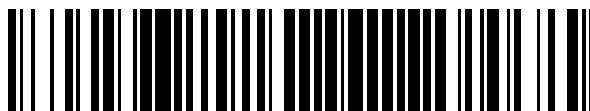


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 237**

51 Int. Cl.:

C07C 37/50 (2006.01) **A01N 37/02** (2006.01)

C07C 39/16 (2006.01) **A61K 31/22** (2006.01)

C07C 39/367 (2006.01)

C07C 43/225 (2006.01)

C07C 43/23 (2006.01)

C07C 47/27 (2006.01)

C07C 47/273 (2006.01)

C07C 217/20 (2006.01)

C07D 277/24 (2006.01)

C07D 295/088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2007 E 07853744 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2076125**

54 Título: **Derivados de NDGA modificados por un puente de butano tetra-O-sustituidos, su síntesis y uso farmacéutico**

30 Prioridad:

02.10.2006 US 827783 P

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

18.03.2014

73 Titular/es:

**ERIMOS PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)
9600 BELLAIRE BOULEVARD, SUITE 228
HOUSTON, TX 77036, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, QINGQI;
LOPEZ, ROCIO A.;
HELLER, JONATHAN D. y
MORRIS, AMANDA JEAN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 449 237 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).

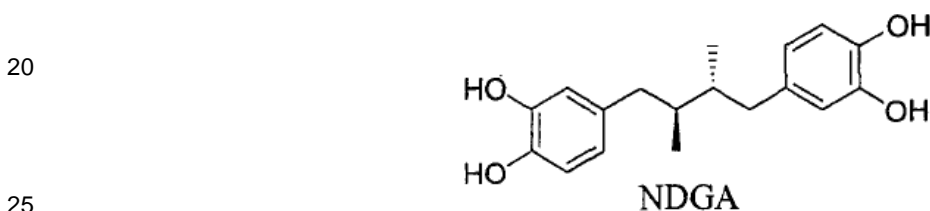
DESCRIPCIÓN

Derivados de NDGA modificados por un puente de butano tetra-O-sustituídos, su síntesis y uso farmacéutico

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a derivados de ácido nordihidroguaiarético, métodos de preparación de los mismos y métodos de utilización de los mismos para el tratamiento de infecciones virales, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, enfermedades vasculares (incluyendo cardiovasculares) y enfermedades proliferativas, tales como cáncer.

[0002] El ácido nordihidroguaiarético (NDGA, la fórmula I) tiene la siguiente estructura química, en la que hay dos grupos catecol, y un puente de 2,3-dimetilbutano. El puente de butano une dos grupos catecol a través de una posición 4. El NDGA es un compuesto natural que puede aislarse de la resina de las hojas de *Larrea tridentata*, una planta del desierto indígena del suroeste de Estados Unidos y México. Tiene una conformación de forma meso de (2S, 3R), que es la estructura simétrica, y no es ópticamente activa.



Fórmula I

30 [0003] La investigación sobre NDGA y sus derivados ha atraído un creciente interés recientemente. Se ha descrito un gran número de derivados de NDGA, y podrían clasificarse de la siguiente manera:

[0004] Tipo 1: NDGA unido por éter, los derivados más comunes de NDGA, en el que un grupo sustituido está unido químicamente a uno o más de los grupos hidroxilo de los grupos catecol.

35 [0005] Tipo 2: derivados de NDGA unidos por éster, en los que un grupo sustituido está unido covalentemente a uno o más de los grupos hidroxilo de los grupos catecol.

[0006] Tipo 3: derivados de NDGA terminados en anillos, en los que dos grupos hidroxilo en los grupos catecol se unían entre sí para formar anillos de 5-6 miembros a través de enlaces éter o carbonato.

40 [0007] Tipo 4: derivados de NDGA disustituídos, en los que un grupo hidroxilo del catecol está metilado, el otro está unido covalentemente a un grupo sustituido.

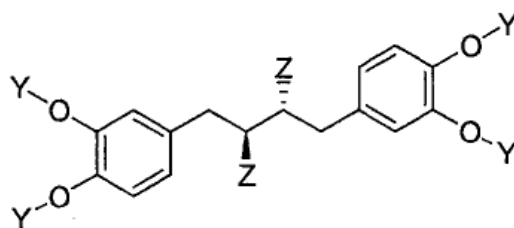
45 [0008] Tipo 5: modificaciones del anillo fenilo, en las que los grupos sustituidos están químicamente unidos al anillo fenilo.

[0009] Tipo 6: modificaciones del puente de butano, en las que se eliminaron o modificaron dos grupos metilo en el puente por grupos sustituidos.

50 [0010] El NDGA y sus derivados sintéticos tienen numerosas características. Al ser un inhibidor de las lipoxigenasas, el NDGA puede inducir la nefropatía quística en la rata. ¹ Además, muestra diversas bioactividades, incluyendo la inhibición de la proteína quinasa C, ² la inducción de la apoptosis, ³ alteraciones de la membrana celular, ⁴ elevación del nivel de Ca^{2+} celular ⁵ y la activación de canales de Ca^{2+} en células de músculo liso, ⁶ rotura de fibrilas de beta-amiloide de Alzheimer preformadas in vitro, antioxidación, ⁸ etc. Este producto natural NDGA se usa comercialmente como un aditivo alimentario para conservar las grasas y mantequilla en algunas partes del mundo. Recientemente, los derivados del lignano de planta NDGA se han utilizado para bloquear la replicación viral a través de la inhibición de la transcripción viral. ⁹⁻¹⁶ Estos compuestos pueden inhibir la producción de transcritos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ⁹⁻¹³ virus del herpes simplex (HSV), ^{14,15} y el virus del papiloma humano (VPH) ¹⁶ mediante la desactivación de sus promotores dependientes de Sp1. Además, el ácido (tetra-O-metil)nordihidroguaiarético (M₄N, Fórmula II, terameprocol) puede funcionar como un inhibidor de la transcripción proviral anti-VIH y causa la detención del crecimiento de una variedad de células humanas y de ratón transformadas en cultivo y en ratones. ¹⁷⁻¹⁹ El compuesto M₄N se encuentra actualmente en ensayos clínicos contra los cánceres humanos.

65

[0018] Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto derivado de ácido nordihidroguaiarético tetra-O-sustituido modificado con un puente de butano designado como "BB-Sb₄N", que tiene la siguiente estructura general (Fórmula VI), así como sus sales farmacéuticamente aceptables:

BB-Sb₄N

Fórmula VI

[0019] En la designación "BB-Sb₄N", "BB" significa el aspecto de la modificación de puente de butano del componente N de la base NDGA y "Sb₄N" significa el aspecto de ácido nordihidroguaiarético tetra-O-sustituido del compuesto derivado del ácido nordihidroguaiarético tetra-O-sustituido modificado por el puente de la presente invención. El compuesto contiene dos unidades catecol, un puente de butano y cuatro grupos Y, cada uno sustituido por H en los grupos hidroxilo de NDGA (a veces referidos como "el grupo sustituido Y") designado por "Sb₄" en "Sb₄N."

[0020] El puente de butano une las dos unidades de catecol en las posiciones 1,4 a través de la posición 4 en los anillos fenilo de las unidades catecol. Los sustituyentes (Z) en las posiciones 2,3 del puente de butano se seleccionan del grupo que consiste en H, -CHO, -CN, -CH₂CH₃, -CH₂Cl, -CH₂Br y -CH₂F.

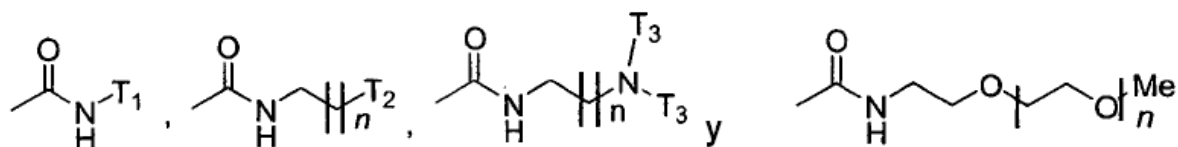
[0021] Y se selecciona del grupo que consiste en:

-A-R;

-(CH₂)_xHal, en el que x es un número entero de 1 a 10, y Hal es un átomo de halógeno, en particular cualquiera de cloro, flúor, bromo o yodo;

-(CH₂CH₂O)_yH, en el que y es un número entero de 1 a 10; y

un grupo unido a carbamato seleccionado del grupo que consiste en:



en el que n es un número entero de 1 a 6, T₁ es una cadena de hidrocarburo lineal saturada de 2-6 carbonos y, opcionalmente, 1-3 átomos de halógeno, T₂ es un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente 0-3 dobles enlaces y que contiene opcionalmente 1-3 átomos de cualquiera entre O, N y S y T₃ es metilo o etilo.

[0022] Cuando Y es -A-R, R es un grupo terminal y A es una cadena lateral de hidrocarburo lineal saturado con heteroátomos opcionales que está unido en un extremo a los grupos O del residuo de hidroxilo respectivo mediante un enlace éter o un enlace carbamato y el otro extremo a un carbono o un heteroátomo en el grupo terminal R.

[0023] La cadena lateral A se selecciona del grupo que consiste en una cadena de hidrocarburo saturada lineal C₂ - C₁₆, opcionalmente con 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, unida a los grupos O de los residuos de hidroxilo respectivos de NGDA a través de un enlace éter; y 1-5 unidades de una cadena de polietilenglicol (PEG).

[0024] El grupo terminal R se selecciona del grupo que consiste en:

un anillo carbocíclico de 5 a 7 miembros seleccionado del grupo que consiste en un anillo totalmente saturado con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S; un anillo que contiene de 1 a 3 dobles enlaces para un anillo de 6 ó 7 miembros y de 1 a 2 dobles enlaces para un anillo de 5 miembros, con de 1 a 3 heteroátomos de N, O o S para el anillo de 5 a 7 miembros; un anillo que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida;

y un grupo soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en una sal de metal alcalino de ácido sulfónico; una sal de metal alcalino de ácido fosfónico; una sal farmacéuticamente aceptable; un azúcar y un grupo polihidroxilo.

5 **[0025]** Otro aspecto de la invención es una composición que comprende el compuesto BB-Sb₄N y un portador farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0026] Aún otro aspecto de la invención es un método de fabricación del compuesto BB-Sb₄N tal como se indica a continuación en este documento.

10 **[0027]** Otro aspecto de la invención es el compuesto BB-Sb₄N solo o como parte de una composición farmacéutica para utilizar profilácticamente o para el tratamiento de una infección viral.

15 **[0028]** Aún otro aspecto de la invención es el compuesto BB-Sb₄N solo o como parte de una composición farmacéutica para utilizar profilácticamente o para el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

[0029] Otro aspecto de la invención es el compuesto BB-Sb₄N solo o como parte de una composición farmacéutica para utilizar profilácticamente o para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

20 **[0030]** Aún otro aspecto de la invención es el compuesto BB-Sb₄N solo o como parte de una composición farmacéutica para utilizar profilácticamente o para el tratamiento de una enfermedad metabólica.

[0031] Un aspecto adicional de la invención es el compuesto BB-Sb₄N solo o como parte de una composición farmacéutica para utilizar profilácticamente o para el tratamiento de una enfermedad vascular.

25 **[0032]** Aún otro aspecto de la invención es un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el compuesto BB-Sb₄N e instrucciones para utilizar profilácticamente o para el tratamiento de una infección viral, una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad metabólica o una enfermedad vascular.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0033] Tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere a compuestos derivados del ácido nordihidroguaiarético, composiciones farmacéuticas que los contienen, métodos de fabricación de los mismos, y métodos de uso de los mismos y los kits que incluyen a los mismos para el tratamiento de enfermedades y trastornos, en particular infecciones, virales, tales como, por ejemplo y sin limitación, infecciones causadas por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (HPV) (todos los subtipos), virus del herpes simplex 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), virus de la varicela zoster, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la viruela (viruela, viruela vacuna, viruela de los monos, vaccinia), orthohepadnavirus, virus JC, y el virus BK; enfermedades inflamatorias, tales como, por ejemplo y sin limitación, diversos tipos de artritis y enfermedades inflamatorias del intestino; enfermedades metabólicas, tales como, por ejemplo y sin limitación, la diabetes; enfermedades vasculares, tales como por ejemplo la hipertensión, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular; y enfermedades proliferativas, tales como diversos tipos de cánceres.

45 **[0034]** La presente invención se basa en consideraciones que incluyen la experiencia con agentes utilizados para tratar el cáncer y virus, incluyendo VIH; derivados que tienen una estructura química similar al NDGA; donde dichos derivados tienen más potencia, mejor perfil de PD/PK y menos o ningún efecto secundario frente al ácido (tetra-O-metil)nordihidroguaiarético (M₄N) (terameprocol), por lo menos algunas de las formulaciones están oralmente biodisponibles. Los derivados de NDGA de la presente invención están en la forma meso sin ninguna posible mezcla de sus enantiómeros, lo cual hará que la caracterización química y biológica sea más fácil. Los grupos funcionales de los sustituyentes para las modificaciones del compuesto parental de NDGA se seleccionan de entre los grupos químicos más comunes utilizados para modificaciones satisfactorias de moléculas farmacológicas. Se pueden sintetizar fácilmente y se pueden formular fácilmente con una solubilidad acuosa razonable, en que en el HCl u otra forma de sal o en base libre, tienen una considerable solubilidad acuosa. Otros de los derivados de NDGA de la presente invención son hidrófobos. Los derivados de NDGA de la presente invención tienen una buena estabilidad, ya sean compuestos solubles en agua o compuestos hidrófobos. Los derivados pueden escalarse fácilmente para la producción comercial.

60 **[0035]** Los derivados de NDGA de la presente invención se desarrollaron basándose en el hecho de que el NDGA es un compuesto natural con una amplia gama de actividades biológicas. El NDGA tiene una gran cantidad de efectos secundarios, que son superados por los derivados de la invención. Los derivados de NDGA modificados con un puente de butano (BB-N), tales como 1,4-bis(catecol-4-il)-butano, poseen mejores actividades biológicas que el NDGA. Los derivados presentan actividades biológicas mejoradas. La investigación que conduce al desarrollo de la presente invención también ha demostrado que la modificación del grupo hidroxilo de los derivados de NDGA, tales como M₄N, evita la replicación de células tumorales e induce selectivamente la muerte de células tumorales (apoptosis). Esto se logra mediante la prevención de la producción regulada por Sp1 de cdc2 (p34) y survivina. La survivina es un inhibidor de la proteína de la apoptosis (IAP) sobreexpresada en células precancerosas y

cancerosas, y rara vez se encuentra en las células adultas sanas. M₄N también previene la proliferación de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simplex (HSV), y virus del papiloma humano (VPH). Esto se logra a través de la desactivación de los promotores dependientes de Sp1 virales que son esenciales para la propagación viral. Los derivados BB-Sb₄N de la presente invención mejorarán de manera notable sus actividades para evitar la producción regulada por Sp1 de cdc2 y survivina mediante el uso de un grupo funcional adecuado para modificar el grupo hidroxilo de NDGA.

[0036] Definiciones

[0037] Un "tampón" adecuado para utilizar en el presente documento incluye cualquier tampón convencional en la técnica, tal como, por ejemplo, Tris, fosfato, imidazol y bicarbonato.

[0038] Una "ciclodextrina", tal como se utiliza en este documento, significa un ciclodextrina no modificada o una ciclodextrina modificada, e incluye, sin limitación α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina y cualquier ciclodextrina modificada que contenga modificaciones de las mismas, tales como hidroxipropil- β -ciclodextrina ("HP- β -CD") o sulfobutiléter β -ciclodextrina ("SBE- β -CD"). La ciclodextrina tiene habitualmente 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina), y 8 (γ -ciclodextrina) azúcares, hasta tres sustituciones por azúcar, y, por tanto, son posibles de 0 a 24 sustituciones primaria (las sustituciones primarias se definen como sustituciones conectadas directamente al anillo de ciclodextrina). Las ciclodextrinas modificadas o no modificadas usadas en la presente invención pueden tener cualquier número y ubicación apropiada de las sustituciones primarias u otras modificaciones.

[0039] Un "derivado de NDGA" de la presente invención tal como se utiliza en este documento significa un derivado de NDGA designado como "BBN" o "BB-Sb₄N" en lo sucesivo.

[0040] Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un agente de relleno, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo convencional sólido, semisólido o líquido, no tóxico. Un "portador farmacéuticamente aceptable" no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, el portador para una formulación que contiene el presente butano catecólico o derivados de NDGA preferiblemente no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para dichos derivados. Los portadores adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, dextrosa, glicerol, solución salina, etanol, tampón, sulfóxido de dimetilo, Cremaphor EL, y combinaciones de los mismos. El portador puede contener agentes adicionales, tales como agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Según sea necesario, se pueden añadir otros materiales, tales como antioxidantes, humectantes, estabilizadores de la viscosidad, y agentes similares.

[0041] Una "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en este documento, incluye las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, mandélico y oxálico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol e histidina. Los ejemplos no limitantes de sales farmacéuticamente aceptables de los derivados de NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo, la siguiente fórmula general de sales:

[0042] [Sb₄(BB-N)]_k-k[ácido],

[0043] en la que BB-N es NDGA modificado con un puente de butano, Sb es un grupo sustituido tal como se describe en la tabla 1 y 2, k es un número entero o no entero, y el ácido es ácido orgánico o inorgánico, tal como se ejemplifica en la siguiente tabla A no limitativa:

[0044]

Tabla A

Sb	Ácido	k
Que contiene un átomo de nitrógeno básico	HCl, HBr, HNO ₃ , MeSO ₃ H, H ₂ SO ₄ , ácido aspártico, ácido cítrico, ácido bencenosulfónico, ácido alcanfórico, ácido alcanforsulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido D-glucónico, ácido glicólico, ácido hippúrico, ácido L-láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido nicotínico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido p-toluenosulfónico.	1-4
Que contiene dos átomos de nitrógeno básicos	HCl, HBr, HNO ₃ , MeSO ₃ H, H ₂ SO ₄ , ácido aspártico, ácido cítrico, ácido bencenosulfónico, ácido alcanfórico, ácido alcanforsulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido D-glucónico, ácido glicólico, ácido hippúrico, ácido L-	1-8

	láctico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido nicotínico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido p-toluenosulfónico.	
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

5 [0045] El término "excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, incluye vehículos, adyuvantes, o diluyentes u otras sustancias auxiliares, tales como los convencionales en la técnica, que están fácilmente disponibles para el público. Por ejemplo, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables incluyen agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes estabilizadores, agentes humectantes y similares.

10 [0046] Un "anillo", a menos que se especifique lo contrario, tal como se utiliza en este documento, tal como en los términos "anillo de 5 miembros", "anillo de 6 miembros" y "anillo de 7 miembros", se refiere a un anillo carbocíclico con alguno de los heteroátomos indicados.

15 [0047] Los términos "sujeto", "huésped", y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un animal que se está tratando con las presentes composiciones, incluyendo, pero sin limitación, simios, seres humanos, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales de granja mamíferos, animales de eventos deportivos mamíferos, y mascotas mamíferos.

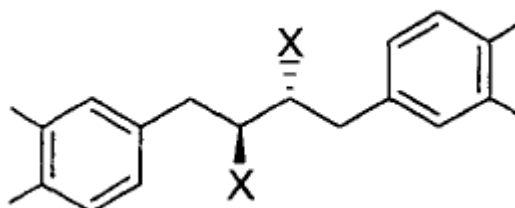
20 [0048] Un compuesto "sustancialmente purificado", en referencia a los derivados de NDGA en este documento es el que está sustancialmente libre de compuestos que no son los derivados NDGA de la presente invención (en lo sucesivo, "materiales que no son derivados de NDGA"). Por sustancialmente libre se entiende por lo menos el 50%, preferiblemente por lo menos el 70%, más preferiblemente por lo menos el 80%, e incluso más preferiblemente por lo menos el 90% libre de materiales que no son derivados de NDGA.

25 [0049] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una afección o enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una afección o enfermedad y/o afectar de forma adversa atribuible a la afección o enfermedad. "Tratamiento", por lo tanto, por ejemplo, cubre cualquier tratamiento de una afección o enfermedad en un animal, preferiblemente en un mamífero, y más preferiblemente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir de que se produzca la afección o enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la afección o enfermedad, pero todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la afección o enfermedad, tal como, detener su desarrollo, y (c) mitigar, aliviar o mejorar la afección o enfermedad, tal como, por ejemplo, provocar la regresión de la afección o enfermedad.

35 [0050] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, hasta la décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o que interviene en ese intervalo indicado, está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la presente invención.

45 [0051] Debe indicarse que, tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes del plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un derivado" incluye una pluralidad de dichos derivados y la referencia al "derivado de NDGA" incluye la referencia a uno o más derivados de NDGA y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia.

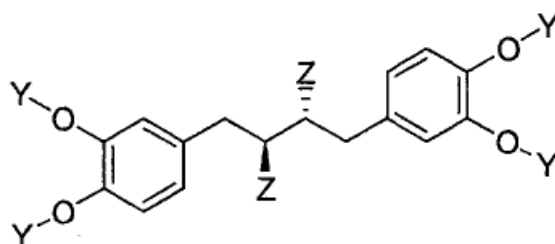
50



55

60

[0052] Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto derivado del ácido nordihidroguaiarético tetra-O sustituido modificado con un puente de butano designado como "BB-Sb₄N", que tiene la siguiente estructura general (Fórmula VI), así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

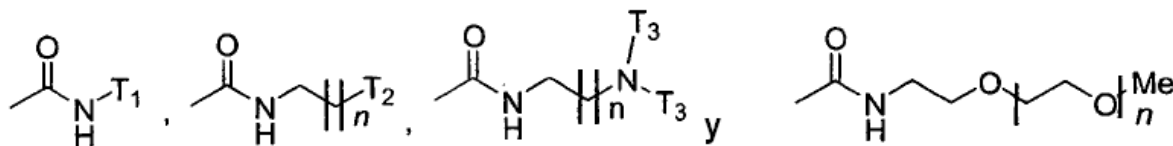


BB-Sb₄N

Fórmula VI

[0053] Tal como se ha indicado anteriormente, Y se selecciona del grupo que consiste en:

- A-R;
- (CH₂)_xHal, en el que x es un número entero de 1 a 10, y Hal es un átomo de halógeno, en particular cualquiera de cloro, flúor, bromo o yodo;
- (CH₂CH₂O)_yH, en el que y es un número entero de 1 a 10; y
- un grupo unido a carbamato seleccionado del grupo que consiste en:



en el que n es un número entero de 1 a 6, T₁ es una cadena de hidrocarburo lineal saturada de 2-6 carbonos y, opcionalmente, 1-3 átomos de halógeno, T₂ es un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente 0-3 dobles enlaces y que contiene opcionalmente 1-3 átomos de cualquiera entre O, N y S y T₃ es metilo o etilo.

[0054] en la que Y es -(CH₂)_xHal, x es preferiblemente de 1 a 3, y Hal es cloro o flúor; más preferiblemente, en este caso, Y es -(CH₂)₂F, por ejemplo.

[0055] en la que Y es -(CH₂CH₂O)_yH, y es preferiblemente 1 a 3, y más preferiblemente, por ejemplo, en este caso, Y es -(CH₂)₂OH (cuando y es 1); o -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-OH (cuando y es 2).

[0056] Con las definiciones anteriores de Y, los sustituyentes de puente de butano Z, y sus cadenas laterales A y grupos terminales R de los grupos Y sustituidos del derivada de NDGA BB-Sb₄N se pueden seleccionar entre los establecidos en el Breve Resumen de la Invención anterior, y también se establecen en forma de tabla en la siguiente Tabla 1.

[0057]

Tabla 1

Grupo Z	-CHO, -CN, -CH ₂ CH ₃ , -CH ₂ Cl, -CH ₂ Br o -CH ₂ F
Cadena lateral A	<ul style="list-style-type: none"> · cadena de hidrocarburo saturado lineal C₂-C₁₆ opcionalmente con 1-5 heteroátomos de N, O o S, y la cadena está unida a los grupos O de los residuos de hidroxilo respectivos de los grupos fenilo a través de un enlace éter · 1-5 unidades de cadena de polietilenglicol (PEG)
R es un anillo de 7 miembros	<ul style="list-style-type: none"> · anillo de 7 miembros totalmente saturado con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S · anillo de 7 miembros que contiene de 1 a 3 dobles enlaces con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S · anillo de 7 miembros que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida.
R es un anillo de 6 miembros	<ul style="list-style-type: none"> · anillo de 6 miembros totalmente saturado con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S · anillo de 6 miembros que contiene de 1 a 3 dobles enlaces con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S · anillo de 6 miembros que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida.

R es un anillo de 5 miembros	<ul style="list-style-type: none"> · anillo de 5 miembros totalmente saturado con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S · anillo de 5 miembros que contiene de 1 a 2 dobles enlaces con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S · anillo de 5 miembros que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida.
R es un grupo soluble en agua	<ul style="list-style-type: none"> · una sal de metal alcalino de ácido sulfónico · una sal de metal alcalino de ácido fosfónico · una sal farmacéuticamente aceptable, tal como la mostrada en la Tabla A · un azúcar · un grupo polihidroxilo

5 [0058] Los ejemplos no limitantes de una cadena lateral adecuada A son una cadena lineal C₂-C₄, tal como etileno, propileno o butileno, unida en un extremo a los grupos O de los residuos de hidroxilo respectivos de NDGA a través de un enlace éter; cadena lineal C₂-C₄, tal como etileno, propileno o butileno, con un heteroátomo O o N, y la cadena está unida a los grupos O de los residuos de hidroxilo respectivos de NDGA a través de un enlace éter; 1-3 unidades de cadena de polietilenglicol (PEG); o un enlace carbamato. La cadena lateral está unida en el otro extremo a un carbono o heteroátomo del grupo terminal R.

10 [0059] Ejemplos no limitantes de grupos Y y grupos terminales R adecuados se establecen en la siguiente tabla 2:

[0060]

Tabla 2

R es un anillo carbocíclico de 5-7 miembros que contiene de 1-3 heteroátomos de N, O o S	
R es polihidroxilo, azúcar u otro grupo soluble en agua, donde m es un número entero de 2 a 6	

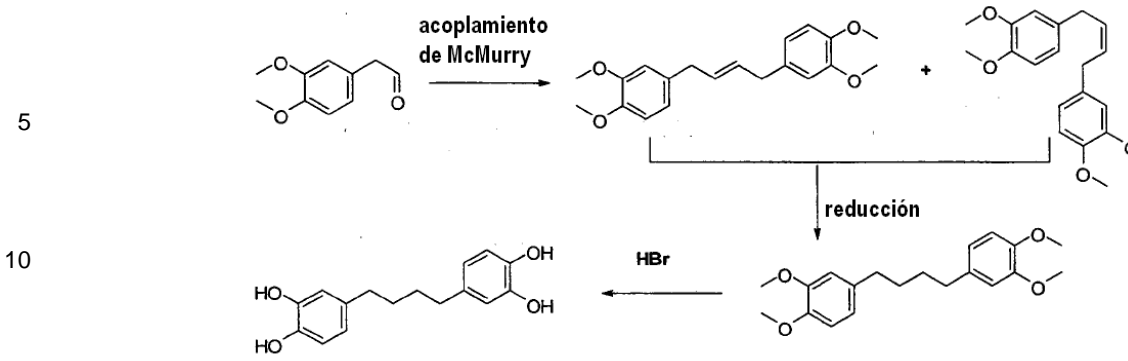
15 [0061] A continuación, se establecen métodos para sintetizar el NDGA modificado con puente de butano (BB-N) y el compuesto derivado de ácido nordihidroguaiarético tetra-O-sustituido modificado con puente de butano designado como BB-Sb4N.

20 [0062] En la bibliografía se describieron varios métodos para sintetizar 1,4-bis(catecol-4-il)-butano, uno de los materiales de partida, (tales como, síntesis de múltiples etapas, véase Anticancer Drug Design, 2001, 16, 261-270; y mediante homoacoplamiento del correspondiente ácido bornónico, véase, Tetrahedron Lett, 2002, 43, 8149-8151). sin embargo, estos métodos produjeron rendimientos bajos del producto esperado y algunos materiales de partida no estaban fácilmente disponibles.

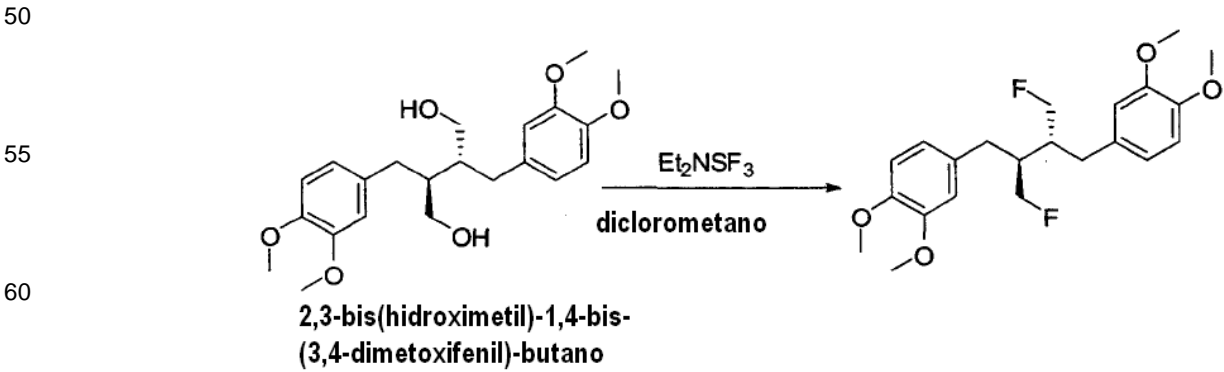
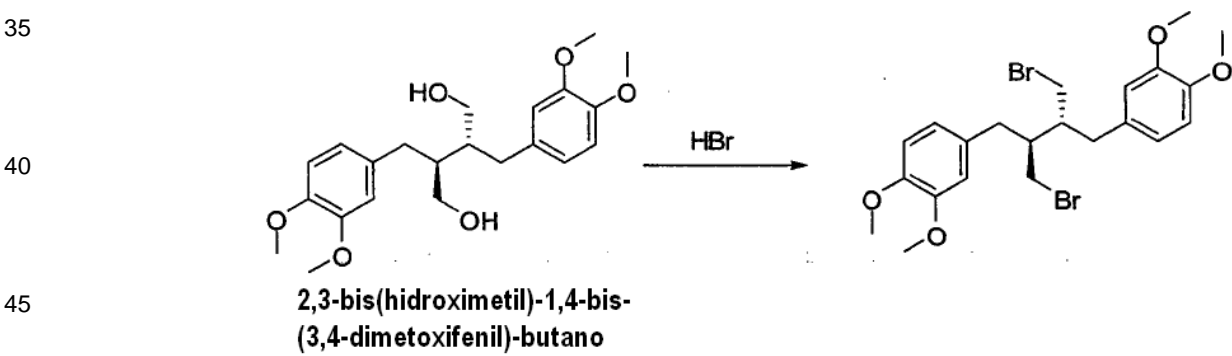
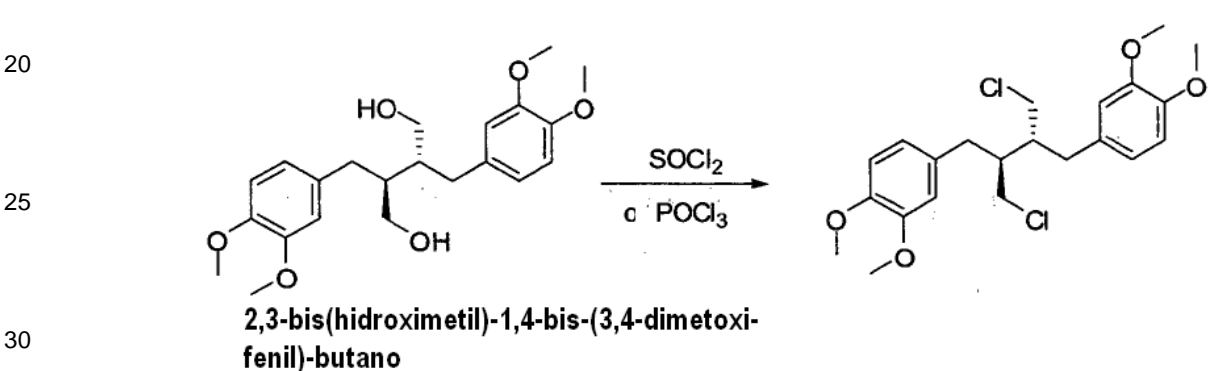
25 [0063] Para superar las deficiencias de los métodos de síntesis anteriores, los inventores desarrollaron un nuevo método para sintetizar el 1,4-bis(catecol-4-il)-butano esperado, que se obtiene en un rendimiento destacadamente elevado mediante un procedimiento simplificado.

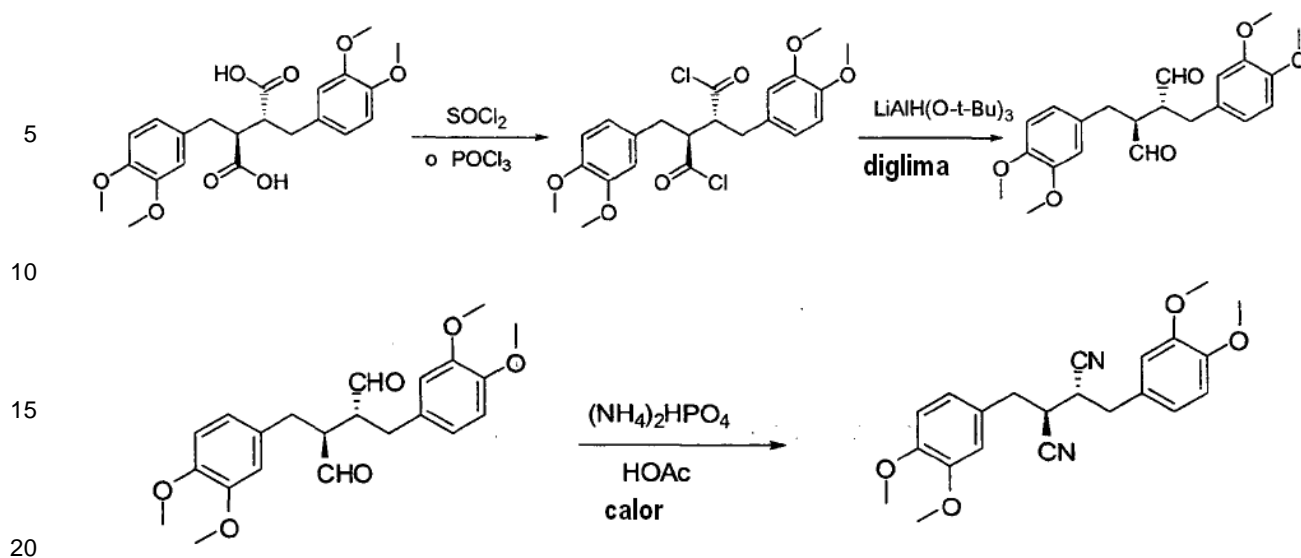
30 [0064] Acoplamiento de McMurry de un aldehído para producir una mezcla de compuestos de forma cis- y trans-, que se reducen para producir el tetra-O-metil-BB-N esperado como precursor para los derivados de BB-N de fórmula V:

35



15 **[0065]** Otros 1,4-bis(catecol-4-il)butanos sustituidos con puente de butano se pueden sintetizar de la siguiente manera:

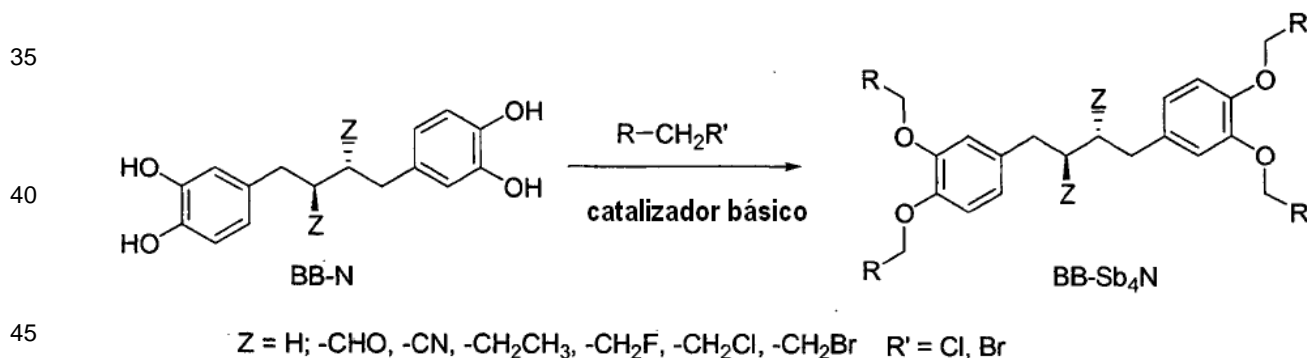




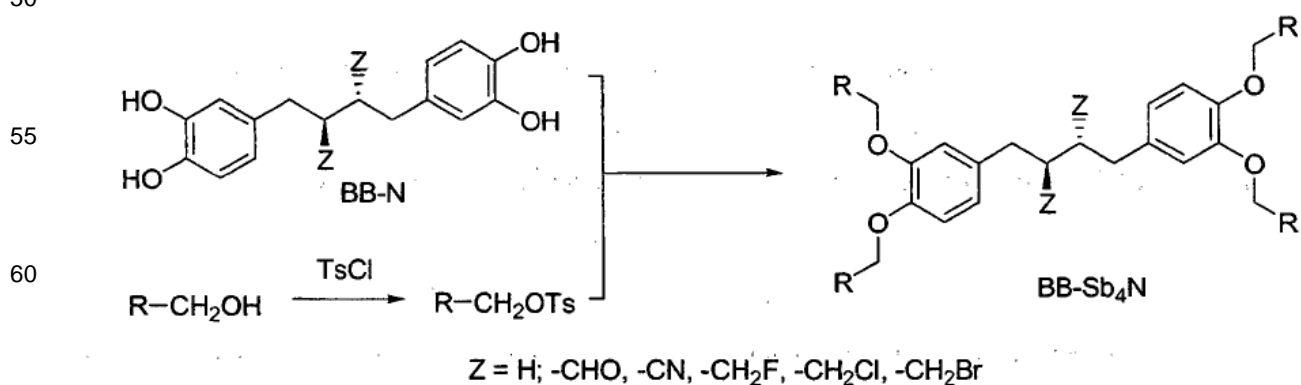
[0066] El 2,3-bis(hidroximetil)-1,4-bis(3,4-dimetoxifenil)-butano de partido se podía sintetizar según la bibliografía (JACS, 1957, 79, 3823-3827; Tetrahedron: Ass. 1998, 9, 2827-2831; Tetrahedron 1996, 52(39), 12799-12814; Tetrahedron Ass. 1995, 6(4), 843-844.)

[0067] A continuación, se exponen los métodos para sintetizar los derivados de NDGA tetra-O-sustituidos modificados con puente de butano unidos por éter BBS₄N (Fórmula VI) a partir de los derivados de NDGA modificados con puente de butano BB-N (Fórmula V, donde los grupos X se sustituyen por los grupos Z tal como se explicó anteriormente) se exponen a continuación.

[0068] Método general 1: reacción de haluro de alquilo con NDGA modificado con un puente de butano (BB-N) bajo condiciones catalíticas básicas:

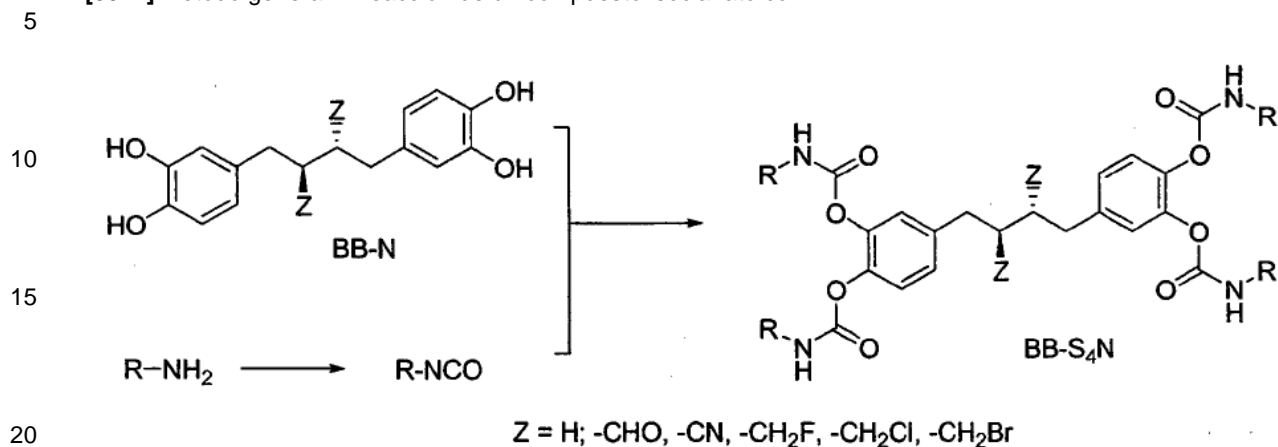


[0069] Método general 2: reacción de alcohol activado con ácido toluenosulfónico con NDGA modificado con un puente de butano (BB-N):

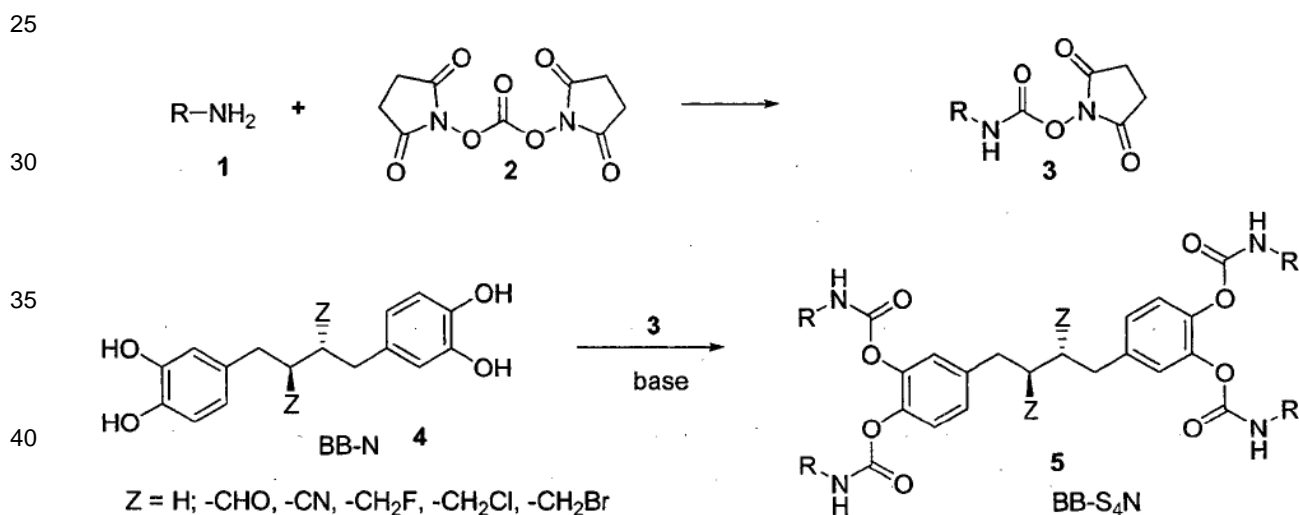


[0070] Métodos para sintetizar derivados de NDGA tetra-O-sustituidos modificados con un puente de butano unidos a carbamato (BBSb₄N):

[0071] Método general 1: reacción de un compuesto isocianato con BB-N



[0072] Método general 2: BB-N reacciona con un compuesto amino activado



[0073] Los detalles de la preparación de compuestos derivados de NDGA específicos BB-N y BB-S4N según la presente invención se establecerán a continuación en la sección de ejemplos.

[0074] Los presentes derivados de NDGA en una formulación adecuada, preferiblemente, pero no exclusivamente, como el principio activo o como uno de dos o más principios activos en una composición farmacéutica con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, según sea apropiado, pueden administrarse de forma segura a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento, mediante administración intranasal, inhalación, vía intravenosa, tal como mediante perfusión o mediante inyección en la vena central, por ejemplo, mediante vía intraarterial (con o sin oclusión), mediante vía intraperitoneal, intersticial, subcutánea, transdérmica, intradérmica, intraocular, intramuscular, vía tópica, vía intracraneal, vía intraventricular, vía oral, o vía bucal, o mediante implantación.

[0075] Además, los derivados de NDGA se pueden administrar de forma segura a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento en formas de solución, suspensión, semisólido o sólido, según sea apropiado, o en formulaciones liposomales, formulaciones de nanopartículas, o formulaciones micelares para la administración a través de una o más rutas mencionadas anteriormente.

[0076] Además, los derivados de NDGA en formulaciones liposomales, formulaciones de nanopartículas, o formulaciones micelares se pueden incluir en una formulación de polímeros biodegradables y administrarse de forma segura, tal como mediante la implantación subcutánea.

[0077] Las composiciones para administración en el presente documento pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como y sin limitación, una solución, suspensión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de

liberación controlada o polvo, un líquido que sea hidrófilo o hidrófobo, un polvo tal como uno resultante de la liofilización, un aerosol, una composición acuosa o soluble en agua, una composición hidrófoba, una composición liposomal, una composición micelar, tal como la basada en Tween® 80 o copolímeros de dos bloques, una composición de nanopartículas, una composición de polímeros, una composición de complejo de ciclodextrina, una emulsión, o como nanopartículas de base lipídica denominadas "lipocores."

[0078] La presente invención comprende además composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden los derivados de NDGA y portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones pueden incluir un tampón, que se selecciona de acuerdo con el uso deseado de los derivados de NDGA, y pueden incluir también otras sustancias apropiadas para el uso pretendido. Los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente un tampón apropiado, una amplia variedad de los cuales son conocidos en la técnica, adecuado para un uso determinado, en vista de la presente descripción. En algunos casos, la composición puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, una variedad de los cuales son conocidos en la técnica. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en este documento se describen en una variedad de publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Gennaro (Gennaro, A., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins, (1995)); Ansel, et al. (Ansel, H.C. et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins (1999)); y Kibbe (Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición Amer. Pharmaceutical Assoc.).

[0079] Las composiciones del presente documento se formulan de acuerdo con el modo de administración potencial. Por lo tanto, si la composición está destinada a ser administrada por vía intranasal o por inhalación, por ejemplo, la composición puede convertirse a una forma de polvo o aerosol, como sea convencional en la técnica, para tales fines. Otras formulaciones, tales como para la administración oral o parenteral, también se utilizan como sea convencional en la técnica.

[0080] Las composiciones o formulaciones adecuadas para la administración oral o con inyectable incluye adicionalmente una composición farmacéutica que contiene un butano catecólico para el tratamiento de las enfermedades indicadas en la que la composición se formula con un portador farmacéuticamente aceptable y otros excipientes opcionales, en la que el portador comprende por lo menos uno de un agente solubilizante y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en: (a) un disolvente orgánico soluble en agua, (b) una ciclodextrina (Incluyendo una ciclodextrina modificada); (c) un tensoactivo iónico, no iónico o anfipático, (d) una celulosa modificada, (e) un lípido insoluble en agua, y una combinación de cualquiera de los portadores (a)-(e).

[0081] El disolvente orgánico soluble en agua puede ser preferiblemente, pero no necesariamente, diferente de sulfóxido de dimetilo. Los disolventes orgánicos solubles en agua de ejemplo no limitantes incluyen polietilenglicol ("PEG"), por ejemplo, PEG 300, PEG 400 o monolaurato de PEG 400, propilenglicol ("PG"), polivinilpirrolidona ("PVP"), etanol, bencil alcohol o dimetilacetamida.

[0082] La ciclodextrina o ciclodextrina modificada puede ser, sin limitación, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, HP- β -CD o SBE- β -CD.

[0083] El tensoactivo iónico, no iónico o anfipático puede incluir, por ejemplo, sin limitación, un tensoactivo, tal como monolaurato de sorbitán polioxietileno (también conocido como polisorbato), que es un tensoactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80, disponibles comercialmente como Tween® 20 o Tween® 80, succinato de d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 ("TPGS"), monooleato de glicerol (también conocido como monooleato de glicerilo), un ácido graso esterificado o un producto de reacción entre óxido de etileno y aceite de ricino en una relación molar de 35:1, disponible comercialmente como Cremophor® EL. Preferiblemente, para ciertas realizaciones, cuando el tensoactivo es un tensoactivo no iónico, el tensoactivo no iónico está presente en ausencia de goma de xantano.

[0084] Los ejemplos no limitantes de una celulosa modificada incluyen celulosa de etilo ("EC"), hidroxipropilmetilcelulosa ("HPMC"), metilcelulosa ("MC") o carboximetilcelulosa ("CMC"). En una realización de la invención, el butano catecólico puede solubilizarse en celulosas modificadas que pueden diluirse en etanol ("EtOH") antes de su uso.

[0085] Los lípidos insolubles en agua incluyen, por ejemplo, un aceite o aceites, tales como aceite de ricino, aceite de sésamo o aceite de menta, una cera o ceras, tales como cera de abejas o cera de carnauba, y composiciones de emulsiones de grasas mixtas, tales como Intralipid® (Pharmacia & Upjohn, ahora Pfizer), utilizado según las recomendaciones del fabricante. Por ejemplo, se recomienda una dosis de adultos no superior a 2 g de grasa/kg de peso corporal/día (20 ml, 10 ml y 6,7 ml/kg de Intralipid® 10%, 20% y 30%, respectivamente). Se cree que el Intralipid® 10% contiene en 1.000 ml: 100 g de aceite de soja purificado, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, 22 g de glicerol anhidro, agua para inyección hasta 1000 ml. El pH se ajusta con hidróxido de sodio hasta un pH de aproximadamente 8. El Intralipid® 20% contiene en 1000 ml: 200 g de aceite de soja purificada, 12g de fosfolípidos de huevo purificados, 22 g de glicerol anhidro, agua para inyección hasta 1000 ml. El pH se ajusta con hidróxido de sodio hasta un pH de aproximadamente 8. Intralipid® 30% contiene en 1000 ml: 300 g de aceite de soja purificada, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, glicerol anhidro 16,7 g de agua para inyección hasta 1000 ml. El pH se

ajusta con hidróxido de sodio hasta un pH de aproximadamente 7,5. Estos productos Intralipid® se almacenan a temperatura ambiente controlada por debajo de 25°C y no deben congelarse.

5 **[0086]** En una realización de la invención, el derivado de NDGA se disuelve o se disuelve y diluye en diferentes portadores para formar una composición líquida para la administración oral en animales, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, en un aspecto de esta realización, el derivado de NDGA se disuelve en un disolvente orgánico soluble en agua, tal como PEG 300, PEG 400 o un monolaurato de PEG 400 (los "compuestos de PEG") o en PG. En otra realización, el derivado de NDGA se disuelve en una ciclodextrina modificada, tal como HP-β-CD o SBE-β-CD. En
10 aún otra realización, el presente derivado de NDGA se solubiliza y/o diluye en una formulación de combinación que contiene un compuesto PEG y HP-β-CD. En una realización adicional, el derivado de NDGA en el presente documento se disuelve en una celulosa modificada, tal como HPMC, CMC o EC. En aún otra realización, el derivado de NDGA en el presente documento se disuelve en otra formulación de combinación que contiene una ciclodextrina modificada y una celulosa modificada, tal como, por ejemplo, HP-β-CD y HPMC o HP-β-CD y CMC.

15 **[0087]** En otra realización, el derivado de NDGA se disuelve en tensoactivos iónicos, no iónicos o anfipáticos, tales como Tween® 20, Tween® 80, TPGS o un ácido graso esterificado. Por ejemplo, los presentes compuestos se pueden disolver en TPGS solo, o Tween® 20 solo, o en combinaciones, tales como TPGS y PEG 400, o Tween® 20 y PEG 400.

20 **[0088]** En una realización adicional, el presente derivado de NDGA se disuelve en un lípido insoluble en agua, tal como una cera, una emulsión de grasas, por ejemplo Intralipid®, o aceite. Por ejemplo, los presentes compuestos se pueden disolver en el aceite de menta solo, o en combinaciones de aceite de menta con Tween® 20 y PEG 400, o aceite de menta con PEG 400, o aceite de menta con Tween® 20, o aceite de menta con aceite de sésamo.

25 **[0089]** Naturalmente, la EC puede sustituirse o añadirse en lugar de la HPMC o CMC en los ejemplos anteriores; el monolaurato de PEG 300 o PEG 400 puede sustituirse o añadirse en lugar de PEG 400 en los ejemplos anteriores; Tween® 80 pueden sustituirse o añadirse en lugar de Tween® 20 en los ejemplos anteriores; y otros aceites, tales como aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite mineral o glicerina, pueden sustituirse o añadirse en lugar del aceite de menta o aceite de sésamo en los ejemplos anteriores.

30 **[0090]** Además, se puede aplicar calentamiento, por ejemplo, calentamiento hasta una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 90°C, en el transcurso de formular cualquiera de estas composiciones para conseguir la disolución de los compuestos en el presente documento o para obtener una suspensión distribuida uniformemente del derivado de NDGA.

35 **[0091]** En todavía una realización adicional, el derivado de NDGA se puede administrar por vía oral como un sólido, ya sea sin ningún portador de acompañamiento o con el uso de portadores. En una realización, el derivado de NDGA se disuelve primero en un vehículo líquido como en los ejemplos anteriores, y posteriormente se convierte en una composición sólida para la administración como una composición oral. Por ejemplo, el derivado de NDGA se
40 disuelve en una ciclodextrina modificada, tal como HP-β-CD, y la composición se liofiliza para proporcionar un polvo que es adecuado para administración oral.

45 **[0092]** En una realización adicional, el derivado de NDGA se disuelve o suspende en una solución de TPGS, con calentamiento, según sea apropiado, para obtener una solución o suspensión distribuida uniformemente. Tras el enfriamiento, la composición se vuelve cremosa y es adecuada para la administración oral.

[0093] En aún otra realización, el derivado de NDGA se disuelve en aceite y se añade cera de abeja para producir una composición sólida cerosa.

50 **[0094]** En general, en la preparación de las formulaciones orales, el derivado de NDGA en el presente documento se solubiliza en primer lugar antes de añadir otros excipientes para producir composiciones de mayor estabilidad. Las formulaciones inestables no son deseables. Las formulaciones líquidas inestables con frecuencia forman precipitados cristalinos o soluciones bifásicas. Las formulaciones sólidas inestables con frecuencia tienen una apariencia granulosa y grumosa y algunas veces contienen líquidos que gotean. Una formulación sólida óptima tiene
55 una apariencia lisa, homogénea, y tiene un pequeño intervalo de temperatura de fusión. En general, las proporciones de los excipientes en la formulación pueden influir en la estabilidad. Por ejemplo, demasiado poco agente de endurecimiento, tal como cera de abejas, puede dejar la formulación demasiado líquida para una formulación oral elegante.

60 **[0095]** Por lo tanto, en general, para las formulaciones líquidas de la presente invención, los excipientes utilizados deben ser buenos disolventes del derivado de NDGA del presente documento. En otras palabras, los excipientes deben ser capaces de disolver el derivado de NDGA sin calentamiento. Los excipientes también deben ser compatibles entre sí independiente del derivado NDGA, de manera que pueden formar una solución, suspensión o emulsión estable. También, en general, para las formulaciones sólidas de la presente invención, los excipientes
65 utilizados deben ser también buenos disolventes del derivado de NDGA para evitar grumos y formulaciones no uniformes. Para evitar formulaciones sólidas que sean demasiado líquidas o heterogéneas en la textura, que son

indeseables, los excipientes deben ser compatibles entre sí de manera que formen un sólido uniforme y homogéneo, incluso en ausencia del derivado de NDGA.

- 5 **[0096]** La presente invención se refiere además a un método para producir la composición farmacéutica de la presente invención, el método que implica la fabricación o disposición del derivado de NDGA en una forma sustancialmente purificada, la combinación de la composición con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, y la formulación de la composición de una manera que es compatible con el modo de administración deseado.
- 10 **[0097]** Los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos en situaciones, por ejemplo, cuando se desea proporcionar un tratamiento a un sujeto que tiene una enfermedad proliferativa, tal como un tumor maligno, premaligno o benigno, una enfermedad viral, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad metabólica o una enfermedad vascular.
- 15 **[0098]** Los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar una variedad de tumores y cánceres, incluyendo, sin limitación, tumores malignos hematológicos, tales como leucemia, por ejemplo leucemia linfoblástica aguda o crónica, leucemia mielóide aguda o crónica, leucemia linfocítica aguda o crónica, leucemia mielógena aguda o crónica, leucemia aguda infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, células T cutáneas malignas, micosis fungoide, linfoma de células T cutáneas fibrosas no malignas, papulosis linfomatoide, hiperplasia linfocítica cutánea rica en células T, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, penfigoide bullosa, lupus eritematoso discoide, liquen plano, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, tumores neurológicos y tumores malignos, tales como neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma, glioma, glioma del tronco encefálico, ependimoma de tumor cerebral, meduloblastoma, cáncer de mama femenino y masculino, tumor carcinoide gastrointestinal, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células de los islotes, cáncer de células claras, sarcoma de células claras de las vainas tendinosas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneas, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, tumor de células germinales extragonadales, cáncer de los conductos biliares extrahepáticos, cáncer de ojo, melanoma intraocular, cáncer ductal, retinoblastoma de cáncer ocular, mucosa oral displásica, tumor oral invasivo, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, cáncer hepatocelular (del hígado), cáncer de la hipofaringe, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, cáncer de hígado, tumores de pulmón y cánceres, tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de Merkel, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, mieloma múltiple, tumores de las cavidades nasales, cáncer paranasal y sinusal, cáncer de nasofaringe, cáncer de la cavidad oral y el labio, cáncer de la orofaringe, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores pineales y neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer de células transicionales renales, de pelvis y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma de tejido blando en adultos, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, tumores testiculares y cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de la uretra, carcinoma urinario de células de transición y escamosas, tumores ginecológicos y cáncer, tal como cáncer de cuello uterino, tumores de ovario y cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer vaginal, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms, tumores hepáticos incluyendo carcinoma hepatocelular ("HCC") y tumores del conducto biliar, otros tumores de pulmón que incluyen cánceres de células pequeñas y cánceres de células claras, sarcomas en diferentes órganos; así como otros tipos de cáncer y tumores.
- 35 **[0099]** Los ejemplos no limitantes de enfermedades virales que se pueden tratar de manera efectiva por los derivados de NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, infecciones virales causadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH) (todos los subtipos), virus del herpes simplex 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), virus de la varicela zoster, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la viruela (viruela, viruela bovina, viruela del simio, vaccinia), Orthohepadnavirus, virus JC, y el virus BK, entre otros.
- 50 **[0100]** Los ejemplos no limitantes de enfermedades inflamatorias que se pueden tratar de manera efectiva por los derivados de NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, la artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Still, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades inflamatorias del intestino, tales como la colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, entre otras.
- 55 **[0101]** Los ejemplos no limitantes de enfermedades metabólicas que se pueden tratar de manera efectiva por los derivados de NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo, la diabetes mellitus (inicio juvenil e inicio adulto), diabetes insipidis, síndrome X, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipoglucemia, ateroma, cetoacidosis, enfermedad de Addison, síndrome de Cushing, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, leucodistrofia y porfiria, entre otras.
- 60

[0102] Los ejemplos no limitantes de enfermedades vasculares que se pueden tratar de manera efectiva por los derivados de NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, hipertensión arterial, hipertensión arterial pulmonar, enfermedad cardiovascular y degeneración macular, entre otras.

5 **[0103]** Tal como se mencionó anteriormente, una cantidad eficaz del derivado de NDGA se administra al huésped, donde "cantidad eficaz" significa una dosis suficiente para producir un resultado deseado. En algunas realizaciones, el resultado deseado es por lo menos una reducción en una o más síntomas de la infección viral o la enfermedad inflamatoria, metabólica o proliferativa. Habitualmente, las composiciones de la presente invención contendrán de menos de aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 99% del principio activo, es decir, el derivado de NDGA
10 en el presente documento; opcionalmente, la presente invención contendrá de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 90% del principio activo. La dosis apropiada para ser administrada depende del sujeto a tratar, tal como la salud general del sujeto, la edad del sujeto, el estado de la enfermedad o afección, el peso del sujeto, por ejemplo. En general, pueden administrarse de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg a un niño y pueden administrarse de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 gramos a un adulto. El derivado de NDGA se puede administrar en una sola dosis o, más habitualmente, múltiples dosis. Las dosificaciones preferidas para un agente determinado son fácilmente determinables por los expertos en la materia mediante una variedad de medios en vista de la presente descripción. Pueden determinarse fácilmente otras dosificaciones eficaces por un experto habitual en la materia en vista de la presente descripción a través de ensayos de rutina que establecen curvas de dosis-respuesta. La cantidad de derivado de NDGA, naturalmente, variará dependiendo del derivado particular de NDGA utilizado, así como de la naturaleza de la formulación que contiene el derivado de NDGA, y la vía de administración.

25 **[0104]** La frecuencia de administración del derivado NDGA, al igual que con las dosis, se determinará por el cuidador en base a la edad, peso, estado de la enfermedad, el estado de salud y la capacidad de respuesta del paciente. Por lo tanto, los agentes se pueden administrar una o más veces al día o, según sea apropiado, durante el tiempo que sea necesario según se determina convencionalmente.

30 **[0105]** En la presente invención se incluyen kits con dosis múltiples o unitarias del derivado de NDGA. En dichos kits, además de los recipientes que contienen las dosis unitarias o múltiples de las composiciones que contienen el derivado de NDGA habrá instrucciones para su uso para una indicación dada, tal como una hoja de información o prospecto con instrucciones que describen el uso y beneficios asociados de los medicamentos en el tratamiento de la condición patológica de interés, tal como cualquiera de un número de enfermedades inflamatorias, metabólicas, vasculares o proliferativas o una infección viral.

35 **[0106]** La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos de trabajo no limitativos específicos, excepto según se indique cuando los ejemplos se indican como proféticos.

[0107] Procedimiento general.

40 **[0108]** Todas las reacciones se llevaron a cabo en material de vidrio secado en estufa (120°C) bajo una atmósfera de nitrógeno, a menos que se indique lo contrario. La acetona, diclorometano, 1,4-dioxano, acetato de etilo, hexano, y tetrahidrofurano se adquirieron de Mallinckrodt Chemical Co. La acetona se secó con tamices moleculares de 4 Å y se destiló. El diclorometano, acetato de etilo y hexano se secaron y se destilaron a partir de CaH₂. El 1,4-dioxano y el tetrahidrofurano se secaron por destilación a partir de sodio y benzofenona bajo una atmósfera de nitrógeno. El ácido nordihidroguaiarético se adquirió de Fluka Chemical Co. El clorhidrato de 4-(2-cloroetil)morfolina, el clorhidrato de 4-(3-cloropropil)morfolina, el monoclóhidrato de 1-(3-cloropropil)piperidina, el monoclóhidrato de 1-(2-cloroetil)piperidina, 2-cloroetanol, (2-cloroetoxi)etano, clorhidrato de 1-(2-cloroetil)pirolidina, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), y carbonato de potasio se adquirieron de Aldrich Chemical Co.

50 **[0109]** El punto de fusión se obtuvo con un aparato para el punto de fusión Buchi 535. La cromatografía de capa fina (TLC) analítica se realizó sobre placas precubiertas (gel de sílice 60 F-254), adquirida de Merck Inc. Los análisis cromatográficos de gases se realizaron en un instrumento Hewlett-Packard 5890 Serie II equipado con una columna capilar de caucho de metilsilicona reticulado de 25-m (d.i. 0,32 mm). Se utilizó gas nitrógeno como gas portador y el caudal se mantuvo constante a 14,0 ml/min. El tiempo de retención t_R se midió bajo las siguientes condiciones:
55 temperatura del inyector 260°C, temperatura de columna isotérmica 280°C. Los análisis de cromatografía de gases y espectro de masas de baja resolución se realizaron en un sistema GC Agilent Technology 6890N Network equipado con un detector de selectivo de masas Agilent 5973 Network y una columna capilar HP-1. La purificación mediante cromatografía en columna por gravedad se llevó a cabo mediante el uso de gel de sílice 60 de Merck Reagents (tamaño de partícula 0,063-0,200 mm, malla 70-230 ASTM). La pureza de todos los compuestos fue superior al 99,5
60 %, tal como se comprobó mediante HPLC o GC.

[0110] Los espectros ultravioletas (UV) se midieron en un espectrofotómetro UV/VIS Hitachi U3300. Los espectros infrarrojo (IR) se midieron en un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier Jasco FT-IR-5300. Los números de onda descritos se refieren a la absorción de poliestireno a 1601 cm⁻¹. Las intensidades de absorción se registraron mediante las siguientes abreviaturas: s, fuerte; m, medio; w, débil. La intensidad fluorescente se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitach F-4500. Los espectros de RMN de protón se obtuvieron en un

espectrómetro Varian Mercury-400 (400 MHz) mediante el uso de cloroformo-d como disolvente y 3-(trimetilsilil)propionato de sodio como patrón interno. Los espectros de RMN carbono 13 se obtuvieron en un espectrómetro Varian Mercury-400 (100 MHz) mediante el uso de cloroformo-d o D₂O como disolvente. Los desplazamientos químicos de carbono 13 se refieren al centro del triplete de CDCl₃ (δ 77,0 ppm). Las multiplicidades se registran mediante las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; m, multiplete; J, constante de acoplamiento (Hertz). Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas JEOL JMS-HX110. Los análisis por espectrometría de masas por ionización (ESI-MS) se realizaron en un analizador de masas de atrapamiento de iones de cuadrupolo ajustado con una fuente de ionización por electrospray de Finnigan LCQ, Finnigan MAT.

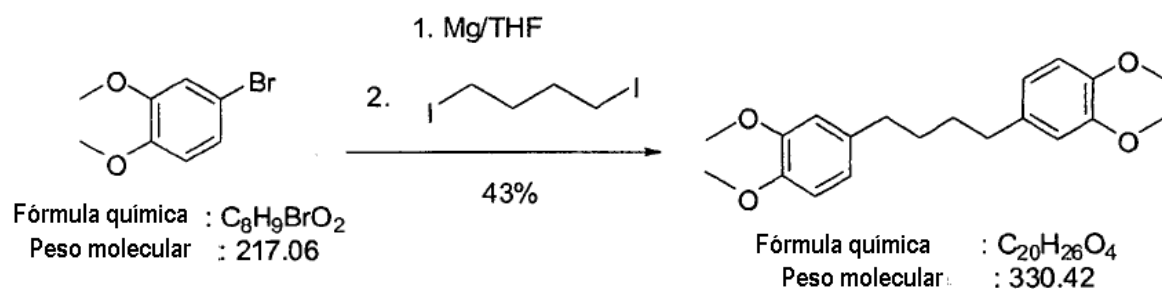
[0111] La computación se realizó en una terminal Silicon Graphics O2+. Se utilizó software Chemoffice Ultra 10.0 para dibujar estructuras químicas y esquemas sintéticos. Se utilizó el software PCModel 7.5 para la energía minimizada con el campo de fuerza de valencia consistente (CVFF) hasta que la derivada máxima era inferior a 1,0 kcal mol⁻¹ Å⁻¹.

[0112] Ejemplo de referencia 1

[0113] Síntesis de 1,4-bis-(3,4-metoxifenil) butano (C₂₀H₂₆O₄, FW = 330,42)

"Compuesto A"

[0114]



[0115] El compuesto se sintetizó utilizando una modificación de Nakamura, et al.²⁰ que implica el acoplamiento de 1,4-diyodobutano con un reactivo de Grignard derivado de 3,4-dimetoxibromobenceno con un 43% de rendimiento. p.f. 93-94°C (literatura²¹ p.f. 91-92°C). HPLC pureza: 99,25%.

[0116] ¹HRMN (CDCl₃, 300MHz): δ = 1.58-1.68 (m, 4H), 2.55-2.65 (m, 4H), 3.85 (s, 6H), 3.86 (s, 6H), 6.69 (s, 2H), 6.70 (dd, J= 7.9, 1.6Hz, 2H), 6.78 (d, J= 7.9Hz, 2H) ppm, consistente con la estructura.

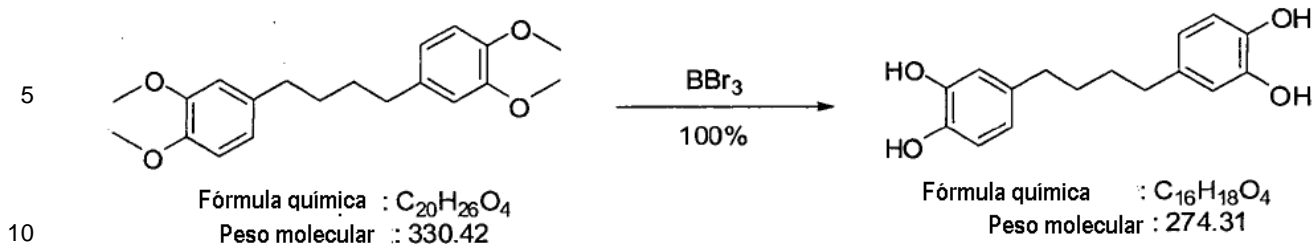
[0117] RMN ¹³C (CDCl₃, 75MHz): δ = 31.1, 35.3, 55.7, 55.9, 111.2, 111.7, 120.1, 135.2, 147.0, 148.7 ppm; consistente con la estructura.

[0118] Análisis: calculado para C₂₀H₂₆O₄, C: 72,70, H: 7,95; hallado C: 72,51, H: 7,82.

[0119] MS (EI), m/e = 331 (M+1); consistente con C₂₀H₂₆O₄

[0120] Ejemplo de referencia 2

[0121] Síntesis de 1,4-bis-(3,4-hidroxifenil) butano (alternativamente denominado 1,4-bis(catecol-4-il)-butano) [C₁₆H₁₈O₄, FW = 274.31] "Compuesto B"



15 [0122] Este compuesto se sintetizó mediante la escisión del grupo metoxi aromático del producto del Ejemplo 1, (1,4-bis-(3,4-metoxifenil)butano), usando tribromuro de boro²² en rendimiento cuantitativo. El crudo de producto se encontró que era puro mediante TLC, por lo que se utilizó para la preparación de derivados sin purificación adicional. La muestra analítica se purificó mediante una columna cromatográfica de gel de sílice flash usando diclorometano y metanol (95:5, V/V) como eluyente.

20 [0123] p.f. 140 - 142°C. HPLC pureza: 98.5%.

[0124] ¹H RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ = 1.60 (t, J = 6.5 Hz, 4H, 2 CH₂), 2.65 (t, J = 6.5 Hz, 4H, 2 CH₂), 6.65 - 6.85 (m, 6H, 6 Ar-H), 9.56 (brs, 4H, 4OH) ppm; consistente con la estructura.

25 [0125] ¹³C RMN (DMSO-d₆, 75 MHz): δ = 31.5, 36.3, 114.5, 115.8, 120.1, 136.5, 143.5, 145.5 ppm, consistente con la estructura.

[0126] MS (EI), m/e = 275 (M + 1), consistente con C₁₆H₁₈O₄.

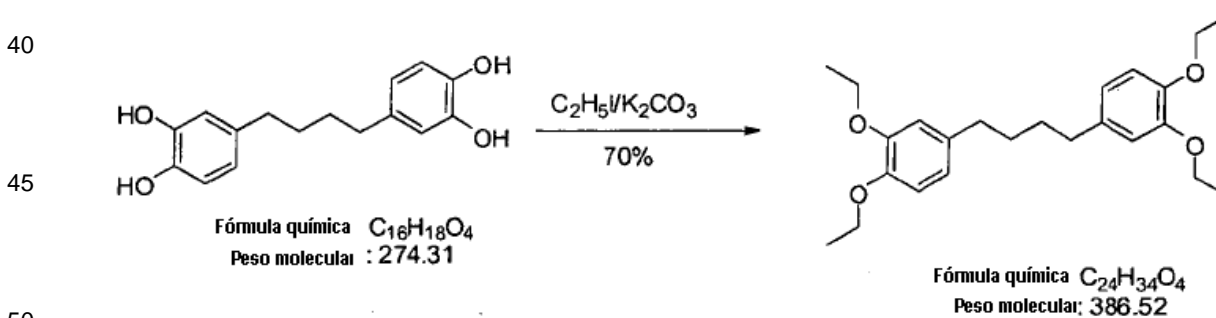
30 [0127] Análisis: calculado para C₁₆H₁₈O₄, C: 70,06, H: 6,61; hallado, C: 70,31, H: 6,82.

[0128] Ejemplo de referencia 3

[0129] Síntesis de 1,4-bis-(3, 4-etoxifenil) butano (C₂₄H₃₄O₄, FW = 386,52)

35 "Compuesto C"

[0130]



55 [0131] A una solución de 1,4-bis-(3,4-hidroxifenil)butano del Ejemplo 2 (700 mg, 2,56 mmoles) en acetona (26 ml) se añadió carbonato de potasio (2,39 g, 16,9 mmol, 6,6 equivalentes) y yodoetano (2,40 g, 15,4 mmol, 6,0 equivalentes) y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas. La TLC de la reacción indicó la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se filtró y los sólidos se lavaron con acetona. El filtrado combinado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml) y se lavó con agua (50 ml). La capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el crudo del producto (1,06 g), que se cristalizó en acetato de etilo-isopropanol (1:1, 6 ml) para producir un producto cristalino puro (700 mg, rendimiento del 70%).

[0132] p.f. 113-115°C. HPLC pureza: 98.50%.

65 [0133] ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ = 1.43 (t, J = 6.8Hz, 6H), 1.44 (t, J = 6.8Hz, 6H), 1.61-1.65 (m, 4H), 2.40-2.60 (m, 4H), 4.06 (q, J = 6.8Hz, 4H), 4.07 (q, J = 6.8Hz, 4H), 6.63-6.72 (m, 4H), 6.79 (d, J = 8.2Hz, 2H) ppm; consistente con la estructura.

[0134] ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 14.9, 31.1, 35.3, 64.5, 64.7, 113.9, 114.2, 120.4, 135.5, 146.8, 148.6 ppm; consistente con la estructura.

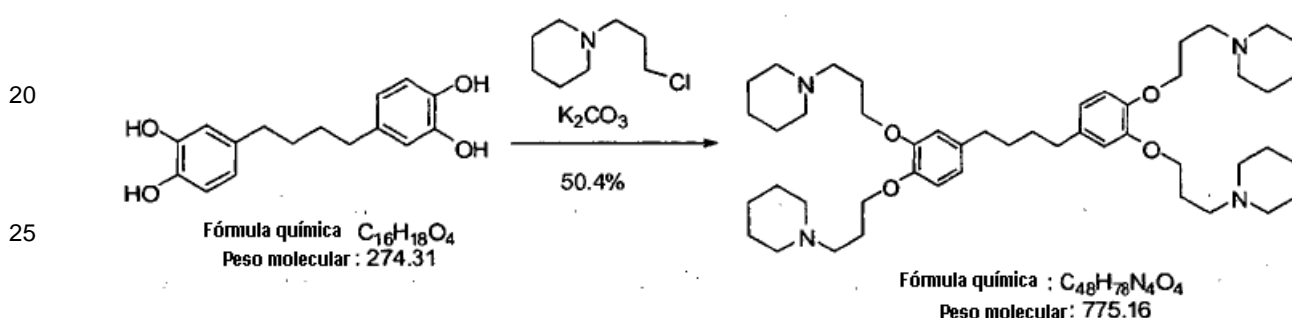
5 [0135] Análisis: calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_4$, C: 74,57, H: 8,88; hallado, C: 74,78, H: 8,75; consistente con la estructura.

Ejemplo 4

10 [0136] Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxilfenil]-butano ($\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_4$, FW = 775,16) "Compuesto D"

[0137] Este compuesto se pudo sintetizar por lo menos mediante dos métodos.

15 [0138] Método 1: utilizando carbonato de potasio como catalizador



30 [0139] A una solución de 1,4-bis-(3,4-hidroxifenil)butano (1,10 g, 4,0 mmoles) en acetona (40 ml) se añadió carbonato de potasio (13,25 g, 96 mmol, 24 equivalentes), clorhidrato de N-(3-cloropropil)piperidina (9,5 g, 48 mmol, 12 equivalentes) y yoduro de sodio (2,4 g, 16 mmol, 4 equivalentes) y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 40 horas. La TLC indicó la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se filtró y los sólidos se lavaron con acetona. El filtrado combinado se concentró al vacío. Se añadió hexano (200 ml) al residuo y la mezcla se calentó a 60°C durante 15 min en un dispositivo rotavaporTM. La capa de hexano se decantó y el procedimiento se repitió dos veces más sobre el residuo. Los extractos de hexano combinados se concentraron a presión reducida para producir el crudo de producto. Se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando gel de sílice (250 g) y elución en gradiente con hexano:acetato de etilo:triethylamina (5:5:0,5) a acetato de etilo:metanol:triethylamina (9:1:0,5) para producir el producto puro (1,56 g, rendimiento del 50,4%) como un sólido blanco. Se purificó adicionalmente mediante cristalización en acetato de etilo-hexano para producir un producto cristalino (1,03 g).

35

40

[0140] p.f. 91-93°C. HPLC pureza: 99,43%.

45 [0141] ^1H RMN (CDCl_3 , 100MHz): δ = 1.38-1.50 (m, 8H), 1.53-1.68 (m, 20H), 1.95-2.07 (m, 8H), 2.35-2.60 (m, 28H), 3.9 (t, J=6.4Hz, 4H), 4.0 (t, J=6.4Hz, 4H), 6.63-6.72 (m, 4H), 6.77 (d, J=8.0Hz, 2H) ppm, consistente con la estructura.

50 [0142] ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 24.5, 27.0, 31.3, 35.4, 54.7, 56.2, 67.9, 68.1, 114.4, 114.7, 120.6, 135.7, 147.1, 149.0 ppm, consistente con la estructura.

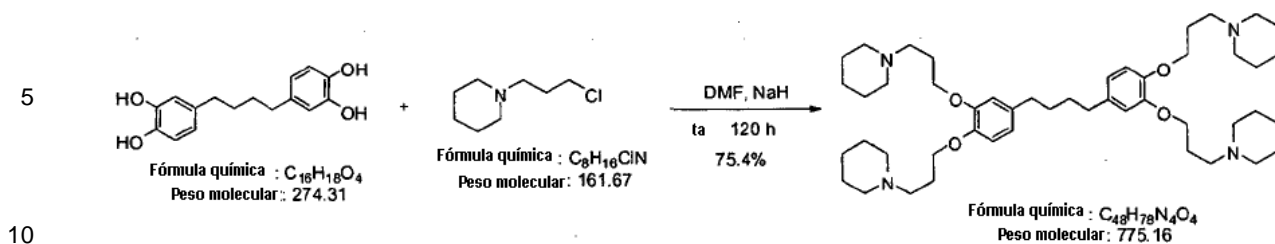
[0143] Análisis: calculado para $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_4$, C: 74,37, H: 10,16, N: 7,23; hallado, C: 74,07, H: 10,06, N: 7,13.

[0144] MS (ESI): m/z = 803,7 (M + H)⁺, 802,7 (M), 678,6, 402,4, 126,0, consistente con la estructura.

55 [0145] Método 2: utilizando hidruro de sodio como catalizador

60

65



15 **[0146]** A una solución de 1,4-bis(3,4-dihidroxi-fenil)-butano (13,0 g, 45,78 mmol) en DMF anhidra (1 L) se añadió una suspensión al 60% de hidruro de sodio en parafina (9,9 g, 248 mmol 5,4 equivalentes) y la mezcla se calentó a 65°C durante una hora. A continuación, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se añadieron N-(3-cloropropil)piperidina (37,0 g, 229 mmol 5,0 equivalentes) y yoduro de sodio (6,9 g, 46 mmol 1 equivalente) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 120 horas. La TLC indicó la conversión completa en el producto.

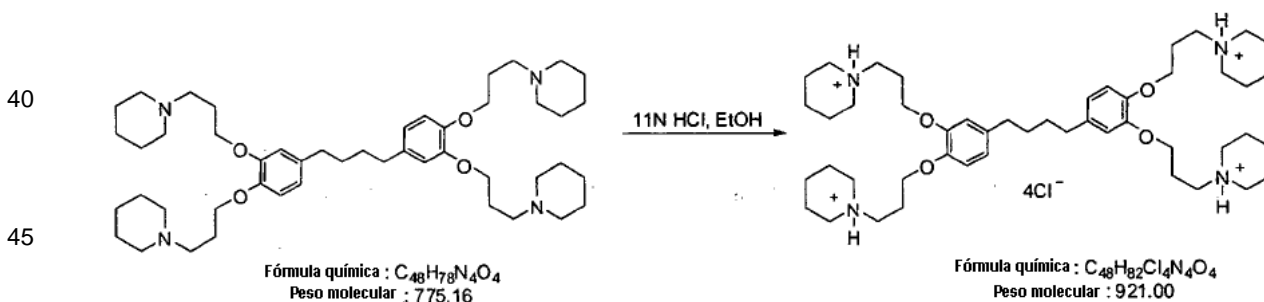
20 **[0147]** La purificación de la reacción se llevó a cabo mediante la adición lenta de la mezcla de reacción a agua (3 L) y éter dietílico (2,5 L). La capa acuosa se extrajo de nuevo con éter dietílico (2 L). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una solución saturada de cloruro de sodio (750 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida. El crudo de producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. La columna se construyó utilizando gel de sílice (500 g) y la mezcla de disolventes acetato de etilo:metanol:triethylamina (93:2:5) y se eluyó con el gradiente de acetato de etilo:metanol:triethylamina (93:2:5 a 91:4:5) para producir el producto como un sólido blanco (26,7 g, rendimiento del 75,4%). Este producto se cristalizó en acetato de etilo:hexano para producir el compuesto cristalino (21,4 g)

25

30 **[0148]** Los datos analíticos son idénticos a los obtenidos de la muestra preparada por el método 1.

30 **[0149] Ejemplo 5**

35 **[0150] Síntesis de sal de tetrakisclorhidrato de 1,4-bis(3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]fenil)-butano ($C_{48}H_{78}N_4O_4 \cdot 4HCl$, FW = 921,00) "Compuesto E"**



50 **[0151]** A toda la solución enfriada con hielo (0-5°C) de HCl acuoso concentrado (7,0 mL, de 11 N, 77 mmol, 24 equiv.) en etanol al 95% (21 ml) se añadió gota a gota una solución de 1,4-bis {3,4-bis [3-(piperidin-1-il)propoxi] fenil}-butano (2,50 g, 3,225 mmol) en etanol al 95% (21 ml)*. La solución se dejó agitar a 0-5°C durante tres horas y se extrajo el disolvente en un evaporador rotatorio, manteniendo la temperatura del baño de agua a 45°C. La sal de clorhidrato se secó a vacío elevado durante 48 horas. A continuación, el crudo de producto se cristalizó en etanol:éter para producir 2,46 g del producto (rendimiento del 83,2%) después de secarse a vacío elevado durante 72 horas. *Cabe indicar que los materiales de partida 1,4-bis {3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi] fenil}-butano no se disolvieron completamente en etanol al 95% a temperatura ambiente, por lo que la mezcla se calentó a 45°C durante lo cual se disolvió el 1,4-bis{3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]fenil}-butano disolvió. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió a la solución etanólica de HCl.

55

60

[0152] Los datos analíticos para este producto se proporcionan a continuación.

[0153] p.f. 270 - 280°C (dec.). HPLC pureza: 98,5%. Contenido de humedad mediante el método de Karl Fisher: 2,4974%.

65

[0154] Análisis elemental: $C_{48}H_{82}N_4O_4Cl_4$, requerido, C: 62,59, H: 8,97, y N: 6,08; hallado, C: 62,38, H: 9,30, y N: 5,89.

[0155] Análisis elemental de cloro mediante un método de valoración (base anhidra): teoría, 15,40%; hallado: 15,44 % (100,3 % de la teoría).

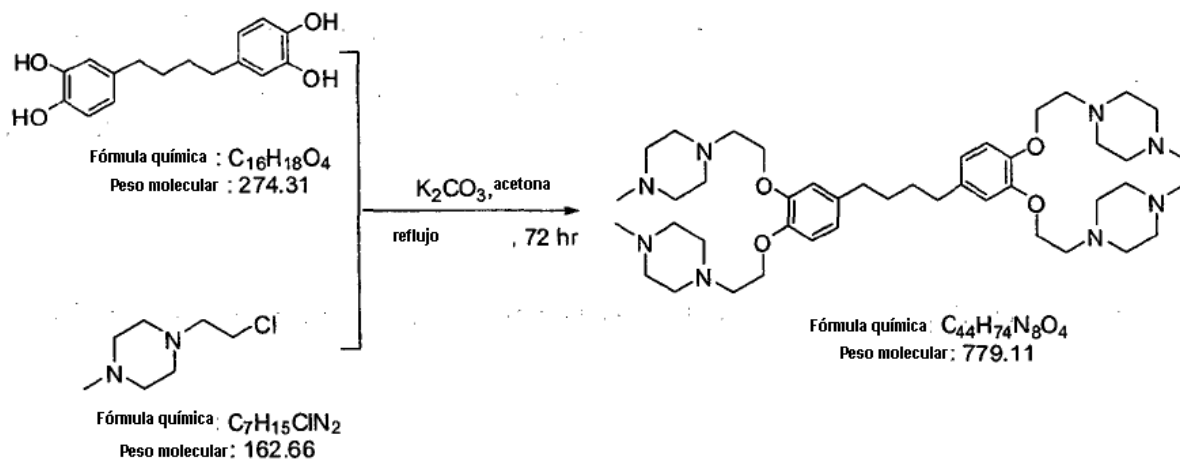
[0156] 1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ = 1.25 - 1.50 (m, 8H), 1.55 - 1.75 (m, 12 H), 1.82 (d, J = 14.4 Hz, 8H), 2.06 -2.10 (m, 8H), 2.39 (s, 4H), 2.76 (t, J = 12.1 Hz, 8H), 3.11 (q, J = 7.8Hz, 8H), 3.39 (d, J= 11.6Hz, 8H), 3.98 - 4.00 (m, 8H), 6.64 (dd, J = 1.8, 8.0 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 1.8 Hz, 2M), 6.84 (d, J = 8.0, 2H) ppm; consistente con la estructura.

[0157] ^{13}C RMN (D_2O , 100 MHz): δ = 24.5, 27.0, 31.3, 35.4, 54.7, 56.2, 67.9, 68.1, 114.4, 114.7, 120.6, 135.7, 147.1, 149.0 ppm; consistente con la estructura.

[0158] MS (ESI), m/z = 777 (M+ + 2), 775 (M+); consistente con la base libre $C_{48}H_{78}N_4O_4$ (775,16).

[0159] Ejemplo 6

[0160] Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis[2-(1-metil-piperazin-4-il)-etoxi]fenil}-butano ($C_{44}H_{74}N_8O_4$; FW = 779,11) "Compuesto F"



[0161] Etapa 1. Síntesis de N'-metil-N-2-cloroetilpiperazina a partir de su sal de clorhidrato.

[0162] Se añadió el diclorhidrato de N'-metil-N-2-cloroetilpiperazina (10,0 g, 45,4 mmol) lentamente a una mezcla de carbonato de potasio acuoso al 50% (200 ml) y éter (200 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min., se separaron las fases, la fase acuosa se extrajo con éter (2 x 200 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para producir N'-metil-N-2-cloroetilpiperazina (6,2 g).

[0163] Etapa 2: síntesis de 1,4-bis{3,4-bis[2-(1-metil-piperazin-4-il)-etoxi]fenil}-butano.

[0164] A una solución de compuesto 2 (1,0 g, 3,65 mmol) en acetona (40 ml) se añadieron carbonato de potasio anhidro (2,52 g, 18,25 mmol, 5 equivalentes), y N'-metil-N-2-cloroetilpiperazina (2,90, 18,25 mmol) y la mezcla se puso a reflujo. Después de aproximadamente 36 horas, se añadieron cantidades adicionales de carbonato de potasio (2,528 g) y N'-metil-N-2-cloroetilpiperazina (2,90 g) y se continuó el reflujo durante 36 horas más. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se filtró, se lavó con acetona (200 ml) y se concentró. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (250 g) usando un gradiente de elución con $CH_2Cl_2:MeOH:Et_3N$, respectivamente, de 85:10:5 a 65:30:5, para producir el compuesto del título (0,88 g, 31,1%). Se purificó adicionalmente mediante cristalización en acetato de etilo-hexano.

[0165] HPLC pureza: 99,67%.

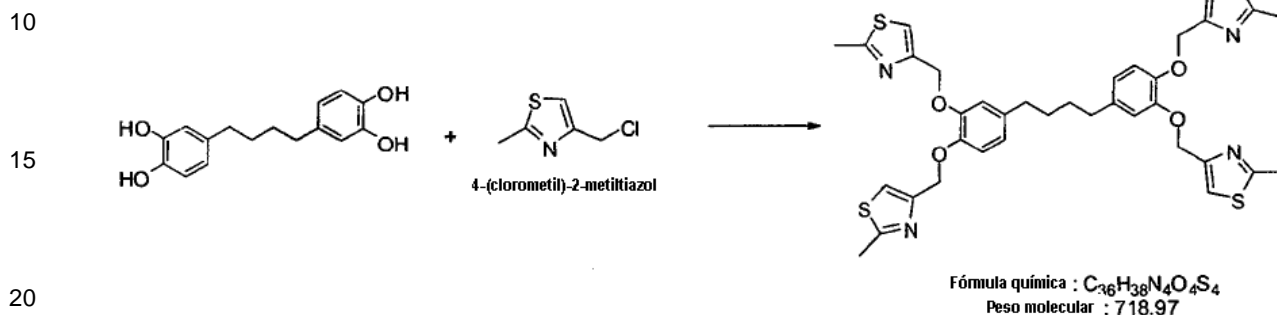
[0166] 1H RMN ($CDCl_3$, 300MHz): δ = 1.55 - 1.63 (m, 4H), 2.28 (s, 6H), 2.29 (s, 6H), 2.33 - 2.63 (m, 36H), 2.81 (t, J=6.0 Hz, 4H), 2.82 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 4.10 (q, J=6.0 Hz, 8H), 6.67 (dd, J = 8.2Hz y 1.7Hz, 2H), 6.70 (d, J = 1.7Hz, 2H), 6.78 (d, J = 8.2 Hz, 2H) ppm; consistente con la estructura.

[0167] ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 31.2, 35.3, 46.1, 53.7, 55.1, 57.3, 67.3, 67.4, 114.4, 114.7, 120.9, 146.0, 147.9, 148.7 ppm; consistente con la estructura.

[0168] Análisis: calculado para $C_{44}H_{74}N_8O_4$, C: 67,83, H: 9,59 y N: 14,39; hallado, C: 67,53, H: 9,71 y N: 14,03.

[0169] Ejemplo 7

5 [0170] Síntesis de sal de tetrakisclorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis(2-metil-tiazol-4-il-metoxi)fenil}-butano ($C_{36}H_{38}N_4O_4S_4$, FW = 718,97) "Compuesto G"



25 [0171] En primer lugar, se generó 4-clorometil-2-metil tiazol a partir de su clorhidrato. Esto se realizó mediante la adición de clorhidrato de 4-clorometil-2-metil tiazol (2,5 g, 13,5 mmol) a carbonato de potasio acuoso al 50% y éter (30 ml de cada uno). La mezcla se agitó durante 15 minutos. La fase orgánica se separó, se secó sobre K_2CO_3 anhidro y se concentró para producir 4-clorometil-2-metil tiazol (2,01 g). Éste se utilizó en la síntesis de la sal tetrakisclorhidrato de 1,4-bis {3,4-bis(2-metil-tiazol-4-il-metoxi)fenil}-butano de la siguiente manera.

30 [0172] A una solución enfriada en hielo de 1,4-bis-(3,4-hidroxifenil)butano del ejemplo 2 (616 mg, 2,25 mmoles) en DMF (15 ml) se añadió una suspensión al 60% de hidruro de sodio en parafina (541 mg, 13,5 mmol, 6 equivalentes). La mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos y a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadió una solución del 4-clorometil-2-metil tiazol (2,01 g, 13,5 mmol, 6 equivalentes) en DMF (5 ml) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se añadió a una solución acuosa saturada de NH_4Cl (150 ml) y éter (350 ml). Después de agitar, la fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo con éter (150 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (50 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (50 ml), y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida para producir el crudo de producto. Se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando gel de sílice (250 g) y hexano:acetato de etilo (50:50 a 0:100) como un eluyente para producir el producto como un sólido blanco (0,88 g, 54,3%). Se purificó adicionalmente mediante cristalización en acetato de etilo-hexano.

40 [0173] p.f. 96-98°C. HPLC pureza: 99,99%.

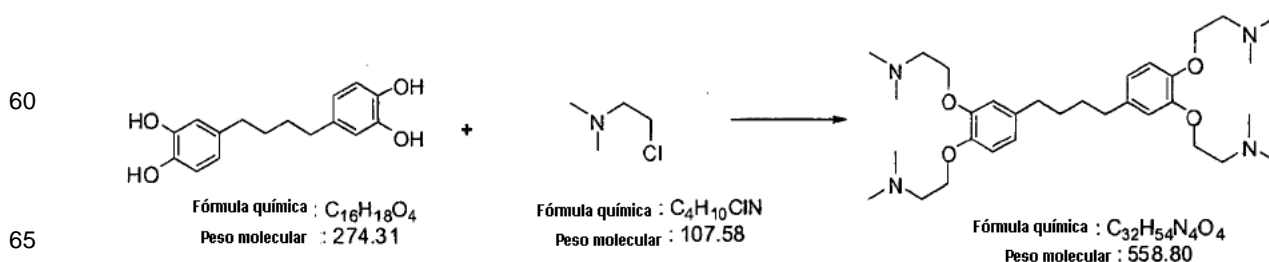
45 [0174] 1H RMN ($CDCl_3$) 1.51-1.61 (m, 4H), 2.48-2.60 (m, 4H), 2.71 (s, 6H), 2.72 (s, 6H), 5.20 (s, 4H), 5.22 (s, 4H), 6.69 (dd, J = 8.2Hz, 1:8, 2H), 6.80 (d, J 1.8Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.2Hz, 2H), 7.18 (s, 4H) ppm; consistente con la estructura.

[0175] ^{13}C RMN ($CDCl_3$) 19.1, 30.9, 35.2, 67.8, 68.0, 115.3, 115.4, 115.6, 115.7, 121.5, 136.4, 146.8, 148.5, 152.4, 152.5, 166.1 ppm; consistente con la estructura.

50 [0176] Análisis: calculado para $C_{36}H_{38}N_4O_4S_4$, C: 60,13, H: 5,34, y N: 7,79. Hallado C 60,07, H 5,22, y N: 7.70.

[0177] Ejemplo de referencia 8

55 [0178] Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis(2-(N,N'-dimetilamino)-etoxi)fenil}-butano ($C_{32}H_{54}N_4O_4$, FW = 558,41) "Compuesto H"



[0179] A una solución de 1,4-bis(3,4-dihidroxifenil)-butano (1,096 g, 4 mmol) en acetona (40 ml) se añadieron carbonato de potasio anhidro (6,64 g, 48 mmol) y clorhidrato de cloruro de dimetilaminoetil (3,46 g, 24 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo. Después de 12 horas, se añadió una cantidad adicional de carbonato de potasio (6,648 g) y clorhidrato cloruro de dimetilaminoetil y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 64 horas. La TLC de la mezcla de reacción indicó la finalización. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se filtró, se lavó con acetona (150 ml) y se concentró. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (250 g) usando una elución en gradiente de CH₂Cl₂:MeOH:Et₃N, respectivamente, de 94:1:5 a 85:10:5 para producir el producto (1,28 g, 57,8%). Este material se cristalizó en acetato de etilo:hexano para producir el producto más purificado (300 mg).

[0180] p.f. 65 - 67°C. HPLC pureza: 99,04%

[0181] ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ = 1.59 - 1.63 (m, 4H), 2.33 (s, 12H), 2.34 (s, 12H), 2.50 - 2.56 (m, 4H), 2.73 (t, J=6.1Hz, 4H), 2.74 (m, J=6.1Hz, 4H), 4.07 (q, J=6.1Hz, 8H), 6.68 (dd, J = 7.9 Hz, 1.9 Hz, 2H), 6.7 1 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 7.9 Hz, 2H) ppm; consistente con la estructura.

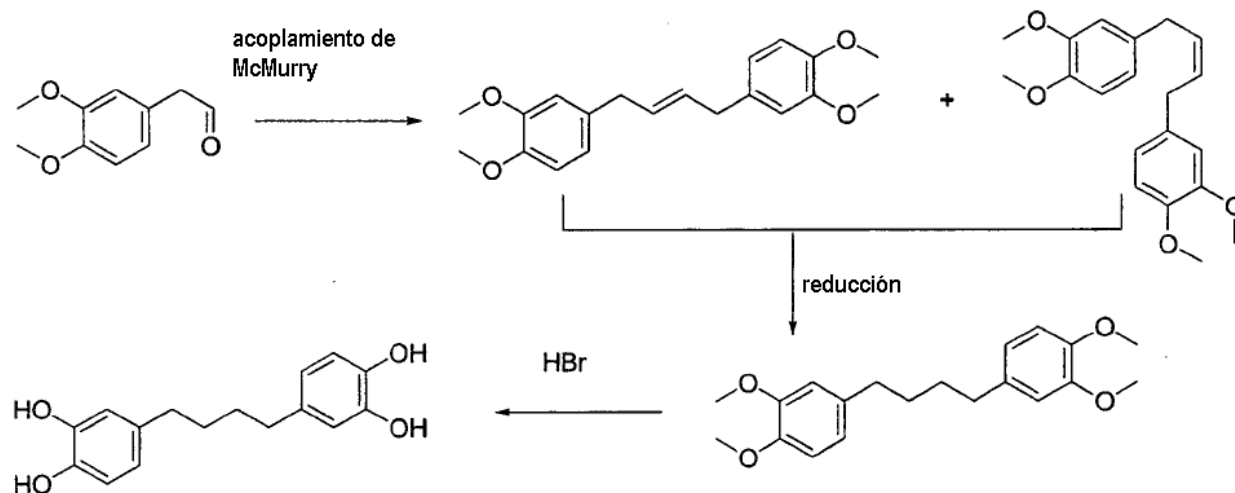
[0182] ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ = 31.1, 35.3, 45.9, 46.1, 58.3, 67.8, 67.191, 4 .6, 114.9, 120.9, 136.0, 147.1, 148.9 ppm, consistente con la estructura.

[0183] Análisis: calculado para C₃₂H₅₄O₄N₄, C: 68,78, H: 9,76, y N: 10,03; hallado, C: 69,82, H: 9,85, y N: 9,83.

[0184] Tal como se ilustra en los siguientes ejemplos proféticos A-R, se pueden realizar reacciones químicas adicionales para sintetizar compuestos según realizaciones de la presente invención.

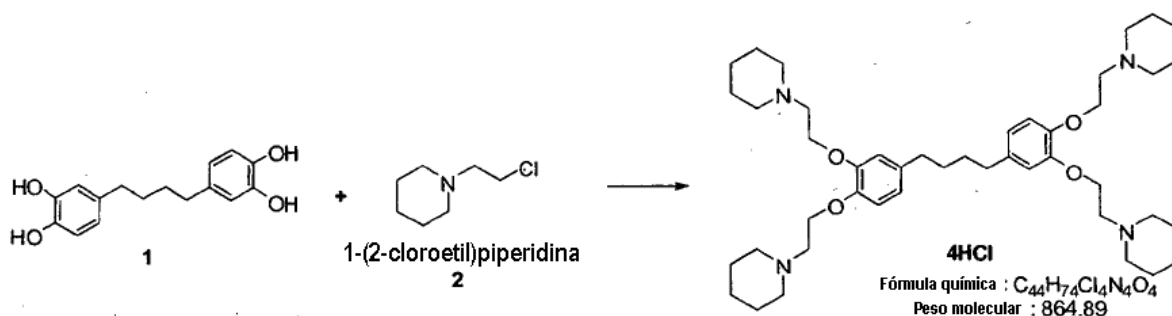
[0185] Ejemplo profético de referencia A

[0186] Síntesis alternativa de 1,4-bis-3,4-hidroxifenil) butano (denominado alternativamente como 1,4-bis(catecol-4-il)-butano)" en el ejemplo 2 "Compuesto B"



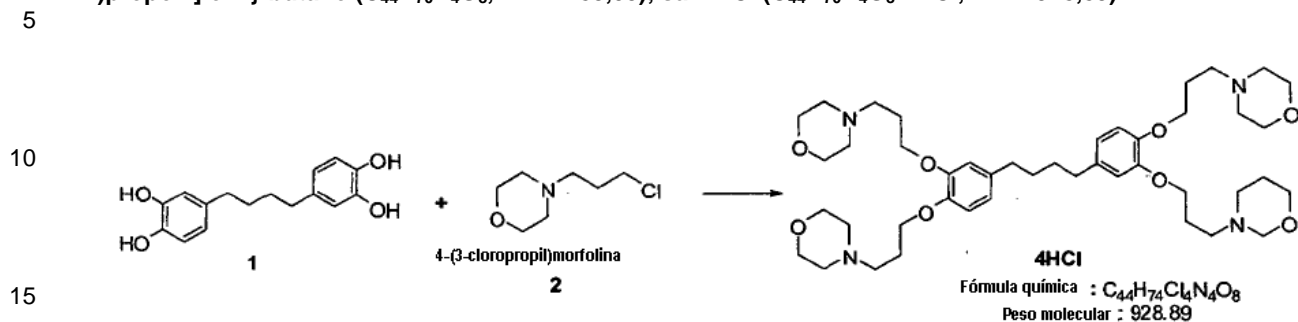
[0187] Ejemplo profético B

[0188] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakisclorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenil}-butano; base libre (C₄₄H₇₀N₄O₄, FW = 719,05); sal 4HCl (C₄₄H₇₀N₄O₄-4HCl, FW = 864,89)



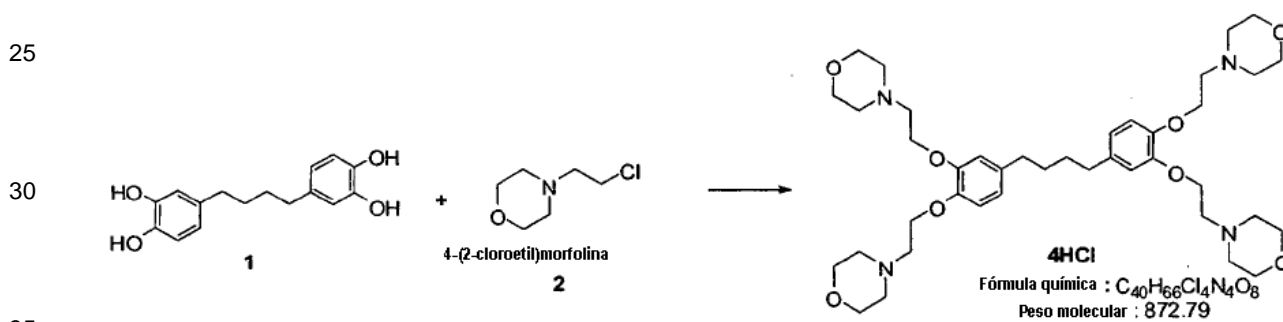
[0189] Ejemplo profético C

[0190] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakis-clorhidrato de 1,4-bis(3,4-bis[3-(morfolin-1-il)propoxi]fenil)-butano ($C_{44}H_{70}N_4O_8$, FW = 783,05); sal 4HCl ($C_{44}H_{70}N_4O_8 \cdot 4HCl$, FW = 928,89)



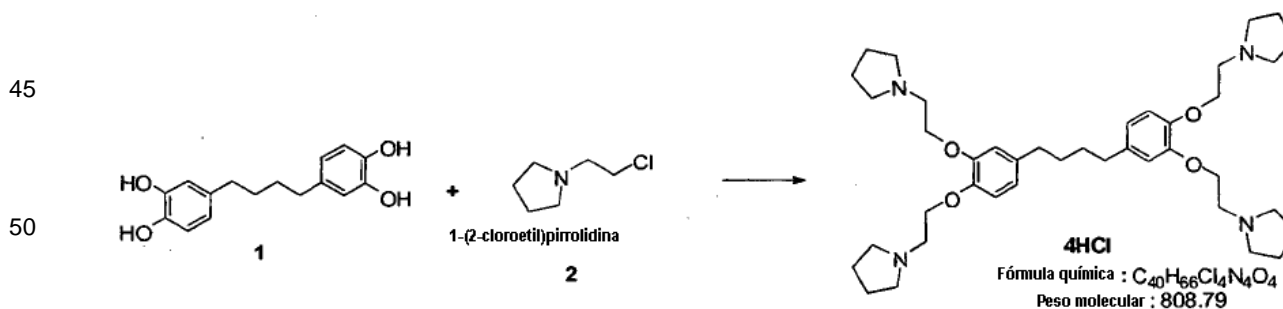
[0191] Ejemplo profético D

[0192] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakis-clorhidrato de 1,4-bis(3,4-bis[2-(morfolin-1-il)etoxi]fenil)-butano ($C_{40}H_{62}N_4O_8$, FW = 726,94); sal 4HCl ($C_{40}H_{62}N_4O_8 \cdot 4HCl$, FW = 872,79)



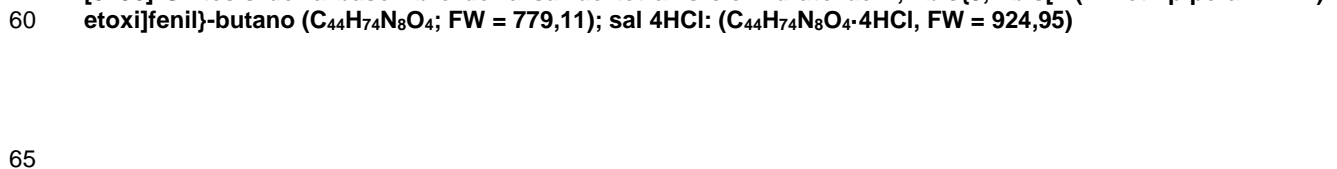
[0193] Ejemplo profético E

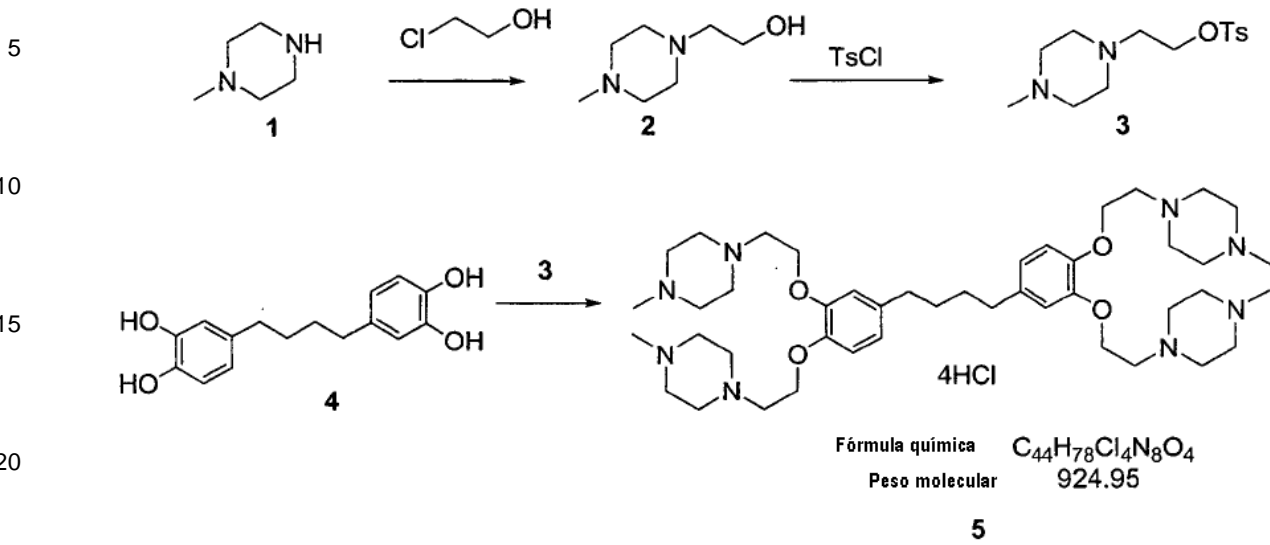
[0194] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakis-clorhidrato de 1,4-bis(3,4-bis[2-(pirrolidin-1-il)etoxi]fenil)-butano ($C_{40}H_{62}N_4O_4$, FW = 662,94); sal 4HCl ($C_{40}H_{62}N_4O_4 \cdot 4HCl$, FW = 808,79)



[0195] Ejemplo profético F

[0196] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakis-clorhidrato de 1,4-bis(3,4-bis[2-(1-metil-piperazin-4-il)etoxi]fenil)-butano ($C_{44}H_{74}N_8O_4$; FW = 779,11); sal 4HCl: ($C_{44}H_{74}N_8O_4 \cdot 4HCl$, FW = 924,95)

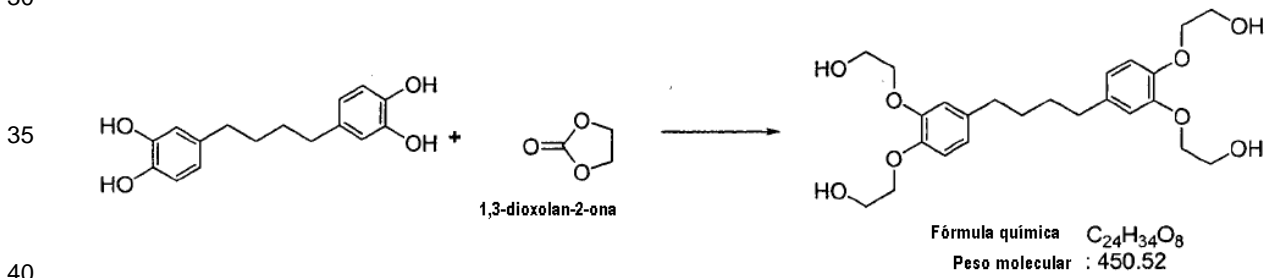




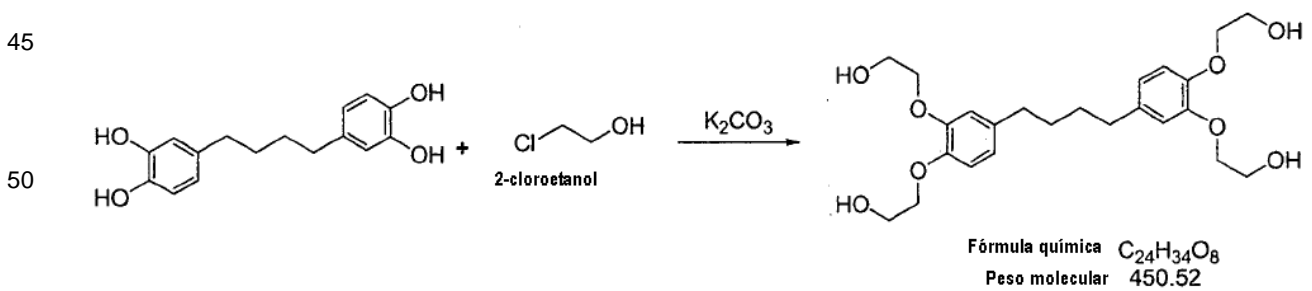
25 [0197] Ejemplo profético de referencia G

[0198] Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis(2-hidroxiethoxi)fenil}-butano ($C_{24}H_{34}O_8$, FW = 450,23)

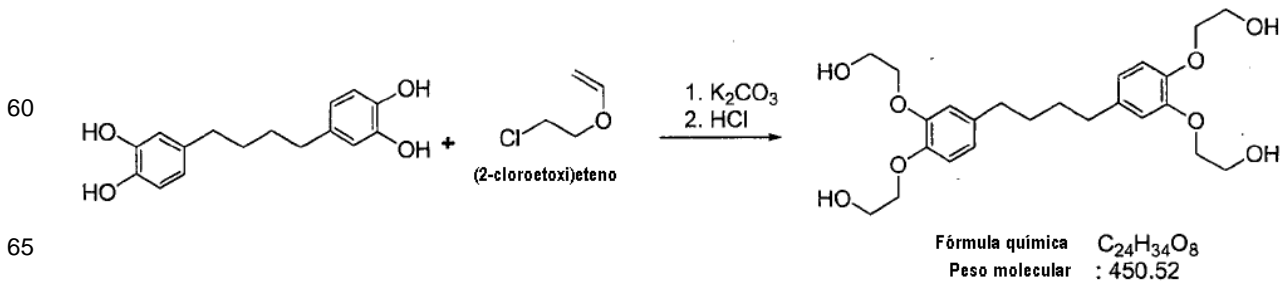
[0199] Método 1



[0200] Método 2



[02011] Método 3



[0202] Ejemplo profético de referencia H

[0203] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakis-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis(2-(N,N-di(2-hidroxi)etil)amino-etoxil)fenil}-butano ($C_{40}H_{70}N_4O_{12}$, FW = 799,00); sal 4HCl ($C_{40}H_{70}N_4O \cdot 4HCl$, FW = 944,85)

5

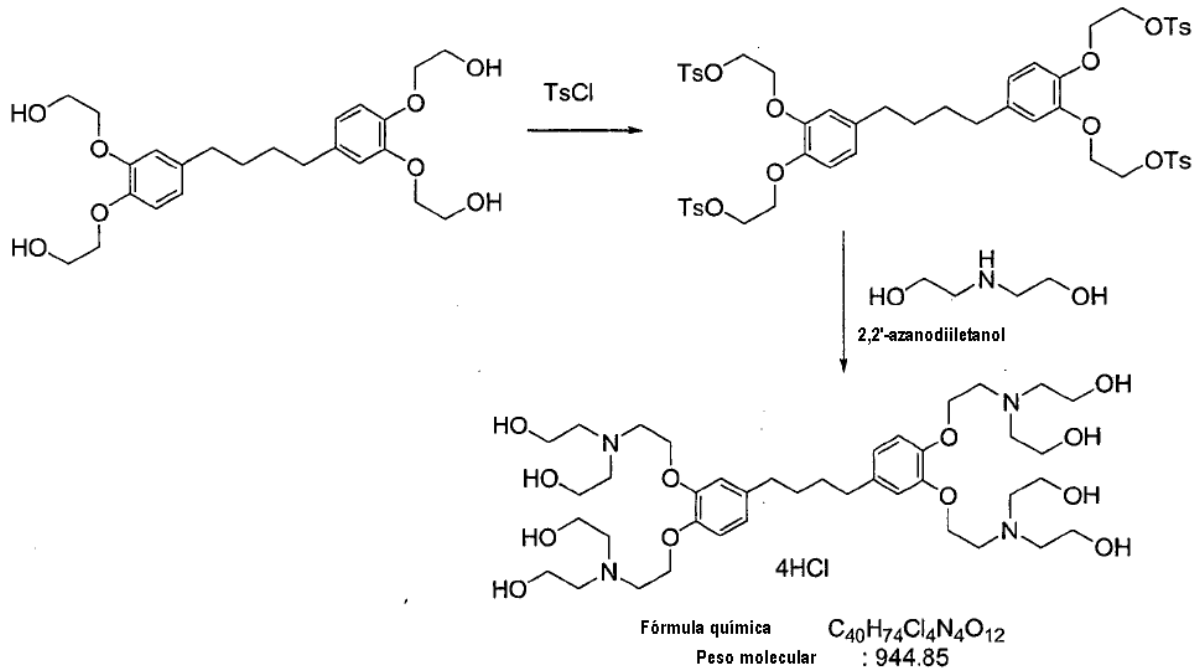
10

15

20

25

30



35

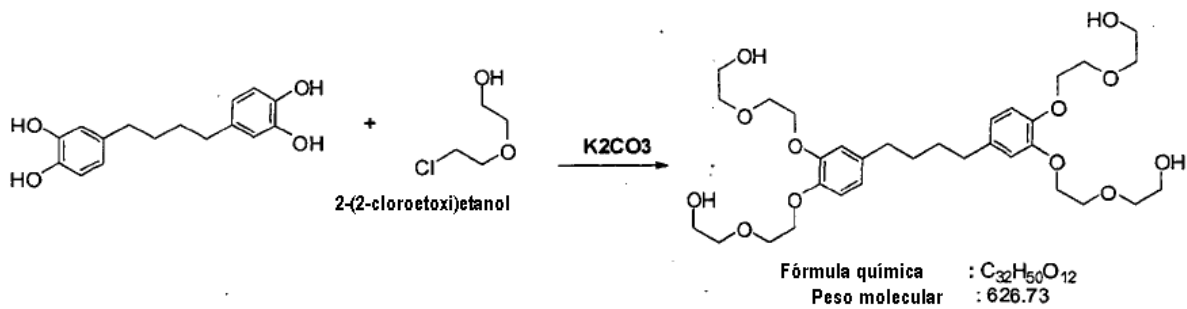
[0204] Ejemplo profético de referencia I

[0205] Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxil}fenil}-butano ($C_{32}H_{50}O_{12}$, FW = 626,73)

40

45

50



[0206] Ejemplo profético J

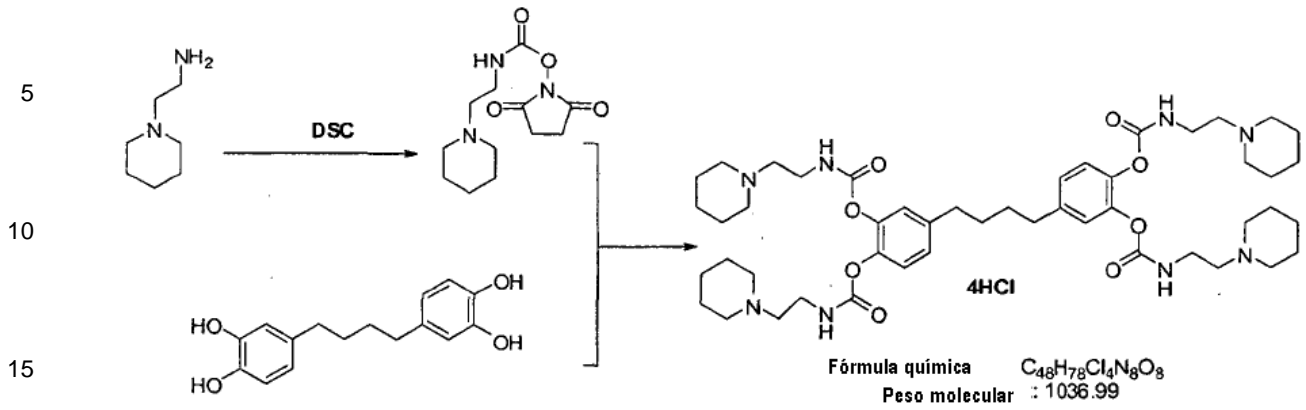
55

[0207] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakis-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis[2-(piperidin-1-il)etilcarbamoi]etoxil}fenil}-butano ($C_{48}H_{74}N_8O_8$, FW = 890,15), sal 4HCl ($C_{48}H_{74}N_8O_8 \cdot 4HCl$, FW = 1036,99)

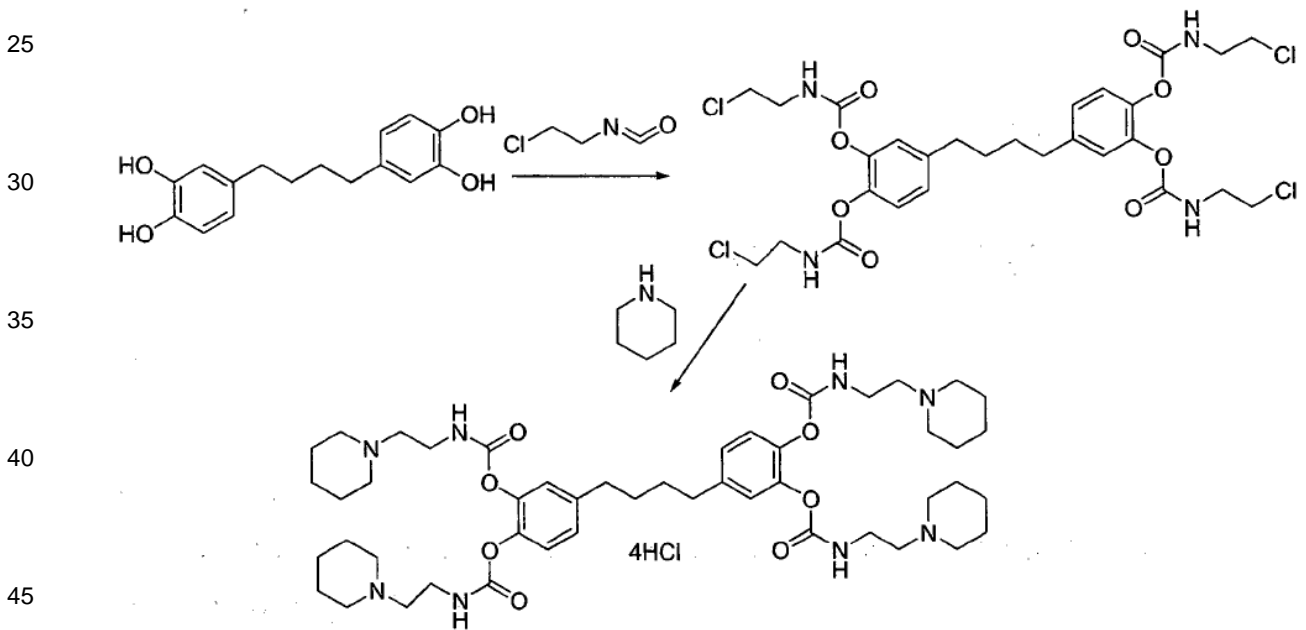
[0208] Método 1

60

65



[0209] Método 2



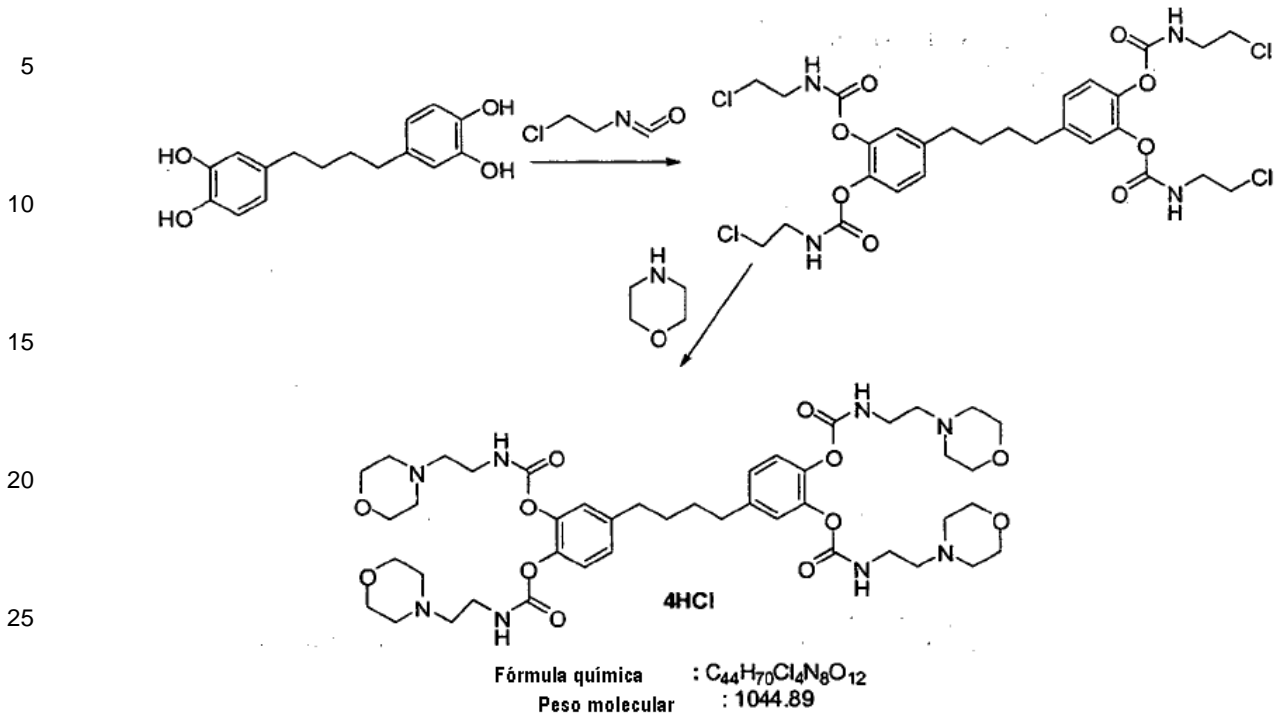
[0210] Ejemplo profético K

50 [0211] Síntesis de la base libre de la sal de tetrakis-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis[2-(morfolin-1-il)etilcarbamoi]fenil}-butano ($C_{44}H_{66}N_8O_{12}$, FW = 899,04); sal 4HCl ($C_{44}H_{66}N_8O_{12} \cdot 4HCl$, FW = 1044,89)

55

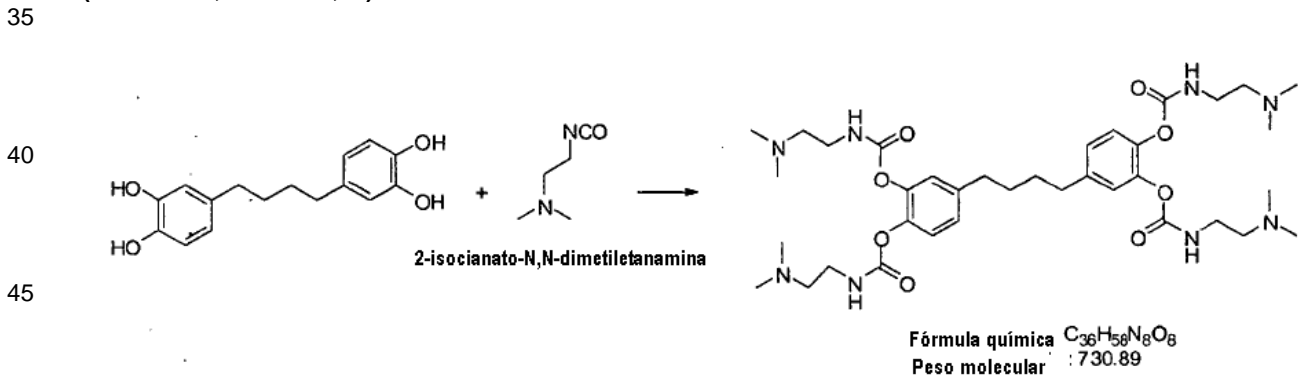
60

65



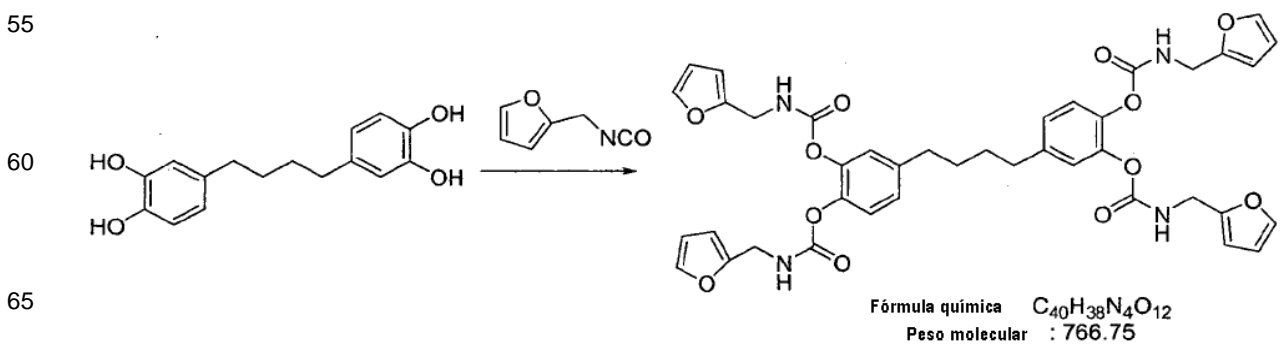
[0212] Ejemplo profético L

[0213] Síntesis de la base libre de 1,4-bis(3,4-bis((2-N,N-dimetilaminoetil)carbamoyloxi)fenil)-butano ($C_{36}H_{58}N_8O_8$, FW = 730,89)



[0214] Ejemplo profético M

[0215] Síntesis de la base libre de 1,4-bis(3,4-bis((furan-2-il)metil-carbamoyloxi)fenil)-butano ($C_{40}H_{38}N_4O_{12}$, FW = 766,75)



[0216] Ejemplo profético de referencia N

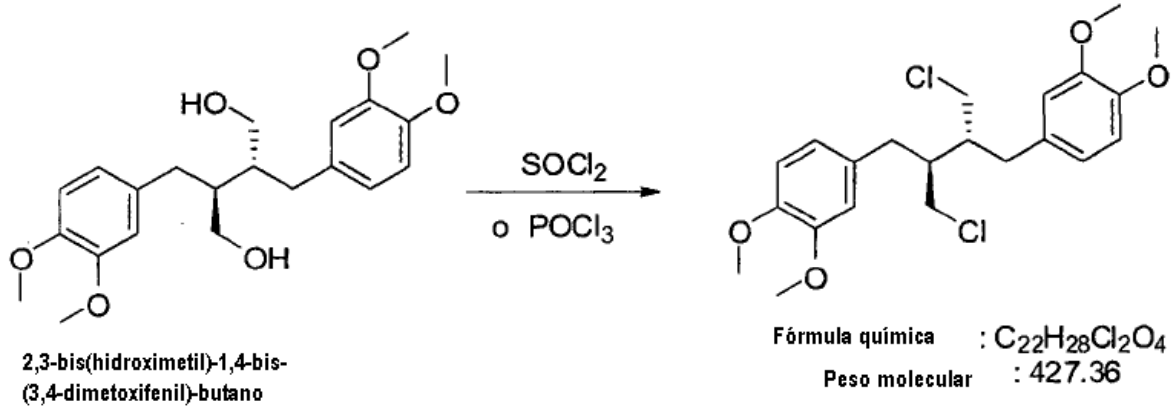
[0217] Síntesis de 1,4-bis(3,4-dimetoxifenil)-2,3-bis(clorometil)-(2S,3R)-butano ($C_{22}H_{28}Cl_2O_4$, FW = 427,36)

5

10

15

20



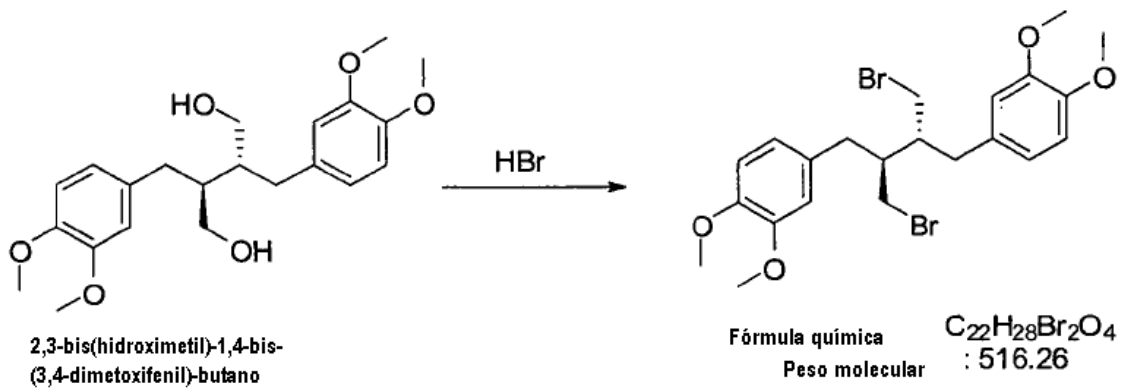
[0218] Ejemplo profético de referencia O

[0219] Síntesis de 1,4-bis(3,4-dimetoxifenil)-2,3-bis(bromometil)-(2S,3R)-butano ($C_{22}H_{28}Br_2O_4$, FW = 516,26)

30

35

40



45

[0220] Ejemplo profético de referencia P

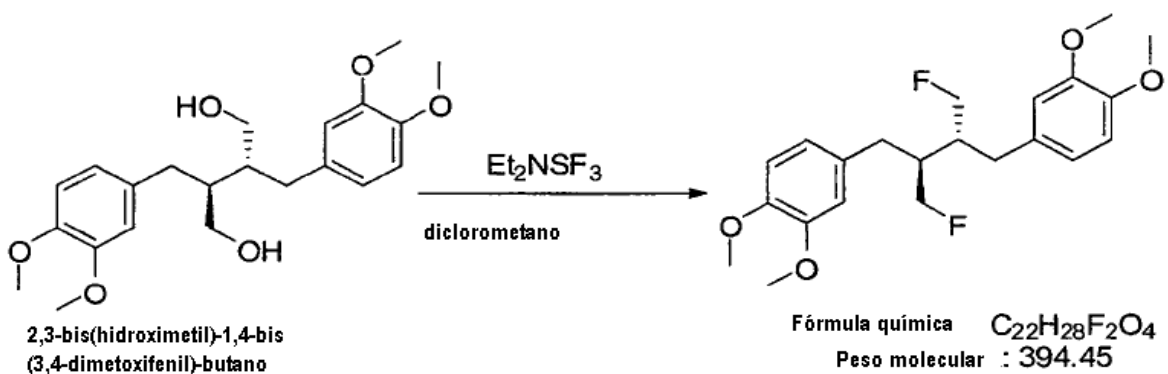
[0221] Síntesis de 1,4-bis(3,4-dimetoxifenil)-2,3-bis(flúorometil)-(2S,3R)-butano ($C_{22}H_{28}F_2O_4$, FW = 394,45)

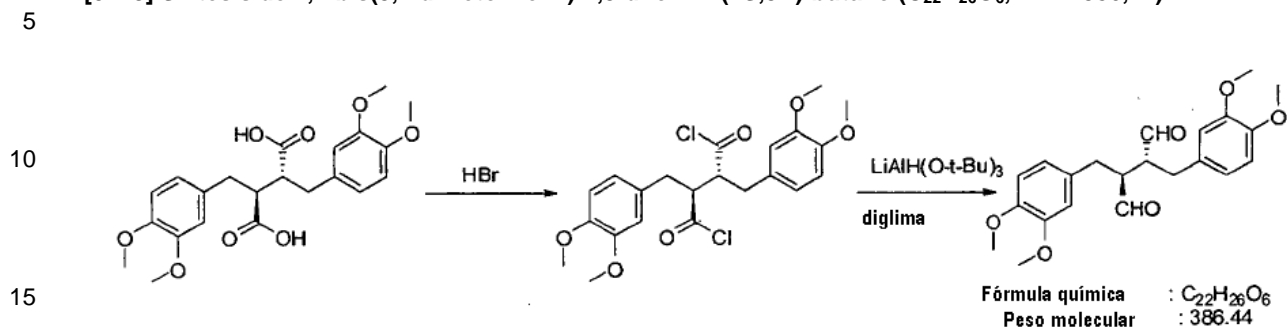
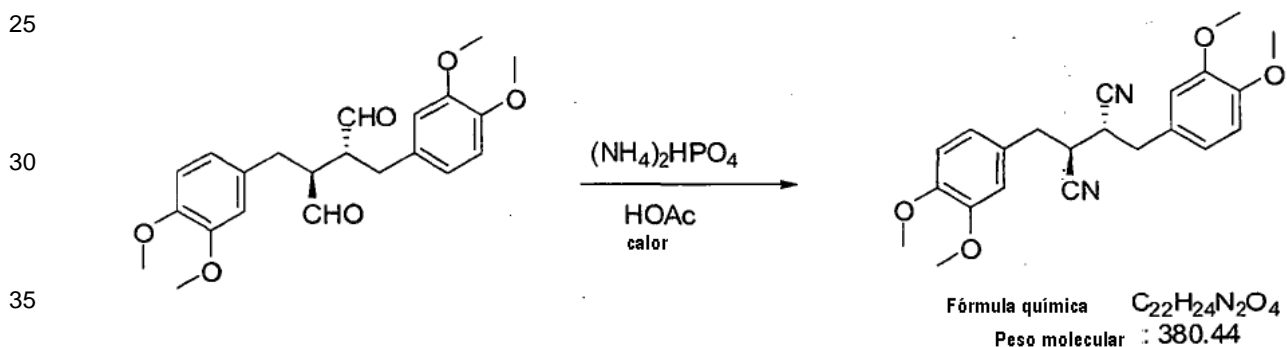
50

55

60

65



[0222] Ejemplo profético de referencia Q**[0223] Síntesis de 1,4-bis(3,4-dimetoxifenil)-2,3-diformil-(2S,3R)-butano (C₂₂H₂₆O₆, FW = 386,44)****[0224] Ejemplo profético de referencia R****[0225] Síntesis de 1,4-bis(3,4-dimetoxifenil)-2,3-diciano-(2S,3R)-butano (C₂₂H₂₄N₂O₄, FW = 380,44)**

40 **[0226]** La invención se describirá adicionalmente con respecto a los siguientes ejemplos de trabajo específicos no limitantes relacionados con estudios de citotoxicidad y eficacia in vitro, siguiendo los protocolos generales que se realizaron.

[0227] Estudios de citotoxicidad y eficacia

45 **[0228]** Algunos de los compuestos de la presente invención han sido estudiados in vitro. Los estudios in vitro han establecido que las diversas clases de los derivados de NDGA de la presente invención serían seguras y eficaces para el tratamiento profiláctico o de tratamiento después de la aparición de una infección viral o una enfermedad proliferativa, inflamatoria, metabólica o vascular. Los siguientes ejemplos explican los estudios implicados en dicha prueba.

[0229] Estudios de citotoxicidad

50 **[0230]** Los estudios realizados con respecto a la citotoxicidad incluían los protocolos conocidos de MTS, azul tripán y MTT. Los estudios de MTS se realizaron utilizando el ensayo de proliferación de células de una solución CellTiter 96@Aqueous (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Las células metabólicamente activas, en particular las células viables, convierten el MTS, un compuesto de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna) en formazán coloreado, que es soluble en medio de cultivo tisular. La medición de la absorbancia del formazán se lee a 490 nm. Se añade el reactivo listo para utilizar directamente a las células en los medios en placas de 96 pocillos, se incuban 1-4 horas y los resultados se registran por el lector de placas. La IC₅₀ se estima mediante la representación gráfica de los datos recogidos. La IC₅₀ es la concentración del material de prueba que inhibe el 50% del crecimiento o la viabilidad del material analizado en comparación con un control.

65 **[0231]** En el ensayo de azul de tripano, las células se tratan con tripsina y se añade una muestra a una solución de colorante azul de tripano y solución salina. Las células viables son capaces de mantener el colorante en el exterior de su membrana, las células dañadas o muertas no lo son. Se cuentan las células viables y no viables (azul), y se

calcula el porcentaje de viables. La tasa de proliferación se calcula utilizando los valores de las células tratadas con placebo y se compara la viabilidad de las células tratadas con la de las células no tratadas.

[0232] El ensayo MTT es un método colorimétrico para determinar el número de células viables. Las células metabólicamente activas convierten el reactivo MTT, bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, en cristales de formazán de color violeta que se solubilizan en dimetil sulfóxido (DMSO). El reactivo MTT se añade a medios de MTT (incoloro). Los medios se añaden a las células y se incuban durante 4 horas. Se añade DMSO a las células y se mezclan. A continuación, se leen las soluciones de color a 540 nm y se corrigen a 630 nm. La IC₅₀ se calcula mediante la representación gráfica de los datos recogidos.

[0233] Ensayo de SEAP de actividad antiviral

[0234] La actividad antiviral se determina usando un ensayo SEAP (fosfatasa alcalina secretada), en el que las células se co-transfectan con plásmidos de SEAP y TAT. TAT es un transactivador de la expresión génica del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y es uno de los dos o más factores virales reguladores necesarios (TAT y REV) para la expresión del gen del VIH. TAT actúa mediante la unión al elemento ARN de TAR y la activación de la transcripción a partir del promotor de la repetición terminal larga (LTR). La proteína TAT estabiliza la elongación de la transcripción y también se ha demostrado que está involucrada en la iniciación de la transcripción. Estudios anteriores han demostrado que TAT media en la reducción de la proliferación de células T dependiente de anticuerpos, lo que contribuye sustancialmente a la insuficiencia de la respuesta inmune. TAT también estimula directamente el crecimiento de células de Kaposi.

[0235] Dado que TAT no tiene homólogos celulares aparentes, este fuerte regulador positivo se ha convertido en una diana atractiva para el desarrollo de medicamentos contra el SIDA. A diferencia de los inhibidores de transcriptasa inversa de VIH disponibles actualmente (AZT, DDI) o potenciales inhibidores de proteasas que impiden nuevas rondas de infección, un inhibidor que suprime la expresión regulada por TAT del gen viral del ADN proviral integrado detendrá el virus en una fase inicial (Hsu et al. Science 254:1799-1802, 1991). Los esfuerzos dirigidos a la elucidación de los factores que controlan la expresión de genes en los niveles de transcripción y post-transcripcional en eucariotas huésped han hecho posible recientemente una evaluación cuantitativa de la función de TAT (Sim, Ann. NY Acad. Sc. 616: 64-70, 1990). Para cribar inhibidores para la transactivación regulada por TAT (TAT-TRS), el gen informador de SEAP se coloca bajo el control del promotor LTR de VIH-1 en el plásmido pBC12/HIV/SEAP. La actividad codificada por TAT es suministrada por un segundo constructo de plásmido pBC12/CMV/t2. La co-transfección transitoria de células COS-7 con estos dos plásmidos conduce a la secreción de la fosfatasa alcalina en el medio de cultivo que es analizada por un sencillo ensayo colorimétrico (Berger et al., Gene 66: 1-10, 1988). El ensayo de SEAP, por lo tanto, proporciona una determinación indirecta de la transactivación por TAT.

[0236] En el ensayo de SEAP, un inhibidor debería causar una reducción de la expresión del gen informador de SEAP a través de la transactivación del promotor LTR de VIH por la proteína TAT (TAT-TRS). La proteína TAT se expresa bajo el control de un promotor de citomegalovirus e induce la expresión de la forma resistente al calor no endógena de la fosfatasa alcalina secretada. Si la transactivación por TAT es bloqueada por un medicamento, el informador SEAP no se excretará en el medio. La SEAP se detecta colorimétricamente por el sustrato fosfato de para-nitrofenilo a 405 nm. Véase Gnabre¹³. Las células se analizan mediante el ensayo de MTT para comparar la citotoxicidad a la inhibición de SEAP. El objetivo es que el fármaco inhiba la SEAP sin ser demasiado tóxico.

[0237] Actividad antiproliferativa

[0238] La actividad antiproliferativa se determina utilizando el kit de detección de apoptosis TiterTACS® (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota USA) relacionado con la apoptosis de células basadas en la fragmentación de ADN y mediante ensayos ELISA de VEGF (factor de crecimiento epitelial vascular) y survivina.

[0239] En el ensayo de fragmentación del ADN, la detección in situ de la apoptosis se logra específicamente con el kit de detección de apoptosis de 96 pocillos TiterTACS®, número de catálogo TA600 (R&D Systems, Inc.). El ensayo TiterTACS® proporciona una cuantificación de la apoptosis en células cultivadas sin un recuento directo de células marcadas utilizando la detección colorimétrica. Las células se tratan con los compuestos de ensayo, se dejan sin tratar como controles negativos experimentales, o se tratan con nucleasa TACS como controles positivos. La TACS nucleasa permite la generación de controles positivos para cada sistema experimental: un breve tratamiento de las células con la TAC nucleasa antes del marcaje genera rupturas del ADN en cada célula, proporcionando un control positivo apropiado específico para el sistema en estudio. La enzima TdT que cataliza la adición de dNTP a fragmentos de ADN permite la detección colorimétrica a 450 nm mediante el uso de una solución de estreptavidina-HRP seguido por el sustrato TACS-Sapphire. Una alta absorbancia a 450 nm es indicativa de apoptosis en las células. Las células tratadas se comparan con las células no tratadas y con células escindidas por nucleasa para evaluar el grado de apoptosis.

[0240] Se realizaron estudios de ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) de VEGF siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el kit ELISA de VEGF humano Endogen®, número de catálogo EHVEGF (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Illinois EE.UU.). Se crean condiciones de hipoxia para las células mediante el

tratamiento con desferrioxamina (DFO), que forma quelatos con hierro y hace que las células secreten VEGF en el medio. Se extrajo el sobrenadante (medio) y se congeló para la prueba, y se contaron las células con el ensayo de azul de tripano para que los resultados se pudieran normalizar para el recuento de células. El VEGF se mide con un ELISA de sándwich que captura la proteína en el medio sobre una microplaca recubierta con anticuerpo, y a continuación utiliza un reactivo de anticuerpo biotinilado para detectar la proteína. Los resultados de una curva estándar permiten al usuario cuantificar la cantidad de proteína en cada muestra.

[0241] Ensayo ELISA-Survivina

[0242] La survivina es un inhibidor de la apoptosis que se expresa abundantemente en muchos cánceres humanos, pero no en el tejido humano normal adulto, y se considera un posible modulador de la fase efectora terminal de la muerte/supervivencia de la célula. La survivina se expresa en G2-M de una manera dependiente del ciclo celular, uniéndose directamente a los microtúbulos del huso mitótico. Parece que la fosforilación de survivina en Thr34 puede ser necesaria para mantener la viabilidad celular en la división celular, y se ha demostrado que la expresión de un mutante survivina defectuoso en la fosforilación desencadena la apoptosis en varias líneas celulares de melanoma humano. La survivina fosforilada actúa en la vía caspasa para suprimir la formación de la caspasa-3 y caspasa-9, inhibiendo de ese modo la apoptosis. De este modo, se esperará que los compuestos que reducen la expresión de survivina aumenten la tasa de apoptosis y muerte celular.

[0243] Se estudiaron los efectos de los compuestos ensayados en survivina siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el Inmunoensayo de survivina total humano IC Surveyor™, número de catálogo SUV647 (R & D Systems, Inc.). Se analizaron los lisados celulares por el contenido de proteína survivina. El kit incluye una placa recubierta con un anticuerpo específico para la survivina y un reactivo de anticuerpo biotinilado que reconoce la survivina unida a la placa. La placa se lee en un lector de placas ajustado a 450 nm y se corrige a 540 nm. Se utilizó un ensayo de proteínas de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, M. 1976, Anal Biochem 72: 248-254) para cuantificar y normalizar las muestras de acuerdo con el contenido de proteína total. Los resultados de una curva estándar permiten al usuario cuantificar la cantidad de proteína survivina en cada muestra.

[0244] Actividad antiinflamatoria

[0245] La actividad anti-inflamatoria se determinó en base al efecto de los compuestos ensayados en los queratinocitos humanos primarios (PHK). Los PHK juegan un papel importante en procesos inflamatorios, sintetizando un conjunto de citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento. Se realizaron estudios para determinar si los compuestos analizados podrían inhibir queratinocitos para prevenir o reducir la producción de interferón gamma (IFN- γ), interleuquina-8 (IL-8), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, también conocida como CD54) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1). Los PHK se tratan primero con TNF- α para inducir un estado proinflamatorio y liberar citoquinas proinflamatorias. A continuación, se ensayan citoquinas específicas siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando ensayos de proteínas de R & D Systems, Inc. (kits Quantikine ELISA; números de catálogo DCP00 para el kit de MCP-1, DGM00 para el kit de GM-CSF, y DIF50 para IFN- γ).

[0246] Protocolos generales para estudios de citotoxicidad relativos a la actividad antiviral y antiproliferativa

[0247] Se analizaron tres líneas celulares obtenidas de ATCC y mantenidas tal como se indica por la ATCC: HeLa (adenocarcinoma de cuello de útero), A549 (carcinoma de pulmón), y COS-7 (riñón de mono transformado SV40). Los estudios de estas líneas celulares se consideran indicativos del efecto de las sustancias analizadas en enfermedades mamíferos, incluyendo humanos.

[0248] Todos los compuestos se disolvieron en DMSO y se utiliza DMSO como placebo. Las muestras se disolvieron primero en diluciones 10 mM en DMSO y después se diluyeron adicionalmente a soluciones de 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, y 0,01 mM. Estas soluciones se añadieron al medio a una concentración del 1% (1 μ l a 100 μ l de medio) para el tratamiento de las células con 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, y 0,1 μ M del compuesto. Los compuestos que se encontró que tenían IC₅₀ bajas se diluyeron adicionalmente en DMSO. Las soluciones se revisaron antes de su uso para la precipitación, especialmente las soluciones 10 mM. Si había precipitación, se calentaban a 65°C y se añadían al medio calentado.

[0249] Se cultivaron pocillos en una placa de 96 pocillos con 1,5-8 x 10⁴ células en 100 μ l de medio y se incubaron durante la noche. Los pocillos exteriores de la placa se llenaron con 200 μ l de agua estéril desionizada (DI) para frenar la evaporación del medio. Después de 24 horas, los productos químicos de ensayo se prepararon en medio a una concentración de 1% en volumen del medio. Se añadió medio de la muestra de ensayo, mezclando con la pipeta antes de añadir 100 μ l por pocillo. Se añadió medio a los pocillos "Sólo medio". La placa de pocillos y su contenido se incubaron durante 24-72 horas, dependiendo del estudio llevado a cabo. En el día del ensayo de MTS, el reactivo MTS se extrajo del frigorífico y se llevó a temperatura ambiente. Usando la pipeta multicanal, se añadieron 20 μ l del reactivo MTS a cada pocillo y se incubó durante una a cuatro horas. La placa se leyó a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 690 nm después de una hora en la incubadora, después de lo cual los

5 pocillos del blanco eran de aproximadamente 0,2 OD. A continuación, se rastrearon los resultados en una plantilla de Microsoft® Excel® diseñado para realizar todos los cálculos necesarios cuando se introducen los datos. Los datos se verificaron para errores estadísticos; se incluyeron puntos de datos que están dentro del 10% del promedio de los puntos de datos para ese grupo. El promedio de los blancos ("Sólo medio") se restó y los datos se insertaron en un gráfico que representa la respuesta de crecimiento, tratadas/no tratadas.

[0250] Protocolo SEAP

10 **[0251]** Se utilizó el siguiente protocolo SEAP como sistema informador para medir la actividad de la transactivación mediada por TAT de la transcripción de VIH. El ensayo de MTT mide la proliferación celular y se utiliza para verificar que los niveles de actividad de SEAP no son debidos únicamente a la citotoxicidad. Estos ensayos se utilizaron en el cribado de potenciales compuestos fármacos cabeza de serie como agentes antivirales, y particularmente, candidatos anti-VIH.

15 **[0252]** Se cotransfectaron células COS-7 (riñón de mono verde) utilizando el reactivo Fugene 6 (Roche Applied Science, número de catálogo 11815091001, Indianapolis, Indiana, USA) con dos plásmidos: pHIVSEAP (vector de expresión de SEAP bajo el control del promotor LTR de VIH) y pCTAT (vector de expresión del factor de transcripción por TAT de VIH bajo el control de un promotor de CMV (citomegalovirus)). Después del tratamiento con compuesto de prueba durante 48 horas, se analizaron las muestras para la actividad del SEAP a 405 nm después de la adición del sustrato del fosfato de p-nitrofenilo. El porcentaje de la inhibición de la actividad de SEAP se calculó en relación con el placebo de control.

[0253] Ejemplo 9

25 **[0254] Estudios de SEAP/MTT y MTS – Citotoxicidad y efectividad antiviral**

30 **[0255]** Los resultados de los estudios de SEAP/MTT y MTS sobre los compuestos indicados de los ejemplos de trabajo anteriores basados en los protocolos generales establecidos anteriormente se indican en la siguiente tabla 3, donde la columna izquierda identifica el compuesto analizado y EC₅₀ indica la concentración del compuesto que tiene el 50% del efecto del control. IC₅₀ se definió anteriormente.

[0256]

Tabla 3

Compuesto	EC ₅₀ SEAP	IC ₅₀ COS-7	IC ₅₀ A549	IC ₅₀ HeLa
A	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
C	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
D	0,7-0,8 µM	0,8-0,9 µM	1-2 µM	5-6 µM
E			9 µM	5-10 µM
F			> 100 µM	> 100 µM
G			> 100 µM	> 100 µM
H	30-40 µM	20-30 µM	20-40 µM	20-30 µM

35 **[0257]** Los resultados de los compuestos con actividad biológica en dos líneas celulares analizadas utilizando el ensayo MTS como indicador de la viabilidad celular se muestra en la tabla 3. Las concentraciones IC₅₀ muestran varios grados de inhibición de la viabilidad celular por estos compuestos. Todos los compuestos fueron capaces de reducir la viabilidad celular y, por tanto, inducir la apoptosis, de una manera dependiente de la dosis. El compuesto D mostró la mayor inhibición de la viabilidad celular en células A549 y HeLa, mientras que su sal de clorhidrato (Compuesto E) mostró la segunda mayor inhibición en estas dos líneas celulares.

40 **[0258]** El grado de inhibición de la transactivación por TAT determinado según el ensayo de SEAP también variaba entre compuestos tal como se muestra en la tabla 3. El compuesto D también mostró una actividad anti-viral significativa con una EC₅₀ alrededor de 0,7-0,8 µM. Las concentraciones de la viabilidad celular en las células de prueba (COS-7) determinadas mediante MTT fueron normalmente similares a las de las concentraciones eficaces para la transactivación por TAT.

50 **[0259] Ejemplo 10**

[0260] Actividad antiproliferativa basada en estudios de apoptosis de TiterTACS®, VEGA y survivina

55 **[0261]** Los resultados de los estudios de apoptosis de la fragmentación de ADN de TiterTACS®, ELISA de VEGA y ELISA de survivina en los compuestos indicados de los ejemplos de trabajo anteriores, en base a los protocolos generales anteriores, se establecen en la siguiente tabla 4.

[0262]

Tabla 4

Compuesto	Fragmentación de ADN	IC ₅₀ de Survivina	IC ₅₀ de VEGF
D	Positiva		4 μ M
H	Positiva	25 μ M	> 60 μ M
Positiva = induce apoptosis Negativa = no induce apoptosis			

5 [0263] Los compuestos ensayados también han mostrado una reducción significativa de los niveles de proteína
survivina a concentraciones micromolares bajas. Consecuentemente, también han mostrado una fuerte inducción de
la apoptosis tal como se determina mediante en el ensayo de fragmentación del ADN. El compuesto H reduce la
expresión de la proteína survivina y, por tanto, es capaz de inducir la apoptosis. El compuesto D también es un
inductor de la apoptosis. Estos compuestos son capaces de disminuir la survivina e inducir la apoptosis de una
10 manera dependiente de la dosis. El compuesto H fue el inhibidor más potente de la producción de proteína survivina
con una IC₅₀ para la producción de survivina de alrededor de 25 μ M.

15 [0264] La liberación de la proteína VEGF también disminuye por la acción de estos compuestos. La inhibición de la
producción de proteína VEGF variaba en las concentraciones micromolares bajas para el compuesto D. Se observó
la inhibición por todos los compuestos de una manera dependiente de la dosis. El compuesto D mostró una IC₅₀ para
la producción de VEGF de alrededor de 4 μ M, mientras que el compuesto H mostró una IC₅₀ de VEGF superior a 60
 μ M.

20 [0265] Los resultados de la tabla 4 indican que los compuestos de la presente invención son eficaces en la inhibición
de actividad viral y causan la muerte celular (apoptosis) en las líneas celulares ensayadas. De los compuestos
ensayados, los compuestos D, E, y H parecen ser más eficaces que los otros debido a sus valores inferiores de EC₅₀
y IC₅₀. El compuesto D parece ser el más eficaz.

[0266] Ejemplo 11

25 [0267] Cribado de líneas celulares tumorales del DTP del U.S. National Cancer Institute

[0268] El United States National Cancer Institute (NCI) proporciona un programa de desarrollo de agentes
terapéuticos (DTP) (<http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>) para cribar sustancias aportadas en apoyo del
descubrimiento de fármacos contra el cáncer. El proyecto de cribado de líneas celulares in vitro (IVCLSP) es un
servicio dedicado que proporciona apoyo directo al programa de descubrimiento de fármacos contra el cáncer DTP y
30 está diseñado para cribar hasta 3.000 compuestos por año para una potencial actividad anticancerígena. El
funcionamiento de este cribado utiliza 60 líneas celulares de tumores humanos diferentes, que representan la
leucemia, el melanoma y cánceres de pulmón, colon, cerebro, ovario, mama, próstata, y riñón. El objetivo es dar
prioridad para una evaluación adicional, a compuestos sintéticos o muestras de productos naturales que muestran
35 una inhibición del crecimiento selectivo o la citólisis de líneas de células tumorales particulares. Este cribado es
único en que la complejidad de una respuesta a la dosis a 60 líneas celulares producida por un compuesto
determinado da lugar a un patrón de respuesta biológica que se puede utilizar en los algoritmos de reconocimiento
de patrones (programa COMPARE. Véase: <http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare.html>). Utilizando estos
algoritmos, es posible asignar un supuesto mecanismo de acción para un compuesto de ensayo, o determinar que el
40 patrón de respuesta es único y no es similar al de cualquiera de los compuestos prototipo estándar incluidos en la
base de datos del NCI. Además, tras la caracterización de diversas dianas moleculares celulares en las 60 líneas
celulares, puede ser posible seleccionar compuestos con más probabilidades de interactuar con una diana
molecular específica.

45 [0269] El cribado es un proceso de dos etapas, empezando con la evaluación de todos los compuestos contra las 60
líneas celulares en una dosis única de 10 μ M. El resultado del cribado de dosis únicas se indica como un gráfico
promedio y está disponible para el análisis mediante el programa COMPARE. Los compuestos que muestran una
inhibición de crecimiento significativa se evalúan frente al panel de 60 células a cinco niveles de concentración.

50 [0270] Metodología del cribado de cáncer in vitro

[0271] Las líneas celulares de tumores humanos del panel de cribado de cáncer se desarrollan en medio RPMI 1640
que contenía suero bovino fetal al 5% y L-glutamina 2 mM. Para un experimento de cribado típico, las células se
inoculan en placas de microtítulos de 96 pocillos en 100 μ l densidades de emplacado de 5.000 a 40.000
55 células/pocillo dependiendo del tiempo de duplicación de las líneas celulares individuales. Después de la inoculación
de las células, las placas de microtítulos se incuban a 37°C, 5% de CO₂, 95% aire y 100% de humedad relativa
durante 24 horas antes de la adición de fármacos experimentales.

60 [0272] Después de 24 horas, se fijan dos placas de cada línea celular in situ con ácido tricloroacético (TCA) para
representar una medición de la población celular para cada línea celular en el momento de la adición del fármaco

(Tz). Los fármacos experimentales se solubilizan en DMSO a 400 veces la concentración de ensayo máxima final deseada y se almacenan congelados antes de su uso. En el momento de la adición de los fármacos, se descongela una alícuota de concentrado congelado y se diluye hasta dos veces la concentración de ensayo máxima final deseada con un medio completo que contenía gentamicina 50 µg/ml. Se realizan cuatro diluciones en serie adicionales de 10 veces o ½ logarítmica para proporcionar un total de cinco concentraciones de fármaco más el control. Se añaden alícuotas de 100 µl de estas diluciones de fármaco diferentes a los pocillos de microtítulos apropiados que ya contenían 100 µl de medio, dando lugar a las concentraciones de fármaco finales requeridas.

[0273] Después de la adición del fármaco, las placas se incuban durante 48 horas adicionales a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire, y humedad relativa del 100%. Para las células adherentes, el ensayo se termina mediante la adición de TCA frío. Las células se fijan in situ mediante la adición suave de 50 µl de TCA frío al 50% (p/v) (concentración final, TCA al 10%) y se incuban durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se descarta y las placas se lavan cinco veces con agua del grifo y se seca al aire. A cada pocillo se añade una solución de sulforrodamina B (SRB) (100 µl) al 0,4% (p/v) en ácido acético al 1%, y las placas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, se extrae el colorante no unido lavando cinco veces con ácido acético al 1% y las placas se secan al aire. La parte unida se solubiliza posteriormente con 10 mM de base Trizma, y se lee la absorbancia en un lector de placas automatizado a una longitud de onda de 515 nm. Para las células en suspensión, la metodología es la misma excepto que el ensayo se termina mediante la fijación de células sedimentadas en el fondo de los pocillos mediante la adición suave de 50 µl de TCA al 80% (concentración final, TCA al 16%). Utilizando las siete mediciones de absorbancia [tiempo cero, (Tz), control de crecimiento, (C), y el crecimiento de ensayo en presencia de fármaco en los cinco niveles de concentración (Ti)], se calcula el porcentaje de crecimiento en cada uno de los niveles de concentración del fármaco. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como:

$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ para concentraciones en las que } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ para concentraciones en las que } Ti < Tz$$

[0274] Se calculan tres parámetros de respuesta a la dosis para cada agente experimental. La inhibición del crecimiento del 50% (GI₅₀) se calcula a partir de $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$, que es la concentración de fármaco que da lugar a una reducción del 50% en el incremento neto de proteína (medido mediante tinción con SRB) n células de control durante la incubación del fármaco. La concentración de fármaco que da lugar a una inhibición del crecimiento total (TGI) se calcula a partir de Ti = Tz. La LC₅₀ (concentración de fármaco que da lugar a una reducción del 50% en la proteína medida al final del tratamiento con el fármaco en comparación con la del principio) que indica una pérdida neta de células después del tratamiento se calcula a partir de $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = -50$. Los valores se calculan para cada uno de estos tres parámetros si se alcanza el nivel de actividad; aunque, si el efecto no se alcanza o se supera, el valor para ese parámetro se expresa como superior o inferior a la concentración máxima o mínima analizada.

[0275] En la tabla 5 se establece un resumen de los resultados del estudio de DTP de NCI tal como se describe anteriormente para el compuesto A a 10µM:

[0276]

Tabla 5

Panel de líneas celulares (# líneas celulares)	Porcentaje de crecimiento promedio del compuesto D a 10 µM	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀
NSCLC (9)	62,77	3,39E-6	7,31E-6	2,84E-5
Cáncer de colon (6)	40,49	2,36E-6	6,45E-6	2,28E-5
Cáncer de mama (8)	59,72	1,00E-5	2,11E-5	3,08E-5
Cáncer de ovario (6)	66,18	6,23E-6	1,46E-5	3,53E-5
Leucemia (6)	12,31	1,09E-6	4,28E-6	1,34E-5
Cáncer renal (8)	82,54	8,00E-6	1,70E-5	3,70E-5
Melanoma (8)	16,46	4,09E-6	7,74E-6	1,59E-5
Próstata (1)	2,84	1,41E-5	2,76E-5	5,39E-5
SNC (5)	78,88	1,90E-6	4,13E-6	1,10E-5

[0277] Los resultados indican que el compuesto D a una concentración de 10 µM presentaba una actividad de base amplia en la reducción del crecimiento celular frente a un conjunto de los tipos de las 60 líneas celulares. Los efectos más intensos en la reducción del crecimiento celular se mostraron contra las líneas celulares del cáncer de próstata, seguido por las líneas celulares de leucemia, con los efectos menos drásticos mostrados con el cáncer renal. Los

valores de GI₅₀, TGI y LC₅₀ fueron todos los más bajos en las líneas celulares de leucemia y de cáncer del SNC, indicando la potencia más intensa del compuesto D contra los tipos de células de cáncer.

[0278] Ejemplo 12

[0279] Estudios de PHK de la actividad anti-enfermedad inflamatoria y anti-enfermedad vascular

[0280] La actividad antiinflamatoria de varios de los compuestos de los ejemplos de trabajo descritos previamente se determinó en base al efecto de compuestos ensayados sobre queratinocitos humanos primarios (PHK) tal como se ha descrito anteriormente y siguiendo las instrucciones del fabricante para los diversos kits utilizados en los estudios. Aunque estos estudios se utilizan más habitualmente para investigaciones antiinflamatorias, también se pueden aplicar a enfermedad vasculares, ya que los resultados en los queratinocitos se pueden extrapolar al endotelio vascular.

[0281] Sólo los datos de MCP-1 con PHK son dependientes de la dosis, por tanto se puede calcular una IC₅₀ para MCP-1, pero no para las otras citoquinas. Los resultados de los estudios de MCP-1 en varios compuestos se muestran en la siguiente tabla 6.

[0282]

Tabla 6

Compuesto	MCP-1 IC ₅₀
A	> 100 µM
C	> 100 µM
D	3 µM
H	75 µM

[0283] Los resultados de los compuestos con actividad antiinflamatoria en PHK tratados con TNF-α ensayada mediante la producción de proteína MCP-1 se muestran en la tabla 6. Las concentraciones IC₅₀ para la proteína MCP-1 muestran varios grados de inhibición de esta citoquina inflamatoria. En los resultados de otras de estas pruebas, todos los compuestos que se analizaron fueron capaces de reducir la producción de proteína MCP-1 de una manera dependiente de la dosis. El compuesto D mostró la mayor inhibición de MCP-1 en PHK tratados con TNF-α.

[0284] Ejemplo 13

[0285] Estudios de permeabilidad como indicativos de la biodisponibilidad oral

[0286] Los estudios de permeabilidad se realizaron por un trabajador externo en nombre del cesionario de la presente invención y la aplicación para determinar la permeabilidad de los compuestos D y G a través de monocapas de Caco-2. Un factor importante de la biodisponibilidad oral es la capacidad de un compuesto para ser absorbido en el intestino delgado. La medición de la permeabilidad aparente del fármaco (Papp) a través de monocapas de células se correlaciona adecuadamente con la absorción intestinal humana, y para esta medición son apropiadas varias líneas celulares de mamífero, incluyendo Caco-2, LLC-PK1 y MDCK, (Artursson, P. et al., "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells," Biochem Biophys Res Comm 175:880-885 (1991); Stewart, B.H., et al., "Comparison of intestinal permeabilities in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans," Pharm Res 12:693 (1995)). La P-glicoproteína (P-gp, codificada por MDR1) es un miembro de la superfamilia de transportadores ABC y se expresa en el intestino humano, el hígado y otros tejidos. La expresión intestinal de P-gp puede afectar a la biodisponibilidad oral de moléculas de fármacos que son sustratos para este transportador. La interacción con P-gp puede estudiarse utilizando ensayos directos de transporte de fármacos en sistemas de células polarizadas, tales como monocapas de células Caco-2, y monocapas de células LLC-PK1 y MDCK que expresan ADNc de P-gp humana.

[0287] Se cultivaron células Caco-2 (línea celular colónica de adenocarcinoma humano Caco-2, ATCC número de catálogo HTB-37, utilizada entre los pasajes 18 y 45) en insertos de cultivo de 1 µm de 24 multipocillos HTS BD Falcon™ (BD número de catálogo 351180) (BD Biosciences Labware Descubrimiento, Woburn, MA, EE.UU.). Las células se cultivaron durante 21-25 días con reemplazo de medio cada 3-4 días. La integridad de la monocapa se evaluó mediante mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial preexperimental (TEER) y determinaciones postexperimentales del flujo de A a B de amarillo lucifer.

[0288] El tampón de transporte fue HBSS (Solución salina equilibrada de Hanks) tamponada con la adición de HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazin-N'-[ácido 2-etanosulfónico]) 10 mM, y se ajustó el pH hasta 7,4 con NaOH. La solución receptora se preparó mediante la adición de DMSO al 1% al tampón de transporte. La solución de prueba

era de los compuestos D y H en DMSO en el tampón de transporte a una concentración de DMSO final del 1%. Se prepararon soluciones donantes para dos compuestos comparadores de la permeabilidad (50 μM de [^3H]-propranolol como "Alta" y 50 μM de [^{14}C]-manitol como "Baja"), así como un sustrato P-gp de control positivo (5 μM de [^3H]-digoxina) mediante la dilución de alícuotas de soluciones madre marcadas y no marcadas radioactivamente en el tampón de transporte a una concentración final de DMSO del 1%.

[0289] Los compuestos D y H de los artículos de ensayo se analizaron a una concentración única (1 μM) en la dirección tanto de A a B como de B a A. Las soluciones donante y receptora se añadieron a las cámaras apical o basolateral de las monocapas (dependiendo de la dirección del transporte a medir). Las monocapas se incubaron en un agitador orbital (50 rpm) a 37°C, con humedad ambiente y CO_2 . Después de 90 minutos, se extrajeron muestras de las cámaras donante y receptora para el análisis.

[0290] Para determinar el grado de unión no específica de la muestra a la placa de ensayo, la solución de muestra se incubó en las condiciones descritas anteriormente en un único pocillo de una placa de ensayo de 24 pocillos. Después de 90 minutos, se extrajo la muestra de cada pocillo para el análisis. Después se recogieron todas las muestras, se añadió una solución de amarillo lucifer a cada monocapa a una concentración final de 100 μM . Los insertos se colocaron en una nueva placa receptora que contenía tampón de transporte. Después de una incubación de 30 min en un agitador orbital (50 rpm) a 37°C, con humedad ambiente y CO_2 , se extrajeron muestras de la cámara receptora para medir el porcentaje de flujo de amarillo lucifer.

[0291] Se analizaron dos compuestos de comparación de la permeabilidad que representan una alta permeabilidad (50 μM de [^3H]-propranolol) y una baja permeabilidad (50 μM de [^{14}C]-manitol) en la dirección de A a B, con muestras tomadas de las cámaras donante y receptora en un punto de tiempo de 90 minutos. El sustrato P-gp de control fue 5 μM de [^3H]-digoxina analizada en la dirección tanto de A a B como de B a A, con muestras tomadas de las cámaras donante y receptora en un punto de tiempo 90 minutos. Se utilizaron monocapas duplicadas para cada incubación.

[0292] Las muestras se analizaron por LC/MS/MS usando relaciones de área de pico con respecto a un patrón interno. Las concentraciones de los artículos de ensayo se calcularon en base a las relaciones de área de pico obtenidas para las diluciones apropiadas de la solución donante que contiene el artículo de ensayo a la concentración nominal en tampón de transporte. Las muestras se diluyeron según sea apropiado para asegurar que la respuesta estaba dentro del rango lineal del detector de espectrometría de masas. Las muestras de comparación y de control se analizaron por recuento de centelleo líquido. Las concentraciones amarillo lucifer se determinaron usando un lector de placas de fluorescencia.

[0293] Las mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial preexperimental (TEER) (promedio de 411 Ωcm^2) y el flujo de A a B a de amarillo lucifer postexperimental (promedio 0,1%) confirmaron la integridad de la monocapa. La polarización de la digoxina de control positivo confirmó un modelo de transporte de P-gp que funcionaba. Los valores de Papp para los comparadores de la permeabilidad, manitol y propranolol, estaban dentro de los rangos históricos observados en la instalación para los ensayos con este sistema de ensayo (promedio $4,1 \times 10^{-7} \pm \text{SD } 2,4 \times 10^{-7}$ para manitol, $1,5 \times 10^{-5} \pm 4,2 \times 10^{-5}$ para propranolol), lo que indica un modelo que funciona correctamente.

[0294] Los resultados para los comparadores de la permeabilidad, manitol y propranolol, así como para el sustrato O-gp de control, digoxina, se indican en la siguiente tabla 7.

[0295]

Tabla 7

Compuesto	promedio P_{app} [cm/s]		Promedio de la relación de polarización (B-A/A-B)	Promedio del balance de masas	
	A a B	B a A		A a B	B a A
digoxina (5 μM)	2,28E-06	1,24E-05	5,4	73%	79%
propranolol (50 μM)	1,42E-05	n.d.	n.d.	71%	n.d.
manitol (50 μM)	5,14E-07	n.d.	n.d.	96%	n.d.
n.d. – no determinado					

[0296] Los datos de permeabilidad bidireccional, así como las relaciones de polarización obtenidas para los compuestos de ensayo en monocapas de células Caco-2 se indican en la tabla 8.

[0297]

Tabla 8

Artículo de ensayo	Concentración nominal [μM]	P_{app} [cm/s]				Relación de polarización [B-A/A-B]
		A a B		B a A		
Compuesto D	1,0	1,38E-05	1,40E-05	2,35E-06	2,51E-06	0,18
Compuesto H	20	6,67E-05	6,44E-05	1,01E-05	1,01E-05	0,15

5 [0298] La recuperación de los artículos de ensayo de las cámaras apical y basolateral (balance de masas), así como de un único pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos sin células (unión no específica) al final de la incubación, se indican en la tabla 9.

[0299]

10

Tabla 9

Artículo de ensayo	Concentración nominal [μM]	Balance de masas*				% de recuperación de unión no específica
		A a B		B a A		
Compuesto D	1,0	54%	78%	48%	39%	35%
Compuesto H	20	$\geq 100\%$	$\geq 100\%$	90%	$\geq 100\%$	96%

*Balance de masas/valores de recuperación > 100% son debidos habitualmente a una mayor solubilidad en el transcurso de la incubación

[0300] Conclusiones

15 [0301] Los resultados fueron muy alentadores. Los estudios de permeabilidad en monocapas de células Caco-2 como modelo in vitro de absorción intestinal demuestran que el Compuesto H se encuentra bajo la clase de permeabilidad alta, y que el Compuesto D se encuentra bajo la clase de permeabilidad moderada a alta según lo determinado por el sistema de clasificación de permeabilidad BCS.

20 [0302] Los resultados de TEER de las monocapas, así como los resultados de flujo de amarillo lucifer postexperimentales, indicaron la presencia de monocapas de células funcionales a lo largo del ensayo. El control positivo para el transporte de P-gp, digoxina, mostró un transporte polarizado (relación de polarización de 5,4, tabal 7), lo que indica un sistema de ensayo que funciona correctamente.

25 [0303] La recuperación del compuesto H de las cámaras apical y basolateral al final del ensayo (balance de masas), así como de la placa de ensayo sin células (Tabla 9), era completa, lo que indica que el grado de unión no específica del Compuesto H a las células o a la placa de plástico no afectó al ensayo. Sin embargo, el balance de masas y las determinaciones de unión no específica mostraron que el Compuesto D se unía a la placa de plástico y/o las células en un grado que podría haber reducido la cantidad de compuesto disponible para la difusión y el transporte. Como resultado de ello, los valores de P_{app} aparente y las relaciones de polarización resultantes (Tabla 8) pueden subestimar la permeabilidad del compuesto D y deben usarse con precaución cuando se asignan los compuestos a una clase de permeabilidad BCS tal como se muestra en la Tabla 10.

[0304]

35

Tabla 10

Clase de permeabilidad ^[3]	Absorción en humanos ^[4]	P_{app} (cm/s)
baja	< 50%	\leq manitol
moderada	50 – 89%	> manitol y < propranolol
alta	$\geq 90\%$	\geq propranolol

40 [0305] La permeabilidad A-B observada para el Compuesto H (Tabla 8) en monocapas de células Caco-2 fue mayor que la de propranolol. En base a la clasificación de permeabilidad BCS (Tabla 10), el Compuesto H, por lo tanto, debe ser considerado un compuesto de permeabilidad alta. Los valores de permeabilidad A-B observados para el Compuesto D estaban entre los observados para el manitol y el propranolol. En base a la clasificación de permeabilidad BCS (Tabla 10), el Compuesto D sería considerado un compuesto de permeabilidad moderada a alta. Tal como se señaló anteriormente, sin embargo, estas clasificaciones deben interpretarse con precaución a la luz del grado de unión observado para estos compuestos.

45

[0306] Los compuestos D y H mostraron relaciones de polarización de 0,1-0,2, lo que indica que la permeabilidad de A-B superaba la permeabilidad de B-A para estos compuestos. Este hallazgo no es coherente con el eflujo de B-A mediado por P-gp, y puede sugerir la participación de flujo A-B activo por un transportador distinto de P-gp.

[0307] Los estudios anteriores demuestran que los compuestos representativos de los derivados de NDGA de la presente invención serían composiciones farmacéuticas útiles.

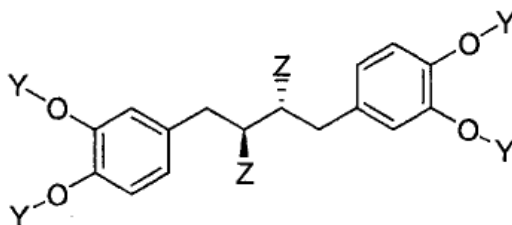
5 Referencias:

[0308]

1. Trang, T.; Stutak, M.; Quirion, R.; Jhamandas, K. *Br. J. Pharmacol.* 2003, 140, 295-304.
2. Nakadate, T. *Jpn. J. Pharmacol.* 1989, 49, 1-9.
- 10 3. Hausott, B.; Greger, H.; Marian, B. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2003, 129, 569-576.
4. Fujiwara, T.; Misumi, Y.; Ikehara, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 301, 927-933.
5. (a) Cheng, J. S.; Jan, C. R. *Toxicol. In Vitro* 2002, 16, 485-490. (b) Wang, J. L.; Chang, H. J.; Tseng, L. L.; Liu, C. P.; Lee, K. C.; Chou, K. J.; Cheng, J. S.; Lo, Y. K.; Su, W.; Law, Y. P.; Chen, W. C.; Chan, R. C.; Jan, C. R. *Pharmacol. Toxicol.* 2001, 89, 301-305. (c) Su, W.; Tseng, L. L.; Lin, M. C.; Chang, H. J.; Lee, K. C.; Chou, K. J.; Lo, Y. K.; Cheng, J. S. *Chang, H. T.; Wang, J. L.; Liu, C. P.; Chen, W. C.; Jan, C. R. Neurochem. Int.* 2002, 40, 249-254.
- 15 (d) Huang, J. K.; Chen, W. C.; Huang, C. J.; Hsu, S. S.; Chen, J. S.; Cheng, H. H.; Chang, H. T.; Jiann, B. P.; Jan, C. R. *Life Sciences* 2004, 75, 2341-2351.
6. Yamamura, H.; Nagano, N.; Hirano, M.; Muraki, K.; Watanabe, M. *Imaizumi, Y. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, 291, 140-146.
- 20 7. Ono, K.; Hasegawa, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Yamada, M.; Naiki, H. *J. Neurochem.* 2002, 81, 434-440.
8. Lee, C. H.; Jang, Y. S.; Her, S. J.; Moon, Y. M.; Baek, S. J.; Eling, T. *Exp. Cell. Res.* 2003, 289, 335-341.
9. Hwu, J. R.; Tseng, W. N.; Gnable, J.; Giza, P.; Huang, R. C. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2994-3000.
10. Huang, R. C.; Li, Y.; Giza, P. E.; Gnable, J. N.; Abd-Elazem, I. S.; King, K. Y.; Hwu, J. R. *Antiviral Res.* 2003, 58, 57-64.
- 25 11. King, K. Y.; Hakimelahi, G. H.; Huang, R. C.; Hwu, J. R. *J. Genetics Mol. Biol.* 2002, 13, 248-257.
12. Gnable, J. N.; Brady, J. N.; Clanton, D. J.; Ito, Y.; Dittmer, J.; Bates, R. B.; Huang, R. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 11239-11243.
13. Gnable, J.; Ito, Y.; Ma, Y.; Huang, R. C. *J. Chromatogr. A* 1996, 719, 353-364
- 30 14. Chen, H.; Teng, L.; Li, J.; Park, R.; Mold, D. E.; Gnable, J.; Hwu, J. R.; Tseng, W. N.; Huang, R. C. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 3001-3007.
15. Park, R.; Giza, P. E.; Mold, D. E.; Huang, R. C. *Antiviral Res.* 2003, 58, 35-45.
16. Craigo, J.; Callahan, M.; Huang, R. C.; DeLucia, A. *Antiviral Res.* 2000, 47, 19-28.
17. Chang, C.-C.; Heller, J. D.; Kuo, J.; Huang, R. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 13239-13244.
18. Heller, J. D.; Kuo, J.; Wu, T. C.; Kast, W. M.; Huang, R. C. *Cancer Res.* 2001, 61, 5499-5504.
- 35 19. (a). Park, R.; Chang, C.C.; Liang, Y.C.; Chung, Y.; Henry, R.A.; Lin, E.; Mold, D.E.; Huang, R.C. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11(12), 4601-4609. (b). Chang, C.C.; Liang, Y.C.; Kultz, A.; Hsu, C.I.; Lin, C.F.; Mold, D.E.; Chou, T.C.; Lee, Y.C.; Huang R.C. Published on line March 17, 2006 *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*.
20. Nakamura M, Matsuo K., and Nakamura E. *J Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 3686
21. *J.Chem. Soc.* 1934, 1423
- 40 22. Nikas S.P. et al. *The AAPS Journal* 2004: 6(4) Article 30 (<http://www.aapsj.org>)

REIVINDICACIONES

1. Compuesto derivado de ácido nordihidroguaiarético tetra-O-sustituido modificado con un puente de butano (BB-Sb4N), que tiene la siguiente estructura general (Fórmula VI), y sus sales farmacéuticamente aceptables:



BB-Sb₄N

Fórmula VI

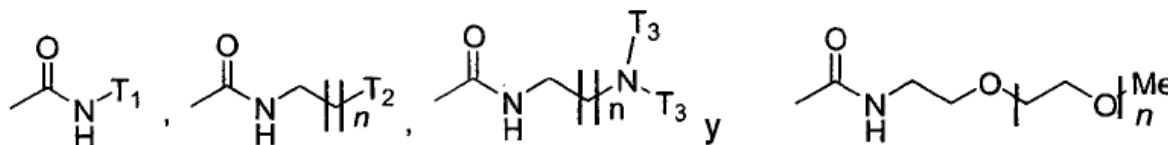
en el que cada Z se selecciona del grupo que consiste en H, -CHO, -CN, -CH₂CH₃, -CH₂Cl, -CH₂Br y -CH₂F; en el que Y se selecciona del grupo que consiste en:

-A-R;

-(CH₂)_xHal, en el que x es un número entero de 1 a 10, y Hal es un átomo de halógeno, en particular cualquiera de cloro, flúor, bromo o yodo;

-(CH₂CH₂O)_yH, en el que y es un número entero de 1 a 10; y

un grupo unido a carbamato seleccionado del grupo que consiste en:



en el que n es un número entero de 1 a 6, T₁ es una cadena de hidrocarburo lineal saturada de 2-6 carbonos y, opcionalmente, 1-3 átomos de halógeno, T₂ es un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente 0-3 dobles enlaces y que contiene opcionalmente 1-3 átomos de cualquiera entre O, N y S y T₃ es metilo o etilo;

en el que cuando Y es -A-R, R es un grupo terminal y A es una cadena lateral de hidrocarburo lineal saturado con heteroátomos opcionales que está unido en un extremo a los grupos O del residuo de hidroxilo respectivo mediante un enlace éter o un enlace carbamato y en el otro extremo a un carbono o un heteroátomo en el grupo terminal R;

la cadena lateral A se selecciona del grupo que consiste en una cadena de hidrocarburo saturada lineal C₂ - C₁₆, opcionalmente con 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, unida a los grupos O de los residuos de hidroxilo respectivos de NGDA a través de un enlace éter; y 1-5 unidades de una cadena de polietilenglicol (PEG);

el grupo terminal R se selecciona del grupo que consiste en:

un anillo carbocíclico de 5 a 7 miembros seleccionado del grupo que consiste en un anillo totalmente saturado con 1 a 3 heteroátomos de N, O o S; un anillo que contiene de 1 a 3 dobles enlaces para un anillo de 6 ó 7 miembros y de 1 a 2 dobles enlaces para un anillo de 5 miembros, con de 1 a 3 heteroátomos de N, O o S para el anillo de 5 a 7 miembros; un anillo que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida; y

un grupo soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en una sal de metal alcalino de ácido sulfónico; una sal de metal alcalino de ácido fosfónico; una sal farmacéuticamente aceptable; un azúcar y un grupo polihidroxilo.

2. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que el compuesto es 1,4-bis[3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]fenil]butano y sus sales farmacológicamente aceptables.

3. Composición que comprende el compuesto BB-Sb₄N, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y un portador farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

4. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición, según la reivindicación 3, para utilizar en un método de tratamiento o profilaxis.

5. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición, según la reivindicación 3, para utilizar en un método de tratamiento o profilaxis de una infección viral.

6. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición, según la reivindicación 3, para utilizar en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad proliferativa.
- 5 7. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición, según la reivindicación 3, para utilizar en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad inflamatoria.
8. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición, según la reivindicación 3, para utilizar en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad metabólica.
- 10 9. Compuesto, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una composición, según la reivindicación 3, para utilizar en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad vascular.
- 15 10. Kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el compuesto BB-Sb4N, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, e instrucciones para utilizar en un método de tratamiento o profilaxis de por lo menos una de una infección viral, una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad metabólica y una enfermedad vascular.