

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 901**

51 Int. Cl.:

A61K 31/385	(2006.01)	C07D 339/08	(2006.01)
C07C 323/52	(2006.01)	C07D 409/04	(2006.01)
C07C 323/56	(2006.01)	C07D 495/04	(2006.01)
C07C 323/60	(2006.01)	C07D 519/00	(2006.01)
C07C 327/32	(2006.01)	C07F 17/02	(2006.01)
C07D 207/34	(2006.01)		
C07D 213/64	(2006.01)		
C07D 213/70	(2006.01)		
C07D 213/81	(2006.01)		
C07D 277/74	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2008 E 08754909 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2139321**

54 Título: **Derivados de ácido lipoico**

30 Prioridad:

18.04.2007 US 912598 P

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

14.02.2014

73 Titular/es:

**CORNERSTONE PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
1 DUNCAN DRIVE
CRANBURY, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

**BINGHAM, PAUL;
KWOK, TOM y
ZACHAR, ZUZANA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 442 901 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

Derivados de ácido lipoico

Antecedentes de la invención

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a derivados de ácido lipoico o sales de los mismos que destruyen, de forma selectiva, células tumorales alterando el metabolismo de las células cancerosas y las vías de transducción de señal relacionadas con el efecto Warburg, así como a procedimientos para tratar a un sujeto con dichos derivados de ácido lipoico.

10

Técnica anterior relacionada

Todas las células de mamífero requieren energía para vivir y crecer. Las células obtienen esta energía metabolizando las moléculas de alimento mediante el metabolismo oxidativo. La gran mayoría de las células normales usan una única vía metabólica para metabolizar su alimento. La primera etapa en esta vía metabólica es la degradación parcial de moléculas de glucosa en piruvato en un procedimiento conocido como glucólisis, que da dos unidades de ATP. La glucólisis se puede producir incluso en condiciones de hipoxia. El piruvato se degrada adicionalmente en la mitocondria mediante un proceso conocido como el ciclo del ácido tricarbóxico (ATC) para producir treinta y seis unidades de ATP por molécula de glucosa, agua y dióxido de carbono. El ciclo del ATC requiere oxígeno. Durante periodos de niveles de oxígeno reducidos, las células normales se adaptan mediante diversos mecanismos y retornan al metabolismo normal cuando se restablecen los niveles de oxígeno. Un vínculo crucial entre la glucólisis y el ciclo de los ATC es una enzima conocida como piruvato deshidrogenasa ("PDH"). La PDH es parte de un complejo de múltiples subunidades más grande (en lo sucesivo "PDC"). La PDH, junto con otras enzimas del complejo PDC, produce acetil CoA que canaliza de forma eficaz el piruvato producido en la glucólisis al ciclo del ATC.

15

20

25

30

35

40

La mayoría de los cánceres muestran una perturbación profunda del metabolismo de la energía. Uno de los cambios fundamentales es la adopción del efecto Warburg, en el que la glucólisis se convierte en la principal fuente de ATP. Tras una generación reducida de ATC se produce un déficit de ATP. En otras palabras, las células cancerosas se comportan como si estuvieran hipóxicas incluso cuando no lo están. Este cambio en el metabolismo de la energía representa una de las correlaciones más sólidas y bien documentadas de la transformación maligna y se ha vinculado con otros cambios resultantes en el crecimiento y metástasis tumoral. Dados los reducidos niveles de ATP disponibles como resultado de la glicólisis desvinculada en gran medida del ciclo de ATC, las células cancerosas aumentan su captación de glucosa y su conversión en piruvato en un intento de compensar el déficit de energía. El exceso de piruvato y otros subproductos metabólicos de la bioquímica de Warburg se debe gestionar. Se sabe que una serie de estos metabolitos son citotóxicos, por ejemplo el acetaldehído. El PDC en el cáncer, junto con otras enzimas relacionadas, desempeña un papel importante en el tratamiento y/o destoxificación del exceso de piruvato y metabolitos. Por ejemplo, la unión de dos moléculas de acetilo para formar el complejo neutro acetoína. Esta generación de acetoína es catalizada por una forma específica del tumor de PDC.

45

50

Se ha sugerido que el ácido lipoico actúa como cofactor con el PDC y la lipoamida relacionada usando enzimas en la destoxificación de estos metabolitos que, en caso contrario, serían tóxicos. Si el ácido lipoico lo fabrican las células sanas y cancerosas o si es un nutriente esencial o no se debate en la literatura y ambas situaciones pueden ser ciertas. Los genes requeridos para producir ácido lipoico se han identificado en células de mamífero. No se sabe si las bombas mitocondriales o los mecanismos de captación están presentes en las células sanas o cancerosas o si difieren en distintos tejidos. Aunque el ciclo del ATC sigue funcionando en las células cancerosas, el ciclo del ATC en las células tumorales es un ciclo variante que depende de la glutamina como principal fuente de energía. La inhibición o inactivación del PDC específico de tumor y enzimas relacionadas que destoxifican metabolitos pueden estimular la apoptosis o necrosis y la muerte celular.

55

60

A pesar del extenso trabajo que caracteriza los cambios altamente conservados entre diversos tipos tumorales y su metabolismo, los cambios siguen explotándose con éxito como diana para la quimioterapia cancerosa. Dado que el cáncer sigue siendo la segunda causa de muerte en americanos, existe una urgente necesidad de nuevos abordajes del tratamiento de la enfermedad. Se ha sugerido que el ácido lipoico, debido a sus propiedades de potencial redox, puede ser útil en el tratamiento de diversas enfermedades que afectan a la función de las mitocondrias, como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer. Estos informes enseñan que la disponibilidad del desplazamiento redox de SH a S-S se mantiene para obtener el efecto deseado.

65

Las patentes de EE.UU. números 6.331,559 y 6.951,887 divulgan una clase nueva de agentes terapéuticos que se dirigen a y destruyen selectivamente las células tumorales y otros tipos determinados de células enfermas. Adicionalmente, estas patentes divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un derivado de ácido lipoico de acuerdo con la presente invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los presentes inventores han descubierto ahora derivados de ácido lipoico adicionales más allá del alcance de las patentes mencionadas anteriormente.

El documento WO 00/24734 A1 se refiere a un derivado de ácido lipoico que se dirige a y destruye selectivamente células tumorales y otros tipos de células enfermas determinados y a composiciones que comprenden derivados de ácido lipoico que poseen el complejo de la piruvato deshidrogenasa específicamente en dichas células.

5 Satoh et al: "Simultaneous determination of alpha-lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications, Elsevier, Amsterdam, vol. 854, nº 1 - 2, 13 de abril de 2007 (2007 - 04 - 13), páginas 109 - 115, divulgan cómo determinar de forma simultánea ácido α -lipoico (LA) y DHLA (la forma reducida del LA) llevando a cabo una HPLC con detección con fluorescencia.

10 HYK W et al: "The extreme migrational enhancement of faradaic current at microelectrodes: experimental studies on sodium (6,8-diferrocenylmethylthio)octanoate electrooxidation", Amsterdam, NL, vol. 575, nº. 2, 1 de febrero de 2005 (2005 - 02 - 01), páginas 321 - 328, se refiere al comportamiento electroquímico inusual del 6,8-diferrocenilmetilthio)octanoato de sodio en soluciones acuosas.

15 El documento US 6.117.02 A se refiere a derivados de ácido 6,8-dimercaptooctanoico sustituidos en la posición 6-S y/o 8-S con el radical 3-metiltiopropanoilo.

20 El documento US 6.605,637 B1 se refiere a nuevos derivados de ácido lipoico que tienen una acción inhibitoria con respecto a las enzimas NO-sintasa productoras de monóxido de nitrógeno NO y/o son agentes que permiten la regeneración de antioxidantes o entidades que atrapan especies de oxígeno reactivas (ROS) e intervienen de un modo más general en el estado redox de los grupos tiol.

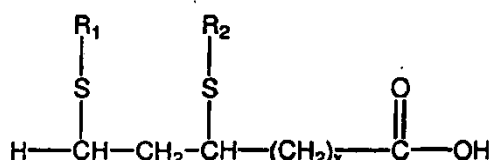
Sumario de la invención

25 En un primer aspecto, la presente invención está dirigida a un derivado de ácido lipoico de acuerdo con la reivindicación 1.

30 Además, la presente invención también está dirigida a una formulación farmacéutica que comprende el derivado de ácido lipoico del primer aspecto de acuerdo con la reivindicación 2 y al uso del derivado de ácido lipoico de acuerdo con la reivindicación 5. Realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada

35 La presente invención se refiere a derivados de ácido lipoico que son eficaces para dirigirse a y destruir células tumorales. En consecuencia, en una primera realización, la presente invención se refiere a un derivado de ácido lipoico que tiene la fórmula (I):

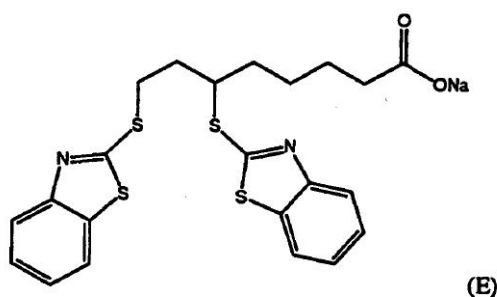
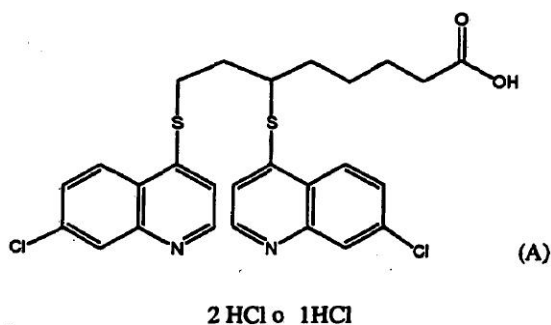


40 donde R_1 y R_2 se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en acilo definido como $R_3C(O)$, heteroarilo, imidoilo definido como $R_4C(=NH)$ -, arilo organometálico y alquil-arilo organometálico; donde R_1 y R_2 como se ha definido con anterioridad están insustituidos y sustituidos.

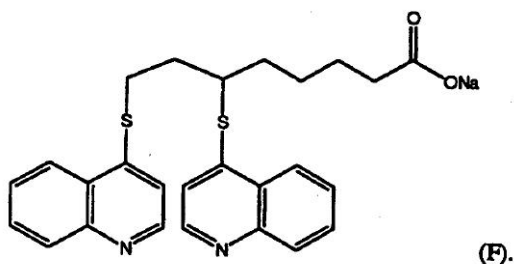
45 donde R_3 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, alquilarilo, heteroarilo, alquilheteroarilo y arilo organometálico, cualquiera de los cuales puede estar sustituido o insustituido;

donde R_4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, heteroarilo y alquilheteroarilo, cualquiera de los cuales puede estar sustituido o insustituido; y donde x es 0 - 16;

50 o una sal del mismo, caracterizado porque el derivado de ácido lipoico se selecciona del grupo que consiste en:



y



5 Una realización adicional de la presente invención está dirigida a una formulación farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un derivado de ácido lipoico de una cualquiera de las realizaciones expuestas anteriormente (en lo que antecede) y (b) al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable.

10 Normalmente, el al menos un derivado de ácido lipoico está presente en una formulación farmacéutica de la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. La formulación farmacéutica de la presente invención puede contener una única dosis o varias dosis del derivado de ácido lipoico. Con una "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir la cantidad de un derivado de ácido lipoico que, cuando se administra a un sujeto que lo necesita, es suficiente para efectuar el tratamiento para (o prevenir) enfermedades caracterizadas por células enfermas que son sensibles a derivados de ácido lipoico. La cantidad de un derivado de ácido lipoico dado que será terapéuticamente eficaz variará en función de factores tales como la afección y la gravedad de la misma, la identidad del sujeto que lo necesite etc., cantidad que expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria. Es importante el hecho de que la cantidad de derivado de ácido lipoico en una sola dosis será suficiente para inhibir o destruir células tumorales sin dañar sustancialmente a las células normales. El al menos un derivado de ácido lipoico está presente, preferentemente, en una formulación farmacéutica de la presente invención en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,001 mg/m² a aproximadamente 10 g/m², más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/m² a aproximadamente 5 g/m², todavía más preferentemente de aproximadamente 0,25 mg/m² a aproximadamente 3 g/m², y lo más preferentemente de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m² del al menos un derivado de ácido lipoico por dosis.

25 Aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados para usar en la presente invención incluyen, sin limitaciones, disolventes, diluyentes, tensioactivos, solubilizantes, conservantes, tampones y combinaciones de los mismos, así como cualquier otro aditivo particularmente adecuado para uso en formas de administración parenteral. Está en la experiencia de un experto en la técnica determinar cantidades adecuadas de estos aditivos farmacéuticamente

aceptables. Disolventes particularmente adecuados para usar en el presente documento incluyen alcohol bencílico, dimetilamina, alcohol isopropílico y combinaciones de los mismos; un experto en la técnica reconocerá fácilmente que puede ser deseable disolver primero el al menos un derivado de ácido lipoico en un disolvente adecuado y después diluir la solución con un diluyente.

5 Cuando se desea una formulación farmacéutica adecuada para, por ejemplo administración intravenosa se utilizará un diluyente adecuado. Cualquier disolvente aprótico polar o acuoso convencional es adecuado para usar en la presente invención. Diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, entre otros, solución salina, una
10 solución de azúcar, alcoholes tales como alcohol etílico, metanol y alcohol isopropílico, disolventes apróticos polares tales como dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA) y combinaciones de los mismos. Un diluyente farmacéuticamente preferido es una solución de dextrosa, más preferentemente una solución de dextrosa que contiene de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 10%, más preferentemente de aproximadamente 5% de dextrosa en peso. El Un diluyente farmacéuticamente normalmente se usa en una cantidad no generadora de homolisis; un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad de diluyente
15 adecuado para usar en una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención,

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con técnicas de formulación convencionales. Por ejemplo, una solución madre del al menos un derivado de ácido lipoico se puede preparar de acuerdo con técnicas convencionales y después se puede diluir según se desee con un diluyente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de los derivados e ácido lipoico de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los detalles expuestos en la solicitud provisional de EE.UU. pendiente de tramitación nº 60/912.605, presentada el 18 de abril de 2007 [Nº de expediente del mandatario 03459,000100.PV] y la correspondiente solicitud de patente de EE.UU. pendiente de tramitación nº xx/xxx,xxx, presentada el xx de abril de 2008, cuya divulgación se incorpora por referencia en el presente documento.

25 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son preparaciones líquidas tales como soluciones parenterales estériles. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar contenidas en cualquier vaso adecuado, tal como un vial o ampolla y son adecuadas para administración mediante una de varias vías, incluyendo, sin limitaciones, las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intratorácica, intrapleural, intrauterina o intratumoral.

Realizaciones adicionales de la invención están dirigidas a formulaciones farmacéuticas que son adecuadas para los tipos de administración aparte de los indicados anteriormente, por ejemplo y sin limitaciones, las vías oral, nasal, tópica, transdérmica y rectal. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar cualquier forma farmacéutica reconocible por el experto en la técnica como adecuada. Formas farmacéuticas adecuadas incluyen formulaciones sólidas, semisólidas, líquidas o liofilizadas, tales como comprimidos, polvos, cápsulas, supositorios, suspensiones, liposomas y aerosoles.

40 Una realización adicional de la invención está dirigida a un derivado de ácido lipoico como se ha definido anteriormente para usar en la invención o al tratamiento de una enfermedad caracterizada por células enfermas que son sensibles a derivados de ácido lipoico. En general, el tratamiento comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un derivado de ácido lipoico de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, el al menos un derivado de ácido lipoico se incorpora en una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención. La invención también comprende prevenir una enfermedad caracterizada por
45 células enfermas que son sensibles a derivados de ácido lipoico que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un derivado de ácido lipoico de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, el al menos un derivado de ácido lipoico se incorpora en una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

50 De acuerdo con los procedimientos de tratamiento y prevención, los derivados de ácido lipoico y las formulaciones farmacéuticas de los derivados de ácido lipoico de la presente invención se pueden usar para prevenir o inhibir enfermedades que implican actividad del PDC celular alterada o distinta, es decir enfermedades caracterizadas por células enfermas que son sensibles a derivados de ácido lipoico. Particularmente están dirigidos a y destruyen las células con un metabolismo energético adecuadamente alterado o desorganizado, es decir actividad alterada de
55 PDC, mientras que el derivado de ácido lipoico no daña a los tejidos sanos adyacentes. El experto en la técnica puede identificar fácilmente enfermedades que tienen la actividad de PDC alterada. Como alternativa, el experto en la técnica puede detectar selectivamente la enfermedad de interés según su sensibilidad a los derivados de ácido lipoico.

60 En realizaciones preferidas de los procedimientos de la presente invención, la enfermedad tratada o prevenida incluye cáncer, tal como carcinoma, sarcoma, mieloma, linfoma, leucemia y tipos mixtos de los mismos. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son eficaces contra cánceres primarios y metastáticos y eficaces contra cánceres de, sin limitaciones, pulmón, hígado, útero, cerviz, vejiga urinaria, riñón, colon, mama, próstata, ovarios y páncreas. En otras realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades asociadas con un metabolismo de la energía alterado, tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedades hiperproliferativas tales como psoriasis y otras enfermedades tales como
65

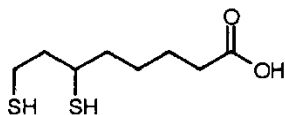
neuropatía diabética.

Para aplicaciones terapéuticas, un derivado de ácido lipoico o una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención se administra directamente a un paciente, normalmente en una forma de dosificación unitaria. En los procedimientos de la presente invención, el derivado de ácido lipoico o formulación farmacéutica que comprende el derivado de ácido lipoico se puede administrar por varias vías, incluyendo, entre otras, las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intratorácica, intrapleural, intrauterina o intratumoral. Los expertos en la técnica reconocerán que el modo de administración del derivado de ácido lipoico depende del tipo de cáncer o síntoma que se va a tratar. Por ejemplo, un modo preferido de administración del ácido lipoico para el tratamiento de la leucemia implicaría administración intravenosa. Asimismo, los expertos en la técnica también reconocerán que aditivos concretos farmacéuticamente aceptables variará desde formulaciones farmacéuticas adecuadas para un modo de administración hasta formulaciones farmacéuticas adecuadas para otro modo de administración.

Adaptando los tratamientos descritos en el presente documento, los derivados de ácido lipoico o las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden usar en procedimientos para tratar enfermedades distintas al cáncer, en los que las células causantes de la enfermedad exhiben patrones metabólicos alterados. Por ejemplo, los patógenos eucariotas de seres humanos y otros animales generalmente son mucho más difíciles de tratar que los patógenos bacterianos porque las células eucariotas son mucho más similares a las células animales que las células bacterianas. Dichos patógenos eucariotas incluyen protozoos tales como los causantes del paludismo, así como patógenos fúngicos y de algas. Dada la considerable falta de toxicidad de los derivados de ácido lipoico de la invención para las células humanas y animales normales y dado que es probable que muchos patógenos eucariotas pasan por estadios del ciclo de la vida en los que sus PDC se hacen sensibles a los derivados de ácido lipoico, los derivados de ácido lipoico y las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para destruir PDC bacterianos.

A continuación se demostrarán realizaciones específicas de la invención con referencia a los ejemplos siguientes. Debe entenderse que estos ejemplos se divulgan únicamente a modo de ilustración de la invención y no debe interpretarse de ningún modo que limita el alcance de la presente invención.

Síntesis de ácido 6,8-bismercaptooctanoico (Intermedio)



El ácido α -lipoico (5,15 g, 25,0 mmol) se suspendió en agua (125 ml) y se añadió bicarbonato sódico (2,1 g, 25,0 mmol). La mezcla se agitó para producir una solución transparente. La solución amarillo claro resultante se enfrió en un baño de hielo y se añadió borohidruro sódico sólido (1,90 g, 50,0 mmol) con agitación en porciones pequeñas durante 20 minutos. La solución se agitó en un baño de hielo durante otros 30 minutos y después a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución turbia se enfrió en un baño de hielo y el pH se ajustó a 1 mediante la adición lenta de ácido clorhídrico 2M. Se produjo una expulsión energética de hidrógeno a medida que se descomponía el exceso de borohidruro sódico u se observó la separación de un líquido oleoso. La mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 50 ml). Los extractos de cloroformo combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y el disolvente se evaporó a presión reducida a temperatura ambiente. El aceite restante se secó adicionalmente al vacío para eliminar los restos del disolvente. Se aisló ácido 6,8-bismercaptooctanoico como un aceite incoloro. 5,2 g (100 %). El producto se almacenó a -20°C en nitrógeno. RMN de ^1H (CDCl_3): δ 2,89 (m, 1 H, S-C-H). 2,67 (m, 2H, S-CH₂), 2,34 (t, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂C(O)), 1,4 -1,92 (m, 8H, (CH₂)₂), 1,33 (t, J = 8,0 Hz, 1 H, S-H), 1,30 (t, J = 7,6 Hz, 1 H, S-H).

EJEMPLO 1

Procedimiento general para los compuestos (A), (E) y (F):

El ácido 6,8-bismercaptooctanoico (1 eq.), obtenido como se ha descrito anteriormente, se disolvió en etanol absoluto. A esta solución se añadió el cloruro de arilo adecuado (2,2 eq.). La solución resultante se trató con una solución de epóxido sódico recién preparada (se añadió sodio (4,4 eq.) en porciones pequeñas, en nitrógeno, al etanol absoluto para formar epóxido sódico recién preparado). La mezcla de reacción se sometió a reflujo en nitrógeno durante 4-6 horas. La mezcla de reacción se enfrió después en un baño de hielo y se acidificó cuidadosamente con HCl 2N hasta un pH de 2-3. La fase acuosa ácida se extrajo con cloroformo (x3) y los extractos de cloroformo combinados se lavaron con agua (x1), NaCl ac. sat. (x1) y se secaron (MgSO_4). La evaporación del cloroformo dio el producto bruto. Los productos se purificaron mediante cromatografía en columna en gel de sílice con cloroformo: metanol (9:1) como eluyente.

Para los compuestos obtenidos como sales de sodio se omitió la etapa de acidificación descrita anteriormente. La mezcla de reacción, tras la evaporación de los disolventes, se disolvió en cloroformo y se añadió éter para precipitar la sal de sodio, que se filtró y se secó al vacío.

5 EJEMPLO 2 (referencia)

Procedimientos generales para los compuestos (C), (d) y (GG) S-acilados

10 Procedimiento 1: El ácido 6,8-bismercaptopoctanoico se aciló con tres equivalentes del cloruro de acilo adecuado en presencia de trietilamina para producir acilanhídrido 6,8-bisacilmercaptopoctanoico. El anhídrido se hidrolizó selectivamente con dioxanos/agua para producir ácido 6,8-bisacilmercaptopoctanoico sin ninguna hidrólisis indeseada de los grupos de éster benzoílico. El producto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice.

15 Ejemplo general del procedimiento 1- Síntesis de ácido 6,8-bisacilmercaptopoctanoico: El ácido 6,8-bismercaptopoctanoico (2,03 g, 10 mmol) se disolvió en cloruro de metileno seco (50 ml) en nitrógeno y se añadió trietilamina (3,24 g, 32 mmol). Gota a gota se añadió cloruro de benzoílo (4,50 g, 32 mmol) en cloruro de metileno (20 ml) con agitación durante 20 minutos. La sal que se formó entre trietilamina y HCl precipitó durante esta adición. La misma solución permaneció incolora. La agitación continuó a temperatura ambiente durante 9 horas. El volumen aumentó hasta 100 ml con más cloruro de metileno (todo el sólido se disolvió) y la solución se transfirió a un embudo
20 separador. Se extrajo con 10% de ácido cítrico (2 x 50 ml, el pH de la fase acuosa se comprobó después de la extracción para garantizar que era ácido) y después se lavó con NaCl acuoso saturado (50 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó el cloruro de metileno. Se obtuvo un aceite incoloro. El aceite anterior (5,48 g) se disolvió en dioxano (20 ml) y se añadió agua (20 ml). Esto produjo que el material formara un aceite. La mezcla se agitó a 40-45°C durante 53 horas. El disolvente se evaporó *al vacío* (2 mm) a 30°C. El aceite
25 restante se disolvió en cloroformo (50 ml) y se extrajo con 5% de ácido cítrico acuoso (20 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó el disolvente. Se aisló un aceite de color amarillo claro (5,7 g). Los espectros de RMN indicaron que únicamente un tercio del anhídrido se había hidrolizado. El material bruto se volvió a disolver en dioxanos (20 ml) y agua (10 ml). Esta mezcla se agitó a 45°C durante 32 horas. Los disolventes se evaporaron al vacío. El RMN indicó que la hidrólisis del anhídrido se había completado. El producto se suspendió en acetato de etilo (2 ml) y se aplicó a una columna de 25 x 4,5 cm de gel de sílice (150 g) equilibrada con hexano –
30 acetato de etilo – ácido acético (100:50:1, v/v). A continuación, la columna se eluyó con la misma mezcla de disolventes. Las fracciones de 40 ml se recogieron a aproximadamente 5 ml/min. El producto bruto se recogió en las fracciones 16 - 21: (1,95 g, aceite incoloro): RMN de ¹H (CDCl₃): δ 8,0 (m, 4H, H aromático), 7,38 - 7,60 (m, 6H, H aromático), 3,89 (m, 1H, CH-S), 3,0 - 3,3 (m, 2H, CH₂S), 2,34 (t, J = 7,1 Hz, 2H, CH₂C(O)), 1,1 - 2,2 (m, 8H, CH₂);
35 RMN de ¹³C (CDCl₃): δ 191,71, 191,46, 179,72, 136,98, 136,92, 133,29, 128,51, 127,25, 127,14, 43,60, 34,98, 34,59, 33,76, 26,43, 26,19, 24,29; TLC (hexano – acetato de etilo – ácido acético, 100:50:1, v/v), R_f = 0,30; IR (neto): 2937, 1710, 1704, 1662, 1667.1655, 1448, 1207, 1175, 911, 773, 757, 733, 648, 688 cm⁻¹.

40 Procedimiento 2: El ácido 6,8-bismercaptopoctanoico se aciló con 1,2 equivalentes del ácido carboxílico adecuado que se había preactivado con CDI (1,2 eq.) en DCM en presencia de trietilamina (1,2 eq.). Los productos se purificaron mediante cromatografía en columna en gel de sílice como se han descrito anteriormente.

El compuesto (K) se aisló durante la cromatografía como producto secundario durante la síntesis del compuesto (D).

45 EJEMPLO 3 (referencia)

Procedimiento general para los compuestos tioacetal (M), (N), (O), (P) y (Q)

50 Los compuestos tioacetal (M) - (Q) se sintetizaron adaptando los procedimientos generales descritos en J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 3458 and J. Org. Chem. 1975, 40, 231:

Al ácido 6.8-bismercaptopoctanoico (1 eq.) en DCM en una atmósfera de nitrógeno se añadió el aldehído o la cetona adecuados (1 eq.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se enfrió hasta -25 °C. Se añadió éterato de BF₃ (1 eq.) y la reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. Después de la evaporación del
55 disolvente, los productos se purificaron mediante cristalización o mediante cromatografía en gel de sílice con acetato de etilo:hexano (1:2) como eluyente.

EJEMPLO 4 (referencia)

60 Procedimiento general para compuestos bis-alquilados (S), (T), (U), (V), (W), (X), (BB) y (II)

Al ácido 6.8-bismercaptopoctanoico (1 eq.) en THF en una atmósfera de nitrógeno se añadió el bromuro de bencilol al bromuro de fenitilo o el bromuro de alquilo (2 eq.) adecuados. Gota a gota se añadió etóxido sódico (3 eq.) recién
65 preparado con agitación durante 10 minutos. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 5,5 horas y se enfrió hasta la temperatura ambiente. Tras la dilución con agua, la solución se enfrió en hielo y se acidificó con HCl 2N hasta un pH = 2. El producto se extrajo con cloroformo (x 3) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con

agua (x 1), NaCl acuoso saturado (x 1) y se secó (MgSO_4). La evaporación del disolvente dio el producto bruto que se cristalizó en benceno y hexano o se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con 1-3% de metanol en DCM.

5 EJEMPLO 5 (referencia)

Síntesis del compuesto (B)

10 El compuesto (B) se sintetizó usando un procedimiento adaptado de Org. Lett. 2007, 6.3687: El ácido 6,8-bismercaptooctanoico (1 eq.) y ferrocenometanol (2,1 eq.) en DCM se trataron con ácido trifluoroacético (6,5 eq.) a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó y el producto bruto se purificó usando cromatografía en columna en gel de sílice (hexano:acetato de etilo 2:1).

15 EJEMPLO 6 (referencia)

Síntesis del compuesto (J) (intermedio)

20 El ácido 6,8-bismercaptooctanoico (1,04 g, 5,0 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (10 ml) en nitrógeno. A esta solución agitada se añadió trifenilmetanol (1,30 g, 5,0 mmol) en porciones pequeñas. La solución se agitó durante 15 minutos y se evaporó usando vacío (2 mm a 10 °C). El residuo resultante se disolvió en ácido trifluoroacético fresco (7 ml) y se agitó durante 10 minutos. El disolvente se eliminó al vacío y todo el ácido trifluoroacético restante se eliminó mediante azeotropismo con benceno seco (3 x 2 ml). El análisis TLC del jarabe viscoso residual ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$, 100:10:1) reveló tres puntos con valores de R_f de 0,42, 0,47 and 0,54. El punto principal tenía un valor R_f de 0,47. El material bruto se disolvió en cloroformo (1 ml) y se aplicó a una columna (36 x 3,2 cm) que se había empaquetado a presión con gel de sílice (140 g) en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$, 250:10:1. Es importante que la columna se empaquete muy bien y se usen al menos 100 g de gel de sílice para cada gramo del material de partida de ácido lipoico reducido. La columna se eluyó inicialmente con la mezcla inicial de disolventes (100 ml). Después, la columna eluyó con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (100:7:1). Se recogieron fracciones de 20 ml a 2 ml/min. Razonablemente, el producto puro se recogió en las fracciones 10 – 16 para dar 1,44 g. Este ácido 6-mercapto-8-tritilmercaptooctanoico se usó para sintetizar los compuestos (Y), (Z) y (AA).

EJEMPLO 7 (referencia)

Procedimiento general para los compuestos (Y) y (Z)

35 La síntesis de los compuestos (Y) y (Z) se puede ilustrar mediante el siguiente procedimiento general para la síntesis de ácido 6-etilmercapto-8-tritilmercaptooctanoico, compuesto (Z): El compuesto (J) (1,09 g, 2,4 mmol) se disolvió en etanol absoluto (40 ml) y se añadió bromuro de etilo (0,38 g, 3,0 mmol). La solución agitada se introdujo en una atmósfera de nitrógeno y se añadió una solución de epóxido sódico (10 mmol) en etanol absoluto (10 ml) en 5 minutos (esta solución se preparó recientemente mediante la reacción de metal sodio (0,23 g) con el etanol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, después se calentó en reflujo suave durante 6 horas (temperatura del baño 95 °C). Se observó un sólido blanco precipitando durante este tiempo. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y el etanol se evaporó al vacío (1 mm a 10°C). El residuo se suspendió en agua (40 ml). El pH se ajustó hasta aproximadamente 2 (papel de pH) con ácido clorhídrico 2M. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). Los extractos combinados se lavaron con NaCl acuoso saturado (20 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio. El disolvente se evaporó, dando un aceite viscoso amarillo de 1,14 g de peso. El material bruto en cloroformo (2 ml) se aplicó a una columna (25 x 3,2 cm) empaquetada con gel de sílice de (90 g) en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$, 250:10:1. La elución con este disolvente dio 0,85 g (74,5 %) de un jarabe amarillo.

50 EJEMPLO 8 (referencia)

Síntesis del compuesto (AA)

55 El compuesto (J) (ácido 6-mercapto-8-tritil-bismercaptooctanoico) (1,36 g, 3,0 mmol) se disolvió en etanol absoluto (50 ml) y se añadió ácido bromoacético (0,63 g, 4,5 mmol). La solución incolora se trató con una solución de epóxido sódico (12 mmol) en etanol absoluto (10 ml) (esta solución se preparó recientemente mediante la reacción del metal sodio (0,28 g) con el etanol). Tras la adición se formó un sólido blanco. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después en reflujo suave durante 7 horas (temperatura del baño 95 °C). La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y el disolvente se evaporó al vacío a temperatura ambiente, dando un sólido amarillo claro. El sólido se disolvió en agua (50 ml). El pH se ajustó hasta aproximadamente 2 con ácido clorhídrico 2M. Se formó un precipitado ligeramente amarillo. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (4 x 25 ml). Los extractos combinados se lavaron con salmuera saturada (20 ml). La solución se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó el disolvente, dando un aceite viscoso amarillo claro (1,59 g). La TLC (gel de sílice, 100:10:1 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$) mostró un punto principal con $R_f = 0,42$. El material bruto se disolvió en cloroformo (2 ml) y se aplicó a una columna (24 x 3,2 cm) que se había empaquetado a presión con gel de sílice (90 g) en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (100:5:1). Después, la columna eluyó con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (100:10:1). Las fracciones (20 ml) se

recogieron a 2 ml/min. El producto se recogió en fracciones 14 - 20 para dar un aceite incoloro 1,32 g (75% después de corregir por el ácido acético residual).

EJEMPLO 9 (referencia)

5

Procedimiento general para los compuestos (G), (H) y (L)

La síntesis de los compuestos (G) y (H) se puede ilustrar mediante el siguiente procedimiento general para el ácido 6-etilmercapto-8-mercaptooctanoico (compuesto (H)): El ácido 6,8-etilmercapto-8-tritil-bismercaptooctanoico (0,85 g, 1,78 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (10 ml). Se obtuvo una solución de color amarillo oscuro. Se añadió trietilsilano (0,42 g, 0,58 ml, 3,6 mmol) en una porción. Se observó un sólido blanco precipitando. La mezcla se dejó a temperatura ambiente removiendo ocasionalmente durante 10 minutos. El sólido se eliminó mediante filtración y se lavó con ácido trifluoroacético (2 x 2 ml). Los filtrados combinados se evaporaron hasta sequedad al vacío a temperatura ambiente y se sometieron a azeotropismo con benceno (2 ml), dando un aceite (0,49 g). La TLC (gel de sílice, CHCl₃-CH₃OH-CH₃COOH (100:5:1)) mostró dos puntos con R_f = 0,82 (trifenilmetano) y 0,35 (producto). El material bruto se añadió a una columna (22 x 2,3cm) empaquetada con gel de sílice (40 g) en CHCl₃-CH₃OH-CH₃COOH (100:5:1). La columna se eluyó con este disolvente, dando el producto como un jarabe marrón claro: 0,33 g (78 %). El producto se almacenó en oscuridad, en nitrógeno o argón, a - 20 °C.

20 De un modo similar, el compuesto (G) se sintetizó a partir del compuesto (Y). El compuesto (L) se sintetizó mediante un procedimiento de tres etapas similar al usado para los compuestos (H) y (G).

EJEMPLO 10 (referencia)

25 Síntesis del compuesto (I)

El compuesto (AA), (ácido 6-carboximetilmercapto-8-tritil-bismercaptooctanoico), se disolvió en ácido trifluoroacético (12 ml). Se añadió trietilsilano (0,53 g, 0,73 ml, 4,6 mmol) en una porción. La solución amarillo brillante se convirtió en incolora y precipitó un sólido blanco. La mezcla se dejó a temperatura ambiente removiendo ocasionalmente durante 10 minutos y se filtró. El sólido se lavó con ácido trifluoroacético (2 x 3 ml). Los filtrados combinados se evaporaron hasta sequedad al vacío a temperatura ambiente y se sometieron a azeotropismo con benceno (2 ml), dando un aceite marrón claro (0,74 g). El material bruto se disolvió en cloroformo (1 ml) y se añadió a una columna (28 x 2,3 cm) empaquetada con gel de sílice (40 g) en CHCl₃-CH₃OH-CH₃COOH (100:5:1). La columna eluyó con CHCl₃-CH₃OH-CH₃COOH (100:7:1), dando un jarabe incoloro viscoso: 0,54 g (82 %). El producto se debe almacenar en oscuridad, preferentemente en nitrógeno a - 20 °C. TLC: R_f = 0,35 (100:7:1 CHCl₃-CH₃OH-CH₃COOH).

EJEMPLO 11 (referencia)

40 Procedimiento general para los compuestos ((CC), (DD), (EE), (FF) y (HH)

Los compuestos (CC), (DD), (EE), (FF) y (HH) se sintetizaron usando los procedimientos descritos anteriormente. El compuesto (J) se alquiló con bromoacetamida. El grupo protector de tritilo se eliminó como se ha descrito anteriormente, dando ácido 6-acetamido-8-mercapto-6, 8-bismercaptooctanoico. Después, este intermedio se alquiló con los bromuros de alquilo o bromuro de bencilo adecuados (para el compuesto (HH)) en presencia de epóxido sódico en etanol a reflujo como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO 12 (Referencia)

50 Síntesis del compuesto MM (ácido 6-etil-8-fenil-6,8-bismercaptooctanoico)

El yoduro cuproso (12 mg) y carbonato potásico anhidro (0,33 g, 2,4 mmol) se introdujeron en un tubo (15 x 2 cm) equipado con una barra de agitación magnética y se añadió ácido 6-etilmercapto-8-mercaptooctanoico (Compuesto (H)) (0,19 g, 0,8 mmol) en 2-metil-2-butanol (2 ml). El tubo se cerró con un tapón tabique y se aclaró con argón. Se añadió etilenglicol (100 mg, 90 µl, 1,6 mmol) mediante una jeringa, seguido de yodobenceno (164 mg, 90 µl, 0,8 mmol). El tubo se aclaró de nuevo con argón, después se selló con parafilm y se agitó a 95 °C durante 38 horas. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió agua (15 ml). El pH de la suspensión se ajustó a 2 con ácido clorhídrico 2,0M. La mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 10 ml). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato magnésico y se filtraron, y el disolvente se evaporó, dando un aceite amarillo de 0,25 g de peso. La TLC (CHCl₃-CH₃OH-HOAc 100:10:1) mostró un punto principal con R_f = 0,45, un punto minoritario con R_f = 0,39 y varios puntos minoritarios. El producto bruto en cloroformo (0,5 ml) se aplicó a una columna (12 x 2,2 cm) con gel de sílice 60 (20 g) empaquetada en CHCl₃-CH₃OH-HOAc (100:5:1). La columna eluyó con CHCl₃-CH₃OH-HOAc (100:10:1). Las fracciones de 4-5 ml se recogieron a un caudal de 0,5 ml/min. El producto se recogió en las fracciones 7 - 10: Aceite incoloro de 140 mg de peso. TLC R_f = 0,45 (gel de sílice; CHCl₃-CH₃OH-HOAc, 100:10:1); RMN de ¹H- (CDCl₃): 8,7,1 - 7,4 (m, 5H), 3,08 (td, 2H), 2,6 - 2,8 (m,1H), 2,48 (q, 2H), 2,35 (t, 2H), 1,3 - 1,9 (m, 8H), 1,22 (t, 3H); EM (ESI (-)): 311 (M-1).

EJEMPLO 13 (referencia)

Síntesis del compuesto disulfuro (LL)

- 5 El ácido 6,8-bismercaptopoctanoico (1,18 g, 5,67 mmol) en DCM (15 ml) y aldritol (5,0 g, 22,7 mmol, 4 eq.) se trataron con una cantidad catalítica de ácido acético glacial (32,5 ul, 2,5 mol %). La reacción se agitó a temperatura ambiente en N₂ durante la noche. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (80 g) con un gradiente de disolventes de hexano a 50% de acetato de etilo en hexano. EM: 425 (M-1).

10

EJEMPLO 14 (referencia)

Síntesis del compuesto disulfuro (JJ)

- 15 El disulfuro de ácido bispiridil-6,8-ditiooctanoico (1 eq.) obtenido de lo anterior se disolvió en DCM y se añadió mercaptano bencilo (2,5 eq.). La reacción se inició añadiendo una cantidad catalítica de ácido acético (2,5 mol%). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice con un gradiente de disolventes de hexano a 50% de acetato de etilo en hexano para eluir el producto. EM: 451 (M-1).

20

EJEMPLO 15 (referencia)

Síntesis del compuesto (KK)

- 25 El andritol (50 ml, 22,6 mmol) en metanol (50 ml) se trató con ácido acético (33 ul, 0,565 mmol, cat.) y se añadió tiofenol (2,309 ml, 22,6 mmol, 1 eq.) La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (50 g) con hexano a 2 % de acetato de etilo en hexano como el gradiente de eluyente: aceite de color amarillo claro, 2.413 g (48,6 %). Este compuesto (500 mg, 2,279 mmol) se hizo reaccionar con el compuesto (L) (237,39 mg, 1,14 mmol, 1eq.) en metanol (10 ml) con ácido acético (3,5 ul, 0,057 mmol, cat.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evaporó y el compuesto bruto se purificó mediante cromatografía preparativa en capa fina en gel de sílice con 10 % de acetato de etilo en hexano como disolvente de desarrollo: Aceite amarillo claro, 38 mg (9 %), TLC (gel de sílice), R_f = 0,18; EM (ESI (-)): 423 (M-1).

30

EJEMPLO 16 (referencia)

Síntesis del compuesto (R)

- 40 El compuesto (R) se sintetizó usando una combinación del procedimiento de mono S-alkilación del ejemplo 9 y la formación de tioacetal del ejemplo 3.

PRUEBAS

- 45 En esta investigación se usaron tres células tumorales humanas y fueron las líneas celulares de NSCLC humano H460, de melanoma humano A2058 y de adenocarcinoma humano HT1080. Las células se obtuvieron inicialmente del Cultivo Americano de Cultivos Tipo (ATCC) y se han usado para experimentos a pases por debajo de 30. Todas las células tumorales se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada en matraces de cultivo tisular T75 que contiene 25 ml de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, con 10% de suero bovino fetal (FBS) y L-glutamina 2 mM. Las células tumorales se dividieron en una proporción de 1:10 cada 4-5 días mediante digestión con tripsina y se resuspendieron en medio fresco en un matraz nuevo. Las células se recogieron para los experimentos a una confluencia del 70-90%.

50

- 55 El medio de cultivo usados para todas las líneas celulares en este estudio fue Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, con 10% de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Los compuestos de ensayo usados se prepararon generalmente a una concentración superior a 20 mM y se analizaron a 1 mM en medio de cultivo para precipitación. La concentración de los compuestos de ensayo más alta analizada es 1 mM.

- 60 Las actividades antitumorales de los compuestos de ensato se evaluaron mediante exposición de las células tumorales a varias concentraciones de los compuestos de ensayo (o vehículo) no se trataron con los compuestos de ensayo o vehículo. Los intervalos de concentración de los compuestos de ensayo evaluados en este estudio fueron 0 - 1 mM. La duración del tratamiento de las células tumorales fue de 48 horas. Después del tratamiento con los artículos de ensayo, se determinó el número de células tumorales viables y las concentraciones de los agentes de ensayo que indujeron un 50% de inhibición del crecimiento celular (CI₅₀) se derivaron y se compararon.

65

Siembra celular para los experimentos: A las células cultivadas hasta una confluencia del 70-90% se retiró el medio y las monocapas celulares se lavaron brevemente mediante la adición 5 ml de la solución salina tamponada con fosfato (PBS) seguido de aspiración. A cada matraz se añadió tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (4 ml) y el matraz se introdujo en el incubador de cultivo tisular durante 5 minutos. Se añadió medio con suero (10 ml) para detener las reacciones enzimáticas y las células se desagregaron mediante resuspensión repetida con pipeta serológica. El medio que contenía células (20 µl) se añadió a (20 µl de 0,4% de solución de azul tripán y 10 µl de esta mezcla que contiene células se introdujeron en una cámara de un hemocitómetro. El número de células viables se determinó contando el número de células viables (células que excluyeron el azul tripán) en las 4 esquinas de la cámara del hemocitómetro a un aumento de 100. El volumen de células necesario se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de células necesarias} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células deseadas/ml}}{\text{n}^\circ \text{ de células contadas/ml}}$$

donde el n° de células contadas/ml= promedio de células en el hemocitómetro x factor de dilución 2×10^4 .

El número de células dirigidas para el estudio fue 4×10^3 por pocillo en 100 µl de medio. El número real de células se contó y se sembró en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Después, las células se incubaron durante -24 horas antes de usarse para el análisis de actividades antitumorales de los compuestos de ensayo y vehículo. La monocapa celular fue confluyente o subconfluyente para algunas líneas celulares el día del experimento.

Tratamiento con compuestos de ensayo y vehículo: El día del análisis, a los pocillos se añadieron 5 µl de una concentración específica de los compuestos de ensayo (o vehículo). Después de la exposición a los artículos de ensayo (o vehículo) durante 48 horas, se determinó el número de células viables en los pocillos (véase la sección siguiente) y se calculó el porcentaje de células relativas a ausencia de tratamiento.

Determinación del número de células viables mediante el ensayo CellTiter Blue: El número de células viables se determinó usando el ensayo CellTiter Blue en este estudio. Específicamente, se dejó que los reactivos llegaran a la temperatura ambiente de acuerdo con las instrucciones de Promega, Inc. (Madison, WI). Se añadió reactivo CellTiter Blue con el pipeteador Eppendorf de 12 canales, 20 µl por pocillo. Después, las células se incubaron a 37 °C durante 1 – 4 horas en un incubador de cultivo celular. La intensidad de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de células viables, se leyó a 530/590 nm usando un lector de placas de fluorescencia FLUOstar optima (BMG technologies, Alemania).

Cálculos de los valores de CI_{50} : Los datos de las lecturas de fluorescencia se copiaron en hojas de cálculo EXCEL y el crecimiento celular respecto a las células sin tratar se calculó usando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ n}^\circ \text{ de células relativas a las no tratadas} = \left(\frac{\text{luminiscencia media a N}}{\text{fluorescencia media sin tratar}} \right) \times 100\%$$

donde N= concentración del compuesto o vehículo.

Los valores calculados se importaron a SigmaPlot, v9. Se generó una curva logística de cuatro parámetros del "crecimiento celular medio relativo como una función de las concentraciones de los compuestos de ensayo". Los valores de CI_{50} se determinaron a partir de las curvas, El valor de R cuadrado proporcionó una indicación del grado de adaptación de los datos a la curva. Los valores de CI_{50} para los compuestos de ensayo se presentan en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1.

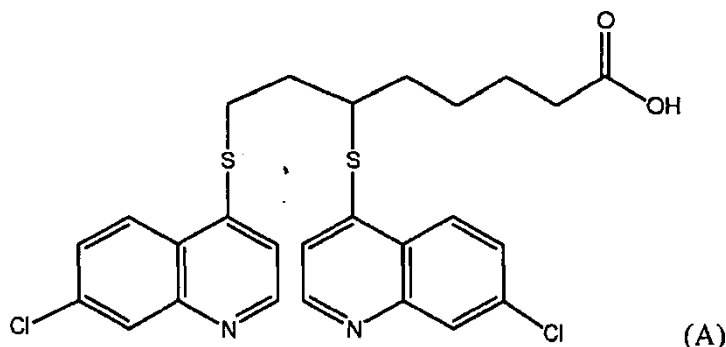
Compuesto	CI_{50} A2058 (melanoma) (µM)	CI_{50} H460 (NSCLC) (µM)	CI_{50} HT1080 (µM)
A	183 ± 3	127 ± 11	80 ± 8
E	277 ± 9	234 ± 23	256 ± 19
F	51 ± 4	70 ± 13	68 ± 20
H*	238 ± 2	282 ± 20	270 ± 4
Q*	717 ± 11	no data	no data
W*	125 ± 3	167 ± 42	no data
X*	59 ± 4	64 ± 4	60 ± 18
JJ*	206 ± 55	318 ± 20	133 ± 2

ES 2 442 901 T3

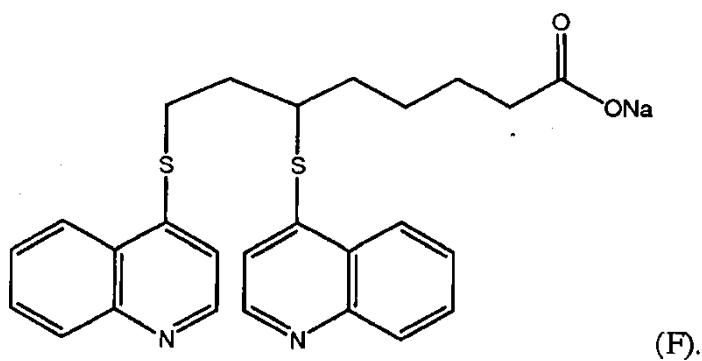
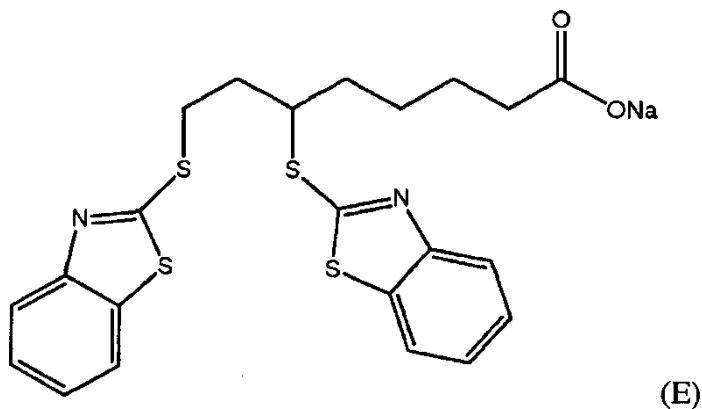
Compuesto	CI ₅₀ A2058 (melanoma) (μM)	CI ₅₀ H460 (NSCLC) (μM)	CI ₅₀ HT1080 (μM)
KK*	483 ± 180	409 ± 69	212 ± 52
LL*	745 ± 176	844 ± 176	737 ± 131
MM*	346 ± 20	449 ± 1	421 ± 53
*Referencia (no incluida dentro del ámbito de la presente invención)			

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de ácido lipoico del grupo que consiste en:



2 HCl o 1HCl



15 2. Una formulación farmacéutica que comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un derivado de ácido lipoico de la reivindicación 1 y (b) al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable.

20 3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 2, donde el al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en disolventes, diluyentes, tensioactivos, solubilizantes, conservantes, tampones y combinaciones de los mismos.

4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 2, donde el al menos un derivado de ácido lipoico está presente en una cantidad para proporcionar de aproximadamente 0,001 mg/m² a aproximadamente 10 g/m².

25 5. Un derivado de ácido lipoico como se define en la reivindicación 1 para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, cáncer metastático, cánceres de pulmón, de hígado, de útero, de cervix, de vejiga urinaria, de riñón, de colon, de mama, de próstata, de ovarios y de páncreas, carcinoma, sarcoma, mieloma, linfoma, leucemia y tipos mixtos de los mismos, enfermedad de Alzheimer, enfermedades hiperproliferativas tales como psoriasis, neuropatía diabética.