esquema sintético representativo se ilustra en la ruta de síntesis 7.

Con referencia a la ruta de síntesis 7, la reducción del trimetilsililéter (18) con borohidruro sódico proporciona el derivado 9-hidroxi (22). A continuación, el derivado 9-hidroxi (22) se activa para la eliminación mediante tratamiento con un agente activador, tal como anhídrido trifluoroacético, anhídrido metanosulfónico o anhídrido trifluorometanosulfónico en presencia de una base adecuada, tal como piridina o 4-(dimetilaminopiridina), para producir el 9-O-trifluoroacetato, 9-O-metanosulfonato o 9-O-triflato, respectivamente, el compuesto intermedio activado (23). El posterior tratamiento del intermedio activado (23) con una base impedida, por ejemplo bis(trimetilsilil)amida sódica o diisopropilamida de litio produce el compuesto intermedio trans-9,10-alqueno (24). El grupo protector trimetilsililo y el grupo éster de metilo del compuesto intermedio (24) se eliminan mediante tratamiento con hidróxido sódico, seguido por tratamiento con ácido acético para dar hidroxácido (21). La lactonización del hidroxácido (21) proporciona la epotilona 3,7-protegida (9), que, tras la desprotección da la trans-9,10-dehidroepotilona.

Ruta de síntesis 7: (X = S)

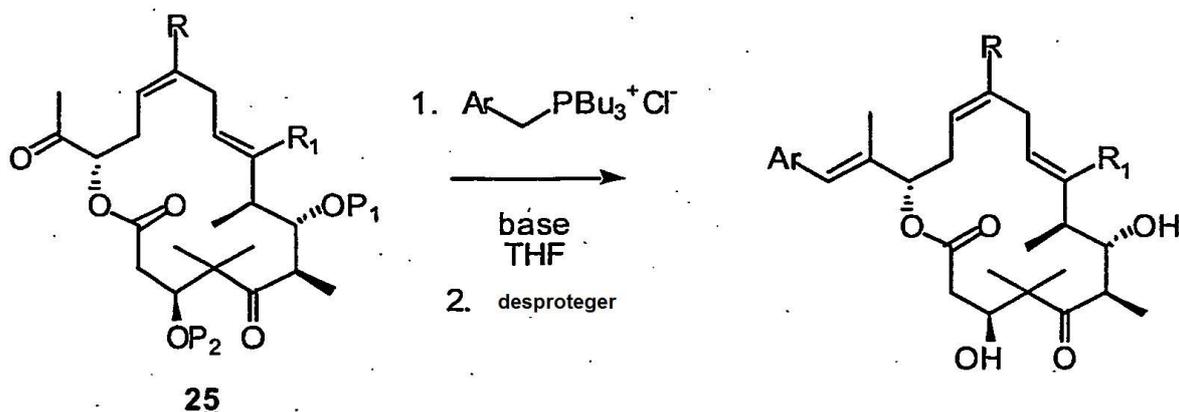


En otras realizaciones de la invención, los compuestos se pueden preparar mediante síntesis total tal como se ilustra en la ruta de síntesis 8. La cetona (25), en la que P₁ y P₂ son grupos protectores de hidroxilo, puede prepararse como se ha descrito en, por ejemplo, A. Rivkin y col., J. Am. Chem. Soc. 2003 125: 2899-2901. Entre los grupos protectores

de hidroxilo típicos se incluyen sililéteres, por ejemplo trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES) y terc-butildimetilsililo (TBS); ésteres, por ejemplo acetato, cloroacetato, trifluoroacetato o benzoato; carbonatos, por ejemplo carbonato de metilo, carbonato de tricloroetilo (troc) o carbonato de alilo (alloc); y acetales, por ejemplo metoximetilo (MOM) o benciloximetilo (BOM). En realizaciones concretas, P₁ y P₂ son sililéteres. La reacción de (25) con iluros de Wittig da compuestos protegidos (26). La posterior desprotección tal como se describe en los ejemplos siguientes proporciona los compuestos de fórmula (I). Los iluros de Wittig se pueden preparar mediante reacción de las correspondientes sales de fosfonio con una base fuerte, por ejemplo bis(trimetilsilil)amida sódica (NaHMDS), bis(trimetilsilil)amida de potasio (KHMDs), diisopropilamida de litio (LDA), butillitio, hidruro sódico o similar. Las sales de fosfonio pueden prepararse mediante reacción de los haluros de alquilo con una triaril- o trialquifosfina, por ejemplo trifenilfosfina o tributilfosfina. En realizaciones concretas de la invención, las sales de fosfonio se preparan mediante reacción de cloruros de alquilo con tributilfosfina. Como alternativa, se pueden preparar iluros de Wittig de acuerdo con otros procedimientos conocidos en la técnica, mediante, por ejemplo, tratamiento de los óxidos de alquildifenilfosfina con una base fuerte. Ejemplos de la preparación de varias sales de fosfonio adecuadas para su uso en la preparación de compuestos de fórmula (I) se proporcionan en los ejemplos siguientes.

La desprotección (eliminación de P₁ y/o P₂) se puede realizar usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3^a Edition (Wiley, New York), 1999. En realizaciones concretas, cuando P₁ y P₂ son sililéteres, tales como TMS, TES o TBS, la desprotección se realiza mediante tratamiento con ácido, por ejemplo HF piridina o ácido trifluoroacético en diclorometano.

Ruta de síntesis 8:



Se puede realizar una detección selectiva de los compuestos de la invención para determinar la citotoxicidad usando ensayos convencionales bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la citotoxicidad de los compuestos se puede determinar mediante el ensayo SRB tal como se ha descrito en Skehan y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112 (1990). En el ensayo SRB, se tripsinizan las siguientes células cultivadas, se recuentan y se diluyen hasta las concentraciones siguientes por 100 μl con medio de crecimiento: MCF-7, 5000; NCI/ADR-Res, 7500; NCI-H460, 5000; A549, 5000; Skov3, 7500; y SF 268, 7500. Las células se siembran a 100 μl /pocillo en placas de microvaloración de 96 pocillos. Veinticuatro horas después, a cada pocillo se añaden 100 μl de un compuesto de epotilona problema de la invención (de concentración variable de 1000 nM a 0,001 nM diluida en medio de crecimiento). Después de la incubación con el compuesto durante un periodo de días, las células se fijan con 100 μl de ácido trifluoroacético al 10% ("TCA") a 4 grados durante 1 hora y se tiñen con 0,2 % de sulfurodamina B (SRB)/1 % de ácido acético y la SRB unida se extrae después con 200 μl de base Tris 10 mM. La cantidad del pigmento unido se determina mediante DO 515 nm, que se correlaciona con el contenido total de proteína celular. Los datos se analizan usando metodologías estadísticas estándar (tales como las disponibles con el programa informático comercializado como KALEIDA GRAPH® de Synergy Software of Reading, PA) y se calculan las CI₅₀.

Los resultados de citotoxicidad para varios compuestos de fórmula (I) se indican en las Tablas 1 y 2 más adelante. Como se puede observar, los compuestos de la invención pueden mostrar inesperadamente una actividad de citotoxicidad tan buena o superior a la trans-9,10-dehidroepotilona D.

También se puede realizar la detección selectiva de los compuestos de la invención según la polimerización de la tubulina usando ensayos convencionales bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los compuestos se pueden analizar según la polimerización de la tubulina usando el procedimiento de Giannakakou y col., *J. Biol. Chem.* 271:17118-17125 (1997) y/o *Intl. J. Cancer* 75:57-63 (1998). En este procedimiento, las células MCF-7 se cultivan hasta la confluencia en placas de cultivo de 35 mm y se tratan con 1 nM de un compuesto de la invención

durante 0, 1 ó 2 horas a 35 °C. Después de lavar las células dos veces con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio o magnesio, las células se lisan a temperatura ambiente durante 5-10 minutos con 300 μ l de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 6,8, $MgCl_2$ 1 mM, EDTA 2 mM, 1% de Triton-X-100, más inhibidores de la proteasa). Las células se raspan y los lisados se transfieren a tubos de Eppendorf de 1,5 ml. Después, los lisados se centrifugan a 18000 g durante 12 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante que contiene la tubulina soluble o sin polimerizar (citósolica) se separa del aglomerado que contiene la tubulina insoluble o polimerizada (citoesquelética) y se transfiere a tubos nuevos. Después, los aglomerados se resuspenden en 300 μ l de tampón de lisis. Los cambios en la polimerización de la tubulina en las células se determinan analizando el mismo volumen de partes alícuotas de cada muestra con SDS-PAGE, seguido por inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-tubulina (Sigma).

- 5
- 10 En otros aspectos, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto de la invención puede estar en forma libre o, cuando sea adecuado, como sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención.

15 Las composiciones de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como forma sólida, semisólida, líquida o aerosol. Véase *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª edición, Lippicott Williams & Wilkins (1991). En general, el producto farmacéutico comprende uno o más de los compuestos de la invención como ingrediente activo mezclado con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicación externa, enteral o parenteral. El ingrediente activo puede mezclarse con, por ejemplo, vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables no tóxicos para comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, pesarios, soluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otra forma adecuada para su uso. Vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones incluyen, por ejemplo, agua, glucosa, lactosa, goma arábica, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea y otros portadores adecuados para su uso en la fabricación de preparaciones en forma sólida, semisólida, licuada o aerosol. Las composiciones pueden comprender además agentes auxiliares estabilizantes, espesantes y/o colorantes y perfumes.

20

25 En una realización, las composiciones que comprenden un compuesto de la invención carecen de Cremophor®. El Cremophor® (BASF Aktiengesellschaft) es un aceite de ricino polietoxilado que normalmente se usa como tensioactivo en la formulación de fármacos de baja solubilidad. No obstante, dado que Cremophor® puede causar reacciones alérgicas en un sujeto, se prefieren las composiciones que minimizan o eliminan el Cremophor®. Formulaciones de epótilona A o B que eliminan Cremophor® se describen en, por ejemplo, la publicación PCT WO 99/39694, y pueden adaptarse para su uso con los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un compuesto de la invención junto con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como alcoholes (por ejemplo, etanol), glicoles (por ejemplo, propilenglicol), compuestos de polioxietileno tales como polietilenglicoles (PEG), Tween® (monoésteres de polioxietilensorbitano; America ICI) y Solutol® (polietilenglicol 660 12-hidroxiestearato; BASF Aktiengesellschaft), o triglicéridos de cadena media (Miglyol®, Huls Aktiengesellschaft). En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden un compuesto de fórmula (I) junto con etanol, propilenglicol y Tween-80®. En ciertas otras realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden un compuesto de fórmula (I) junto con etanol, propilenglicol y Solutol HS-15®. Como alternativa, las composiciones sin Cremophor® de la invención pueden comprender al menos una ciclodextrina y, en realizaciones más concretas, la ciclodextrina puede ser una hidroxialquil- β -ciclodextrina o sulfoalquil- β -ciclodextrina, y, en una realización todavía más concreta, una hidroxipropil- β -ciclodextrina o sulfobutil- β ciclodextrina. Realizaciones todavía más concretas en las que el vehículo incluye una hidroxipropil- β ciclodextrina incluyen aquéllas para las que la hidroxipropil- β ciclodextrina tiene un grado de sustitución de al menos aproximadamente el 4,6 % y, más específicamente, un grado de sustitución de al menos aproximadamente el 6,5 %. Realizaciones todavía más específicas de la composición de la invención son aquéllas para las que el vehículo comprende una hidroxipropil- β -ciclodextrina que tiene un grado de sustitución entre aproximadamente el 4,6 % y aproximadamente el 6,5 %.

30

35

40

45

En una realización de la invención, la composición comprende un compuesto de fórmula (I), un alcohol, un glicol y una ciclodextrina. En ciertas realizaciones, la composición comprende un compuesto de fórmula (I), etanol, propilenglicol y una ciclodextrina. En una realización, la composición comprende un compuesto de fórmula (I), junto con aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % de etanol, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 % de propilenglicol y de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % de una β -ciclodextrina. En una realización concreta, la composición comprende un compuesto de fórmula (I), junto con aproximadamente el 7 % de etanol, aproximadamente el 3 % de propilenglicol y aproximadamente el 12 % de una β -ciclodextrina.

50

Cuando sea aplicable, los compuestos de la invención pueden formularse en forma de microcápsulas y/o nanopartículas. Protocolos generales se describen en, por ejemplo, *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*, Max Donbrow, ed., CRC Press (1992) y las patentes de EE.UU. N° 5.510.118; 5.534.270; y 5.662.883. Aumentando la proporción del área de superficie y el volumen, estas formulaciones permiten la administración oral de compuestos que, de otro modo, no podrían administrarse por vía oral.

55

Las composiciones de la invención también pueden formularse usando otros procedimientos que se han usado

anteriormente para fármacos de baja solubilidad. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden formular en emulsiones con vitamina E o un derivado PEGilado de la misma tal como se describe en los documentos WO 98/30205 y WO 00/71163. Normalmente, el compuesto se disuelve en una solución acuosa que contiene etanol (preferentemente menos del 1 % p/v) y, después, se añade la vitamina E o una vitamina E PEGilada. A continuación, el etanol se elimina para formar una preemulsión que se puede formular para las vías de administración intravenosa u oral. Como alternativa, los compuestos de la invención pueden encapsularse en liposomas. Los procedimientos para formar liposomas como vehículos de liberación de fármaco son bien conocidos en la técnica. Protocolos adecuados incluyen los descritos por las patentes de EE.UU. 5,683,715; 5,415,869, and 5,424,073, con relación a otro fármaco contra el cáncer de relativamente baja solubilidad taxol y en la publicación PCT WO 01/10412, con relación a la epotilona B. De los diversos lípidos que se pueden usar, los lípidos actualmente particularmente preferentes para formar liposomas de epotilona encapsulados incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de diestearilo derivadas con polietilenglicol.

En otras realizaciones más, las composiciones de la invención pueden comprender polímeros, tales como biopolímeros o polímeros biocompatibles (sintéticos o naturales). Los polímeros biocompatibles se pueden clasificar como biodegradables y no biodegradables. Los polímeros biodegradables se degradan *in vivo* como una función de la composición química, el procedimiento de fabricación y/o la estructura del implante. Ejemplos ilustrativos de polímeros sintéticos incluyen, por ejemplo, polianhídridos, polihidroxiácidos tales como ácido poliláctico, ácidos poliglicólicos y copolímeros de los mismos, poliésteres, poliamidas, polioctoésteres y algunos polifosfacenos. Ejemplos ilustrativos de polímeros naturales incluyen proteínas y polisacáridos tales como colágeno, ácido hialurónico, albúmina y gelatina.

En otras realizaciones más, los compuestos de la presente invención pueden conjugarse con un polímero que potencia la solubilidad en agua. Ejemplos representativos de polímeros adecuados para este fin incluyen polietilenglicol, poli(ácido d-glutámico), poli(ácido 1-glutámico), poli(ácido d-aspartico), poli(ácido 1-aspartico) y copolímeros de los mismos. Son preferentes los ácidos poliglutámicos que tienen pesos moleculares entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 100.000, siendo más preferentes los pesos moleculares entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 80.000 y siendo los más preferentes los pesos moleculares entre aproximadamente 30.000 y 60.000. El polímero se conjuga mediante un enlace éster a uno o más hidroxilos de una epotilona de la invención usando un protocolo como el descrito esencialmente en la patente de EE.UU. Nº 5.977.163. Los puntos de conjugación preferentes incluyen los grupos 3-hidroxilo y 7-hidroxilo.

En otras realizaciones más, los compuestos de la invención pueden estar conjugados con un anticuerpo monoclonal. Esta estrategia permite dirigir los compuestos a dianas específicas. Protocolos generales para el diseño y uso de anticuerpos conjugados se describen en *Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer*, Michael L. Grossbard, ed. (1998).

La cantidad de ingrediente activo incorporado en las composiciones de la invención para producir una forma de dosificación unidad variará en función del sujeto tratado y el modo de administración concreto. La magnitud de la dosis terapéutica de los compuestos de la invención variará con la naturaleza y gravedad de la afección que se va a tratar y con el compuesto concreto y su vía de administración. En general, el intervalo de dosis diario para la actividad anticancerosa se encuentra en el intervalo de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal en un mamífero, preferentemente de 0,01 a 80 mg/kg y, más preferentemente, de 0,1 a 70 mg/kg, en dosis únicas o múltiples. En casos poco habituales, puede ser necesario administrar dosis superiores a 100 mg/kg.

En otros aspectos, la presente invención incluye compuestos de fórmula (I) para su uso en procedimientos para tratar enfermedades hiperproliferativas, tales como cáncer, normalmente, pero no necesariamente, en un mamífero. En una realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar cánceres de cabeza y cuello, que incluyen tumores de la cabeza, el cuello, la cavidad nasal, los senos paranasales, la nasofaringe, la cavidad oral, la orofaringe, la laringe, la hipofaringe, las glándulas salivares y los paragangliomas. Los compuestos de la presente invención se usan para tratar cánceres del hígado y el árbol biliar, particularmente el carcinoma hepatocelular. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar cánceres intestinales, en particular el cáncer colorrectal. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar el cáncer de ovarios. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar cáncer pulmonar de células pequeñas y no pequeñas. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar el cáncer de mama. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar sarcomas, tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rhabdomyosarcoma embrionario, leiomyosarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial, liposarcoma y sarcoma alveolar de partes blandas. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar neoplasias de los sistemas nervioso central, particularmente el cáncer de cerebro. En otra realización, los compuestos de la presente invención se usan para tratar linfomas, que incluyen linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado con la mucosa, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes de linaje B, linfoma de Burkitt y linfoma de células grandes anaplásicas de linfocitos T.

La administración al sujeto puede repetirse según sea necesario para contener (es decir, prevenir el posterior

crecimiento) o eliminar el cáncer. Clínicamente, la práctica del procedimiento tendrá como resultado una reducción del tamaño o el número de los crecimientos cancerosos y/o una reducción de los síntomas asociados (cuando sea aplicable). Patológicamente, la práctica del procedimiento producirá al menos uno de los siguientes: inhibición de la proliferación de células cancerosas, reducción del tamaño del cáncer o del tumor, prevención de metástasis adicionales e inhibición de la angiogénesis tumoral.

5 Los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden administrar en politerapias, bien de forma concurrente, antes o después de uno o más de los otros procedimientos terapéuticos o médicos deseados. La combinación de terapias y procedimientos concreta en el régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de las terapias y/o procedimientos y el efecto terapéutico que se desea conseguir. Ejemplos de combinaciones
10 adecuadas incluyen un compuesto de la invención y uno o más de azacitidina, cladribina, citarabina, floxuridina, fludarabina fosfato, gemcitabina, pentostatina, mostaza de uracilo o un análogo nucleosídico, tal como 5-fluorouracilo ("5FU") o un profármaco de los mismos, tal como 5 α -desoxi-5-fluoro-N-[(pentiloxi)carbonil]-citidina (comercializado con el nombre XELODA® (Roche, Basilea, Suiza)), que es un profármaco sistémico administrado por vía oral de 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR), que *in vivo* se convierte en 5-fluorouracilo.

15 En una realización, los compuestos y composiciones de la presente invención se usan en combinación con otro agente o procedimiento anticanceroso. Ejemplos ilustrativos de otros antineoplásicos incluyen, entre otros: (i) fármacos alquilantes tales como mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida; (ii) antimetabolitos tales como metotrexato; (iii) agentes estabilizantes de microtúbulos tales como vinblastina, paclitaxel, docetaxel y discodermolida; (iv) inhibidores de la angiogénesis; y (v) antibióticos citotóxicos tales como doxorubicin (adriamicina), bleomicina y mitomicina. Ejemplos ilustrativos de otros procedimientos anticancerosos incluyen: (i) cirugía; (ii) radioterapia; y (iii)
20 terapia fotodinámica.

En otras realizaciones, los compuestos y/o composiciones de la invención se pueden usar en combinación con un agente o procedimiento para mitigar los posibles efectos secundarios de los compuestos o composiciones, tales como diarrea, náuseas y vómitos. La diarrea se puede tratar con agentes antidiarreicos tales como opioides (p. ej., codeína, difenoxilato, difenoxina y loeramida), subsalicilato de bismuto y octeótrido. Las náuseas y los vómitos pueden tratarse con agentes antieméticos tales como dexametasona, metoclopramida, difenhidramina, lorazepam, ondansetrón, proclorperacina, trietilperacina y dronabinol. Para las composiciones que incluyen aceite de ricino polietoxilado tal como Cremophor®, el pretratamiento con corticosteroides tales como dexametasona y metilprednisolona y/o antagonistas H₁ tales como difenilhidramina HCl y/o antagonistas H₂ pueden usarse para mitigar la anafilaxia.

30 En otro aspecto de la invención, los compuestos y/o composiciones de la invención pueden usarse para tratar trastornos no cancerosos que se caracterizan por hiperproliferación celular. En una realización, los compuestos de la presente invención se pueden usar para tratar la psoriasis, un trastorno que se caracteriza por la hiperproliferación celular de los queratinocitos que se acumulan en la piel y forman lesiones escamosas elevadas. Este procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición de la invención a un
35 sujeto que sufre psoriasis. La administración se puede repetir según sea necesario para disminuir el número o gravedad de las lesiones o eliminar las lesiones. Clínicamente, la práctica del procedimiento tendrá resultado una reducción del tamaño o el número de las lesiones cutáneas y la disminución de los síntomas cutáneos (dolor, ardor y hemorragia en la piel afectada) y/o una reducción de los síntomas asociados (p. ej., enrojecimiento de las articulaciones, calor, inflamación, diarrea, dolor abdominal). Patológicamente, la práctica del procedimiento tendrá como resultado al menos uno de los efectos siguientes: inhibición de la proliferación de queratinocitos, reducción de la inflamación de la piel (mediante, por ejemplo, impacto sobre: factores de atracción y de crecimiento, presentación antigénica, producción de especies de oxígeno reactivo y metaloproteinasas de la matriz) e inhibición de la angiogénesis dérmica.

45 En otras realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden usarse para tratar la esclerosis múltiple, una afección que se caracteriza por una desmielinización progresiva del cerebro. Aunque los mecanismos exactos implicados en la pérdida de mielina no se conocen, existe un incremento de la proliferación y acumulación de astrocitos en las zonas de destrucción de mielina. En estos puntos existe una actividad similar a la de los macrófagos y un incremento de la actividad de la proteasa que es, al menos, parcialmente responsable de la degradación de la vaina de mielina. Este procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o
50 composición de la invención a un sujeto que sufre esclerosis múltiple. Dicha administración puede repetirse según sea necesario para inhibir la proliferación de astrocitos y/o disminuir la gravedad de la pérdida de la función motora y/o prevenir o atenuar la progresión crónica de la enfermedad. Clínicamente, la práctica de este procedimiento tendrá como resultado una mejora de los síntomas visuales (pérdida de visión, diplopía), trastornos de la marcha (debilidad, inestabilidad axial, pérdida sensorial, espasticidad, hiperreflexia, pérdida de destreza), disfunción de las extremidades superiores (debilidad, espasticidad, pérdida sensorial), disfunción de la vejiga urinaria (urgencia, incontinencia, vacilación, vaciado incompleto), depresión, labilidad emocional y alteraciones cognitivas. Patológicamente, la práctica del procedimiento tendrá como resultado la reducción de uno o más de los siguientes, tales como pérdida de mielina, degradación de la barrera hematoencefálica, infiltración perivascular de células mononucleares, anomalías
55

inmunológicas, formación de cicatriz gliótica y proliferación de astrocitos, producción de metaloproteinasas y alteración de la velocidad de conducción.

En otras realizaciones más, los compuestos y/o composiciones de la invención se usan para tratar la artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria recidivante crónica de múltiples sistemas que, en ocasiones, provoca la destrucción y alquilosis de las articulaciones afectadas. La artritis reumatoide se caracteriza por un marcado engrosamiento de la membrana sinovial que forma proyecciones vilosas que se extienden hacia el espacio articular, multicapas del revestimiento de los sinoviocitos (proliferación de sinoviocitos), infiltración de la membrana sinovial con glóbulos blancos (macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y folículos linfoides; que se denomina "sinovitis inflamatoria") y depósito de fibrina con necrosis celular dentro del sinovio. El tejido formado como resultado de este proceso se denomina paño y, en último término, el paño crece para llenar el espacio articular. El paño desarrolla una extensa red de vasos sanguíneos nuevos a través del proceso de angiogénesis que es esencial para la evolución de la sinovitis. La liberación de enzimas digestivas (metaloproteinasas de la matriz (p. ej., colagenasa, estromelina)) y otros mediadores del proceso inflamatorio (p. ej., peróxido de hidrógeno, superóxidos, enzimas lisosomales y productos del metabolismo del ácido araquidónico) de las células del tejido del paño conduce a la destrucción progresiva del tejido cartilaginoso. El paño invade el cartílago articular y produce erosiones y fragmentación del tejido cartilaginoso. Eventualmente se produce la erosión del hueso subcondral con anquilosis fibrosa y, en último término, anquilosis ósea, de la articulación implicada. En este aspecto de la invención, se administra a un sujeto que sufre artritis reumatoide una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto y/o composición de la invención. Dicha administración puede repetirse según sea necesario para conseguir inhibir la proliferación de los sinoviocitos y/o disminuir la gravedad de la pérdida de movimiento de las articulaciones afectadas y/o prevenir o atenuar la progresión crónica de la enfermedad. Clínicamente, la práctica de la presente invención tendrá como resultado uno o más de los siguientes: (i) disminución de la gravedad de los síntomas (dolor, inflamación y tumefacción de las articulaciones afectadas; rigidez matutina, debilidad, fatiga, anorexia, pérdida de peso); (ii) disminución de la gravedad de los signos clínicos de la enfermedad (engrosamiento de la cápsula articular, hipertrofia sinovial, derrame articular, contracturas de los tejidos blandos, disminución del rango de movimiento, anquilosis y deformidad de la articulación fija); (iii) disminución de las manifestaciones extraarticulares de la enfermedad (nódulos reumáticos, vasculitis, nódulos pulmonares, fibrosis intersticial, pericarditis, epiescleritis, iritis, síndrome de Felty, osteoporosis); (iv) incremento de la frecuencia y la duración de los periodos de remisión/sin síntomas de la enfermedad; (v) prevención de la alteración y la discapacidad fijas; y/o (vi) prevención/atenuación de la progresión crónica de la enfermedad, Patológicamente, la práctica de la presente invención producirá al menos uno de los siguientes: (i) disminución de la respuesta inflamatoria; (ii) interrupción de la actividad de las citoquinas inflamatorias (tales como IL-1, 1NFa, FGF, VEGF); (iii) inhibición de la proliferación de sinoviocitos; (iv) inhibición de la actividad de la metaloproteinasas de la matriz y/o (v) inhibición de la angiogénesis.

Los compuestos y/o composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar la aterosclerosis y/o la reestenosis, en particular en pacientes cuyos bloqueos pueden tratarse con una endoprótesis endovascular. La aterosclerosis es una lesión vascular crónica en la que algunas de las células del músculo liso vascular normales ("CMLV") de la pared arterial, que normalmente controlan el tono vascular regulando el flujo sanguíneo, cambian su naturaleza y desarrollan un comportamiento "de tipo cáncer". Estas CMLV se convierten en anormalmente proliferativas, secretan sustancias (factores de crecimiento, enzimas de degradación tisular y otras proteínas) que les permiten invadir y diseminarse por el revestimiento interno de los vasos, bloquean el flujo sanguíneo y hacen que los vasos sean anormalmente susceptibles a un bloqueo completo mediante coagulación sanguínea local. La reestenosis, la recurrencia de la estenosis o constricción arterial después de procedimientos correctores, es una forma acelerada de aterosclerosis. En este aspecto de la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición de la invención puede recubrir una endoprótesis y colocarse la endoprótesis en la arteria enferma en un sujeto que sufre aterosclerosis. Procedimientos para recubrir una endoprótesis con un compuesto se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 6.156.373 y 6.120. 847. Clínicamente, la práctica de la presente invención tendrá como resultado uno o más de los siguientes: (i) aumento del flujo sanguíneo arterial; (ii) disminución de la gravedad de los signos clínicos de la enfermedad; (iii) disminución del índice de reestenosis; o (iv) prevención/atenuación de la progresión crónica de la aterosclerosis. Patológicamente, la práctica de la presente invención producirá al menos uno de los siguientes efectos en el punto de la implantación de la endoprótesis: (i) disminución de la respuesta inflamatoria, (ii) inhibición de la secreción de V5MC de metaloproteinasas de la matriz; (iii) inhibición de la acumulación en las células de músculo liso; y (iv) inhibición de la desdiferenciación fenotípica V5MC.

En una realización, los niveles de dosificación que se administran a un sujeto que sufre cáncer o un trastorno no canceroso caracterizado por hiperproliferación celular son del orden de aproximadamente 1 mg/m^2 a aproximadamente 200 mg/m^2 , que se pueden administrar en forma de inyección intravenosa rápida (por cualquier vía de administración adecuada) o de infusión continua (p. ej., 1 hora, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas), cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas, según sea necesario. No obstante, debe entenderse que el nivel específico de dosis para cualquier paciente concreto depende de varios factores. Estos factores incluyen la actividad del compuesto específico empleado; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del sujeto; el momento y la vía de administración y la tasa de excreción del fármaco; si se emplea una combinación farmacológica en el tratamiento y la

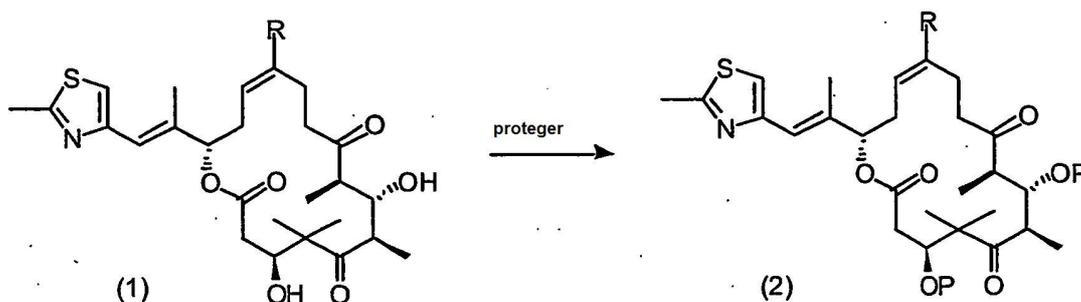
gravedad del trastorno que se está tratando.

En otra realización, los niveles de dosificación son de aproximadamente 10 mg/m² a aproximadamente 150 mg/m², preferentemente de aproximadamente 10 mg/m² a aproximadamente 75 mg/m² y, más preferentemente de aproximadamente 15 mg/m² a aproximadamente 50 mg/m², una vez cada tres semanas según sea necesario y tolerado. Los niveles de dosificación pueden ser de aproximadamente 1 mg/m² a aproximadamente 150 mg/m², preferentemente de aproximadamente 10 mg/m² a aproximadamente 75 mg/m² y, más preferentemente de aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 50 mg/m², una vez cada dos semanas según sea necesario y tolerado. Los niveles de dosificación pueden ser de aproximadamente 1 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m², preferentemente de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 50 mg/m² y, más preferentemente de aproximadamente 10 mg/m² a aproximadamente 25 mg/m², una vez a la semana según sea necesario y tolerado. Los niveles de dosificación pueden ser de aproximadamente 0,1 mg/m² a aproximadamente 25 mg/m², preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 15 mg/m² y, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/m² a aproximadamente 10 mg/m², una vez al día según sea necesario y tolerado.

Habiéndose proporcionado en lo que antecede una descripción detallada de la invención, se dan los ejemplos siguientes con fines de ilustración y no deben entenderse como limitación del ámbito de la invención o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)

Protección de 3,7-diol



20 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-oxoepotilona D

(Compuesto 2); R = Me; P = Et₃Si

A una solución de 9-oxoepotilona D y 2,6-lutidina en diclorometano a temperatura ambiente se añade clortrietilsilano y se agita hasta que la reacción está sustancialmente completa mediante determinación usando procedimientos conocidos en las técnicas de síntesis orgánica (p. ej., seguimiento mediante cromatografía de capa fina ("TLC") o cromatografía de líquidos ("CL"), normalmente durante la noche. Después, la solución producto se diluye con diclorometano y se lava secuencialmente con agua, solución de bicarbonato sódico acuoso saturado ("NaHCO₃ ac. sat.") y salmuera, y, después, se seca sobre sulfato de magnesio ("MgSO₄"), se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto deseado se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un sistema disolvente adecuado, tal como, por ejemplo, un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

30 Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)

3,7-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-9-oxoepotilona D

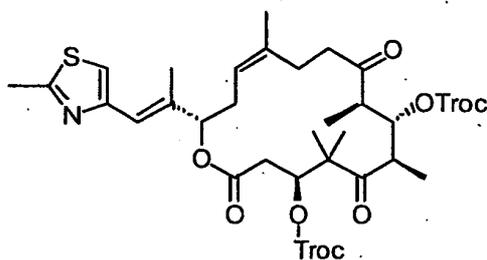
(Compuesto (2)); R = Me; P = ^tBuMe₂Si

Por analogía de los detalles proporcionados en el ejemplo 1 en lo que antecede, a una solución de 9-oxoepotilona d y 2,6-lutidina en diclorometano a temperatura ambiente se añade trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsililo y se agita durante la noche. La mezcla se diluye con diclorometano y se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

Ejemplo 3

3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-oxoepotilona D

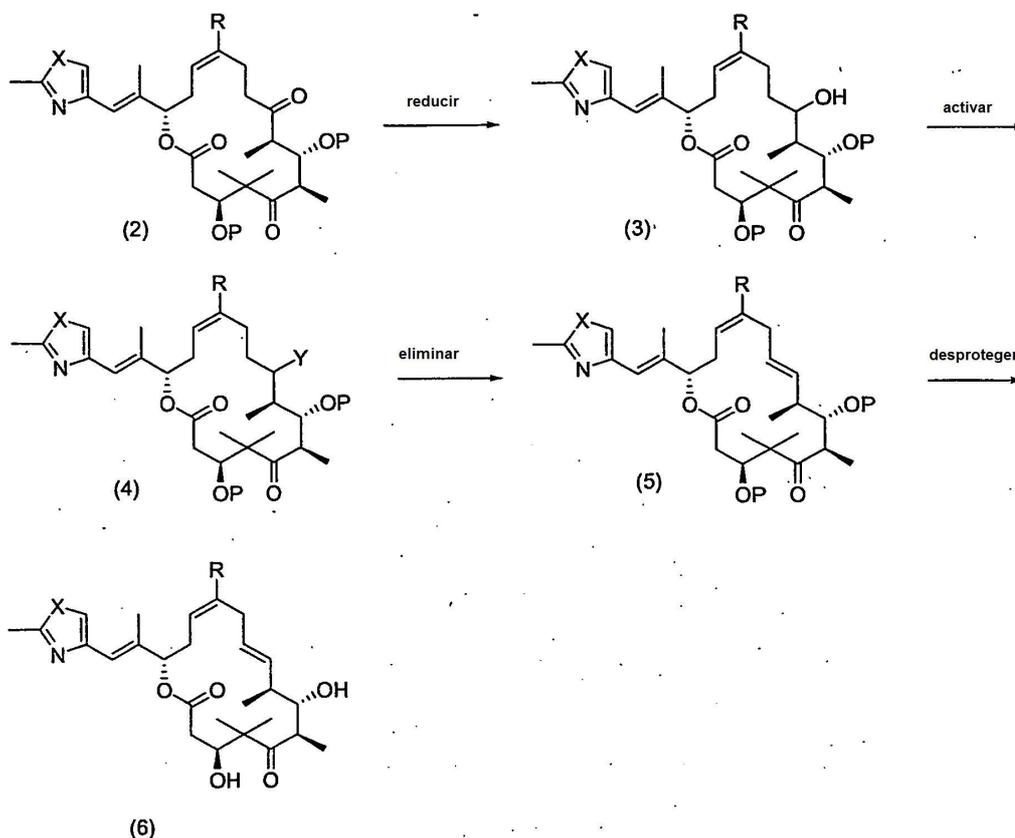
(Compuestos (2): R = Me; P = CO₂CH₂CCl₃)



5 Una solución de 9-oxoepotilona D (80 mg) en 1,5 ml de piridina se trató con cloroformiato de 2,2,2-tricloroetilo (134 mg) durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con acetato de etilo, se lavó sucesivamente con NH₄Cl saturado y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. La cromatografía en gel de sílice (40 % de acetato de etilo/hexanos) dio 162 mg de producto.

Ejemplo comparativo 5

II. RUTA 1: CETORREDUCCIÓN Y ELIMINACIÓN



10 Etapa 1. Ceterreducción (referencia)

3,7-bis-O-(triethylsilyl)-9-hidroxiopotilona D

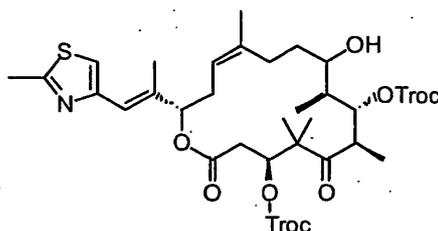
(Compuesto (3); R = Me; P = Et₃Si; X = S)

15 A una solución de 3,7-bis-O-(triethylsilyl)-9-oxoepotilona D en metanol a 0 °C se añade 1 equivalente de borohidruro sódico. La solución se agita a 0 °C durante 40 minutos antes de añadir NH₄Cl acuoso. Las fases orgánicas se extraen con acetato de etilo y se combinan antes de secar (Na₂SO₄), filtrar y concentrar a presión reducida. La cromatografía en columna (sílice, EtOAc-hexano) da el producto.

Ejemplo 6 (referencia)

3,7-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-9-hidroxiopotilona D**(Compuesto (3); R = Me; P = ^tBuMe₂Si; X = S)**

5 A una solución de 3,7-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-9-oxoepotilona D en metanol a 0 °C se añade 1 equivalente de borohidruro sódico. La solución se agita a 0 °C durante 40 minutos antes de añadir NH₄Cl acuoso. Las fases orgánicas se extraen con acetato de etilo y se combinan antes de secar (Na₂SO₄) filtrar y concentrar a presión reducida. La cromatografía en columna (sílice, EtOAc-hexano) da el producto.

Ejemplo 7 (referencia)**3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-hidroxiopotilona D****(Compuesto (3); R = Me; P = CO₂CH₂CCl₃; X=S)**

10 A una solución de 3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-oxoepotilona D en metanol a 0 °C se añade 1 equivalente de borohidruro sódico. La solución se agita a 0 °C durante 40 minutos antes de añadir NH₄Cl acuoso. Las fases orgánicas se extraen con acetato de etilo y se combinan antes de secar (Na₂SO₄) filtrar y concentrar a presión reducida. La cromatografía en columna (sílice, EtOAc-hexano) da 3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-hidroxiopotilona D.

Ejemplo 9 (referencia)**Etapa 2. Activación****3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-(metanosulfoniloxi)epotilona D****(Compuesto (4); R=Me; P=Et₃Si; X=S; Y=MeSO₂O)**

20 A una solución de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-hidroxi epotilona D y 4-(dimetilamino)piridina en diclorometano se añade cloruro de metanosulfonilo. Después de agitar durante 12 horas, la mezcla se diluye con diclorometano y se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

Ejemplo 10 (referencia)**3,7-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-9-(metanosulfoniloxi)epotilona D****(Compuesto (4); R=Me; P=^tBuMe₂Si; X=S; Y MeSO₂O)**

30 A una solución de 3,7-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-9-hidroxi epotilona D y 4-(dimetilamino)piridina en diclorometano se añade cloruro de metanosulfonilo. Después de agitar durante 12 horas, la mezcla se diluye con diclorometano y se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

Ejemplo 11 (referencia)**3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-(metanosulfoniloxi)epotilona D****(Compuesto (4); R=Me; P=CO₂CH₂CCl₂; X=S; Y=MeSO₂O)**

35 A una solución de 3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-hidroxiopotilona D y 4-(dimetilamino)piridina en diclorometano se añade cloruro de metanosulfonilo. Después de agitar durante 12 horas, la mezcla se diluye con diclorometano y se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

Ejemplo 12 (referencia)**3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-(trifluorometanosulfonilo)epotilona D****(Compuesto (4); R=Me; P=Et₃Si; X=S; Y=CF₃SO₂O)**

5 A una solución de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-hidroxiopotilona D en THF a -78 °C se añade, gota a gota, una solución 1,0 M de bis(trimetilsilil)amida sódica en THF. Después de 30 minutos, se añade gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico y se deja calentar la mezcla a temperatura ambiente. La mezcla se diluye en éter y se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se usa sin purificación adicional.

Ejemplo 13 (referencia)**10 3-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-9-(trifluorometanosulfonilo)epotilona D****(Compuesto (4); R=Me; P = ^tBuMe₂Si; X=S; Y=CF₃SO₂O)**

15 A una solución de 3,7-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-9-hidroxiopotilona D en THF a -78 °C se añade, gota a gota, una solución 1,0M de bis(trimetilsilil)amida sódica en THF. Después de 30 minutos, gota a gota se añade anhídrido trifluorometanosulfónico y se deja calentar la mezcla a temperatura ambiente. La mezcla se diluye en éter y se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se usa sin purificación adicional.

Ejemplo 14 (referencia)**3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-(trifluorometanosulfonilo)epotilona D****(Compuesto (4); R=Me; P=CO₂CH₂CCl₃; X=S; Y=CF₃SO₂O)**

20 A una solución de 3,7-bis-O-(2,2,2-tricloroetoxicarbonil)-9-hidroxiopotilona D en THF a -78 °C se añade, gota a gota, una solución 1,0M de bis(trimetilsilil)amida sódica en THF. Después de 30 minutos, gota a gota se añade anhídrido trifluorometanosulfónico y se deja calentar la mezcla a temperatura ambiente. La mezcla se diluye en éter y se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se usa sin purificación adicional.

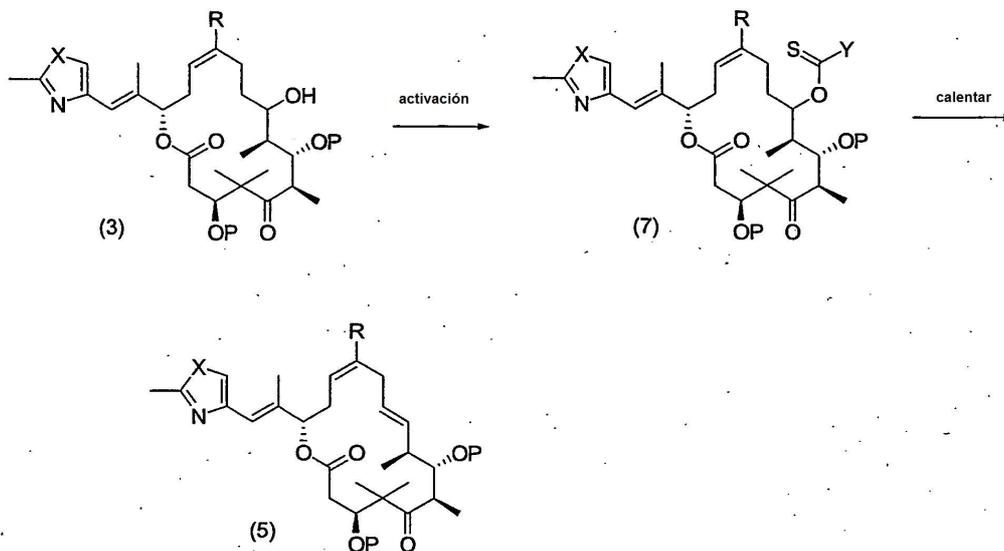
25 Ejemplo 15**Etapa 3. Eliminación****3,7-bis-O-(trietilsilil)-9,10-dehidroxiopotilona D mediante eliminación de mesilato****(Compuesto (5); R=Me; P=Et₃Si; X=S) (no reivindicado, solo de referencia)**

30 Una solución de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-(metanosulfonilo)epotilona D en THF se enfría hasta -78 °C y se trata con 1 equivalente de una solución 1,0 M de bis(trimetilsilil)amida sódica en THF. La mezcla se deja calentar hasta la temperatura ambiente y, después, se vierte en NH₄Cl acuoso saturado y se extrae con acetato de etilo. El extracto se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

35 Ejemplo 19**Etapa 4. Desprotección****9,10-dehidroepotilona D (mediante P = Et₃Si)****(Compuesto (6); R = Me; X = S) (no reivindicado, solo de referencia)**

40 Una solución de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9,10-dehidroepotilona D en acetonitrilo y agua se enfría en hielo y se trata con ácido fluorhídrico al 48 %. La reacción se monitoriza mediante cromatografía en capa fina. Tras la finalización, la reacción se neutraliza mediante la adición de NaHCO₃ acuoso saturado y se concentra hasta una suspensión acuosa. La suspensión se extrae con acetato de etilo y el extracto se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El residuo se somete a cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo-hexanos) para aislar el producto.

45 Ejemplo 22

III. Ruta 2: Eliminaciones pirolíticas**Etapa 1. Activación****3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-((metiltio)tiocarboniloxi)epotilona D****5 (Compuestos (7); R = Me; P = Et₃Si; X = S; Y = S-Me) (referencia)**

Una solución de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-hidroxiopotilona D en THF se enfría hasta -78 °C y se trata con 1 equivalente de una solución 1,0M de bis(trimetilsilil)amida sódica en THF. Después de 30 minutos se añade disulfuro de carbono y la mezcla se deja calentar hasta la temperatura ambiente. Después de 1 hora se añade yoduro de metilo y la reacción se deja progresar 12 horas, se vierte en NH₄Cl acuoso saturado y se extrae con acetato de etilo. El extracto se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

Ejemplo 23 (referencia)**3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-((dimetilamino)tiocarboniloxi)epotilona D****15 (Compuesto (7); R = Me; P = Et₃Si; X = S; Y = NMe₂)**

Una mezcla de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-hidroxiopotilona D, cloruro de dimetiltiocarbamoilo y piridina se deja reaccionar durante 12 horas. La mezcla se vierte en agua y se extrae con acetato de etilo. El extracto se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

20 Ejemplo 24 (referencia)**Etapa 2. Pirólisis****3,7-bis-O-(trietilsilil)-9,10-dehidropotilona D mediante el xantato****(Compuesto (5); R = Me; P = Et₃Si; X = S)**

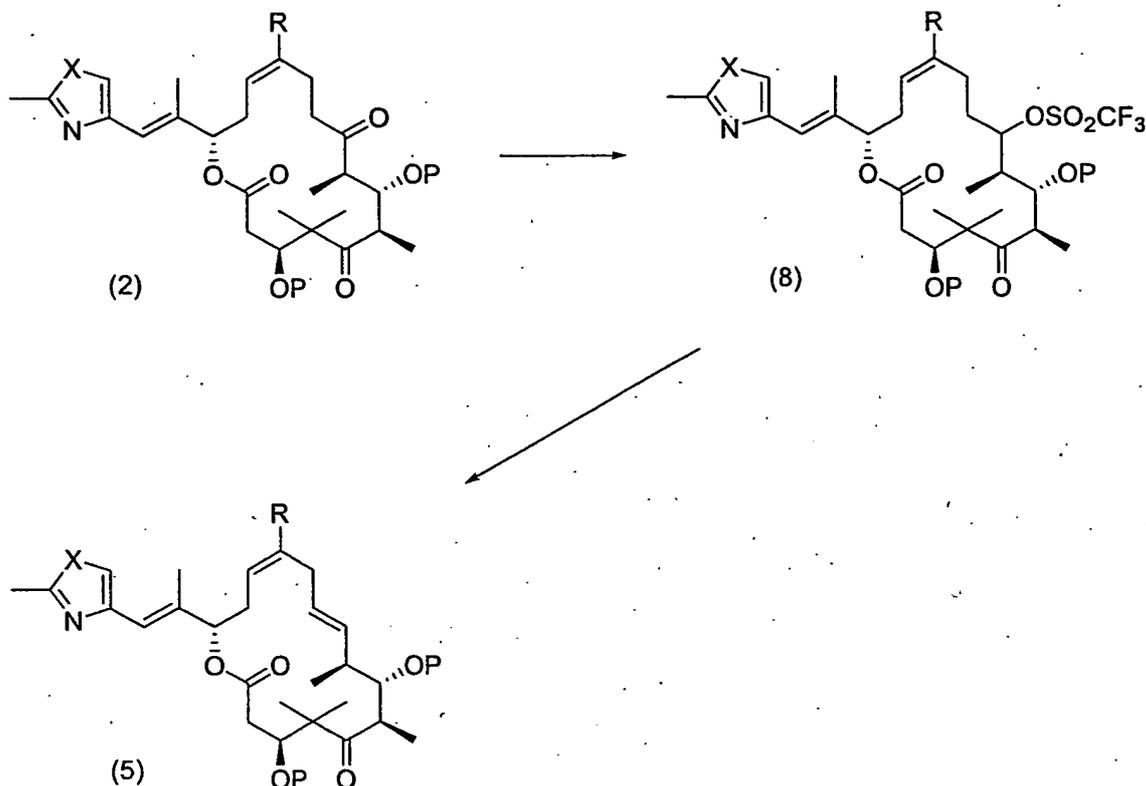
El compuesto 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-((metiltio)tiocarboniloxi)epotilona D se introduce en alto vacío (aprox. 0,01 kPa) y se calienta a 170 °C en el material de partida ha desaparecido determinado mediante análisis cromatográfico en capa fina. La reacción se enfría hasta la temperatura ambiente y el residuo se somete a cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo-hexanos) para aislar el producto.

Ejemplo 25 (referencia)**3,7-bis-O-(trietilsilil)-9,10-dehidropotilona D mediante el tiocarbamato****30 (Compuesto (5); R = Me; P = Et₃Si, X = S)**

El compuesto 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-((dimetilamino)tiocarbonilo)epotilona D se introduce en alto vacío (aprox. 0,01 kPa) y se calienta a 170 °C en el material de partida ha desaparecido por medio de determinación mediante análisis cromatográfico en capa fina. La reacción se enfría hasta la temperatura ambiente y el residuo se somete a cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo-hexanos) para aislar el producto.

5 Ejemplo 26

IV. Reducción de triflato de vinilo



3,7-bis-O-(trietilsilil)-9,10-dehidro-9-(trifluorometanosulfonilo) epotilona D

(Compuesto (8); R = Me; P = Et₃Si, X = S) (referencia)

- 10 A una solución de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-oxoepotilona D y 2,6-di-*tert*-butil-4-metilpiridina en diclorometano a 0 °C se añade gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico. Después de la finalización de la adición, la mezcla se deja calentar lentamente hasta la temperatura ambiente y se agita durante la noche. Se realiza un seguimiento de la reacción mediante cromatografía en capa fina y se añade anhídrido trifluorometanosulfónico adicional hasta que el material de partida se ha consumido. La mezcla se evapora y el residuo se combina con éter etílico. Las sales precipitadas se eliminan mediante filtración y la solución etérea se lava secuencialmente con agua, HCl 1N helado, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad.
- 15

Ejemplo 27 (referencia)

3,7-bis-O-(trietilsilil)-9,10-dehidro-9-(trifluorometanosulfonilo) epotilona D

(Compuesto (8); R = Me; P = Et₃Si; X = S)

- 20 A una solución de bis(trimetilsilil)amida sódica 1,0 M en THF a -78 °C se añade, gota a gota, una solución de 3,7-bis-O-(trietilsilil)-9-oxoepotilona D en THF. Después de la finalización de la adición, la mezcla se conserva durante 30 minutos a -78 °C y, gota a gota, se añade una solución de N-(5-cloro-2-piridil)triflimida (Organic Syntheses 74: 77-83 (1996)). La mezcla se conserva durante 2 horas, después se deja calentar lentamente hasta la temperatura ambiente. La mezcla se evapora y el residuo se combina con etiléter. La solución de éter se lava secuencialmente con agua, NaOH al 5 %
- 25 helado y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad.

Ejemplo 28 (referencia)

3,7-bis-O-(triethylsilyl)-9,10-dehidroepotilona D**(Compuesto (5); R = Me; P = Et₃Si; X = S)**

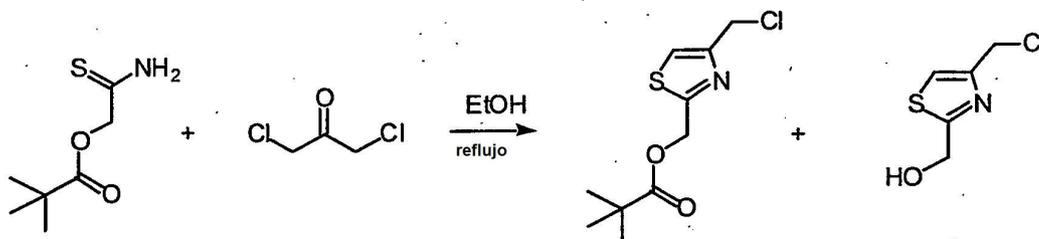
Una mezcla de 3,7-bis-O-(triethylsilyl)-9,10-dehidro-9-(trifluorometanosulfonilo) epotilona D, tributilamina, acetato de paladio y trifenilfosfina en dimetilformamida se coloca en atmósfera inerte y se desgasifica mediante rociado. Mediante jeringuilla se añade ácido fórmico y la mezcla se calienta a 60 °C durante 1 hora. La mezcla se enfría hasta la temperatura ambiente, se diluye en éter y se lava secuencialmente con agua, HCl 1 N helado, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora hasta sequedad. El residuo se somete a cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo-hexanos) para aislar el producto.

Ejemplo 34 (referencia)**(Compuesto (24); R = Me; X = S)**

Etapa 1. Reducción de cetona. Una solución del producto del ejemplo 32, etapa 3 en metanol se enfría hasta 0 °C y se trata con 1 equivalente de borohidruro sódico. La solución se agita a 0 °C durante 40 minutos antes de añadir NH₄Cl acuoso saturado. Las fases orgánicas se extraen con acetato de etilo y el extracto se seca, se filtra y se concentra hasta sequedad. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice.

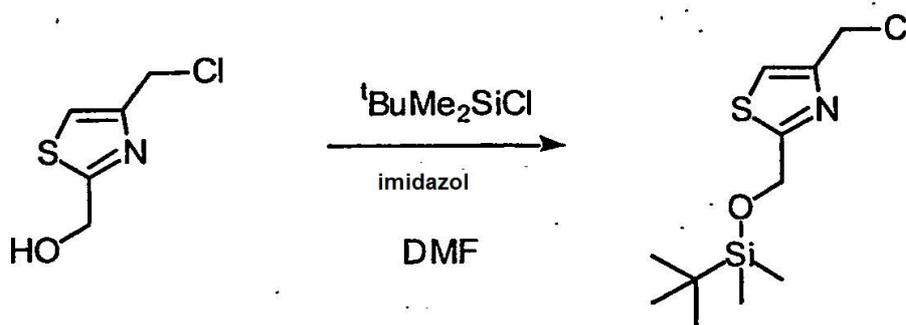
Etapa 2. Formación de xantato. Una solución del producto de la etapa 1 en THF se enfría hasta -78 °C y se trata con 1 equivalente de una solución 1,0M de bis(trimethylsilyl)amida sódica en THF. Después de 30 minutos se añade disulfuro de carbono y la mezcla se deja calentar hasta la temperatura ambiente. Después de 1 hora se añade yoduro de metilo y la reacción se deja progresar 12 horas, se vierte en NH₄Cl acuoso saturado y se extrae con acetato de etilo. El extracto se lava secuencialmente con agua, NaHCO₃ ac. sat. y salmuera, después se seca, se filtra y se evapora. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice.

Etapa 3. Eliminación pirolítica. El producto de la etapa 2 se coloca en alto vacío (aprox., 0,01 kPa) y se calienta a 150-200 °C hasta que el material de partida se ha consumido determinado mediante análisis TLC. La reacción se enfría hasta la temperatura ambiente y el residuo se somete a cromatografía en gel de sílice para aislar el producto.

Ejemplo 36**2-(pivaloiloximetil)-4-(clorometil)tiazol**

Una mezcla de 30 mmol de 1,3-dicloroacetona y 30 mmol de 2-(pivaloiloxi)tioacetamida se disolvió en 21 ml de alcohol absoluto y se sometió a reflujo durante la noche en nitrógeno. La mezcla resultante se concentró al vacío y el residuo se disolvió en 100 ml de agua. La solución acuosa resultante se neutralizó hasta un pH= 8 antes de extraer con éter (200 ml X 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó para dar un jarabe marrón. La cromatografía en gel de sílice (gradiente del 2 % al 10 % de acetona en hexano) dio 200 mg de 2-(pivaloiloximetil)-4-(clorometil)tiazol y 800 mg de 2-(hidroximetil)-4-(clorometil)tiazol.

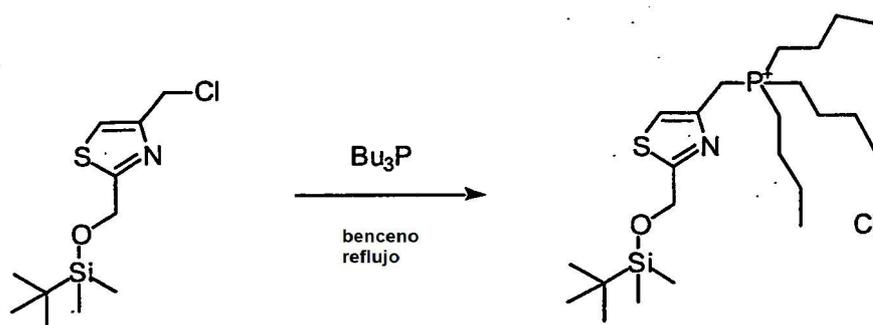
Ejemplo 37**2-(terc-butildimetilsililoximetil)-4-(clorometil)tiazol**



Una mezcla de 800 mg de (2-hidroximetil)-(4-clorometil)tiazol (4,89 mmol) y 1,33 g de imidazol (18,56 mmol) se disolvió en 10 ml de DMF. La solución resultante se enfrió hasta 0 °C antes de añadir 1,47 g de cloruro de *t*-butildimetilsililo (9,78 mmol) en porciones. La solución resultante se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y la reacción continuó durante otras 4 horas antes de inactivarla mediante la adición de 30 ml de solución de NaHCO₃ acuoso saturada. La mezcla resultante se extrajo con 50 ml X 2 de acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron secuencialmente con agua, 20 ml X 3, y salmuera. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó para dar un jarabe marrón. La cromatografía en gel de sílice (gradiente del 1 % al 10 % de acetona en hexano) dio 800 mg de 2-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-4-(clorometil)-tiazol.

10 Ejemplo 38

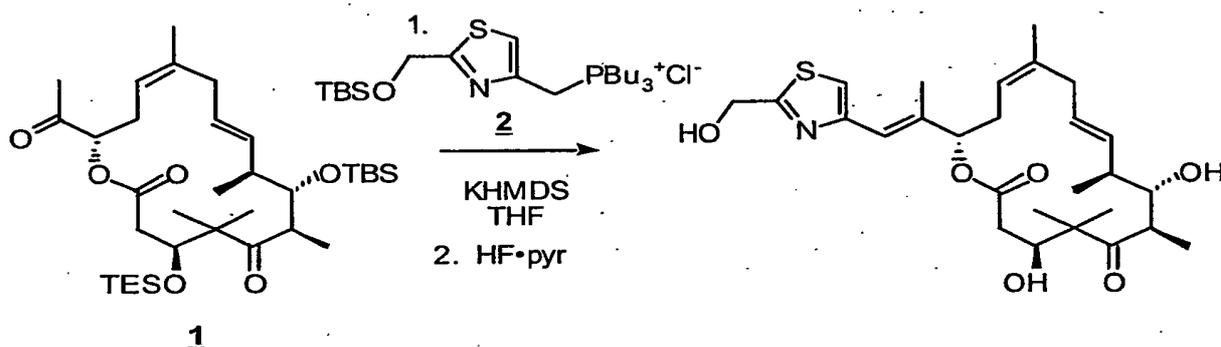
Cloruro de 2-(*tert*-butildimetilsililometil)-4-tiazolil]metil]tributilfosfonio



A una solución de 557,0 mg de 2-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-4-(clorometil)tiazol (2,0 mmol) en 3 ml de benceno se añadió, gota a gota, tri-*n*-butilfosfina en atmósfera de nitrógeno. La solución resultante se sometió a reflujo en nitrógeno durante la noche. A continuación, la solución se concentró al vacío y el residuo se cristalizó mediante la adición de una mezcla de 1:1 (v/v) de éter y hexano. Después se filtró el sólido, se lavó con una cantidad pequeña de hexano antes de secarse sobre vacío para proporcionar 800 mg de sal de fosfonio en forma de un sólido blanco.

Ejemplo 39

Preparación de 21-hidroxi-9,10-dehidro-epotilona D



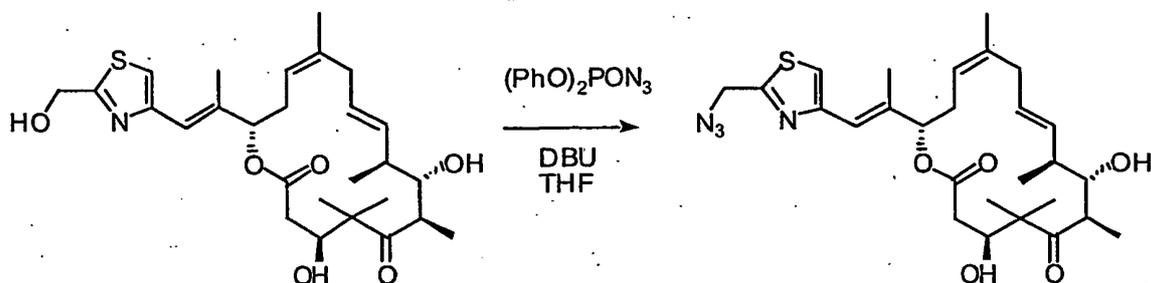
A una solución de cloruro de 2-(*tert*-butildimetilsililoxi)metiltiazol-4-il]metiltri-*n*-butilfosfonio (0,58 g) en 1 ml de

tetrahidrofurano (THF) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se añadió una solución 0,5 M de bis(trimetilsilil)amida potásica en tolueno (2,4 ml). La solución se dejó calentar hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, después se enfrió hasta $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una solución de la cetona 1 (128 mg). (A. Rivkin y col., J. Am. Chem. Soc. 2003 125: 2899-2901). La mezcla se dejó calentar hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, momento en el cual se juzgó que la reacción estaba completa mediante análisis cromatográfico en capa fina. La reacción se inactivó mediante la adición de cloruro amónico acuoso saturado y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice (20:1 hexanos/éter) para proporcionar 150 mg de producto protegido puro.

El producto protegido (150 mg) se disolvió en 3 ml de THF y se trató con fluoruro de hidrógeno-piridina (2 ml) a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante 1 hora y después se mantuvo durante 4 horas. Lentamente se añadió metoxitrimetilsilano (15 ml) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla se evaporó hasta sequedad y el residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice (de 3:1 a 1:1 de hexanos/acetona) para proporcionar 64 mg de 21-hidroxi-9,10-dehidroepotilona D pura.

Ejemplo 40

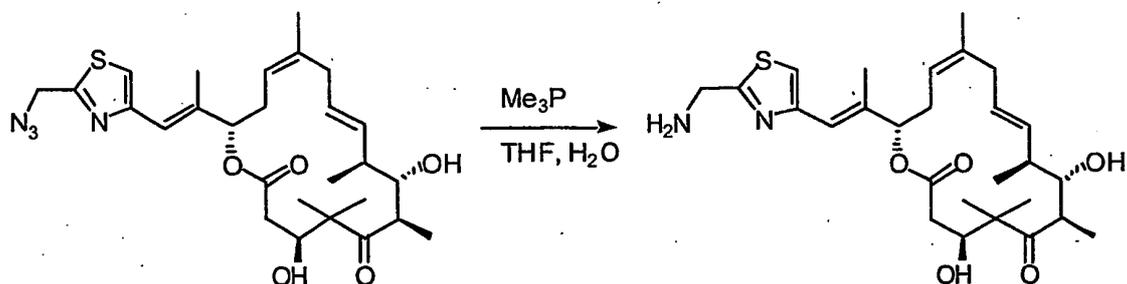
Preparación de 21-azido-9,10-dehidro-epotilona D



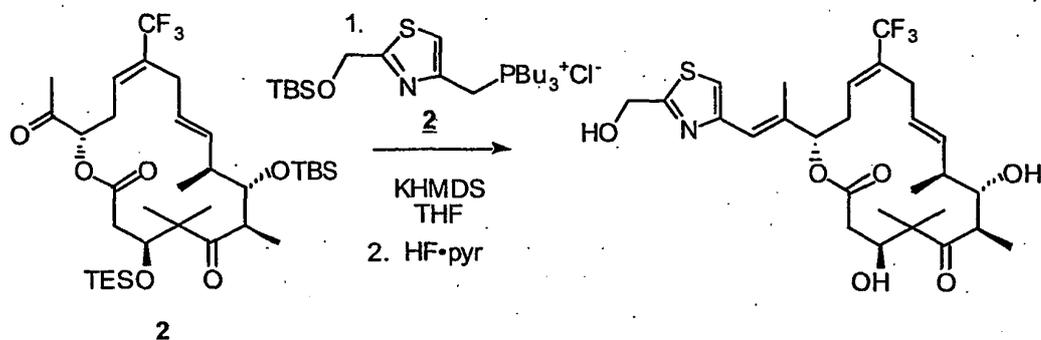
Una solución de 21-hidroxi-9,10-dehidroepotilona D (30 mg) en 1,5 ml de THF seco se enfrió hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se trató con fosforilazida de difenilo (15,3 μl) en 1 minuto. Después de 5 minutos, se añadió 1,8-diaza[5.4.0]bicycloundec-7-eno (DBU) (8,8 μl) y la reacción se agitó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, después se calentó hasta la temperatura ambiente. Después de 18 horas, el análisis cromatográfico en capa fina indicó la 21-hidroxi-9,10-dehidroepotilona D restante y la mezcla se enfrió hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se trató con la adición de fosforilazida de difenilo (2 μl). La mezcla se agitó 30 minutos adicionales a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La solución se vertió en 30 ml de acetato de etilo y se lavó con 2 x 10 ml de agua. Los lavados acuosos combinados se extrajeron con acetato de etilo (2 x 15 ml) y los extractos se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron. El material bruto se sometió a cromatografía en gel de sílice para proporcionar 9 mg de producto.

Ejemplo 41

Preparación de 21-amino-9,10-dehidro-epotilona D



Una solución de 21-azido-9,10-dehidroepotilona D (14 mg) y trimetilfosfina (33 μl de una solución 1M en THF) en 0,3 ml de THF se agitó durante 5 minutos, después se trató con 80 μl de agua y se agitó 3 horas adicionales. La mezcla se evaporó hasta sequedad y el residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice (10 % de metanol en cloroformo) para dar 8 mg de 21-amino-9,10-dehidroepotilona D. Masa exacta: calc.: Para $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (M+H) = 505,2731, obs. = 505.2719. RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 218,6, 172,8, 170,5, 152,4, 138,1, 137,3, 131,1, 129,8, 120,3, 119,4, 116,1, 78,2, 75,4, 71,5, 53,2, 44,6, 43,9, 40,0, 39,5, 34,8, 31,8, 23,5, 22,4, 19,2, 17,6, 15,8, 15,0.

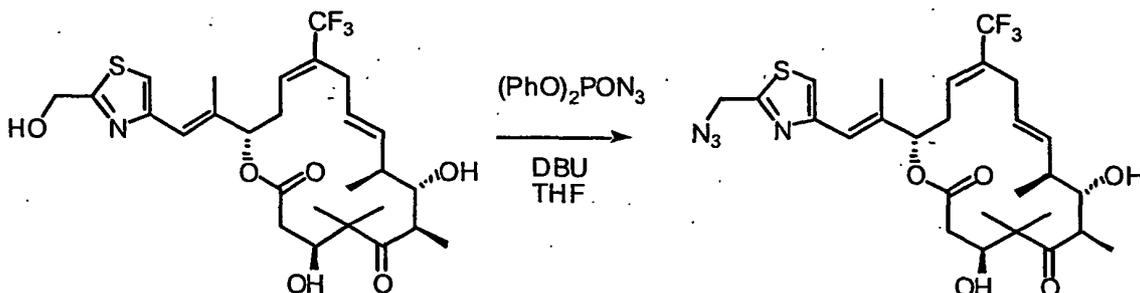
Ejemplo 42**Preparación de 21-hidroxi-9,10-dehidro-26-trifluoroepotilona D**

5 A una solución de cloruro de (2-(*tert*-butildimetilsililoxi)metiltiazol-4-il)metiltris-*n*-butilfosfonio (0,641 g) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF) a -30 °C se añadió gota a gota en 10 minutos una solución 0,5 M de bis(trimetilsilil)amida potásica en tolueno (1,5 ml). La solución se dejó calentar hasta 0 °C durante 40 minutos, después se enfrió hasta -70 °C y se añadió una solución de la cetona **3** (85 mg). (A. Rivkin y col., J. Am. Chem. Soc. 2003 125: 2899-2901) en 1 ml de THF gota a gota durante 10 minutos. Después de 20 minutos la mezcla se dejó calentar hasta -30 °C durante 1 hora. La reacción se inactivó mediante la adición de cloruro amónico acuoso saturado y se extrajo con acetato de etilo.

10 El extracto se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice, eluyendo secuencialmente con 0, 2, 4, 6 y 8 % de éter en heptanos para proporcionar 67 mg del producto protegido puro.

El producto protegido (67 mg) se disolvió en 1,5 ml de THF y se trató con fluoruro de hidrógeno-piridina (0,6 ml) a 0 °C. Después de 20 minutos, la reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, se mantuvo durante 3,5 horas, después se enfrió de nuevo a 0 °C. Lentamente se añadió metoxitrimetilsilano (6 ml) y la mezcla se llevó hasta la temperatura ambiente y se evaporó hasta llegar a un aceite. El aceite se sometió a cromatografía en gel de sílice (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 % de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar 21-hidroxi-9,10-dehidro-26-trifluoroepotilona D pura. CL/EM: $m/z = 560$ [M+H]

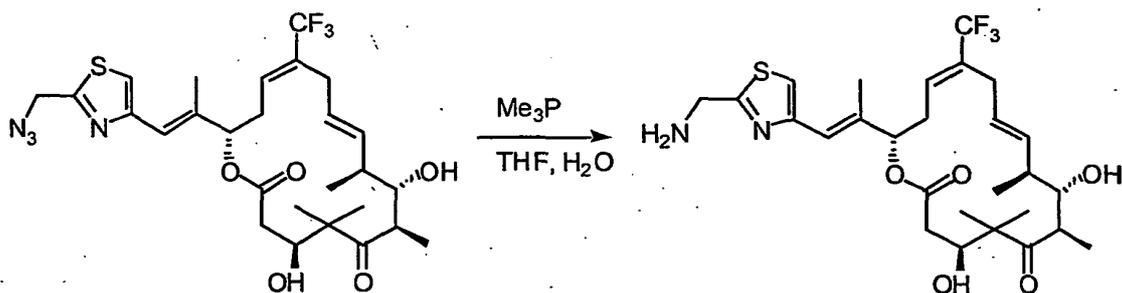
15

Ejemplo 43**20 Preparación de 21-azido-9,10-dehidro-26-trifluoroepotilona D**

Una solución de 21-hidroxi-9,10-dehidroepotilona D (20 mg) en 0,5 ml de THF seco se enfrió hasta 0 °C y se trató con fosforilazida de difenilo (10 μ l). Después de 5 minutos, se añadió 1,8-diaza[5.4.0]bicicoundec-7-eno (DBU) (5 μ l) y la reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se aplicó directamente a una columna de gel de sílice, que después se eluyó con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 % de acetato de etilo en hexanos para proporcionar el producto. EM: calc. para $C_{27}H_{38}N_4O_5S$ [M+H] = 530,2563; obs. 585,2797.

25

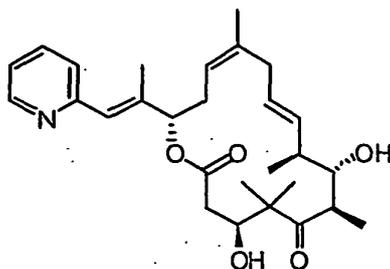
Ejemplo 44**Preparación de 21-amino-9,10-dehidro-26-trifluoroepotilona D**



- Una solución de 21-azido-9,10-dehidro-26-trifluoropentilona D (13 mg) se enfrió hasta 0 °C y se trató con trimetilfosfina (28 µl de una solución 1M en THF) en 0,5 ml de THF se agitó durante 5 minutos, después se trató con 100 µl de agua y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se aplicó directamente a una columna de gel de sílice, que después se eluyó con 0, 2, 4, 6, 8 y 10 % de metanol en diclorometano que contiene 1 % de trietilamina para proporcionar el producto. Una segunda cromatografía en gel de sílice, eluyendo con 0, 25, 50, 75 y 100 % de acetato de etilo en hexanos, seguida por 0, 2 y 5 % de metanol en diclorometano que contiene el 1 % de trietilamina proporcionó el producto puro. CL/EM: $m/z = 559$ [M+H]

Ejemplo 45

- 10 **17-des(2-metil-4-tiazolil)-17-(2-piridil)-9,10-dehidroepotilona D (KOSN 1632)**

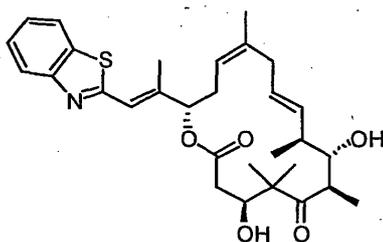


- El cloruro de (2-piridil)metiltri-*n*-butilfosfonio se preparó del siguiente modo. A una solución de 10 mmol de (clorometil)piridina en 15 ml de benceno se añadieron 10 mmol de tri-*n*-butilfosfina, gota a gota en nitrógeno. La solución resultante se sometió a reflujo durante 18 horas antes de enfriar hasta la temperatura ambiente. Después, la solución se concentró al vacío; se han tomado todas las medidas necesarias para reducir todo contacto con el aire. Se formó un sólido blanco mediante la adición de dietiléter al residuo. El licor madre se filtró y el sólido blanco se lavó varias veces con dietiléter en nitrógeno, después, el sólido se secó al vacío para dar un polvo blanco como producto final.

- La 17-des(2-metil-4-tiazolil)-17-(2-piridil)-9,10-dehidroepotilona D se preparó de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 42, sustituyendo el cloruro de (2-(*terc*-butildimetil-sililoxi)-metiltiazol-4-il)metiltri-*n*-butilfosfonio por cloruro de (2-piridil)metiltri-*n*-butilfosfonio y dejando que la reacción se calentara hasta -10 °C antes de inactivar. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 218,6, 170,6, 155,9, 149,0, 141,1, 137,4, 131,1, 129,8, 136,3, 125,2, 124,0, 121,4, 120,4, 77,9, 75,3, 71,4, 53,5, 44,5, 40,0, 39,6, 34,8, 31,9, 23,6, 22,7, 18,6, 17,3, 15,7, 14,8.

Ejemplo 47

- 25 **17-des(2-metil-4-tiazolil)-17-(2-benzotiazolil)-9,10-dehidroepotilona D (KOSN 1635)**



Se preparó de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 42, sustituyendo el cloruro de (2-(*tert*-butildimetil-sililoxi)-metiltiazol-4-il)metiltri-*n*-butil-fosfonio por cloruro de (2-benzotiazolil)metiltri-*n* butilfosfonio, y dejando que la reacción se calentara hasta la temperatura ambiente y se mantuvo durante 2 días antes de inactivar. RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 218,6, 170,4, 164,6, 152,7, 145,4, 137,9, 129,7, 129,8, 134,9, 126,4, 125,2, 122,8, 121,4, 119,8, 119,5, 77,6, 75,6, 71,8, 53,2, 44,8, 34,8, 40,1, 39,4, 34,8, 31,6, 23,5, 22,6, 19,3, 17,6, 16,9, 15,1.

Ejemplo 48

Datos de citotoxicidad

Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular de carcinoma de mama humano MCF-7, la línea celular de carcinoma de mama resistente a múltiples fármacos NCI/ADR se obtuvieron del National Cancer Institute. La línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana A549 y la línea celular de cáncer de ovario humano SKOV-3 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Gibco/BRL, Rockville, MD) suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM y FBS al 10 % (Hyclone, Logan, UT). Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C en 5 % de CO₂.

Ensayos de citotoxicidad

Las células tumorales se sembraron en 100 µl a 5000 (MCF-7), 7500 (NCI/ADR), 5000 (A549) Y 7500 (SKOV3) células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se dejaron adherir durante 24 horas. Cada compuesto de 0,001 a 1000 nM en 100 µl se añadió a las células en pocillos por duplicado. Después de 3 días, las células se fijaron a 4 °C durante 1 hora con 10 % de ácido tricloroacético y después se tiñeron con 0,2 % de sulforhodamina B (SRB)/1 % de ácido acético durante 20 minutos a temperatura ambiente. El pigmento no unido se eliminó mediante aclarado con 1 % de ácido acético y, después, la SRB unida se extrajo con 200 µl de base Tris 10 mM. La absorbancia se midió a 515 nm usando un lector de placas de microvaloración de 96 pocillos (Spectra Max 250, Molecular Devices). Los valores de CI₅₀ se calcularon usando un programa KaleidaGraph. Los experimentos se realizaron dos veces. Los resultados se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Análogo	MCF-7	NCI/ADR	A549	SKOV3
Epotilona D*	6,8	23	25	39
9,10-dehidroepotilona D*	2	6,2	4,7	6,2
21-OH 9,10-dehidroepotilona D	2,3	14	3,8	5,7
21-NH ₂ 9,10-dehidroepotilona D	3,2	25	5,9	5,7
26-trifluoro 9,10-dehidroepotilona D	5,3	33	11	22
21-OH 26-trifluoro 9,10-dehidroepotilona D	3,6	65	6,1	7,9
21-NH ₂ 26-trifluoro 9,10-dehidroepotilona D	9,7	330	35	40
17-des(2-metil-4-tiazolil)-17-(2-piridil)-9,10-dehidroepotilona D	0,87	4,6	3,3	4,4
17-des(2-metil-4-tiazolil)-17-(2-quinolil)-9,10-dehidroepotilona D*	8,9	24	25	19
17-des(2-metil-4-tiazolil)-17-(2-benzotiazolil)-9,10-dehidroepotilona D	1,1	5,6	4,2	3,4
* ejemplos comparativos				

Ejemplo 49

Análogos adicionales de 9,10-dehidroepotilona D

Siguiendo del procedimiento de los ejemplos 39 (cuando R= metilo) y 42 (cuando R= CF₃), los compuestos adicionales mostrados en la tabla 2 se prepararon sustituyendo el cloruro de (2-(*tert*-butildimetil-sililoxi) metiltiazol-4-il)metiltri-*n*-butil-fosfonio por el correspondiente cloruro de fosfonio. Los datos de citotoxicidad (Tabla 2) se obtuvieron tal como se describe en el ejemplo 48. Los datos de inhibición del citocromo P450 (Tabla 3) se obtuvieron usando el procedimiento

del índice inicial contra el sustrato BFC.

El cloruro de (4-metoxipiridin-2-il)metiltributilfosfonio se preparó del siguiente modo. A una solución de 770 mg (4,9 mmol) de 2-(clorometil)-4-metoxipiridina en 7 ml de benceno se añadieron 1,22 ml de tri-n-butilfosfina (4,9 mmol), gota a gota en nitrógeno. La solución resultante se sometió a reflujo durante 18 horas antes de enfriar hasta la temperatura ambiente. Después, la solución se concentró al vacío; se han tomado todas las medidas necesarias para reducir todo contacto con el aire. Se formó un sólido ligeramente amarillo mediante la adición de dietiléter al residuo. El licor madre se filtró y el sólido amarillo se lavó varias veces con dietiléter en nitrógeno, después, el sólido se secó al vacío para dar la sal de fosonio en forma de 1,2 g de polvo amarillo. El cloruro de (5-metil-isoxazol-3-il)metiltributil fosfonio se preparó del siguiente modo: El 3-(clorometil)-5-metil isoxazol (0,30 g, 2,28 mmol, 1 eq.) se disolvió en 6 ml de benceno en 100 ml de RBF secada en horno. Mediante jeringuilla se añadió tributilfosfina (0,57 ml, 2,28 mmol, 1 eq.) y la solución se sometió a reflujo durante 15 horas en una atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió hasta la temperatura ambiente y el volumen se redujo al vacío. Se añadió Et₂O para precipitar la sal de fosonio deseada. El sobrenadante de éter se decantó y el sólido blanco se secó al vacío durante la noche (0,760 g, rendimiento del 99 %).

Los datos de RMN ¹³C para compuestos seleccionados mostrados en la tabla 2 son los siguientes:

15 **KOSN 1703** RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 218,6, 170,5, 154,7, 147,3, 141,0, 137,1, 135,5, 134,4, 130,7, 129,8, 124,2, 123,7, 120,5, 77,7, 75,4, 70,8, 61,8, 53,7, 44,6, 39,7, 39,6, 34,8, 31,8, 23,5, 22,8, 18,1, 17,4, 15,9, 15,0.

KOSN 1727 RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 218,6, 170,5, 168,8, 152,3, 137,4, 131,2, 129,8, 120,3, 119,5, 130,7, 117,1, 78,2, 75,5, 71,7, 67,0, 59,9, 53,7, 53,1, 44,6, 40,1, 39,4, 34,8, 31,9, 23,5, 22,4, 19,4, 17,5, 15,9, 15,0.

20 **KOSN 1756** RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 218,6, 170,6, 165,9, 157,2, 150,1, 141,2, 137,3, 131,1, 129,8, 125,1, 120,5, 110,2, 107,5, 77,7, 75,2, 71,2, 55,1, 53,6, 44,4, 39,9, 39,6, 34,8, 31,9, 23,5, 22,9, 18,3, 17,3, 15,8, 14,7.

KOSN 1674 RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 218,3, 170,3, 144,6, 137,8, 135,9, 132,9, 129,8, 131,0, 129,8, 127,8, 124,3, 119,8, 119,4, 118,8, 110,0, 75,9, 75,4, 71,6, 53,4, 44,7, 39,9, 39,5, 34,9, 31,6, 23,6, 22,7, 18,6, 17,3, 15,0, 14,5.

KOSN 1724: RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 218,6, 170,3, 168,9, 159,9, 142,9, 137,6, 129,6, 131,1, 129,8, 119,9, 113,6, 102,1, 77,7, 75,5, 71,7, 53,0, 44,7, 40,0, 39,4, 34,8, 31,6, 23,4, 22,2, 19,4, 17,5, 16,1, 15,0, 12,1.

25 **KOSN 1673** RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 218,2, 170,0, 155,5, 149,0, 139,4, 136,4, 132,1, 130,2, 129,8, 127,6, 125,6, 124,1, 121,6, 76,2, 75,0, 70,8, 53,8, 39,1, 44,7, 39,5, 39,1, 30,8, 28,4, 22,6, 17,6, 17,4, 15,7, 14,8.

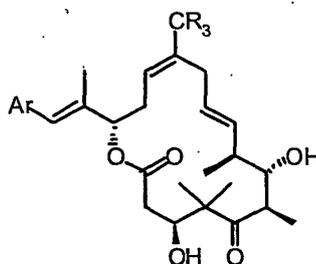
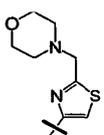
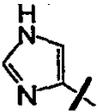
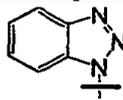
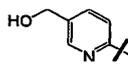
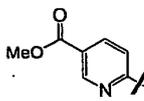
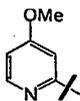


Tabla 2

ID del compuesto	Ar	R	Cl ₅₀ (nM)			
			MCF-7	NCL/ADR	A549	Skov
KOSN-1727		H	390	410	420	490

(continuación)

			Cl ₅₀ (nM)			
KOSN-1712		H	20	220	31	37
KOSN-1759		H	36	61	42	51
KOSN-1724		H	2,5	6,1	5,3	5,3
KOSN-1674		H	34	180	42	50
KOSN-1690		H	35	110	38	39
KOSN-1697		H	57	320	350	300
KOSN-1703		H	0,61	7,1	2,4	4,5
KOSN-1765		H	44	360	350	220
KOSN-1756		H	2,1	4,9	4	4
KOSN-1673		F	4,3	19	15	9,6

Ejemplo 50**Parámetros farmacológicos**

5 Las mediciones de la inhibición del citocromo P450 se realizaron usando un kit comercialmente disponible (BD GenTest, Woburn, MA), usando BFC como sustrato contra CYP3A4. Los valores de CI_{50} en micromoles obtenidos de este modo se indican en la tabla 3.

Tabla 3

Compuesto	CI_{50} (nM)		
	CYP3A4	CYP2C9	CYP2C19
Epotilona D*	2,4	9-12	1,6-3,4
<i>Trans</i> -9,10-dehidroepotilona D*	1,6	10,8	2
21-OH-26-F ₃ - <i>trans</i> -9,10-dehidroepotilona D	1	17,3	20,5
21-NH ₂ - <i>trans</i> -9,10-dehidroepotilona D	0,61	0,83	0,63
26-F ₃ - <i>trans</i> -9,10-dehidroepotilona D	2	14,4	3,2
21-OH- <i>trans</i> -9,10-dehidroepotilona D	0,8	22	5,6
KOSN 1635	3,12	4,1	3,27
KOSN 1632	2,52	15	3,05
KOSN 1673	3,5	9	4,7
KOSN 1703	6	4	10,2
KOSN 1756	4,8	7,1	1,9
KOSN 1724	7,1	12,9	10,9
* ejemplos comparativos			

10 La solubilidad del compuesto se determinó del siguiente modo: A 95 μ l de solución salina tamponada con fosfato se añadieron 5 μ l de la solución madre (a 20 mg/ml en DMSO). Después de agitar en vórtex durante aproximadamente 10 segundos, la solución/suspensión se filtró a través de un filtro de 0,45 micrómetros y la cantidad de analito se cuantificó mediante HPLC. Las solubilidades (mg/ml) determinadas fueron las siguientes: epotilona D, <0,06; *trans*-9,10-dehidroepotilona D, <0,06; 21-OH-26-F₃-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, 0,1; 21-amino-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, >0,6; 21-amino-26-F₃-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, >0,6; 26-F₃-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, <0,06; 21-OH-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, 0,1; KOSN 1635, <0,02; KOSN 1632, 0,12.

15 Las semividas de los compuestos en plasma fresco humano y de ratón se determinaron mediante disolución de los compuestos en DMSO y añadiendo partes alícuotas a las muestras de plasma de ratón o humano. En el tiempo cero se tomaron partes alícuotas de 75 μ l de cada muestra y se añadieron 150 μ l de acetonitrilo. El precipitado blanco se centrifugó a 13500 rpm durante 3 minutos. Todo el sobrenadante transparente se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y se repitió la etapa de centrifugación (13500 rpm/3 minutos). Se pipetearon cuidadosamente 150 μ l del sobrenadante transparente en tubos para muestras de HPLC marcados y se intentó evitar pipetear los precipitados de proteínas. Las muestras se analizaron mediante HPLC para medir el resto del compuesto en cada punto de tiempo mediante comparación con patrones auténticos. Se determinó que las semividas (minutos) en plasma de ratón y humano, respectivamente, eran: epotilona D: 49, >1440; 21-OH-26-F₃-*trans*-9,10 dehidroepotilona D: 379, >1440; 21-amino-*trans*-9,10-dehidroepotilona D: 59, >1440; 26-F₃-*trans*-9,10-dehidroepotilona D: 163, >1440; 21-OH-*trans*-9,10-dehidroepotilona D: 1059, >1440; KOSN 1635: 58, >1440; KOSN 1632: 28, >1440. Usando plasma congelado de ratón, la *trans*-9,10 dehidroepotilona D tenía una semivida de 47 minutos. En plasma fresco humano, la *trans*-9,10 dehidroepotilona D tenía una semivida > 1440 min.

30 Se realizaron estudios de unión de proteína plasmática del siguiente modo. Los compuestos se disolvieron en DMSO, después se diluyeron en muestras frescas o descongeladas de plasma de ratón o humano y se incubaron a 37 °C. En puntos de tiempo de 50 μ l se mezclaron con 100 μ l de acetonitrilo y se centrifugaron a ~ 14000 rpm durante 3 minutos.

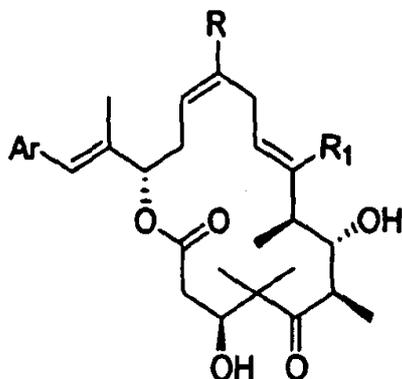
5 Se extrajo una alícuota de 100 µl del sobrenadante y se apartó para analizar para indicar el compuesto en la fracción total. El sobrenadante restante se transfirió a un dispositivo de ultrafiltración Microcon equipado con una membrana YM10 y se centrifugó para separar el material unido a proteínas. Una alícuota de 50 µl del filtrado sin proteínas se mezcló con 100 µl de acetonitrilo, se centrifugó a ~ 14000 rpm durante 3 minutos, después se recogieron 100 µl del sobrenadante y se analizaron para determinar la cantidad de compuesto no unido a proteínas. La cantidad de compuesto en la muestra total y en la fracción sin proteínas se determinó mediante análisis HPLC contra patrones auténticos.

10 Estos estudios de unión a proteínas plasmáticas indicaron los porcentajes siguientes de compuesto unido a proteína: eptilona D: 98,5 %; *trans*-9,10-dehidroepotilona D, 96,6 %; 26-trifluoro-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, 96,5 %; 21-amino-*trans*-9,10-dehidro-epotilona D, 89,5 %; 21-OH-26-F₃-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, 92,8 %; 21-OH-*trans*-9,10-dehidroepotilona D, 94,2 %; KOSN 1635, 99,7 %; KOSN 1632, 89,4 %.

Aunque se ha ilustrado y descrito la realización preferente de la invención, se apreciará que se pueden realizar varios cambios a la misma sin desviarse del ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) siguiente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

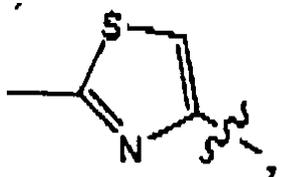


(I)

- 5 en la que R es H, alquilo C₁-C₄ o alquilo C₁-C₄ sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, hidroxilo, amino y azido;

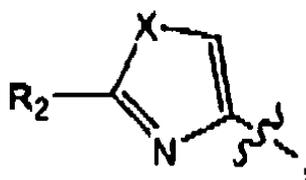
R₁ es H, alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄, en el que el alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄ están sustituidos o no sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de halo, hidroxilo, amino y azido; y

- 10 Ar es tiazolilo, imidazolilo, piridilo, benzotiazolilo, oxadiazolilo o benzotriazolilo, y está no sustituido o está monosustituido o disustituido con sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, halo, ciano, oxo, =N-alquilo C₁-4, =N-alcoxi C₁-4, amino, alquilamino, dialquilamino, acilaminoalquilo, alcoxi, tioalcoxi, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo o haloalquilo; con la condición de que cuando R es metilo o trifluorometilo y Ar es



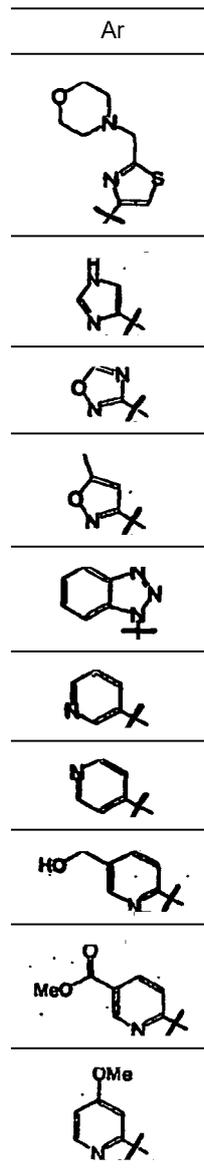
entonces R₁ no es H.

- 15 2. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que Ar es

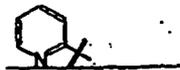


en la que X es S y R₂ es H o alquilo C₁-C₄ sustituido o no sustituido.

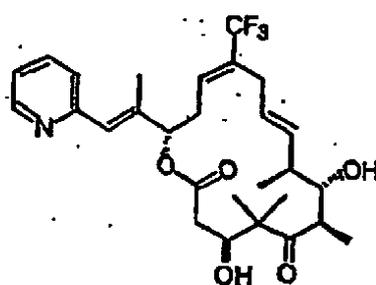
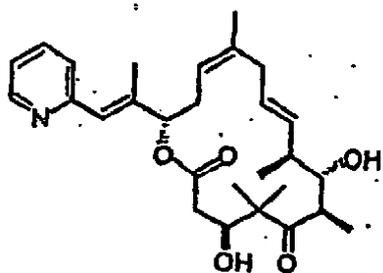
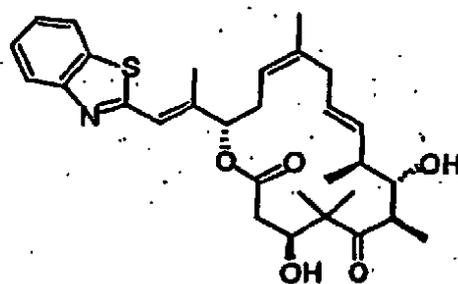
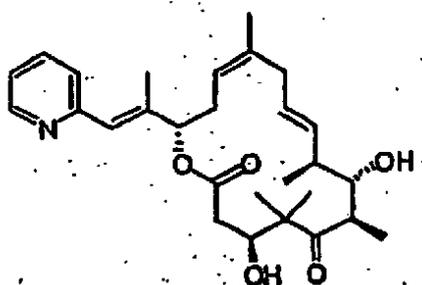
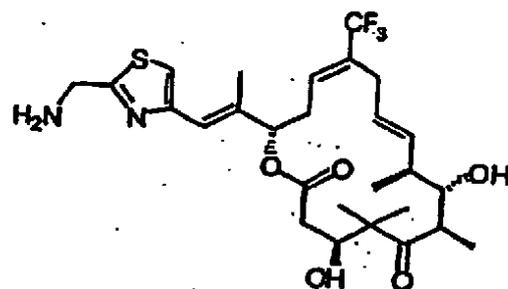
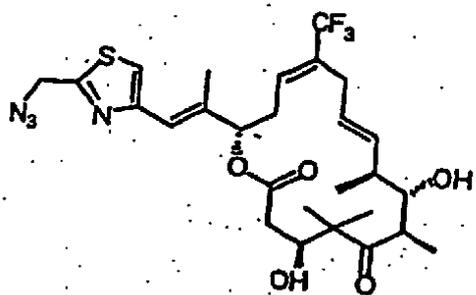
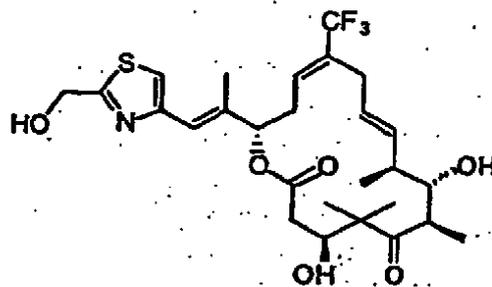
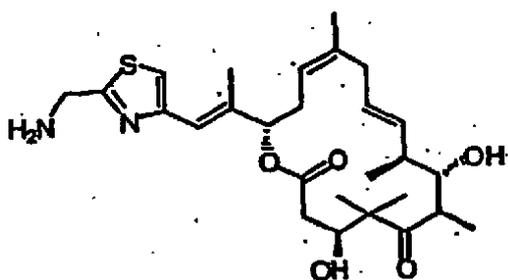
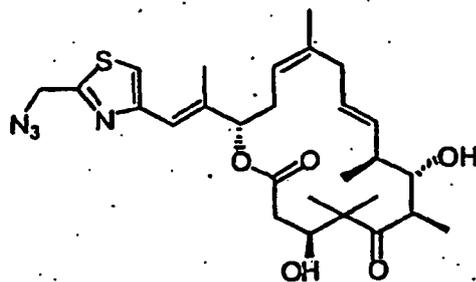
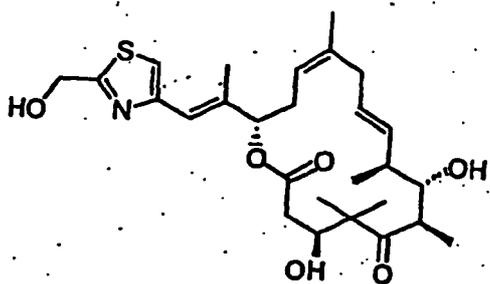
3. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que R es metilo o trifluorometilo.
4. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ es alquilo C₁-C₄ sustituido con uno o más grupos seleccionados de forma independiente de halo, hidroxilo, amino y azido.
5. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que Ar es opcionalmente 2-piridilo sustituido.
6. Un compuesto de la reivindicación, en el que R₁ es H, R es CH₃ y Ar es:

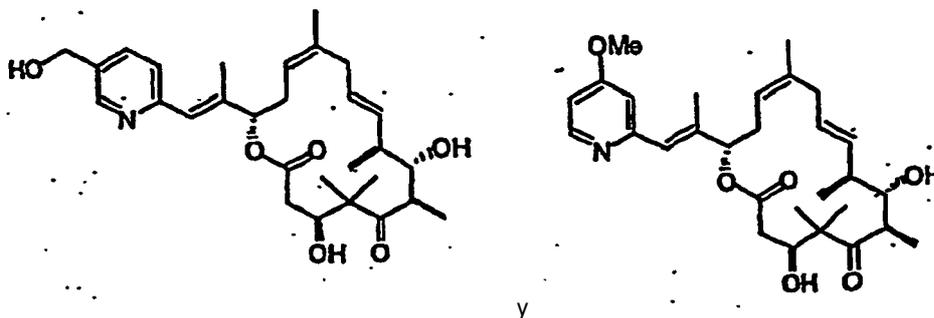


o R₁ es H, R es CH₃ y Ar es



7. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:





8. Una composición que comprende una cantidad de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 eficaz para reducir la hiperproliferación celular en un sujeto humano o animal cuando se administra al mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 9. Una composición de la reivindicación 8, que comprende uno o más agentes activos además del compuesto de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como producto farmacéutico.
11. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.
- 10 12. Un compuestos para el uso de la reivindicación 11, en el que la enfermedad hiperproliferativa es seleccionada de cáncer, psoriasis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, aterosclerosis y reestenosis.
13. Un compuestos para el uso de la reivindicación 11, en el que la enfermedad hiperproliferativa es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

15