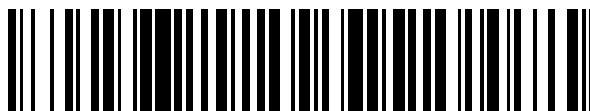


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 540**

51 Int. Cl.:

C07C 403/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2002 E 02783947 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1534672**

54 Título: **Derivados de retinol, su uso en el tratamiento del cáncer y para potenciar la eficacia de otros agentes citotóxicos**

30 Prioridad:

23.07.2002 SE 0202311
23.07.2002 US 398200 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2014

73 Titular/es:

ARDENIA INVESTMENTS LTD. (100.0%)
First Floor, 45 Welbeck Street
London W1G 8DZ, GB

72 Inventor/es:

STRELCHENOK, OLEG y
ALEKSOV, JULIAN

ES 2 452 540 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 retinol, su uso en el tratamiento del cáncer y para potenciar la eficacia de otros agentes citotóxicos

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a compuestos novedosos que tienen propiedades terapéuticas en sí mismos, y que pueden potenciar la eficacia de otros compuestos terapéuticamente activos, por ejemplo compuestos citotóxicos usados en el tratamiento del cáncer. Se ha mostrado que los compuestos novedosos presentan una propiedad de inhibición del crecimiento celular en sí mismos. Además de esto, se ha encontrado sorprendentemente que estos compuestos hacen posible preparar nuevas formulaciones de compuestos escasamente solubles, mostrados a modo de ejemplo en el presente documento por compuestos citotóxicos escasamente solubles, tales como docetaxel y paclitaxel, mostrando las formulaciones eficacia terapéutica y solubilidad mejoradas. También se ha encontrado que los compuestos hacen posible preparar nuevas formulaciones de otros compuestos citotóxicos, tales como doxorubicina y mitoxantrona, que muestran eficacia terapéutica mejorada. Además, se ha encontrado que los compuestos de la invención en solución salina en presencia de calcio, y en particular las correspondientes isoformas cis y trans de un compuesto según la invención, muestran propiedades terapéuticas.

20 **Antecedentes de la invención.**

Docetaxel es un representante de la familia de los taxoides. [Éster N-terc-butílico de (2R,3S)-N-carboxi-3-fenilisoserina, 13-éster con 4-acetato y 2-benzoato de 5 β -20-epoxi-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahidroxitax-11-en-9-ona, trihidratado, el principio activo en Taxotere[®], Rhone-Poulenc Rorer, Collegetville, PA, EE.UU.]. El compuesto puede prepararse mediante síntesis a partir de su precursor químico, presente de manera natural en la biomasa de agujas renovables de plantas del tejo.

Docetaxel es el agente más eficaz para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Actualmente, el uso práctico ha confirmado que docetaxel también tiene una alta actividad contra cánceres gástrico, de cuello, de cabeza, de ovarios y de pulmón de células no pequeñas y de células pequeñas; así como melanoma, y sarcomas de tejido blando. Fomenta el ensamblaje de, y estabiliza, microtúbulos y por tanto inhibe su despolimerización. Docetaxel está altamente unido a proteína, concretamente, a α_1 -glicoproteína ácida, albúmina y lipoproteínas. El perfil farmacocinético se caracteriza por la rápida distribución inicial de docetaxel a los compartimentos periféricos y, en una fase posterior, el lento flujo de salida de docetaxel desde dichos compartimentos periféricos.

Docetaxel es altamente lipófilo y escasamente soluble en agua. Taxotere[®] es una formulación en viales de una única dosis que contienen 20 mg (0,5 ml) u 80 mg (2,0 ml) de docetaxel (anhidro). Cada ml de este producto contiene 40 mg de docetaxel (anhidro) y 1040 mg de polisorbato 80. El diluyente para Taxotere[®] contiene el 13% de etanol en agua para inyección.

El patrón de seguridad de Taxotere[®] incluye un régimen de medicación previa. Todos los pacientes deben recibir medicación previa con corticosteroides orales para reducir la intensidad de la retención de líquidos y reacciones de hipersensibilidad. Otros efectos secundarios menos intensos incluyen neurotoxicidades, reacciones cutáneas, alopecia y astenia.

Docetaxel está ahora desafiando el papel de antiguos agentes en el tratamiento del cáncer y está aprobado en la actualidad tras el fallo de otra quimioterapia. Por ejemplo, docetaxel ha demostrado ser el fármaco más eficaz contra metástasis en el hígado. En ensayos clínicos, pacientes con cáncer de mama metastásico muestran tasas de respuesta para el tratamiento con docetaxel de primera línea a una dosis de 100 mg/m² que superan a las de paclitaxel a dosis < 250 mg/m².

La combinación de doxorubicina y paclitaxel ha entrado en ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. Hay bases para suponer que las interacciones farmacocinéticas entre paclitaxel y doxorubicina pueden intensificar la cardiotoxicidad de antraciclina. En cambio, docetaxel no tiene influencia sobre la farmacocinética de doxorubicina. Por tanto docetaxel es el principal candidato para su uso con doxorubicina en ensayos clínicos (C. L. Vogel, J-M. Nabholz, The Oncologist, 1999, v. 4, pág. 17-33; J. E. Cortes, R. Pazdur, J. Clin. Oncology, 1995, v. 13, pág. 2643-2655).

La doxorubicina, un antibiótico de antraciclina soluble en agua, sigue siendo un agente importante de quimioterapia de primera línea en el tratamiento de una variedad de tumores sólidos y hematopoyéticos. La doxorubicina se aísla de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. El nombre químico para doxorubicina es {clorhidrato de (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicolil-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacenodiona, el principio activo en Adriamycin[®], Pharmacia, Suecia}. Adriamycin[®] contiene 50 mg de clorhidrato de doxorubicina, 250 mg de monohidrato de lactosa, 5 mg de parahidroxibenzoato de metilo en forma seca.

La eficacia de la doxorubicina se ve complicada por su toxicidad limitante de la dosis, cardiotoxicidad crónica o tras una única dosis y una resistencia espontánea o adquirida. Debe enfatizarse que la doxorubicina tiene una

determinada afinidad por fosfolípidos y el desarrollo de resistencia parece estar asociado con algunas alteraciones de membrana. En la actualidad, se cree que los efectos antiproliferativo y citotóxico de la doxorubicina están conectados con la inhibición de la síntesis del ADN, formación de radicales libres y peroxidación de lípidos, unión a ADN y reticulación de ADN, efectos de membrana directos.

5 Ensayos con incorporación de doxorubicina en regímenes de combinación para el tratamiento de cáncer de mama han mostrado tasas de supervivencia moderadas para mujeres con enfermedad metastásica.

10 La resistencia a fármaco, tanto intrínseca como adquirida, es el motivo fundamental para el fallo clínico de este compuesto en el tratamiento de cáncer de mama. No obstante, la enorme experiencia clínica recopilada hasta ahora muestra la doxorubicina como un fármaco bien tolerado y eficaz para la mayoría de los tumores sensibles a antraciclina (D. A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.*, 1999, v. 57, n.º 727-741; Vogel y Nabholz, citado anteriormente).

15 La mitoxantrona es un agente citotóxico de antracenodiona sintético derivado del colorante de antraquinona ametantrona que tiene similitudes estructurales con doxorubicina. Tiene un mecanismo de acción similar a las antraciclinas. Mitoxantrona se intercala en el ADN e inhibe la síntesis de ADN. La actividad antitumoral del fármaco también se atribuye a su interacción con ADN topoisomerasa II.

20 La mitoxantrona es el principio activo en Novantrone[®], Wyet Lederle. Novantrone[®] es un concentrado para infusiones, 2 mg/ml. Cada ml de concentrado contiene 2 mg de clorhidrato de mitoxantrona, 8 mg de cloruro de sodio, 0,05 mg de acetato de sodio, 0,46 mg de ácido acético y 0,15 mg de sulfato de sodio. La mitoxantrona muestra eficacia clínica en el tratamiento de leucemia, linfoma y cáncer de mama. También es eficaz para el tratamiento paliativo de carcinoma hepático, de ovarios avanzado y cáncer de próstata resistente a hormonas.

25 Las dosis acumulativas de mitoxantrona pueden provocar cardiotoxicidad e inmunosupresión. Los pacientes que tienen historia de terapia con antraciclina pueden padecer insuficiencia cardiaca congestiva (D. Faulds *et al.*, *Drugs*, 1991, v. 41, n.º 3, pág. 400-449).

30 Las tendencias modernas en el combate contra el cáncer están desafiando el papel principal de la monoterapia en el tratamiento de pacientes. La experiencia clínica sugiere un gran potencial de la terapia de combinación en el entorno adyuvante. Sin embargo, la creación de opciones terapéuticas eficaces para el entorno adyuvante requiere el desarrollo de una nueva estrategia de formulación para compuestos insolubles en agua, con el fin de maximizar el potencial de los fármacos.

35 En los últimos años, se han usado formulaciones de fármacos basadas en productos en emulsión nutricionales. Tales formulaciones necesitan ajustarse con una carga de fármaco significativa y complementarse con emulsionantes. Las formulaciones deben estar estrictamente especificadas en cuanto a la distribución de tamaño de gotita. Esto complica la preparación y requiere homogenización a alta presión de las emulsiones lipídicas. Además, se necesita tratar varias cuestiones técnicas, tales como la estabilidad a largo plazo y la eliminación de la posibilidad de precipitación de fármaco tras la dilución (L. Collins-Gold, *et al.*, *Modern Drug Discovery*, 2000, vol. 3, n.º 3, pág. 44 - 46, 48).

45 El documento DE 4032187 da a conocer derivados de N-retinoil-L-cistein-(aminomercapto) estructuralmente próximos que pueden usarse en el tratamiento del cáncer.

En solicitudes en tramitación junto con la presente (documentos US 10/098.873 y PCT/SE02/00380) los presentes inventores han dado a conocer ácido N-retinoil-L-cisteico, ácido N-retinoil-L-homocisteico, ácido N-retinoil-L-cisteinsulfínico, así como sales de sodio de estos compuestos.

50 En la presente solicitud de patente, los inventores dan a conocer isoformas novedosas de ácido N-retinoil-L-cisteico, ácido N-retinoil-L-homocisteico, ácido N-retinoil-L-cisteinsulfínico, sus ésteres y amidas, así como sales de los mismos. Estos compuestos novedosos muestran propiedades de inhibición del crecimiento celular y, además de esto, también hacen posible preparar nuevas formulaciones micelares de compuestos citotóxicos escasamente solubles en agua, tales como paclitaxel y docetaxel, que muestran eficacia terapéutica y solubilidad mejoradas y nuevas formulaciones micelares de doxorubicina y mitoxantrona, que demuestran una eficacia terapéutica mejorada.

Breve resumen de la invención

La presente invención hace disponible un grupo de nuevos compuestos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas al presente documento y sales de sodio de esos compuestos y también sales de sodio de sus ésteres y amidas, que muestran efectos terapéuticos en sí mismas, y que, en combinación con compuestos citotóxicos, tales como docetaxel, paclitaxel, doxorubicina y mitoxantrona, muestran un efecto sinérgico. Además, la presente invención da a conocer métodos de preparación de formulaciones solubles en agua de productos farmacéuticos escasamente solubles, tales como docetaxel y paclitaxel, que muestran actividad farmacológica potenciada, y las formulaciones de productos farmacéuticos solubles en agua tales como doxorubicina y mitoxantrona, que muestran eficacia terapéutica mejorada. La invención también hace disponibles métodos para el tratamiento del cáncer en los que se administran los compuestos y las formulaciones de la invención a pacientes en medio acuoso de iones de

sodio abundantes que contienen iones de calcio. La presente invención también hace disponible una composición farmacéutica novedosa que comprende al menos uno de los compuestos de la invención en solución salina en presencia de calcio, y preferiblemente dos isoformas cis y trans correspondientes de uno de dichos compuestos, pudiendo dichas isoformas formar un complejo con calcio.

5

Descripción de la invención.

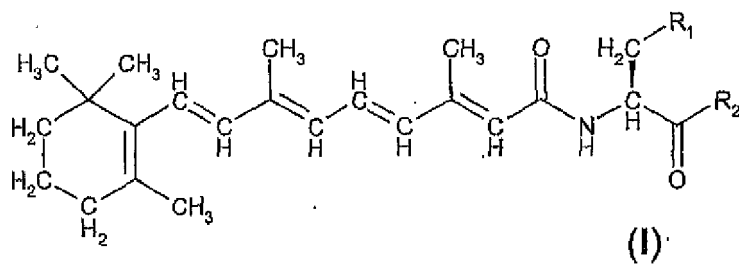
En solicitudes en tramitación junto con la presente (documentos US 10/098.873 y PCT/SE02/00380) los presentes inventores han mostrado que ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico (I-1), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico (II-1), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteinsulfínico (I-2), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteinsulfínico (II-2), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico (I-3) y ácido N-(13-cis-retinoil)-L-homocisteico (II-3) pueden aumentar la solubilidad de paclitaxel, así como potenciar su eficacia terapéutica.

10

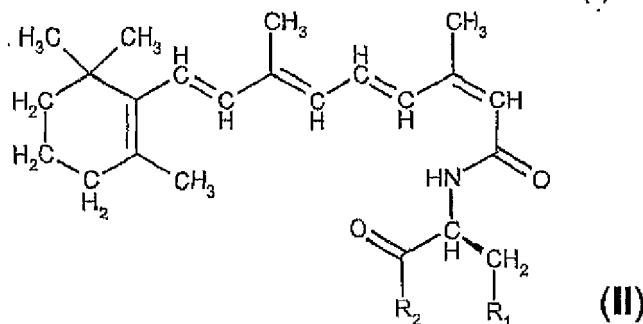
Ahora los inventores han encontrado sorprendentemente que las sales de sodio de un grupo de ésteres novedosos (I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b) y sales de sodio de amidas (I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) de estos compuestos presentan las mismas propiedades.

15

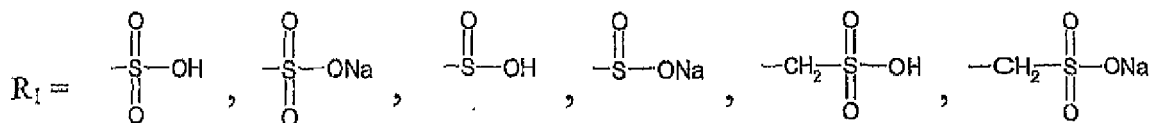
A continuación se presentan las fórmulas estructurales generales de estos compuestos y las fórmulas estructurales de cada compuesto sintetizado:



20



en las que



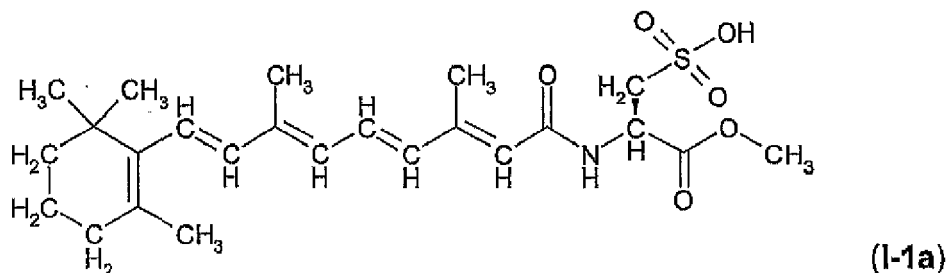
25

R₂ = NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, OX en el que X es alquilo C₁-C₄.

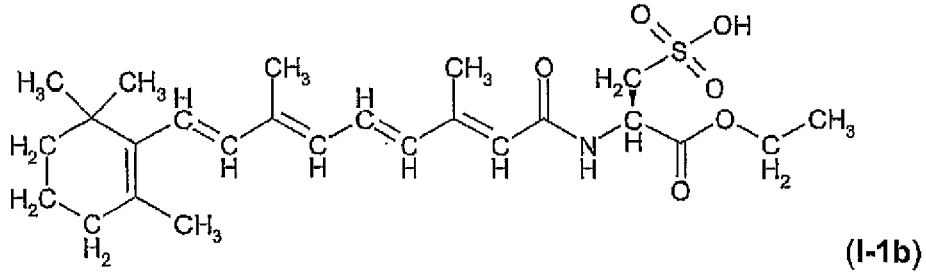
Los inventores han sintetizado compuestos individuales, que se encuentran dentro del alcance de la fórmula general anterior, y derivados preparados de los mismos. A continuación se facilitan ejemplos de estos compuestos.

30

En primer lugar, se muestra a modo de ejemplo un grupo de derivados de ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico:

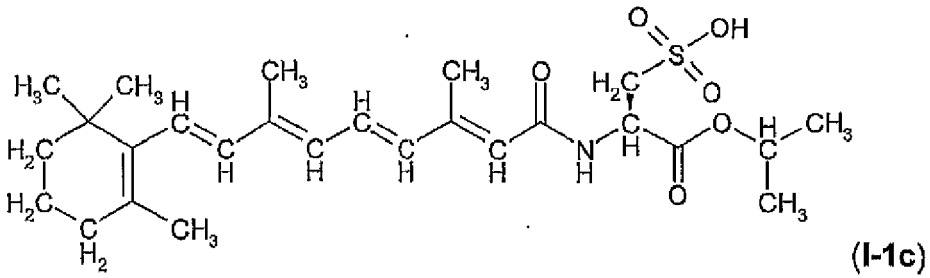


éster metílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

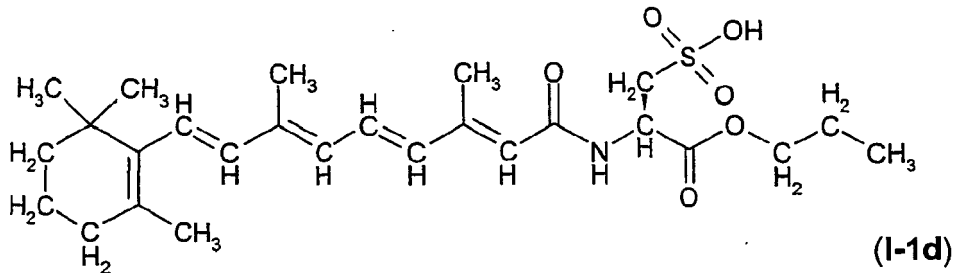


5

éster etílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

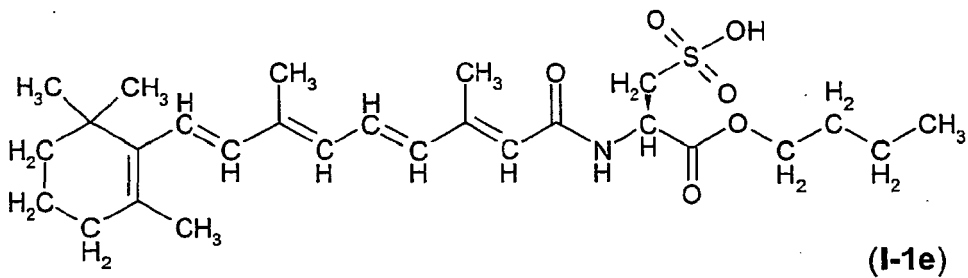


éster isopropílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

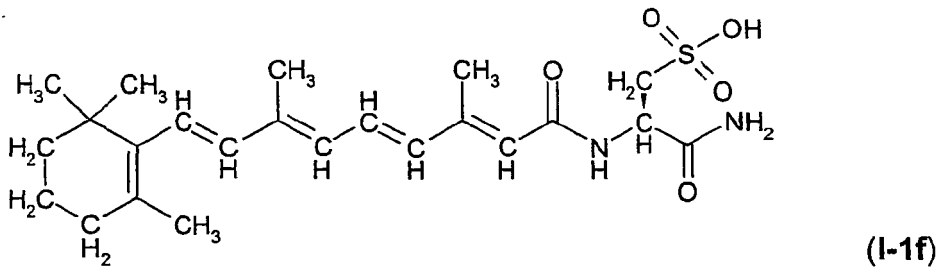


10

éster propílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

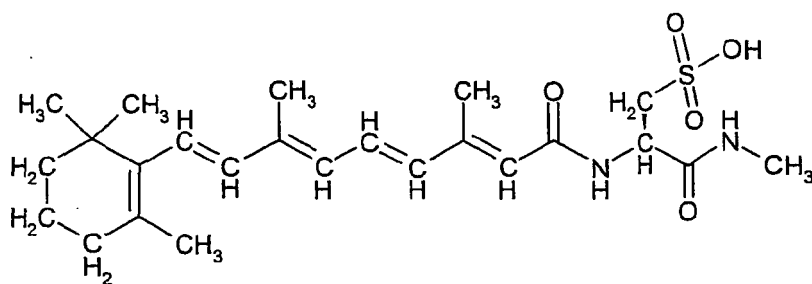


éster butílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



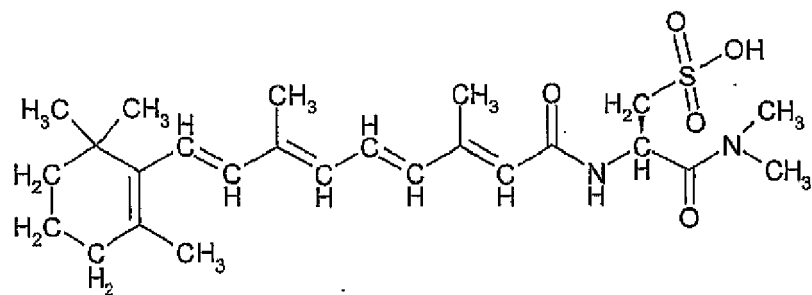
15

amida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



(I-1g)

metilamida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

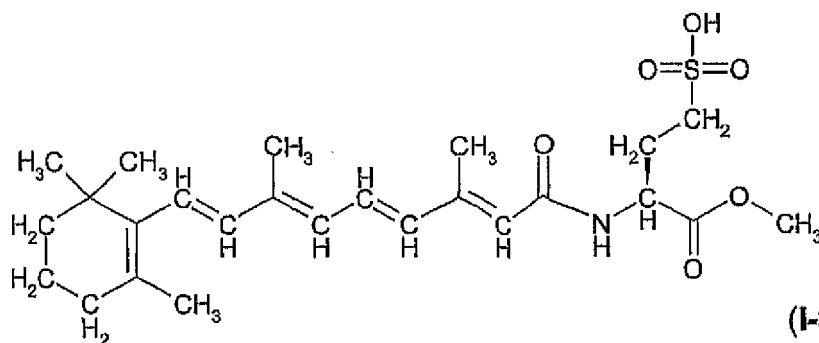


(I-1h)

5 dimetilamida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

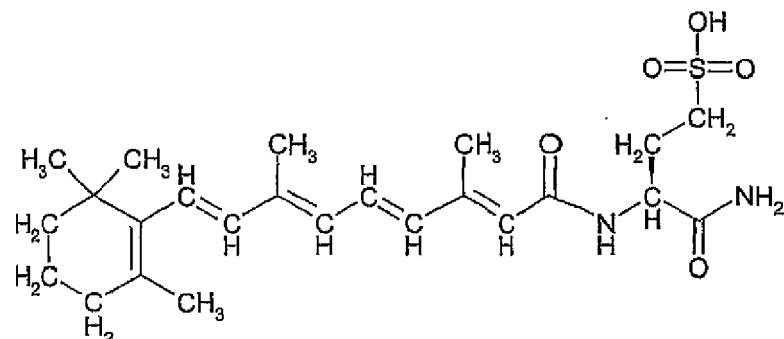
La invención también incluye sales de sodio de estos compuestos (I-1a a I-1h) mostrados a modo de ejemplo anteriormente, así como sales de sodio de todos los compuestos cubiertos por la fórmula general.

10 La invención también abarca el siguiente grupo de compuestos (I-3a, I-3f) y derivados de los mismos:



(I-3a)

éster metílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico

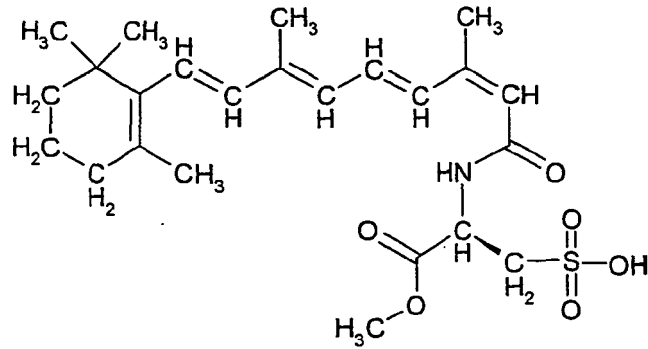


(I-3f)

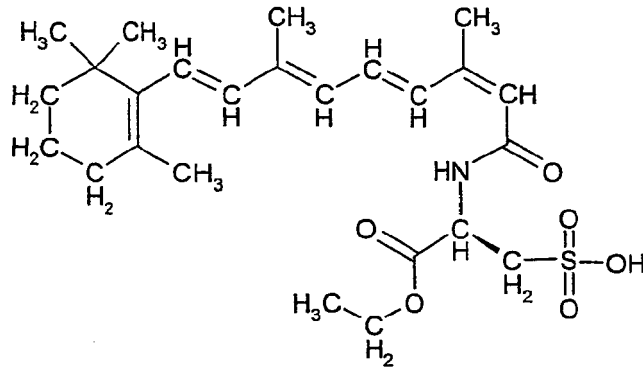
15 amida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico

La invención también incluye sales de sodio de estos compuestos (I-3a, I-3f) mostrados a modo de ejemplo anteriormente, así como sales de sodio de todos los compuestos cubiertos por la fórmula general.

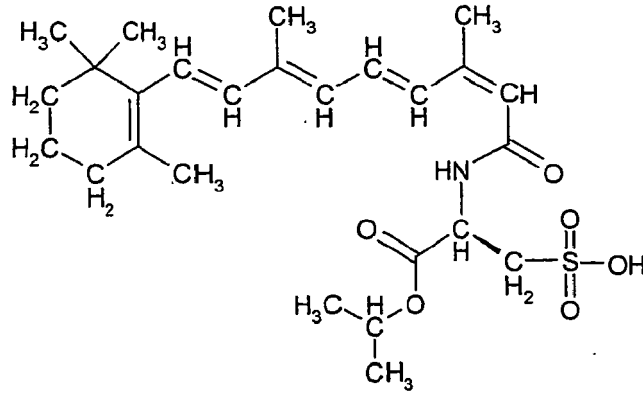
20 Además, la invención abarca un grupo de derivados de ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico (II-1a a II-1f):



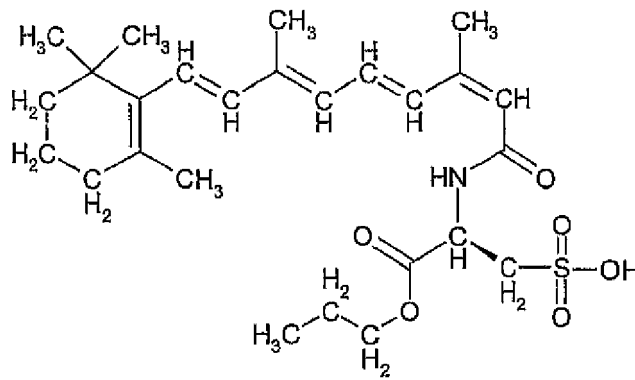
éster metílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



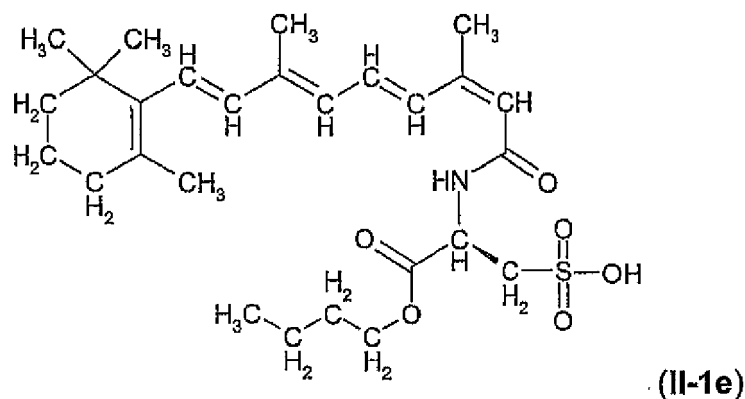
5 éster etílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



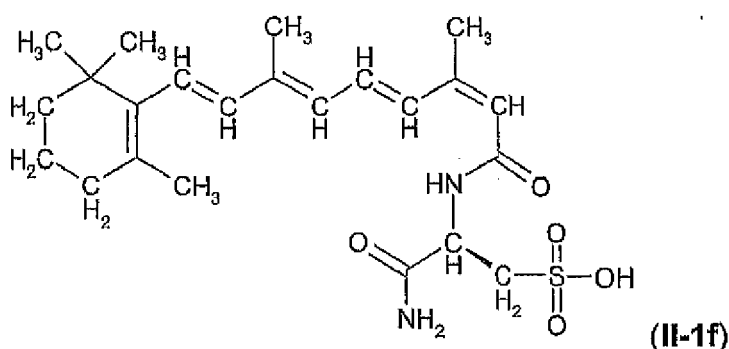
éster isopropílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



10 éster propílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



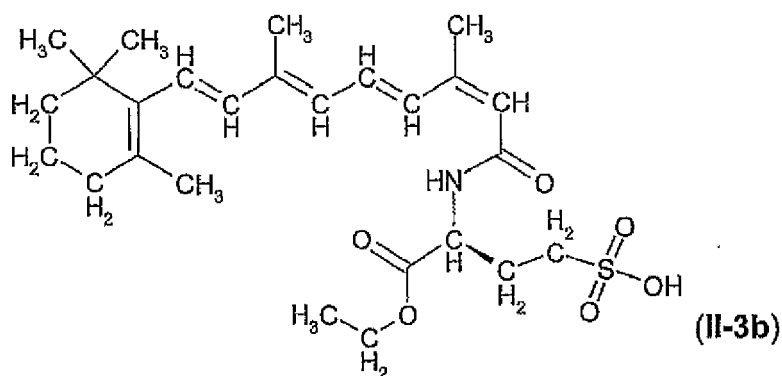
éster butílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



5 amida del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico

La invención también incluye sales de sodio de estos compuestos (II-1a a II-1f) mostrados a modo de ejemplo anteriormente, así como sales de sodio de todos los compuestos cubiertos por la fórmula general.

10 La invención también abarca el siguiente grupo de compuestos (II-3b) y derivados de los mismos:



éster etílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-homocisteico

15 La invención también incluye sales de sodio de los compuestos anteriores (II-3b) mostrados a modo de ejemplo anteriormente, así como sales de sodio de todos los compuestos cubiertos por la fórmula general.

La presente invención hace disponible el uso de compuestos definidos por la fórmula general, en particular los compuestos mostrados a modo de ejemplo anteriormente, sus sales de sodio o derivados de los mismos para la preparación de un medicamento. La presente invención también hace disponible el uso de los compuestos definidos por la fórmula general, en particular los compuestos mostrados a modo de ejemplo anteriormente, sus sales de sodio o un derivado de los mismos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Además, la presente invención hace disponible una composición farmacéutica que comprende una sustancia activa en una cantidad terapéuticamente eficaz y uno de los compuestos definidos por la fórmula general, en particular los compuestos mostrados a modo de ejemplo anteriormente, sus sales de sodio o un derivado de los mismos. En particular, la presente invención hace disponible una composición farmacéutica en la que la sustancia activa es un compuesto citotóxico y el compuesto potenciador es uno de los compuestos anteriores, sus sales de sodio o un

derivado de los mismos. Según una realización de la invención, dichas sustancias activas son docetaxel, paclitaxel, doxorubicina y mitoxantrona.

Otra realización de la presente invención es un método para potenciar la eficacia de una sustancia farmacéuticamente activa, en el que dicha sustancia se prepara en forma micelar con al menos uno de los compuestos anteriores, sus sales de sodio o un derivado de los mismos.

Otra realización es un método para aumentar la solubilidad de una sustancia farmacéuticamente activa, en el que dicha sustancia se prepara en forma micelar con al menos uno de los compuestos anteriores, sus sales de sodio o un derivado de los mismos.

Aún otra realización es el método para mejorar la biodisponibilidad de sustancia farmacéuticamente activa, en el que dicha sustancia se prepara en forma micelar con al menos uno de los compuestos anteriores, sus sales de sodio o un derivado de los mismos.

La presente invención también hace disponible una composición farmacéutica novedosa, en la que al menos uno de los compuestos anteriores y preferiblemente los isómeros cis y trans correspondientes de uno de los compuestos anteriores, sus sales de sodio o un derivado de los mismos, están presentes en solución salina, en presencia de iones de calcio. Tales formulaciones se dan a conocer adicionalmente en la presente descripción y ejemplos, y se ha mostrado que muestran propiedades sorprendentes. Por consiguiente, dicha invención también hace disponible un método para el tratamiento del cáncer, en el que se administra al menos uno de los compuestos anteriores o dos isómeros cis-trans de los compuestos anteriores, sus sales de sodio o derivados de los mismos, a un paciente en medio acuoso de iones de sodio abundantes que contienen iones de calcio. La cantidad de calcio es preferiblemente una cantidad correspondiente a una concentración de CaCl_2 en el intervalo de 2,2 a 2,6 mmol/l (8,8 -10,4 mg/dl) o lo más preferiblemente de 2,3 mmol/l.

La presente invención también hace disponible un método para el tratamiento del cáncer, en el que se mezcla al menos una sustancia citotóxica con al menos uno de los compuestos anteriores o dos isómeros cis-trans de los compuestos anteriores, sus sales de sodio o derivado de los mismos, y se administran a un paciente en medio acuoso de iones de sodio abundantes que contienen iones de calcio. En particular, la invención se refiere a tales métodos, en los que la al menos una sustancia citotóxica se elige de docetaxel, paclitaxel, doxorubicina y mitoxantrona.

Los inventores han mostrado que los compuestos escasamente solubles docetaxel y paclitaxel pueden disolverse en micelas de ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico (I-1), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico (II-1), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteinsulfínico (I-2), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteinsulfínico (II-2), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico (I-3), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-homocisteico (II-3), sales de sodio de sus ésteres (I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b) y sales de sodio de sus amidas (I-1f - I-1h, I-3f, II-1f), creando micelas mixtas. De esta manera, se logra una solubilidad excelente de docetaxel y paclitaxel en forma de micelas mixtas en solución salina.

Se han realizado pruebas que evalúan la citotoxicidad de los compuestos (I-1a - I-1h, I-3a, I-3f; II-1a - II-1f, II-3b) en forma de sales de sodio en el intervalo de concentración de 10^{-9} a 10^{-7} M en cultivos de la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 y revelaron la siguiente dependencia: un aumento de las concentraciones de los compuestos de la invención condujo a una potenciación de la inhibición del crecimiento celular, alcanzando un valor próximo al 47% para los compuestos I-1a y II-1a; un valor próximo al 48% para los compuestos I-1b y II-1b; un valor próximo al 50% para los compuestos I-1c y II-1c; un valor próximo al 54% para los compuestos I-1d y II-1d; un valor próximo al 54% para los compuestos I-1e y II-1e; y un valor próximo al 53% para los compuestos I-1f y II-1f; un valor próximo al 43% para el compuesto I-1g; un valor próximo al 46% para el compuesto I-1h; un valor próximo al 49% para el compuesto I-3a; un valor próximo al 55% para el compuesto I-3f; un valor próximo al 62% para el compuesto II-3b.

Se convirtieron sales de sodio de los compuestos I-1 y II-1 en las correspondientes formas ácidas de los compuestos y se disolvieron en metanol, con el fin de preparar las formulaciones de docetaxel/compuesto I-1, docetaxel/compuesto II-1 y paclitaxel/compuesto II-1.

La inhibición del crecimiento celular de la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 alcanzada por las formulaciones de docetaxel/compuesto (I-1 y II-1) fue próxima al 86% (próxima al 48% en comparación con docetaxel solo como control positivo). La concentración de docetaxel en las formulaciones de docetaxel/compuesto I-1 y docetaxel/compuesto II-1 requerida para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fue más de 5 veces inferior, en comparación con docetaxel solo.

La inhibición del crecimiento celular de la línea celular de adenocarcinoma de ovarios humano SKOV-3 mediante la formulación de paclitaxel/compuesto II-1 ha sido próxima al 84% (próxima al 44% en comparación con paclitaxel solo como control positivo). La concentración de paclitaxel en la formulación de paclitaxel/compuesto II-1 requerida para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fue más de 3 veces inferior, en comparación con paclitaxel solo.

En pruebas que evaluaron la citotoxicidad de las formulaciones de docetaxel y sales de sodio de los compuestos (I-1a - I-1c, II-1a - II-1c), la formulación de paclitaxel y sal de sodio del compuesto II-1a mostró los siguientes efectos: la inhibición del crecimiento celular de la línea celular de carcinoma de próstata humano DU 145 mediante las formulaciones de docetaxel/compuesto (I-1a y II-1a) fue próxima al 88% (próxima al 53% en comparación con docetaxel solo como control positivo); la inhibición del crecimiento celular de la línea celular de adenocarcinoma de ovarios humano SCOV-3 mediante las formulaciones de docetaxel/compuesto (I-1b y II-1b) fue próxima al 84% (próxima al 51% en comparación con docetaxel); y la inhibición del crecimiento celular de la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 mediante las formulaciones de docetaxel/compuesto (I-1c y II-1c) fue próxima al 88% (próxima al 40% en comparación con docetaxel). La concentración de docetaxel en las formulaciones de docetaxel/compuesto (I-1a- I-1c y II-1a - II-1c) requerida para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fue aproximadamente 2-5 veces inferior, en comparación con docetaxel solo.

La inhibición del crecimiento celular de la línea celular de adenocarcinoma de ovarios humano SKOV-3 mediante la formulación de paclitaxel/compuesto II-1a ha sido próxima al 82% (próxima al 39% en comparación con paclitaxel solo como control positivo). La concentración de paclitaxel en la formulación de paclitaxel/compuesto II-1a requerida para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fue 2,8 veces inferior, en comparación con paclitaxel solo.

Pruebas que evaluaron la citotoxicidad de las formulaciones de doxorubicina y sales de sodio de los compuestos (I-1d y II-1d) mostraron los siguientes efectos: la inhibición del crecimiento celular de la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 mediante las formulaciones de doxorubicina/compuesto (I-1d y II-1d) fue próxima al 76% (próxima al 48% en comparación con doxorubicina). La concentración de doxorubicina en las formulaciones de doxorubicina/compuesto I-1d y doxorubicina/compuesto II-1d requerida para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fue aproximadamente de 5 a 6 veces inferior, en comparación con doxorubicina sola.

Pruebas que evaluaron la citotoxicidad de las formulaciones de mitoxantrona y sales de sodio de los compuestos (I-1e, I-1f, II-1e y II-1f) mostraron los siguientes efectos: la inhibición del crecimiento celular de la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 mediante las formulaciones de mitoxantrona/compuesto (I-1e y II-1e) fue próxima al 78% (próxima al 47% en comparación con mitoxantrona); la inhibición del crecimiento celular de la línea celular de carcinoma de próstata humano DU 145 mediante las formulaciones de mitoxantrona/compuesto (I-1f y II-1f) fue próxima al 80% (próxima al 52% en comparación con mitoxantrona). La concentración de mitoxantrona en las formulaciones de mitoxantrona/compuesto (I-1e y II-1e) requerida para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fue 12-20 veces inferior, en comparación con mitoxantrona sola. La concentración de mitoxantrona en las formulaciones de mitoxantrona/compuesto (I-1f y II-1f) requerida para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fue de 4 a 6 veces inferior, en comparación con mitoxantrona sola.

Las formulaciones de la invención de ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico (I-1), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico (II-1), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteinsulfínico (I-2), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteinsulfínico (II-2), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico (I-3), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-homocisteico (II-3), sales de sodio de estos compuestos, sales de sodio de sus ésteres (I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b), sales de sodio de sus amidas (I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) y docetaxel o paclitaxel se prepararon de la siguiente manera.

En primer lugar se prepararon disoluciones de docetaxel o paclitaxel y uno cualquiera de los compuestos de la invención (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) en etanol (u otro alcohol alifático) en concentraciones apropiadas. Entonces se mezclaron alícuotas de estas disoluciones para formar disoluciones micelares mixtas con la razón molar deseada de docetaxel/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) o paclitaxel/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f). Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico en un evaporador rotatorio a presión reducida. Entonces se disolvió la película seca resultante en agua. Se filtró la disolución obtenida a través de un filtro estéril de 22 μm y se liofilizó para obtener las formulaciones en forma seca.

Se mostró que las formulaciones de docetaxel/compuesto y paclitaxel/compuesto en sistemas micelares mixtos en forma seca eran estables durante un periodo de tiempo suficiente esperando a ser usadas. No hubo ningún cambio en la concentración de los principios activos durante un almacenamiento de 6 meses a 4°C. Se reconstituyeron las formulaciones de docetaxel/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; I-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) y paclitaxel/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) con agua o solución salina y mostraron una acción citotóxica sin cambios en la línea celular MDA-MB-231 tras un almacenamiento de 6 meses a 4°C.

Las formulaciones de doxorubicina/compuesto o mitoxantrona/compuesto se prepararon de la siguiente manera:

se evaporó una alícuota de disolución madre en agua-alcohol de ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico (I-1), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico (II-1), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteinsulfínico (I-2), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-

cisteinsulfínico (II-2), ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico (I-3), ácido N-(13-cis-retinoil)-L-homocisteico (II-3), sales de sodio de estos compuestos, sales de sodio de sus ésteres (I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b), sales de sodio de sus amidas (I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló la disolución obtenida con una alícuota de disolución de doxorubicina en agua o con una alícuota de disolución de mitoxantrona en agua para formar una disolución micelar mixta con la razón molar deseada de doxorubicina/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) o mitoxantrona/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f). Se filtró cada disolución a través de un filtro estéril de 22 μm y se liofilizó para obtener las formulaciones en forma seca.

Se mostró que las formulaciones de doxorubicina/compuesto y mitoxantrona/compuesto en sistemas micelares mixtos en forma seca eran estables durante un periodo de tiempo suficiente esperando a ser usadas. No hubo ningún cambio en la concentración de los principios activos durante almacenamiento de 6 meses a 4°C. Se reconstituyeron las formulaciones de doxorubicina/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) y mitoxantrona/compuesto (I-1 - I-3, II-1 - II-3 o sales de sodio de estos compuestos; I-1a - I-1e, I-3a; II-1a - II-1e, II-3b; I-1f - I-1h, I-3f, II-1f) con agua y mostraron una acción citotóxica sin cambios en la línea celular MDA-MB-231 tras un almacenamiento de 6 meses a 4°C.

Se llevó a cabo una evaluación comparativa de la citotoxicidad de los compuestos de la invención usando diluciones consecutivas de sus disoluciones iniciales antes de añadirlas a cultivos celulares. Se mostró a modo de ejemplo la influencia de iones de calcio sobre la citotoxicidad de los propios compuestos y las formulaciones realizando una serie de diluciones consecutivas de sus disoluciones iniciales en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medios de cultivo con FBS al 5% (C).

Se eligió la concentración de CaCl_2 2,3 mM porque se conoce ampliamente que el calcio total en el suero humano se mantiene entre 2,2 y 2,6 mmol/l (8,8-10,4 mg/dl).

Las pruebas comparativas que evaluaron la citotoxicidad de los compuestos (I-1, I-1f - I-1h, I-3f; II-1, II-1a, II-1f, II-3b) en forma de sales de sodio en el intervalo de concentración de 10^{-9} a 10^{-7} M con respecto a la dilución de sus disoluciones iniciales en (A) y (B) se han realizado en cultivos de línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 y presentaron los siguientes resultados: un aumento de las concentraciones de los compuestos de la invención condujo a una potenciación de la inhibición del crecimiento celular, alcanzando un valor próximo al 31% para el compuesto I-1 en (B) y un valor próximo al 41,5% para el compuesto I-1 en (A) (próximo al 15% en comparación con el compuesto I-1 en B); un valor próximo al 45% para el compuesto I-1f en (B) y un valor próximo al 53% para el compuesto I-1f en (A) (próximo al 15% en comparación con el compuesto I-1f en B); un valor próximo al 23% para el compuesto I-1g en (B) y un valor próximo al 43% para el compuesto I-1g en (A) (próximo al 26,5% en comparación con el compuesto I-1g en B); un valor próximo al 26% para el compuesto I-1h en (B) y un valor próximo al 42% para el compuesto I-1h en (A) (próximo al 21% en comparación con el compuesto I-1h en B); un valor próximo al 41% para el compuesto I-3f en (B) y un valor próximo al 54% para el compuesto I-3f en (A) (próximo al 22% en comparación con el compuesto I-3f en B); un valor próximo al 32% para el compuesto II-1 en (B) y un valor próximo al 43% para el compuesto II-1 en (A) (próximo al 15,5% en comparación con el compuesto II-1 en B); un valor próximo al 40,5% para el compuesto II-1a en (B) y un valor próximo al 49% para el compuesto II-1a en (A) (próximo al 14% en comparación con el compuesto II-1a en B); un valor próximo al 46% para el compuesto II-1f en (B) y un valor próximo al 54% para el compuesto II-1f en (A) (próximo al 15% en comparación con el compuesto II-1f en B); un valor próximo al 44% para el compuesto II-3b en (B) y un valor próximo al 60,5% para el compuesto II-3b en (A) (próximo al 29% en comparación con el compuesto II-3b en B).

Las pruebas comparativas que evaluaron la citotoxicidad del compuesto II-1a en forma de sal de sodio en el intervalo de concentración de 10^{-9} a 10^{-7} M con respecto a su disolución inicial en (A) y (B) se han realizado en cultivos de línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 y presentaron los siguientes efectos: un aumento de la concentración del compuesto de la invención condujo a una potenciación de la inhibición del crecimiento celular, alcanzando un valor próximo al 26% para el compuesto II-1a en (B) y un valor próximo al 34% para el compuesto II-1a en (A) (próximo al 12% en comparación con el compuesto II-1a en B).

Las pruebas comparativas que evaluaron la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuestos (I-1a + II-1a), paclitaxel/compuesto I-1, paclitaxel/compuestos (I-1a + II-1a), doxorubicina/compuestos (I-1a + II-1a), doxorubicina/compuesto I-1f en el intervalo de concentración de 10^{-9} a 10^{-7} M con respecto a la dilución de sus disoluciones iniciales en (A) y (B) y (C) se han realizado en cultivos de línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 y presentaron los siguientes resultados: la inhibición del crecimiento celular mediante la formulación de docetaxel/compuestos (I-1a + II-1a) en una concentración de docetaxel de 10^{-7} M fue próxima al 86% en (A) (próxima al 41% en comparación con docetaxel solo), fue próxima al 81% en (B) (próxima al 18% en comparación con docetaxel solo), fue próxima al 86,5% en (C) (próxima al 43% en comparación con docetaxel solo); mediante la formulación de paclitaxel/compuesto I-1 en una concentración de paclitaxel de 10^{-7} M fue próxima al 83% en (A) (próxima al 39% en comparación con paclitaxel solo), fue próxima al 79% en (B) (próxima al 26% en comparación con paclitaxel solo), fue próxima al 84% en (C) (próxima al 42% en comparación con paclitaxel solo); mediante la formulación de paclitaxel/compuestos (I-1a + II-1a) en una concentración de paclitaxel de 10^{-7} M fue

próxima al 84% en (A) (próxima al 45% en comparación con paclitaxel solo), fue próxima al 79% en (B) (próxima al 25% en comparación con paclitaxel solo), fue próxima al 85% en (C) (próxima al 48% en comparación con paclitaxel solo); mediante la formulación de doxorubicina/compuestos (I-1a + II-1a) en una concentración de doxorubicina de 10^{-7} M fue próxima al 77% en (A) (próxima al 48% en comparación con doxorubicina sola), fue próxima al 66% en (B) (próxima al 25% en comparación con doxorubicina sola), fue próxima al 78% en (C) (próxima al 51% en comparación con doxorubicina sola); mediante la formulación de doxorubicina/compuesto I-1f en una concentración de doxorubicina de 10^{-7} M fue próxima al 81% en (A) (próxima al 58% en comparación con doxorubicina sola), fue próxima al 70% en (B) (próxima al 33% en comparación con doxorubicina sola), fue próxima al 82% en (C) (próxima al 60% en comparación con doxorubicina sola).

Las concentraciones de docetaxel en la formulación de docetaxel/compuestos (I-1a + II-1a) en (A), en la formulación en (B), en la formulación en (C) requeridas para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fueron aproximadamente 5,7 veces inferior, 3,3 veces inferior, 7,7 veces inferior, respectivamente, en comparación con docetaxel solo.

Las concentraciones de paclitaxel en la formulación de paclitaxel/compuesto I-1 en (A), en la formulación en (B), en la formulación en (C) requeridas para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fueron aproximadamente 11,3 veces inferior, 2,8 veces inferior, 14,1 veces inferior, respectivamente, en comparación con paclitaxel solo.

Las concentraciones de paclitaxel en la formulación de paclitaxel/compuestos (I-1a + II-1a) en (A), en la formulación en (B), en la formulación en (C) requeridas para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fueron aproximadamente 7,7 veces inferior, 2,1 veces inferior, 10,0 veces inferior, respectivamente, en comparación con paclitaxel solo.

Las concentraciones de doxorubicina en la formulación de doxorubicina/compuestos (I-1a + II-1a) en (A), en la formulación en (B), en la formulación en (C) requeridas para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fueron aproximadamente 18,2 veces inferior, 2,8 veces inferior, 34,4 veces inferior, respectivamente, en comparación con doxorubicina sola.

Las concentraciones de doxorubicina en la formulación de doxorubicina/compuesto I-1f en (A), en la formulación en (B), en la formulación en (C) requeridas para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fueron aproximadamente 17,3 veces inferior, 3,0 veces inferior, 30,5 veces inferior, respectivamente, en comparación con doxorubicina sola.

Las pruebas comparativas que evaluaron la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuestos (I-1a + I-1a) en el intervalo de concentración de 10^{-9} a 10^{-7} M con respecto a la dilución de su disolución inicial en (A) y (B) y (C) se han realizado en cultivos de línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 y presentaron los siguientes efectos: la inhibición del crecimiento celular mediante la formulación en una concentración de docetaxel de 10^{-7} M fue próxima al 88% en (A) (próxima al 40% en comparación con docetaxel solo), fue próxima al 85% en (B) (próxima al 23% en comparación con docetaxel solo), fue próxima al 88% en (C) (próxima al 41% en comparación con docetaxel solo).

Las concentraciones de docetaxel en la formulación de docetaxel/compuestos (I-1a + II-1a) en (A), en la formulación en (B), en la formulación en (C) requeridas para mostrar el mismo efecto de inhibición del crecimiento celular del 50% fueron aproximadamente 2,2 veces inferior, 1,5 veces inferior, 2,2 veces inferior, respectivamente, en comparación con docetaxel solo.

La evaluación comparativa de la citotoxicidad de los propios compuestos de la invención y la formulación con respecto a diluciones de sus disoluciones iniciales en solución salina normal y solución salina con CaCl_2 2,3 mM mostró un efecto sorprendente asociado con este último vehículo. En este último caso las medias de la inhibición del crecimiento celular fueron próximas a los resultados de actividad de los compuestos y las formulaciones tras la dilución de sus disoluciones mediante medios de cultivo. Con respecto a esto, es necesario enfatizar que todos los medios de cultivo usados en los ejemplos dados a conocer en el presente documento contenían iones Ca^{2+} . Los resultados experimentales revelaron un papel importante de los iones Ca^{2+} para la actividad terapéutica, y en particular la actividad antitumoral de los compuestos de la invención. Un medio acuoso que tiene una abundancia de iones de sodio, pero que contiene una pequeña cantidad de iones de calcio, crea las condiciones más favorables para la acción citotóxica de los compuestos de la invención.

Las estructuras de los compuestos de la invención favorecen la unión de Ca^{2+} . Las sales de sodio de los compuestos I-1, I-2, I-3 y II-1, II-2, II-3 contienen grupos sulfonato o sulfinato y carboxilato, que existen principalmente en formas de base conjugada que neutralizan iones Na^+ en medio acuoso a pH aproximadamente fisiológico. Las sales de sodio de los compuestos I-1f a I-1h, II-1f, I-3f contienen grupo sulfonato que neutraliza el ión Na^+ y grupos carboxamida. Las sales de sodio de los compuestos I-1a a I-1e, II-1a a II-1e, I-3a y II-3b contienen grupo sulfonato que neutraliza el ión Na^+ y grupos éster. En un medio que tiene una abundancia de iones de sodio, una pequeña cantidad de iones de calcio puede formar complejos de quelato de calcio, que comprende al menos

una y/o dos moléculas de los compuestos según la invención y el átomo de metal unido. La quelación se refiere a la coordinación de dos o más átomos donadores de un ligando con un átomo de metal central. El complejo resultante tiene la estabilidad derivada en parte del factor entrópico favorable que acompaña a la liberación de moléculas de agua de la esfera de coordinación.

5 Con el fin de ser activos en el sistema nervioso central, los compuestos de la invención en forma de complejos de quelato de calcio lábiles requerirán la inclusión (en coordinación con un átomo de metal) de los isómeros cis-trans de cada ligando, concretamente, ácido todo trans-retinoil-L-cisteico y ácido 13-cis-retinoil-L-cisteico; éster metílico del ácido todo trans-retinoil-L-cisteico y éster metílico del ácido 13-cis-retinoil-L-cisteico; amida del ácido todo trans-retinoil-L-cisteico y amida del ácido 13-cis-retinoil-L-cisteico, etcétera. Se conoce ampliamente que el ión Ca^{2+} favorece números de coordinación elevados y geometría de coordinación irregular.

15 Los compuestos de la invención en sí mismos tienen baja toxicidad. Se llevó a cabo un estudio de toxicidad i.p. de una única dosis en ratas. Los compuestos (I-1, I-2, II-3, I-1a, II-1a, I-1f, I-1h, II-1f, I-3a, I-3f, II-3b) al nivel de dosis de 100 mg/kg de peso corporal no produjeron mortalidad. Por tanto, la dosis letal mínima es superior a 100 mg/kg de peso corporal para estos compuestos.

20 Los compuestos según la invención pueden usarse como tales o como componente en composiciones farmacéuticas. Los compuestos pueden administrarse de manera sistémica o local, por ejemplo por vía tópica. Los modos adecuados de administración de los propios compuestos y en composiciones farmacéuticas incluyen administración intravenosa, administración intraperitoneal. La administración oral, rectal y transdérmica de los compuestos puede ser adecuada y eficaz. Los compuestos pueden mostrar una alta actividad en el sistema nervioso central y la administración oral, rectal y transdérmica requerirá una dosis baja del compuesto para recibir una alta tasa de respuesta. Para obtener resultados óptimos en el tratamiento de pacientes se necesita disolver los propios compuestos, y en forma de preparaciones farmacéuticas, en un medio acuoso que tiene una abundancia de iones de sodio y que contiene una pequeña cantidad de iones de calcio.

Ejemplos

30 MATERIALES Y MÉTODOS

Se adquirieron los ácidos todo trans-retinoico, 13-cis-retinoico y L-cisteico, L-cisteinsulfínico, L-homocisteico de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU. Todos los demás reactivos químicos y disolventes se adquirieron de Aldrich Chemical Co.

35 Se registraron espectros de ^1H -RMN a 400 MHz usando un espectrómetro Unity-400 de Varian. Se usó DMSO-d_6 como disolvente.

40 Se usaron placas previamente recubiertas con gel de sílice 60 de Merck para la cromatografía en capa fina (CCF) y se revelaron en un sistema de disolventes que consistía en cloroformo-metanol (4:1, v/v). La detección de los compuestos en placas de CCF se logró pulverizando con H_2SO_4 al 10% en metanol seguido por calentamiento hasta 150°C , tinción con yodo y detección en luz UV (λ 366 nm).

45 La determinación de las concentraciones de los compuestos sintetizados se realizó mediante espectros UV (espectrofotómetro UV-mini-1240 de Shimadzu, λ 250-500 nm, EtOH) para los derivados de ácido todo trans-retinoico: $\lambda_{\text{máx}}$ 348-350 nm, ϵ 45000; para los derivados de ácido 13-cis-retinoico: $\lambda_{\text{máx}}$ 348-350 nm, ϵ 37000. Las concentraciones determinadas mediante espectros UV fueron iguales a los pesos de las muestras.

50 Los compuestos sintetizados son solubles en cloroformo, etanol, metanol y etanol ac. al 70%. Todas las etapas de la síntesis se realizaron en atmósfera de nitrógeno seco.

55 Se adquirieron las células de cuatro líneas celulares de tumor humano de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, EE.UU.): línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26, lote 1227150), línea celular de carcinoma de próstata humano DU 145 (ATCC-HTB-81, lote 1391494), línea celular de adenocarcinoma de ovarios humano SKOV-3 (ATCC-HTB-77, lote 1658010) y línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 (ATCC-CCL-185, lote 1388888).

60 Se propagaron células MDA-MB-231 en medio de cultivo MEM con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) al 10% y antibióticos. Se cultivaron células DU 145 en medio de cultivo MEM que contenía L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, FBS al 10% y antibióticos. Se cultivaron células SKOV-3 en medio de cultivo 5A de McCoy, complementado con L-glutamina 1,5 mM, FBS al 10% y antibióticos. Se cultivaron células A549 en medio de cultivo F-12 de Ham con L-glutamina 1 mM, FBS al 10% y antibióticos. Todos los medios y complementos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Se llevó a cabo la propagación celular de todas las líneas en frascos de cultivo de 25 cm^2 Falcon™ (Becton Dickinson Labware).

65 Se llevaron a cabo pruebas de citotoxicidad de fármaco usando placas de cultivo de 96 pocillos Falcon™ para

detectar células adherentes (Becton Dickinson Labware). Se sembraron estas placas con células o bien a 12×10^3 células MDA-MB-231/pocillo, o bien a 12×10^3 células DU 145/pocillo, o bien a 14×10^3 células SKOV-3/pocillo, o bien a 10×10^3 células A549/pocillo en un volumen de 200 μ l/pocillo.

- 5 Se incubaron tanto los frascos como las placas de cultivo para provocar el crecimiento celular a 37°C en una atmósfera humidificada del 95% de aire y el 5% de CO₂.

Se dejó que los cultivos celulares en placas de cultivo se adhirieran durante 24 horas de incubación. En el día 1 tras la siembra de células, se añadieron disoluciones de 2 μ l de los fármacos que iban a someterse a prueba en medio con FBS al 5% a los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Se incubaron las células durante 2 días consecutivos. Al final del periodo de incubación se desprendieron las células adherentes mediante tripsinización y se contó el número de células viables usando una prueba de exclusión con azul trípiano y un hemocitómetro. Todos los datos se derivaron de un promedio de tres determinaciones cada una en seis repeticiones. Se expresaron los resultados como número de células medio \pm EE y se evaluaron las diferencias entre las series de control y de prueba por medio de la prueba de la t de Student. Se evaluó la citotoxicidad de fármaco basándose en el grado de inhibición del crecimiento celular. Se calculó la inhibición del crecimiento celular de los fármacos sometidos a prueba de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición del crecimiento celular, \%} = \frac{\text{Series de control} - \text{de prueba}}{\text{Control}} \times 100$$

En el caso de la evaluación comparativa de la citotoxicidad de los propios compuestos de la invención y la formulación con respecto a diluciones consecutivas de sus disoluciones iniciales antes de añadirse a los cultivos, se añadieron disoluciones de 2 μ l de los fármacos que iban a someterse a prueba en medio con FBS al 5%, en solución salina normal y en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM a los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5%, solución salina normal y solución salina con CaCl₂ 2,3 mM como controles de disolvente (controles negativos). Las diferencias entre estas series de control fueron insignificantes. Por tanto se calculó un promedio de los controles negativos. En otros cultivos control, se añadieron disoluciones de 2 μ l de docetaxel, paclitaxel, doxorubicina en medio con FBS al 5%, en solución salina normal y en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM a los cultivos (controles positivos). Las diferencias entre estas series de control para cada antibiótico fueron insignificantes. Por tanto se calculó un promedio de controles positivos (para cada antibiótico).

<Los ejemplos 14, 15, 22, 24, 30, 31, 51, 52 y 65 se incluyen únicamente como ejemplos comparativos>.

Ejemplo 1. Síntesis de ésteres y amidas de ácido N-retinoil-L-cisteico y ésteres y amidas de ácido N-retinoil-L-homocisteico

Síntesis de ésteres de ácidos L-cisteico y L-homocisteico. Se añadió cloruro de tionilo (3 mmol, 0,219 ml) a los 50 ml de un alcohol apropiado mientras se agitaba seguido por monohidrato de ácido L-cisteico (1 mmol, 187 mg) o ácido L-homocisteico (1 mmol, 183 mg) tras 15 min., tras lo cual se sometió la mezcla a reflujo durante 48 h. Se evaporó el alcohol a presión reducida y se recristalizó el residuo en etanol. Se alcanzaron rendimientos en el intervalo del 85-95% para todos los ésteres.

Síntesis de amidas de ácidos L-cisteico y L-homocisteico. Se añadieron 10 ml de disolución acuosa de una amina apropiada (disolución al 28% de NH₃ o disolución al 40% de metilamina o dimetilamina en agua) a una disolución de un éster metílico del ácido apropiado (1 mmol) en 5 ml de agua y se dejó reposar la disolución resultante durante 2-7 días. Se extrajeron el disolvente y un exceso de la amina a presión reducida y se recristalizó el residuo en metanol. Se alcanzaron rendimientos en el intervalo del 30-85% para todas las amidas.

Acilación de ésteres y amidas de ácido L-cisteico y ésteres y amidas de ácido L-homocisteico. Se disolvieron ácido todo trans o 13-cis-retinoico (150 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,083 ml, 0,6 mmol) en 1 ml de tetrahidrofurano anhidro, tras lo cual se añadió acetonitrilo anhidro (2 ml), se enfrió la mezcla hasta -20°C y se añadieron 0,07 ml (0,55 mmol) de cloroformiato de butilo. Tras 30 min., se transfirió con pipeta la mezcla, libre del clorhidrato de trietilamina precipitado, a una disolución de un derivado apropiado de ácidos L-cisteico o L-homocisteico (0,75 mmol) en una mezcla de 3 ml de disolución saturada de NaHCO₃ (aproximadamente 1,1 M), 10 ml de H₂O, 8 ml de metanol y 15 ml de THF. Tras agitar durante 10 horas a temperatura ambiente, se evaporó parcialmente la mezcla a presión reducida hasta que el ácido retinoico sin reaccionar comenzó a separarse (hasta un volumen residual de aproximadamente 10 ml). Entonces, se añadieron 15 ml de H₂O al residuo y se extrajo el ácido retinoico sin reaccionar con éter (5x30 ml). Se añadieron 20 ml de disolución saturada de NaCl a la disolución acuosa y se extrajo el producto mediante acetato de etilo (3x30 ml). Se evaporó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo obtenido en 20 ml de etanol y se eliminaron por filtración todas las impurezas insolubles. Se almacenó el producto en forma de una disolución transparente del producto puro obtenido.

Con el fin de obtener la forma ácida del compuesto, se evaporó una disolución de su sal de sodio a presión reducida, se disolvió en agua, se acidificó cuidadosamente con HCl 0,1 M a pH 3,5 y se extrajo con cloroformo-etanol (1:1,

ES 2 452 540 T3

v/v). Se evaporó el cloroformo a presión reducida para dar la disolución concentrada en etanol-agua, que, cuando fue necesario, se diluyó con etanol y se filtró. Entonces se usó inmediatamente la disolución del compuesto obtenida.

5 Compuesto (I-1a):

Rendimiento: 65%. R_f 0,30-0,35. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,43 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,68 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,24 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,81 (2H, d, J 6,0 Hz, SCH_2), 3,57 (3H, s, OCH_3), 4,47 (1H, m, NCH), 5,83 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,12-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,34 [1H, d, J 15,0 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,92 [1H, dd, J 15,0, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,16 (1H, d, J 6,4 Hz, NH).

15 Compuesto (I-1b):

Rendimiento: 55%. R_f 0,35-0,40. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,16 (3H, t, J 7,1 Hz, CH_3CH_2), 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,24 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,81 (2H, d, J 6,1 Hz, SCH_2), 4,04 (2H, q, J 7,1 Hz, OCH_2), 4,44 (1H, m, NCH), 5,84 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,11-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,34 [1H, d, J 15,0 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,91 [1H, dd, J 15,0, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,14 (1H, d, J 6,4 Hz, NH).

20 Compuesto (I-1c):

Rendimiento: 57%. R_f 0,35-0,40. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,14 y 1,17 [3H+3H, 2d, J 6,2 Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$], 1,43 y 1,55 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,68 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,24 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,79 (2H, d, J 6,0 Hz, SCH_2), 4,38 (1H, m, NCH), 4,84 (1H, m, OCH), 5,84 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,11-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,34 [1H, d, J 15,0 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,91 [1H, dd, J 15,0, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,12 (1H, d, J 6,2 Hz, NH).

30 Compuesto (I-1d):

Rendimiento: 58%. R_f 0,40-0,45. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 0,86 (3H, t, J 7,3 Hz, CH_3CH_2), 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,43 y 1,55 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,55 (2H, m, CH_2CH_3), 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,24 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,81 (2H, d, J 6,0 Hz, SCH_2), 3,95 (2H, m, OCH_2), 4,44 (1H, m, NCH), 5,84 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,12-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,34 [1H, d, J 15,2 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,91 [1H, dd, J 15,2, 11,3 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,15 (1H, d, J 6,4 Hz, NH).

40 Compuesto (I-1e):

Rendimiento: 60%. R_f 0,40-0,45. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 0,86 (3H, t, J 7,3 Hz, CH_3CH_2), 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,31 (2H, m, CH_2CH_3), 1,43 y 1,55 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,52 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,68 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,24 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,81 (2H, d, J 6,0 Hz, SCH_2), 3,99 (2H, m, OCH_2), 4,43 (1H, m, NCH), 5,84 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,11-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,34 [1H, d, J 15,0 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,91 [1H, dd, J 15,0, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,15 (1H, d, J 6,4 Hz, NH).

45 Compuesto (I-1f):

Rendimiento: 32%. R_f 0,10-0,15. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,42 y 1,55 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,25 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,73 (1H, dd, J 13,9, 7,7 Hz, SCH^aH^b), 2,83 (1H, dd, J 13,9, 4,8 Hz, SCH^aH^b), 4,36 (1H, m, NCH), 5,83 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,11-6,27 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,33 [1H, d, J 15,2 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,90 [1H, dd, J 15,2, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,93 (1H, s a, NH^aH^b), 7,34 (1H, s a, NH^aH^b), 8,02 (1H, d, J 6,4 Hz, NHCH).

55 Compuesto (I-1g):

Rendimiento: 30%. R_f 0,20-0,25. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 0,99 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,94 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,27 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,53 (3H, d, J 4,6 Hz, CH_3NH), 2,73 (1H, dd, J 13,7, 7,9 Hz, SCH^aH^b), 2,83 (1H, dd, J 13,7, 4,8 Hz, SCH^aH^b), 4,40 (1H, m, NCH), 5,84 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,10-6,27 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,32 [1H, d, J 15,0 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,90 [1H, dd, J 15,0, 11,4 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 7,77 (1H, m, NHCH_3), 8,04 (1H, d, J 6,4 Hz, NHCH).

65 Compuesto (I-1h):

ES 2 452 540 T3

Rendimiento: 21%. R_f 0,20-0,25. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,94 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,25 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,59 (1H, dd, J 13,5, 6,4 Hz, $\text{SCH}^{\text{aH}^{\text{b}}}$), 2,77 [3H, s, $(\text{CH}_3)^{\text{a}}\text{N}(\text{CH}_3)^{\text{b}}$], 2,82 (1H, dd, J 13,5, 6,2 Hz, $\text{SCH}^{\text{aH}^{\text{b}}}$), 3,11 [3H, s, $(\text{CH}_3)^{\text{a}}\text{N}(\text{CH}_3)^{\text{b}}$], 5,00 (1H, m, NCH), 5,84 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,10-6,32 [4H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,89 [1H, dd, J 15,2, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,13 (1H, d, J 7,1 Hz, NH).

Compuesto (I-3a):

Rendimiento: 58%. R_f 0,30-0,35. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,42 y 1,55 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,86-2,07 (2H, m a, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1,95 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,25 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,47 (2H, m, SCH_2), 3,61 (3H, s, OCH_3), 4,31 (1H, m, NCH), 5,90 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,11-6,29 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,29 [1H, d, J 15,0 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 6,91 [1H, dd, J 15,0, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,46 (1H, d, J 6,9 Hz, NH).

Compuesto (I-3f):

Rendimiento: 35%. R_f 0,10-0,15. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,42 y 1,55 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,80-2,00 (2H, m a, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 1,94 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,98 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,26 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CHCO}$), 2,45 (2H, m, SCH_2), 4,26 (1H, m, NCH), 5,96 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,10-6,31 [4H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,89 [1H, dd, J 15,0, 11,3 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 7,00 (1H, s a, $\text{NH}^{\text{aH}^{\text{b}}}$), 7,41 (1H, s a, $\text{NH}^{\text{aH}^{\text{b}}}$), 8,12 (1H, d, J 8,1 Hz, NHCH).

Compuesto (II-1a):

Rendimiento: 63%. R_f 0,25-0,30. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 y 1,98 (3H+3H, 2s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,82 (2H, d, J 6,0 Hz, SCH_2), 3,57 (3H, s, OCH_2), 4,46 (1H, m, NCH), 5,70 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,13-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,88 [1H, dd, J 15,4, 11,4 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 7,84 [1H, d, J 15,4 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,16 (1H, d, J 6,4 Hz, NH).

Compuesto (II-1b):

Rendimiento: 60%. R_f 0,30-0,35. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,16 (3H, t, J 7,1 Hz, CH_3CH_2), 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 y 1,98 (3H+3H, 2s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 2,00 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,80 (2H, d, J 6,2 Hz, SCH_2), 4,04 (2H, q, J 7,1 Hz, OCH_2), 4,41 (1H, m, NCH), 5,68 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,13-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,88 [1H, dd, J 15,4, 11,5 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 7,83 [1H, d, J 15,4 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,12 (1H, d, J 6,2 Hz, NH).

Compuesto (II-1c):

Rendimiento: 55%. R_f 0,35-0,40. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,14 y 1,17 [3H+3H, 2d, J 6,2 Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$], 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 y 1,98 (3H+3H, 2s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,78 (2H, d, J 6,0 Hz, SCH_2), 4,36 (1H, m, NCH), 4,84 (1H, m, OCH), 5,68 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,13-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,87 [1H, dd, J 15,2, 11,4 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 7,82 [1H, d, J 15,2 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,08 (1H, d, J 6,0 Hz, NH).

Compuesto (II-1d):

Rendimiento: 58%. R_f 0,35-0,40. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 0,85 (3H, t, J 7,3 Hz, CH_3CH_2), 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,55 (2H, m, CH_2CH_3), 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 y 1,98 (3H+3H, 2s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,81 (2H, d, J 6,0 Hz, SCH_2), 3,95 (2H, m, OCH_2), 4,42 (1H, m, NCH), 5,69 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,13-6,27 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,87 [1H, dd, J 15,4, 11,4 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 7,83 [1H, d, J 15,4 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,13 (1H, d, J 6,2 Hz, NH).

Compuesto (II-1e):

Rendimiento: 59%. R_f 0,35-0,40. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 0,85 (3H, t, J 7,4 Hz, CH_3CH_2), 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,30 (2H, m, CH_2CH_3), 1,43 y 1,55 [2H+2H, 2m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,52 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,67 [3H, s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CC}(\text{CH}_3)_2$], 1,95 y 1,98 (3H+3H, 2s, $\text{CH}_3\text{C}=(\text{CH})_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 1,99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 2,80 (2H, d, J 6,1 Hz, SCH_2), 3,98 (2H, m, OCH_2), 4,41 (1H, m, NCH), 5,68 (1H, s, $=\text{CHCO}$), 6,13-6,26 [3H, m, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}=\text{CH}$], 6,87 [1H, dd, J 15,4, 11,4 Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 7,82 [1H, d, J 15,4 Hz, $\text{CHC}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}$], 8,13 (1H, d, J 6,2 Hz, NH).

Compuesto (II-1f):

Rendimiento: 34%. R_f 0,10-0,15. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3SOCD_3 , 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1,43 y 1,56 [2H+2H, 2m,

CH₂CH₂C(CH₃)₂, 1,67 [3H, s, CH₃C=CC(CH₃)₂], 1,95 y 1,97 [3H+3H, 2s, CH₃C=(CH)₃C(CH₃)=CHCO], 1,99 (2H, m, CH₂C=), 2,71 (1H, dd, J 13,9, 7,9 Hz, SCH^aH^b), 2,82 (1H, dd, J 13,9, 4,9 Hz, SCH^aH^b), 4,33 (1H, m, NCH), 5,68 (1H, s, =CHCO), 6,12-6,26 [3H, m, CH=CHC(CH₃)=CHCH=CH], 6,87 [1H, dd, J 15,6, 11,3 Hz, CH=CHC(CH₃)=CHCO], 6,90 (1H, s a, NH^aH^b), 7,33 (1H, s a, NH^aH^b), 7,88 [1H, d, J 15,6 Hz, CHC(CH₃)=CHCO], 7,96 (1H, d, J 6,2 Hz, NHCH).

Compuesto (II-3b):

Rendimiento: 54%. R_f 0,30-0,35. ¹H-RMN (CD₃SOCD₃, 400 MHz) δ 1,00 [6H, s, C(CH₃)₂], 1,17 (3H, t, J 7,1 Hz, CH₃CH₂), 1,42 y 1,56 [2H+2H, 2m, CH₂CH₂C(CH₃)₂], 1,67 [3H, s, CH₃C=CC(CH₃)₂], 1,84-2,11 (2H, m a, CH₂CH₂S), 1,95 y 1,97 (3H+3H, 2s, CH₃C=(CH)₃C(CH₃)=CHCO], 1,99 (2H, m, CH₂C=), 2,46 (2H, m, SCH₂), 4,07 (2H, m, OCH₂), 4,24 (1H, m, NCH), 5,75 (1H, s, =CHCO), 6,12-6,26 [3H, m, CH=CHC(CH₃)=CHCH=CH], 6,87 [1H, dd, J 15,4, 11,4 Hz, CH=CHC(CH₃)=CHCO], 7,86 [1H, d, J 15,4 Hz, CHC(CH₃)=CHCO], 8,41 (1H, d, J 7,0 Hz, NH).

Ejemplo 2. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1a en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1a en los cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1a (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1a en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) en diferentes concentraciones del compuesto I-1a a cultivos de 200 µl hasta una concentración final del compuesto I-1a de desde 10⁻⁹ hasta 10⁻⁷ mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente.

Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en los cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1a.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (57,2 ± 3,00) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1a tenían el siguiente número de células viables:

10⁻⁹ mol/l: (34,3 ± 2,27) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 40,0% (p < 0,001);

10⁻⁸ mol/l: (31,1 ± 1,90) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 45,6% (p < 0,001);

10⁻⁷ mol/l: (29,8 ± 2,44) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 47,9% (p < 0,001).

Por tanto, se mostró que el compuesto I-1a ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 47,9% (p < 0,001) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1a.

Ejemplo 3. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1b en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1b en cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1b (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1b en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) en diferentes concentraciones del compuesto I-1b a cultivos de 200 µl hasta una concentración final del compuesto I-1b de desde 10⁻⁹ hasta 10⁻⁷ mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1b.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (57,2 ± 3,00) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1b tenían el siguiente número de células viables:

10⁻⁹ mol/l: (34,8 ± 2,41) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 39,2% (p < 0,001);

10⁻⁸ mol/l: (31,9 ± 2,16) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 44,2% (p < 0,001);

10^{-7} mol/l: $(30,5 \pm 1,82) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,7% ($p < 0,001$).

5 Por tanto, se mostró que el compuesto I-1b ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 46,7% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1b.

Ejemplo 4. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1c en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1c en cultivos

10 Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1c (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1c en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

15 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto I-1c a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto I-1c de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1c.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(57,2 \pm 3,00) \times 10^3$ células.

25 Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1c tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(34,0 \pm 2,13) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 40,6% ($p < 0,001$);

30 10^{-8} mol/l: $(30,4 \pm 1,79) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,9% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(28,9 \pm 1,52) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 49,5% ($p < 0,001$).

35 Por tanto, se mostró que el compuesto I-1c ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 49,5% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1c.

Ejemplo 5. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1d en cultivos

40 Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1d (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1d en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

45 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones del compuesto I-1d a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto I-1d de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1d.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(53,3 \pm 2,66) \times 10^3$ células.

55 Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1d tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(29,2 \pm 1,89) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 45,2% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(26,3 \pm 1,67) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 50,7% ($p < 0,001$);

60 10^{-7} mol/l: $(24,1 \pm 1,46) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 54,8% ($p < 0,001$).

65 Por tanto, se mostró que el compuesto I-1d ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 54,8% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1d.

Ejemplo 6. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de

adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1e en cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1e (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1e en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto I-1e a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto I-1e de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1e.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(53,3 \pm 2,66) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1e tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(29,5 \pm 2,18) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 44,7% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(27,1 \pm 1,75) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 49,2% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(24,8 \pm 1,34) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,5% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto I-1e ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 53,5% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1e.

Ejemplo 7. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1f en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1f en cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1f (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1f en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones del compuesto I-1f a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto I-1f de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1f.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(53,3 \pm 2,66) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1f tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(29,4 \pm 2,15) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 44,8% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(27,4 \pm 1,42) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 48,6% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(25,3 \pm 1,11) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 52,5% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto I-1f ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 52,5% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1f.

Ejemplo 8. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto II-1a en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto II-1a en cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto II-1a (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto II-1a en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto II-1a a cultivos de 200 μ l

hasta una concentración final del compuesto II-1a de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el gado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1a.

5 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(58,5 \pm 3,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1a tenían el siguiente número de células viables:

10 10^{-9} mol/l: $(35,8 \pm 2,50) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 38,8% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(32,7 \pm 2,06) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 44,1% ($p < 0,001$);

15 10^{-7} mol/l: $(31,3 \pm 2,15) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,5% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto II-1a ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 46,5% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto II-1a.

20 Ejemplo 9. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto II-1b en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1b en cultivos

25 Se preparó una disolución inicial del compuesto II-1b (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto II-1b en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

30 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto II-1b a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto II-1b de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1b.

35 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(58,5 \pm 3,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1b tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(34,3 \pm 1,88) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 41,4% ($p < 0,001$);

40 10^{-8} mol/l: $(31,4 \pm 1,94) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,3% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(29,8 \pm 1,70) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 49,1% ($p < 0,001$).

45 Por tanto, se mostró que el compuesto II-1b ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 49,1% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto II-1b.

50 Ejemplo 10. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto II-1c en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto II-1c en cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto II-1c (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto II-1c en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

55 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto II-1c a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto II-1c de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1c.

60 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(58,5 \pm 3,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1c tenían el siguiente número de células viables:

65

10^{-9} mol/l: $(33,6 \pm 2,75) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 42,6% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(31,0 \pm 2,05) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 47,0% ($p < 0,001$);

5 10^{-7} mol/l: $(29,0 \pm 1,26) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 50,4% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto II-1c ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 50,4% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto II-1c.

10 Ejemplo 11. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto II-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto II-1d en cultivos

15 Se preparó una disolución inicial del compuesto II-1d (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto II-1d en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

20 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto II-1d a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto II-1d de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1d.

25 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,8 \pm 3,16) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1d tenían el siguiente número de células viables:

30 10^{-9} mol/l: $(31,3 \pm 2,68) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 44,9% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(28,2 \pm 1,29) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 50,4% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(26,3 \pm 1,86) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,7% ($p < 0,001$).

35 Por tanto, se mostró que el compuesto II-1d ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 53,7% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto II-1d.

40 Ejemplo 12. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto II-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto II-1e en cultivos

45 Se preparó una disolución inicial del compuesto II-1e (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto II-1e en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

50 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto II-1e a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final del compuesto II-1e de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1e.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,8 \pm 3,16) \times 10^3$ células.

55 Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1e tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(30,9 \pm 1,82) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 45,6% ($p < 0,001$);

60 10^{-8} mol/l: $(28,0 \pm 1,34) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 50,7% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(26,0 \pm 1,27) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 54,2% ($p < 0,001$)

65 Por tanto, se mostró que el compuesto II-1e ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 54,2% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto II-1e.

Ejemplo 13. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto II-1f en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto II-1f en cultivos

5 Se preparó una disolución inicial del compuesto II-1f (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto II-1f en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

10 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) en diferentes concentraciones del compuesto II-1f a cultivos de 200 µl hasta una concentración final del compuesto II-1f de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1f.

15 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,8 \pm 3,16) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1f tenían el siguiente número de células viables:

20 10^{-9} mol/l: $(31,2 \pm 2,42) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 45,1% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(28,5 \pm 2,13) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 49,8% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(26,6 \pm 1,83) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,2% ($p < 0,001$)

25 Por tanto, se mostró que el compuesto II-1f ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 53,2% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto II-1f.

30 Ejemplo 14. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto I-1

35 Se convirtió la sal de sodio del compuesto I-1 en la forma ácida del compuesto I-1 y se disolvió en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol con una disolución del compuesto I-1 en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

40 Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel: compuesto I-1 iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-5} M.

45 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control de contenían $(57,6 \pm 3,04) \times 10^3$ células.

50 Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(15,4 \pm 1,02) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 73,3% ($p < 0,001$).

Los cultivos de células MDA-MB-231, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto I-1 igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

55 1:3: $(9,3 \pm 0,75) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 83,9% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 39,6% ($p < 0,001$);

60 1:6: $(8,4 \pm 0,53) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 85,4% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 45,5% ($p < 0,001$);

1:10: $(7,8 \pm 0,61) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 86,5% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 49,4% ($p < 0,001$)

65 Ejemplo 15. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de docetaxel: compuesto I-1 (1:6) con

respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1 en cultivos

Se convirtió la sal de sodio del compuesto I-1 en la forma ácida del compuesto I-1 y se disolvió en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol con una disolución del compuesto I-1 en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 1).

Tabla 1. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de docetaxel: compuesto I-1 (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1 en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Docetaxel, mol/l	Compuesto I-1, mol/l				
Control	0	0	55,8 ± 1,99	-	-	-
Docetaxel	10^{-9}	0	34,2 ± 2,28	38,7*	-	3,6 $\times 10^{-9}$
	10^{-8}	0	23,4 ± 2,15	58,1*	-	
	10^{-7}	0	13,7 ± 1,03	75,4*	-	
Formu-lación	10^{-9}	6×10^{-9}	25,6 ± 1,34	54,1*	+25,1**	6,3 $\times 10^{-10}$ (b)
	10^{-8}	6×10^{-8}	14,9 ± 1,09	73,3*	+36,3**	
	10^{-7}	6×10^{-7}	7,2 ± 0,65	87,1*	+47,4*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(b) Extrapolado.

(*) $p < 0,001$

(**) $p < 0,01$

Ejemplo 16. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1a en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto I-1a

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1a (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto I-1a en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel : compuesto I-1a iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-5} M.

Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel en los cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(55,7 \pm 2,69) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(14,2 \pm 0,85) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 74,5% ($p < 0,001$).

Los cultivos de células DU 145, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto I-1a igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

5 1:3: $(8,0 \pm 0,69) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 85,6% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 43,7% ($p < 0,001$);

1:6: $(7,2 \pm 0,66) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 87,1% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 49,3% ($p < 0,001$);

10 1:10: $(6,4 \pm 0,52) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 88,5% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 54,9% ($p < 0,001$).

15 Ejemplo 17. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1a en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de docetaxel : compuesto I-1a (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1a en cultivos

20 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1a (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto I-1a en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

25 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 2).

30 Tabla 2. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1a en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de docetaxel : compuesto I-1a (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1a en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, 10^3	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Docetaxel, mol/l	Compuesto I-1a, mol/l				
Control	0	0	41,5 \pm 2,93	-	-	-
Docetaxel	10^{-9}	0	27,1 \pm 1,07	34,7*	-	8,0 $\times 10^{-9}$
	10^{-8}	0	20,0 \pm 1,16	51,8*	-	
	10^{-7}	0	10,8 \pm 0,94	74,0*	-	
Formulación	10^{-9}	6 $\times 10^{-9}$	22,2 \pm 0,88	46,5*	+18,1**	1,5 $\times 10^{-9}$
	10^{-8}	6 $\times 10^{-8}$	14,8 \pm 1,11	64,3*	+26,0**	
	10^{-7}	6 $\times 10^{-7}$	5,9 \pm 0,45	85,8*	+45,4*	

35 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

40 (*) $p < 0,001$

(**) $p < 0,01$

45 Ejemplo 18. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1b en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto I-1b

50 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1b (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto I-1b en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel : compuesto I-1b iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-5} M.

5 Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 μ l) a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de docetaxel en cultivos igual a 10^{-7} M.

10 En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(51,5 \pm 2,84) \times 10^3$ células.

15 Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(16,1 \pm 0,94) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 68,7% ($p < 0,001$).

20 Los cultivos de células SKOV-3, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto I-1b igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

1:3: $(9,2 \pm 0,82) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 82,1% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 42,9% ($p < 0,001$);

25 1:6: $(8,4 \pm 0,75) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 83,7% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 47,8% ($p < 0,001$);

30 1:10: $(7,6 \pm 0,69) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 85,2% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 52,8% ($p < 0,001$).

Ejemplo 19. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1b en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de docetaxel : compuesto I-1b (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1b en cultivos

35 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1b (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto I-1b en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

40 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

45 En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 3).

50 Tabla 3. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1b en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de docetaxel : compuesto I-1b (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1b en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Docetaxel, mol/l	Compuesto I-1b, mol/l				
Control	0	0	$52,1 \pm 2,96$	-	-	-
Docetaxel	10^{-9}	0	$34,3 \pm 2,01$	34,2*	-	$5,2 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	0	$23,2 \pm 2,19$	55,5*	-	
	10^{-7}	0	$16,8 \pm 0,80$	67,8*	-	

Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	$26,5 \pm 1,29$	49,1*	+22,7**	$1,2 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	6×10^{-8}	$15,3 \pm 0,85$	70,6*	+34,1**	
	10^{-7}	6×10^{-7}	$8,7 \pm 0,80$	83,3*	+48,2*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

5

(*) $p < 0,001$

(**) $p < 0,01$

10 Ejemplo 20. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1c en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto I-1c

15 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1c (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto I-1c en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

20 Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel : compuesto I-1c iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-5} M.

25 Se trataron cultivos de células A549 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 μ l) a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de docetaxel en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(53,7 \pm 2,59) \times 10^3$ células.

30 Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(10,6 \pm 0,72) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 80,3% ($p < 0,001$).

35 Los cultivos de células A549, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto I-1c igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

1:3: $(7,0 \pm 0,53) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 87,0% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 34,0% ($p < 0,002$);

40 1:6: $(6,6 \pm 0,58) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 87,7% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 37,7% ($p < 0,002$);

45 1:10: $(6,3 \pm 0,42) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 88,3% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 40,6% ($p < 0,001$).

Ejemplo 21. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1c en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano a una razón molar de docetaxel : compuesto I-1c (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1c en cultivos

50 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1c (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto I-1c en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

55 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células A549 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

60 En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante

dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 4).

5 Tabla 4. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1c en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano a una razón molar de docetaxel : compuesto I-1c (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto I-1c en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, 10^3 X	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	Cl ₅₀ mol/l (a)
	Docetaxel, mol/l	Com-puesto I-1c, mol/l				
Control	0	0	54,6 ± 2,79	-	-	-
Docetaxel	10 ⁻⁹	0	34,1 ± 2,07	37,5*	-	2,2
	10 ⁻⁸	0	15,6 ± 0,49	71,4*	-	X
	10 ⁻⁷	0	10,5 ± 0,97	80,8*	-	10 ⁻⁹
Formulación	10 ⁻⁹	6 X 10 ⁻⁹	27,4 ± 1,83	49,8*	+19,6*	1,0
	10 ⁻⁸	6 X 10 ⁻⁸	9,7 ± 0,46	82,2*	+37,8*	X
	10 ⁻⁷	6 X 10 ⁻⁷	6,5 ± 0,43	88,1*	+38,1**	10 ⁻⁹

10 a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) p < 0,001

15 (***) p < 0,01

(•) p < 0,05

20 Ejemplo 22. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1

25 Se convirtió la sal de sodio del compuesto II-1 en la forma ácida del compuesto II-1 y se disolvió en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1 en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

30 Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1 iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10⁻⁵ M.

35 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel en cultivos igual a 10⁻⁷ M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (57,6 ± 3,04) X 10³ células.

40 Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían (15,4 ± 1,02) X 10³ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 73,3% (p < 0,001).

45 Los cultivos de células MDA-MB-231, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto II-1 igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

1:3: (9,5 ± 0,62) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 83,5% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 38,3% (p < 0,001);

50 1:6: (8,6 ± 0,57) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 85,1% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 44,2% (p < 0,001);

1:10: (8,1 ± 0,59) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 85,9% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 47,4% (p < 0,001).

Ejemplo 23. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de docetaxel : compuesto II-1 (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1 en cultivos

- 5 Se convirtió la sal de sodio del compuesto II-1 en la forma ácida del compuesto II-1 y se disolvió en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1 en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.
- 10 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.
- 15 En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de docetaxel : compuesto II-1 (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1 en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, 10^3	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Docetaxel, mol/l	Compuesto II-1, mol/l				
Control negativo	0	0	55,8 ± 1,99	-	-	-
Docetaxel	10^{-9}	0	34,2 ± 2,28	38,7*	-	3,6 X 10^{-9}
	10^{-8}	0	23,4 ± 2,15	58,1*	-	
	10^{-7}	0	13,7 ± 1,03	75,4*	-	
Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	26,3 ± 1,49	52,9*	+23,1*	7,0 X 10^{-10} (b)
	10^{-8}	6×10^{-8}	15,6 ± 1,22	72,0*	+33,3**	
	10^{-7}	6×10^{-7}	7,7 ± 0,64	86,2*	+43,8*	

- 25 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.
- (b) Extrapolado.
- 30 (*) $p < 0,001$
- (**) $p < 0,01$
- (*) $p < 0,02$

Ejemplo 24. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1a en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1a

- 40 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1a (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1a en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.
- 45 Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1a iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-5} M.
- 50 Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(55,7 \pm 2,69) \times 10^3$ células.

5 Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(14,2 \pm 0,85) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 74,5% ($p < 0,001$).

Los cultivos de células DU 145, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto II-1a igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

10 1:3: $(7,9 \pm 0,73) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 85,8% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 44,4% ($p < 0,001$);

15 1:6: $(7,5 \pm 0,59) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 86,5% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 47,2% ($p < 0,001$);

1:10: $(6,8 \pm 0,58) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 87,8% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 52,1% ($p < 0,001$).

20 Ejemplo 25. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1a en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de docetaxel : compuesto II-1a (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1a en cultivos

25 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1a (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1a en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

30 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 6).

40 Tabla 6. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1a en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de docetaxel : compuesto II-1a (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1a en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Docetaxel, mol/l	Compuesto II-1a, mol/l				
Control	0	0	41,5 ± 2,93	-	-	-
Docetaxel	10^{-9}	0	27,1 ± 1,07	34,7*	-	8,0 X 10^{-9}
	10^{-8}	0	20,0 ± 1,16	51,8*	-	
	10^{-7}	0	10,8 ± 0,94	74,0*	-	
Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	23,1 ± 1,52	44,3*	+14,8**	2,2 X 10^{-9}
	10^{-8}	6×10^{-8}	15,8 ± 1,27	61,9*	+21,0•	
	10^{-7}	6×10^{-7}	6,4 ± 0,54	84,6*	+40,7**	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

45 (*) $p < 0,001$

(**) $p < 0,002$

50 (•) $p < 0,05$

(••) $p > 0,05$

Ejemplo 26. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1b en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1b

5 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1b (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1b en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

10 Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1b iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-5} M.

15 Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

20 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(51,5 \pm 2,84) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(16,1 \pm 0,94) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 68,7% ($p < 0,001$).

25 Los cultivos de células SKOV-3, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto II-1b igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

30 1:3: $(9,6 \pm 0,86) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 81,4% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 40,4% ($p < 0,001$);

35 1:6: $(8,8 \pm 0,72) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 82,9% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 45,3% ($p < 0,001$);

1:10: $(8,1 \pm 0,70) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 84,3% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 49,7% ($p < 0,001$).

Ejemplo 27. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1b en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de docetaxel : compuesto II-1b (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1 b en cultivos

45 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1b (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1b en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

50 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

55 En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 7).

Tabla 7. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1b en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de docetaxel: compuesto II-1b (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1b en cultivos

Fármaco	Formulación	Número de	Inhibición	Efecto	Cl ₅₀ mol/l
---------	-------------	-----------	------------	--------	------------------------

	Docetaxel, mol/l	Compuesto II-1b, mol/l	células tumorales, X 10 ³	del crecimiento celular, %	positivo, %	(a)
Control	0	0	52,1 ± 2,96	-	-	-
Docetaxel	10 ⁻⁹	0	34,3 ± 2,01	34,2*	-	5,2 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	0	23,2 ± 2,19	55,5*	-	
	10 ⁻⁷	0	16,8 ± 0,80	67,8*	-	
Formulación	10 ⁻⁹	6 X 10 ⁻⁹	27,4 ± 1,36	47,4*	+20,1**	1,3 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	6 X 10 ⁻⁸	15,9 ± 1,04	69,5*	+31,5**	
	10 ⁻⁷	6 X 10 ⁻⁷	9,2 ± 0,68	82,3*	+45,2*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

5

(*) p < 0,001

(**) p < 0,02

10 Ejemplo 28. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1c en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano con respecto a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1c

15 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1c (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1c en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

20 Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de docetaxel : compuesto II-1c iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10⁻⁵ M.

25 Se trataron cultivos de células A549 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel en cultivos igual a 10⁻⁷ M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (53,7 ± 2,59) X 10³ células.

30 Los cultivos, tratados mediante docetaxel en una concentración de 100 nM, contenían (10,6 ± 0,72) X 10³ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 80,3% (p < 0,001).

35 Los cultivos de células A549, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de docetaxel/compuesto II-1c igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

1:3: (7,2 ± 0,61) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 86,6% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 32,1% (p < 0,01);

40 1:6: (6,8 ± 0,52) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 87,3% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 35,8% (p < 0,002);

45 1:10: (6,5 ± 0,50) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 87,9% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de docetaxel aumentó en un 38,7% (p < 0,001).

Ejemplo 29. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1c en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano a una razón molar de docetaxel : compuesto II-1c (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1c en cultivos

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1c (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de docetaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1c en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células A549 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 8).

Tabla 8. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto II-1c en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano a una razón molar de docetaxel: compuesto II-1c (1:6) con respecto a la concentración final de docetaxel/compuesto II-1c en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, 10^3	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Docetaxel, mol/l	Compuesto II-1c, mol/l				
Control	0	0	54,6 ± 2,79	-	-	-
Docetaxel	10^{-9}	0	34,1 ± 2,07	37,5*	-	2,2 X 10^{-9}
	10^{-8}	0	15,6 ± 0,49	71,4*	-	
	10^{-7}	0	10,5 ± 0,97	80,8*	-	
Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	28,6 ± 1,39	47,6*	+16,1•	1,2 X 10^{-9}
	10^{-8}	6×10^{-8}	10,4 ± 0,75	81,0*	+33,3*	
	10^{-7}	6×10^{-7}	6,9 ± 0,52	87,4*	+34,3**	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) p < 0,001

(**) p < 0,01

(•) p < 0,05

Ejemplo 30 Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto II-1 en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano con respecto a las razones molares de paclitaxel : compuesto II-1

Se convirtió la sal de sodio del compuesto II-1c en la forma ácida del compuesto II-1 y se disolvió en metanol. Se mezcló una disolución de paclitaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1 en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de paclitaxel : compuesto II-1 iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de paclitaxel fue igual a 10^{-5} M.

Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de paclitaxel en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(50,5 \pm 2,58) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante paclitaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(14,6 \pm 0,82) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 71,1% (p < 0,001).

Los cultivos de células SKOV-3, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de paclitaxel/compuesto II-1 igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

5 1:3: $(9,6 \pm 0,68) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 81,0% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de paclitaxel aumentó en un 34,2% ($p < 0,001$);

1:6: $(8,7 \pm 0,63) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 82,8% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de paclitaxel aumentó en un 40,4% ($p < 0,001$);

10 1:10: $(8,2 \pm 0,70) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 83,8% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de paclitaxel aumentó en un 43,8% ($p < 0,001$).

15 Ejemplo 31. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto II-1 en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de paclitaxel: compuesto II-1 (1:6) con respecto a la concentración final de paclitaxel/compuesto II-1 en cultivos

20 Se convirtió la sal de sodio del compuesto II-1 en la forma ácida del compuesto II-1 y se disolvió en metanol. Se mezcló una disolución de paclitaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1 en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

25 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de paclitaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

30 En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 9).

Tabla 9. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto II-1 en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de paclitaxel: compuesto II-1 (1:6) con respecto a la concentración final de paclitaxel/compuesto II-1 en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	Cl ₅₀ mol/l (a)
	Paclitaxel, mol/l	Compuesto II-1, mol/l				
Control	0	0	49,6 \pm 3,13	-	-	-
Paclitaxel	10^{-9}	0	37,3 \pm 1,80	24,8**	-	4,5 $\times 10^{-9}$
	10^{-8}	0	19,9 \pm 1,45	59,9*	-	
	10^{-7}	0	14,1 \pm 0,98	71,6*	-	
Formulación	10^{-9}	6 $\times 10^{-9}$	27,6 \pm 1,56	44,4*	+26,0•	1,4 $\times 10^{-9}$
	10^{-8}	6 $\times 10^{-8}$	13,3 \pm 0,71	73,2*	+33,2•	
	10^{-7}	6 $\times 10^{-7}$	8,3 \pm 0,57	83,3*	+41,1*	

35 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

40 (*) $p < 0,001$

(**) $P < 0,01$

45 (•) $p < 0,002$

Ejemplo 32. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto II-1a en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano con respecto a las razones molares de paclitaxel : compuesto II-1a

50 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1a (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de paclitaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1a en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en solución salina a las razones molares de paclitaxel : compuesto II-1a iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de paclitaxel fue igual a 10^{-5} M.

Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 μ l) a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de paclitaxel en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(50,5 \pm 2,58) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante paclitaxel en una concentración de 100 nM, contenían $(14,6 \pm 0,82) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 71,1% ($p < 0,001$).

Los cultivos de células SKOV-3, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de paclitaxel/compuesto II-1a igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

1:3: $(10,1 \pm 0,73) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 80,0% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de paclitaxel aumentó en un 30,8% ($p < 0,002$);

1:6: $(9,4 \pm 0,80) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 81,4% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de paclitaxel aumentó en un 35,6% ($p < 0,001$);

1:10: $(8,9 \pm 0,64) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 82,4% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de paclitaxel aumentó en un 39,0% ($p < 0,001$).

Ejemplo 33. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto II-1a en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de paclitaxel : compuesto II-1 a (1:6) con respecto a la concentración final de paclitaxel/compuesto II-1a en cultivos

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1a (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en metanol. Se mezcló una disolución de paclitaxel en metanol y la disolución del compuesto II-1a en metanol. Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió la película secada resultante en solución salina.

A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células SKOV-3 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de paclitaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 10).

Tabla 10. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto II-1a en cultivos de línea celular SKOV-3 de adenocarcinoma de ovarios humano a una razón molar de paclitaxel: compuesto II-1a (1:6) con respecto a la concentración final de paclitaxel/compuesto II-1a en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Paclitaxel, mol/l	Compuesto II-1a, mol/l				
Control	0	0	$49,6 \pm 3,13$	-	-	-
Paclitaxel	10^{-9}	0	$37,3 \pm 1,80$	24,8**	-	$4,5 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	0	$19,9 \pm 1,45$	59,9*	-	
	10^{-7}	0	$14,1 \pm 0,98$	71,6*	-	

Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	$28,4 \pm 1,72$	42,7*	+23,9**	$1,6 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	6×10^{-8}	$14,2 \pm 1,00$	71,4*	+28,6**	
	10^{-7}	6×10^{-7}	$9,3 \pm 0,64$	81,3*	+34,0*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

5

(*) $p < 0,001$

(**) $p < 0,01$

10

(•) $p < 0,002$

Ejemplo 34. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto I-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a las razones molares de doxorubicina : compuesto I-1d

15

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1d (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de doxorubicina en agua.

20

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en agua a las razones molares de doxorubicina : compuesto I-1d iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de doxorubicina fue igual a 10^{-5} M.

25

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 μ l) a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de doxorubicina en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

30

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(50,9 \pm 2,07) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante doxorubicina en una concentración de 100 nM, contenían $(23,6 \pm 1,02) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,6% ($p < 0,001$).

35

Los cultivos de células MDA-MB-231, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de doxorubicina/compuesto I-1d igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

40

1:3: $(12,2 \pm 0,62) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 76,0% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de doxorubicina aumentó en un 48,3% ($p < 0,001$);

1:6: $(12,1 \pm 0,69) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 76,2% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de doxorubicina aumentó en un 48,7% ($p < 0,001$);

45

1:10: $(11,9 \pm 0,74) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 76,6% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de doxorubicina aumentó en un 49,6% ($p < 0,001$).

Ejemplo 35. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto I-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de doxorubicina : compuesto I-1d (1:6) con respecto a la concentración final de doxorubicina/compuesto I-1d en cultivos

50

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1d (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de doxorubicina en agua.

55

A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de doxorubicina de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las

60

disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 11).

Tabla 11. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto I-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de doxorubicina : compuesto I-1d (1:6) con respecto a la concentración final de doxorubicina/compuesto I-1d en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, X 10 ³	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Doxorubicina, mol/l	Compuesto I-1d, mol/l				
Control	0	0	55,7 ± 2,49	-	-	-
Doxorubicina	10 ⁻⁹	0	48,0 ± 1,85	13,8**	-	7,6 X 10 ⁻⁸
	10 ⁻⁸	0	41,0 ± 1,50	26,4*	-	
	10 ⁻⁷	0	26,2 ± 1,29	53,0*	-	
Formulación	10 ⁻⁹	3 X 10 ⁻⁹	37,7 ± 1,62	32,3*	+21,5•	1,3 X 10 ⁻⁸
	10 ⁻⁸	3 X 10 ⁻⁸	29,7 ± 1,48	46,7*	+27,6*	
	10 ⁻⁷	3 X 10 ⁻⁷	13,5 ± 0,74	75,8*	+48,5*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) p < 0,001

(**) p < 0,05

(•) p < 0,002

Ejemplo 36. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto II-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a las razones molares de doxorubicina : compuesto II-1d

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1d (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de doxorubicina en agua.

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en agua a las razones molares de doxorubicina : compuesto II-1d iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de doxorubicina fue igual a 10⁻⁵ M.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de doxorubicina en cultivos igual a 10⁻⁷ M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, el cultivo control contenía (50,9 ± 2,07) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante doxorubicina en una concentración de 100 nM, contenían (23,6 ± 1,02) X 10³ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,6% (p < 0,001).

Los cultivos de células MDA-MB-231, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de doxorubicina/compuesto II-1d igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

1:3: (13,0 ± 0,76) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 74,5% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de doxorubicina aumentó en un 44,9% (p < 0,001);

1:6: (12,8 ± 0,60) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 74,9% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de doxorubicina aumentó en un 45,8% (p < 0,001);

1:10: (12,6 ± 0,68) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 75,2% (p < 0,001), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de doxorubicina aumentó en un 46,6% (p < 0,001).

Ejemplo 37. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto II-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de doxorubicina : compuesto II-1d (1:6) con respecto a la concentración final de doxorubicina/compuesto II-1d en cultivos

- 5 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1d (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de doxorubicina en agua.
- 10 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de doxorubicina de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.
- 15 En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 12).

Tabla 12. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto II-1d en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de doxorubicina : compuesto II-1d (1:6) con respecto a la concentración final de doxorubicina/compuesto II-1d en cultivos

20

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Doxorubicina, mol/l	Compuesto II-1d, mol/l				
Control	0	0	55,7 ± 2,49	-	-	-
Doxorubicina	10^{-9}	0	48,0 ± 1,85	13,8**	-	7,6 X 10^{-8}
	10^{-8}	0	41,0 ± 1,50	26,4*	-	
	10^{-7}	0	26,2 ± 1,29	53,0*	-	
Formulación	10^{-9}	3×10^{-9}	39,6 ± 1,76	28,9*	+17,5•	1,6 X 10^{-8}
	10^{-8}	3×10^{-8}	31,2 ± 1,53	44,0*	+23,9*	
	10^{-7}	3×10^{-7}	14,5 ± 0,81	74,0*	+44,7*	

- 25 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) p < 0,001

- 30 (**) p < 0,05

(•) p < 0,01

Ejemplo 38. Evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones de mitoxantrona/compuesto I-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a las razones molares de mitoxantrona : compuesto I-1e

35

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1e (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.

40

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en agua a las razones molares de mitoxantrona : compuesto I-1e iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de mitoxantrona fue igual a 10^{-5} M.

45

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de mitoxantrona en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

50

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(55,6 \pm 2,88) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante mitoxantrona en una concentración de 100 nM, contenían $(22,9 \pm 1,49) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 58,8% ($p < 0,001$).

5 Los cultivos de células MDA-MB-231, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de mitoxantrona/compuesto I-1e igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

10 1:3: $(13,7 \pm 1,05) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 75,4% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 40,2% ($p < 0,001$);

15 1:6: $(12,5 \pm 0,98) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 77,5% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 45,4% ($p < 0,001$);

1:10: $(11,9 \pm 0,82) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 78,6% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 48,0% ($p < 0,001$).

20 Ejemplo 39. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto I-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto I-1e (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto I-1e en cultivos

25 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1e (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.

30 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de mitoxantrona de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

35 En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 13).

Tabla 13. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto I-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto I-1e (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto I-1e en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Mitoxantrona, mol/l	Compuesto I-1e, mol/l				
Control	0	0	$57,8 \pm 1,97$	-	-	-
Mitoxantrona	10^{-9}	0	$32,6 \pm 1,99$	43,6*	-	$5,0 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	0	$27,4 \pm 1,90$	52,6*	-	
	10^{-7}	0	$22,5 \pm 1,63$	61,1*	-	
Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	$25,1 \pm 1,88$	56,6*	+23,0*	$2,5 \times 10^{-10}$ (b)
	10^{-8}	6×10^{-8}	$18,3 \pm 0,55$	68,3*	+33,2*	
	10^{-7}	6×10^{-7}	$11,6 \pm 0,86$	79,9*	+48,4*	

40 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

45 (b) Extrapolado.

(*) $p < 0,001$

(**) $p < 0,01$

50 (•) $p < 0,02$

Ejemplo 40. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto II-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a las razones molares de mitoxantrona : compuesto II-1e

- 5 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1e (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.
- 10 Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en agua a las razones molares de mitoxantrona : compuesto II-1e iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de mitoxantrona fue igual a 10^{-5} M.
- 15 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 μ l) a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de mitoxantrona en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.
- 20 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(55,6 \pm 2,88) \times 10^3$ células.
- Los cultivos, tratados mediante mitoxantrona en una concentración de 100 nM, contenían $(22,9 \pm 1,49) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 58,8% ($p < 0,001$).
- 25 Los cultivos de células MDA-MB-231, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de mitoxantrona/compuesto II-1e igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:
- 30 1:3: $(14,0 \pm 1,23) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 74,8% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 38,9% ($p < 0,001$);
- 1:6: $(12,9 \pm 0,62) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 76,8% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 43,7% ($p < 0,001$);
- 35 1:10: $(12,3 \pm 1,01) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 77,9% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 46,3% ($p < 0,001$).

Ejemplo 41. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto II-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto II-1e (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto II-1e en cultivos

- 40 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1e (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.
- 45 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de mitoxantrona de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.
- 50 En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 14).
- 55 Tabla 14. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto II-1e en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto II-1e (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto II-1e en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, 10^3	de X Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
	Mitoxantrona, mol/l	Compuesto II-1e, mol/l				
Control	0	0	$57,8 \pm 1,97$	-	-	-

Mitoxantrona	10^{-9}	0	$32,6 \pm 1,99$	43,6*	-	5,0 X 10^{-9}
	10^{-8}	0	$27,4 \pm 1,90$	52,6*	-	
	10^{-7}	0	$22,5 \pm 1,63$	61,1*	-	
Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	$26,2 \pm 1,43$	54,7	+19,6*	4,0 X 10^{-10} (b)
	10^{-8}	6×10^{-8}	$19,5 \pm 1,12$	66,3	+28,8**	
	10^{-7}	6×10^{-7}	$13,0 \pm 0,91$	77,5	+42,2*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

5

(b) Extrapolado.

(*) $p < 0,001$

10

(**) $p < 0,01$

(•) $p < 0,05$

15

Ejemplo 42. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto I-1f en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano con respecto a las razones molares de mitoxantrona : compuesto I-1f

20

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1f (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.

25

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en agua a las razones molares de mitoxantrona : compuesto I-1f iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de mitoxantrona fue igual a 10^{-5} M.

30

Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 μ l) a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de mitoxantrona en cultivos igual a 10^{-7} M. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(48,2 \pm 3,14) \times 10^3$ células.

35

Los cultivos, tratados mediante mitoxantrona en una concentración de 100 nM, contenían $(19,2 \pm 1,16) \times 10^3$ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 60,2% ($p < 0,001$).

40

Los cultivos de células DU 145, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de mitoxantrona/compuesto I-1f igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

45

1:3: $(9,9 \pm 0,48) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 79,5% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 48,4% ($p < 0,001$);

1:6: $(9,3 \pm 0,54) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 80,7% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 51,6% ($p < 0,001$);

1:10: $(8,8 \pm 0,65) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 81,7% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 54,2% ($p < 0,001$).

50

Ejemplo 43. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto I-1f en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto I-1f (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto I-1f en cultivos

55

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1f (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.

A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de mitoxantrona de 1 X 10⁻⁹, 1 X 10⁻⁸ y 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 15).

Tabla 15. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto I-1f en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto I-1f (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto I-1f en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, X 10 ³	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	Cl ₅₀ mol/l (a)
	Mitoxantrona, mol/l	Compuesto I-1f, mol/l				
Control	0	0	57,5 ± 3,03	-	-	-
Mitoxantrona	10 ⁻⁹	0	46,5 ± 2,32	19,1*	-	3,2 X 10 ⁻⁸
	10 ⁻⁸	0	35,0 ± 1,70	39,1*	-	
	10 ⁻⁷	0	23,1 ± 1,34	59,8*	-	
Formulación	10 ⁻⁹	6 X 10 ⁻⁹	37,9 ± 2,86	34,1*	+18,5**	5,2 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	6 X 10 ⁻⁸	25,2 ± 0,93	56,2*	+28,0*	
	10 ⁻⁷	6 X 10 ⁻⁷	11,4 ± 0,74	80,2*	+50,6*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) p < 0,001

(**) p < 0,01

(•) p < 0,02

(••) p < 0,05

Ejemplo 44. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto II-1f en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano con respecto a las razones molares de mitoxantrona : compuesto II-1f

Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1f (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.

Se prepararon disoluciones iniciales de la formulación en agua a las razones molares de mitoxantrona : compuesto II-1f iguales a 1:3, 1:6 y 1:10. A partir de estas disoluciones, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. La concentración de mitoxantrona fue igual a 10⁻⁵ M.

Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de las disoluciones de trabajo (2 µl) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de mitoxantrona en cultivos igual a 10⁻⁷ M. En los cultivos control, se añadieron 2 µl de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (48,2 ± 3,14) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante mitoxantrona en una concentración de 100 nM, contenían (19,2 ± 1,16) X 10³ células, la inhibición del crecimiento celular fue del 60,2% (p < 0,001).

Los cultivos de células DU 145, tratados mediante disoluciones de la formulación a la razón molar de mitoxantrona/compuesto II-1f igual a 1:3, 1:6 y 1:10 en medio con FBS al 5%, tenían el siguiente número de células viables:

1:3: $(10,9 \pm 0,83) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 77,4% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 43,2% ($p < 0,001$);

5 1:6: $(10,4 \pm 0,70) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 78,4% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 45,8% ($p < 0,001$);

1:10: $(9,7 \pm 0,53) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 79,9% ($p < 0,001$), la inhibición del crecimiento celular en comparación con la de mitoxantrona aumentó en un 49,5% ($p < 0,001$).

10 Ejemplo 45. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto II-1f en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto II-1f (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto II-1f en cultivos

15 Se evaporó una alícuota de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1f (2 mg) en etanol-agua (2:1, v/v) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió la película secada resultante en agua. Se mezcló una alícuota de la disolución obtenida y la disolución de una alícuota de mitoxantrona en agua.

20 A partir de esta disolución inicial, se prepararon las disoluciones de trabajo en medio con FBS al 5% para añadir a los cultivos. Se trataron cultivos de células DU 145 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) con diferentes concentraciones de formulación a cultivos de 200 μ l hasta una concentración final de mitoxantrona de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

25 En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 16).

30 Tabla 16. Evaluación de la citotoxicidad de la formulación de mitoxantrona/compuesto II-1f en cultivos de línea celular DU 145 de carcinoma de próstata humano a una razón molar de mitoxantrona : compuesto II-1f (1:6) con respecto a la concentración final de mitoxantrona/compuesto II-1f en cultivos

Fármaco	Formulación		Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	Cl ₅₀ mol/l (a)
	Mitoxantrona, mol/l	Compuesto II-1f, mol/l				
Control	0	0	$57,5 \pm 3,03$	-	-	-
Mitoxantrona	10^{-9}	0	$46,5 \pm 2,32$	19,1*	-	$3,2 \times 10^{-8}$
	10^{-8}	0	$35,0 \pm 1,70$	39,1*	-	
	10^{-7}	0	$23,1 \pm 1,34$	59,8*	-	
Formulación	10^{-9}	6×10^{-9}	$39,3 \pm 2,15$	31,7*	+15,5**	$7,2 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	6×10^{-8}	$27,1 \pm 1,57$	52,9*	+22,6**	
	10^{-7}	6×10^{-7}	$13,7 \pm 0,88$	76,2*	+40,7*	

35 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) $p < 0,001$

40 (**) $p < 0,01$

(•) $p < 0,02$

(••) $p < 0,05$

45 Ejemplo 46. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1g en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1g en los cultivos

50 Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1g (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1g en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto I-1g a cultivos de 200 μ l hasta concentraciones finales del compuesto I-1g de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1g.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,5 \pm 2,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1g tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(40,8 \pm 2,14) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 27,8% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(36,2 \pm 1,95) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 35,9% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(32,1 \pm 1,72) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 43,2% ($p < 0,001$)

Por tanto, se mostró que el compuesto I-1g ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 43,2% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1g.

Ejemplo 47. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-1h en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-1h en los cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto I-1h (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-1h en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto I-1h a cultivos de 200 μ l hasta concentraciones finales del compuesto I-1h de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1h.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,5 \pm 2,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1h tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(38,4 \pm 2,11) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 32,0% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(34,1 \pm 1,89) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 39,6% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(30,3 \pm 1,55) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,4% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto I-1h ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 46,4% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-1h.

Ejemplo 48. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-3a en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-3a en los cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto I-3a (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-3a en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto I-3a a cultivos de 200 μ l hasta concentraciones finales del compuesto I-3a de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-3a.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,5 \pm 2,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-3a tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(40,0 \pm 2,06) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 29,2% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(34,9 \pm 1,64) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 38,2% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(28,8 \pm 1,15) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 49,0% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto I-3a ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 49,0% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-3a.

Ejemplo 49. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto I-3f en cultivos de línea celular MDA-MB-23 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto I-3f en los cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto I-3f (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto I-3f en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto I-3f a cultivos de 200 μ l hasta concentraciones finales del compuesto I-3f de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-3f.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,5 \pm 2,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-3f tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(33,1 \pm 1,90) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 41,4% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(29,0 \pm 1,32) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 48,7% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(25,3 \pm 0,76) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 55,2% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto I-3f ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 55,2% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto I-3f.

Ejemplo 50. Evaluación de la citotoxicidad del compuesto II-3b en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a la concentración final del compuesto II-3b en los cultivos

Se preparó una disolución inicial del compuesto II-3b (1 mg/ml) disolviendo la sustancia seca en solución salina. A partir de esta disolución, se prepararon las disoluciones de trabajo del compuesto II-3b en MEM con FBS al 5% en diferentes concentraciones por medio de diluciones consecutivas para añadir a los cultivos.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μ l) en diferentes concentraciones del compuesto II-3b a cultivos de 200 μ l hasta concentraciones finales del compuesto II-3b de desde 10^{-9} hasta 10^{-7} mol/l en los cultivos. En los cultivos control, se añadieron 2 μ l de medio con FBS al 5% como control de disolvente. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-3b.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,5 \pm 2,35) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-3b tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: $(29,5 \pm 1,21) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 47,8% ($p < 0,001$);

10^{-8} mol/l: $(25,2 \pm 1,27) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 55,4% ($p < 0,001$);

10^{-7} mol/l: $(21,4 \pm 0,88) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 62,1% ($p < 0,001$).

Por tanto, se mostró que el compuesto II-3b ejercía una acción citotóxica significativa contra células de adenocarcinoma de mama humano. El grado de inhibición del crecimiento celular aumentó en un 62,1% ($p < 0,001$) cuando se aumentó la concentración del compuesto II-3b.

Ejemplo 51. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto I-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de sus disoluciones iniciales en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1 en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto I-1 en una concentración de 10^{-3} M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto I-1 en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10^{-5} M a partir de estas disoluciones iniciales.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones del compuesto I-1 en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 μl hasta concentraciones finales del compuesto I-1 de desde 1×10^{-9} hasta 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,9 \pm 3,30) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1 en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: A $(35,9 \pm 1,38) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 36,9% ($p < 0,001$)
B $(42,8 \pm 1,56) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 24,8% ($p < 0,01$).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1 en A en comparación con la de en B aumentó en un 16,1% ($p < 0,01$);

10^{-8} mol/l: A $(34,0 \pm 1,32) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 40,2% ($p < 0,001$)
B $(40,0 \pm 1,35) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 29,7% ($p < 0,001$).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1 en A en comparación con la de en B aumentó en un 15,0% ($p < 0,01$);

10^{-7} mol/l: A $(33,3 \pm 1,17) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 41,5% ($p < 0,001$)
B $(39,1 \pm 1,41) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 31,3% ($p < 0,001$).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1 en A en comparación con la de en B aumentó en un 14,8% ($p < 0,01$).

Ejemplo 52. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto II-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1 en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto II-1 en una concentración de 10^{-3} M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto II-1 en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10^{-5} M a partir de estas disoluciones iniciales.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones del compuesto II-1 en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 μl hasta concentraciones finales del compuesto II-1 de desde 1×10^{-9} hasta 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(56,9 \pm 3,30) \times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1 en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

5 10^{-9} mol/l: A $(35,6 \pm 1,29) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 37,4% ($p < 0,001$)
B $(42,4 \pm 1,63) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 25,5% ($p < 0,01$).

10 La inhibición del crecimiento celular mediante II-1 en A en comparación con la de en B aumentó en un 16,0% ($p < 0,01$);

10^{-8} mol/l: A $(33,4 \pm 1,20) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 41,3% ($p < 0,001$)
B $(39,5 \pm 1,46) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 30,6% ($p < 0,001$).

15 La inhibición del crecimiento celular mediante II-1 en A en comparación con la de en B aumentó en un 15,4% ($p < 0,01$);

20 10^{-7} mol/l: A $(32,6 \pm 1,09) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 42,7% ($p < 0,001$)
B $(38,6 \pm 1,25) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 32,2% ($p < 0,001$).

La inhibición del crecimiento celular mediante II-1 en A en comparación con la de en B aumentó en un 15,5% ($p < 0,01$).

25 Ejemplo 53. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto II-1a en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

30 Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1a en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto II-1a en una concentración de 10^{-3} M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto II-1a en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10^{-5} M a partir de estas disoluciones iniciales.

35 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones del compuesto II-1a en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 μl hasta concentraciones finales del compuesto II-1a de desde 1×10^{-9} hasta 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1a.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(57,3 \pm 1,70) \times 10^3$ células.

45 Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1a en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: A $(36,8 \pm 1,74) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 35,8% ($p < 0,001$)
B $(44,1 \pm 2,24) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 23,0% ($p < 0,001$).

50 La inhibición del crecimiento celular mediante II-1a en A en comparación con la de en B aumentó en un 16,6% ($p < 0,05$);

10^{-8} mol/l: A $(33,4 \pm 1,25) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 41,7% ($p < 0,001$)
B $(39,4 \pm 2,28) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 31,2% ($p < 0,001$).

55 La inhibición del crecimiento celular mediante II-1a en A en comparación con la de en B aumentó en un 15,2% ($p < 0,05$);

60 10^{-7} mol/l: A $(29,3 \pm 0,76) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 48,9% ($p < 0,001$)
B $(34,1 \pm 1,97) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 40,5% ($p < 0,001$).

La inhibición del crecimiento celular mediante II-1a en A en comparación con la de en B aumentó en un 14,1% ($p < 0,05$).

65 Ejemplo 54. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto I-1f en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2

2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1f en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto I-1f en una concentración de 10⁻³ M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto I-1f en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10⁻⁵ M a partir de estas disoluciones iniciales.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones del compuesto I-1f en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 µl hasta concentraciones finales del compuesto I-1f de desde 1 X 10⁻⁹ hasta 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1f.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (57,4 ± 3,10) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1f en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

10⁻⁹ mol/l: A (35,3 ± 1,34) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 38,6% (p < 0,001)
B (42,6 ± 0,80) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 25,8% (p < 0,001).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1f en A en comparación con la de en B aumentó en un 17,1% (p < 0,001);

10⁻⁸ mol/l: A (30,8 ± 1,23) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,3% (p < 0,001)
B (36,7 ± 0,75) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 36,1% (p < 0,001).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1f en A en comparación con la de en B aumentó en un 16,1% (p < 0,01);

10⁻⁷ mol/l: A (26,8 ± 0,63) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,3% (p < 0,001)
B (31,6 ± 0,89) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 44,9% (p < 0,001).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1f en A en comparación con la de en B aumentó en un 15,2% (p < 0,002).

Ejemplo 55. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto II-1f en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1f en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto II-1f en una concentración de 10⁻³ M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto II-1f en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10⁻⁵ M a partir de estas disoluciones iniciales.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones del compuesto II-1f en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 µl hasta concentraciones finales del compuesto II-1f de desde 1 X 10⁻⁹ hasta 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1f.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (57,4 ± 3,10) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1f en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

10⁻⁹ mol/l: A (34,4 ± 1,20) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 40,1% (p < 0,001)
B (41,8 ± 1,46) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 27,2% (p < 0,001).

La inhibición del crecimiento celular mediante II-1f en A en comparación con la de en B aumentó en un 17,7% (p <

0,01);

10^{-8} mol/l: A $(30,2 \pm 0,75) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 47,4% ($p < 0,001$)
B $(36,0 \pm 1,28) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 37,3% ($p < 0,001$).

5 La inhibición del crecimiento celular mediante I-1f en A en comparación con la de en B aumentó en un 16,1% ($p < 0,01$);

10^{-7} mol/l: A $(26,3 \pm 0,68) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 54,2% ($p < 0,001$)
B $(31,1 \pm 0,96) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 45,8% ($p < 0,001$).

10 La inhibición del crecimiento celular mediante I-1f en A en comparación con la de en B aumentó en un 15,4% ($p < 0,002$).

15 Ejemplo 56. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto I-1g en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

20 Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1g en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto I-1g en una concentración de 10^{-3} M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto I-1g en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10^{-5} M a partir de estas disoluciones iniciales.

25 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones del compuesto I-1g en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 μl hasta concentraciones finales del compuesto I-1g de desde 1×10^{-9} hasta 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1g.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían $(55,8 \pm 1,37) \times 10^3$ células.

35 Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1g en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

10^{-9} mol/l: A $(39,9 \pm 1,76) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 28,5% ($p < 0,001$)
B $(53,5 \pm 3,21) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 4,2% ($p > 0,05$).

40 La inhibición del crecimiento celular mediante I-1g en A en comparación con la de en B aumentó en un 25,4% ($p < 0,01$);

10^{-8} mol/l: A $(35,3 \pm 1,94) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 36,7% ($p < 0,001$)
B $(47,9 \pm 2,86) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 14,2% ($p < 0,05$).

45 La inhibición del crecimiento celular mediante I-1g en A en comparación con la de en B aumentó en un 26,3% ($p < 0,01$);

10^{-7} mol/l: A $(31,7 \pm 2,13) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 43,2% ($p < 0,001$)
B $(43,1 \pm 2,03) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 22,8% ($p < 0,001$).

50 La inhibición del crecimiento celular mediante I-1g en A en comparación con la de en B aumentó en un 26,5% ($p < 0,01$).

55 Ejemplo 57. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto I-1h en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

60 Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1h en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto I-1h en una concentración de 10^{-3} M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto I-1h en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10^{-5} M a partir de estas disoluciones iniciales.

65

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones del compuesto I-1h en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 µl hasta concentraciones finales del compuesto I-1h de desde 1 X 10⁻⁹ hasta 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-1h.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (55,8 ± 1,37) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-1h en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

10⁻⁹ mol/l: A (40,9 ± 2,47) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 26,7% (p < 0,001)
B (51,9 ± 3,46) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 7,0% (p > 0,05).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1h en A en comparación con la de en B aumentó en un 21,1% (p < 0,05);

10⁻⁸ mol/l: A (36,7 ± 2,04) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 34,2% (p < 0,001)
B (46,1 ± 2,65) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 17,4% (p < 0,02).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1h en A en comparación con la de en B aumentó en un 20,4% (p < 0,02);

10⁻⁷ mol/l: A (32,5 ± 1,26) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 41,8% (p < 0,001)
B (41,3 ± 0,99) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 26,0% (p < 0,001).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-1h en A en comparación con la de en B aumentó en un 21,3% (p < 0,001).

Ejemplo 58. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto I-3f en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-3f en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto I-3f en una concentración de 10⁻³ M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto I-3f en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10⁻⁵ M a partir de estas disoluciones iniciales.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones del compuesto I-3f en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 µl hasta concentraciones finales del compuesto I-3f de desde 1 X 10⁻⁹ hasta 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto I-3f.

Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían (55,4 ± 1,76) X 10³ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto I-3f en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

10⁻⁹ mol/l: A (33,8 ± 2,36) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 39,0% (p < 0,001)
B (43,3 ± 2,88) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 21,8% (p < 0,01).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-3f en A en comparación con la de en B aumentó en un 21,9% (p < 0,05);

10⁻⁸ mol/l: A (29,5 ± 1,14) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,8% (p < 0,001)
B (37,6 ± 1,52) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 32,1% (p < 0,001).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-3f en A en comparación con la de en B aumentó en un 21,5% (p < 0,002);

10⁻⁷ mol/l: A (25,7 ± 0,90) X 10³, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,6% (p < 0,001)

B ($32,8 \pm 0,99$) $\times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 40,8% ($p < 0,001$).

La inhibición del crecimiento celular mediante I-3f en A en comparación con la de en B aumentó en un 21,6% ($p < 0,001$).

5 Ejemplo 59. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto II-3b en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

10 Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-3b en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto II-3b en una concentración de 10^{-3} M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto II-3b en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10^{-5} M a partir de estas disoluciones
15 iniciales.

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones del compuesto II-3b en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 μl hasta concentraciones finales del compuesto II-3b
20 de desde 1×10^{-9} hasta 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células MDA-MB-231 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-3b.

25 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían ($55,4 \pm 1,76$) $\times 10^3$ células.

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-3b en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

30 10^{-9} mol/l: A ($29,9 \pm 1,23$) $\times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 46,0% ($p < 0,001$)
B ($41,4 \pm 2,15$) $\times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 25,3% ($p < 0,001$).

La inhibición del crecimiento celular mediante II-3b en A en comparación con la de en B aumentó en un 27,8% ($p < 0,001$);

35 10^{-8} mol/l: A ($25,7 \pm 1,13$) $\times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 53,6% ($p < 0,001$)
B ($35,6 \pm 1,97$) $\times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 35,7% ($p < 0,001$).

La inhibición del crecimiento celular mediante II-3b en A en comparación con la de en B aumentó en un 27,8% ($p < 0,002$);

40 10^{-7} mol/l: A ($21,9 \pm 0,98$) $\times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 60,5% ($p < 0,001$)
B ($30,8 \pm 1,60$) $\times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 44,4% ($p < 0,001$).

45 La inhibición del crecimiento celular mediante II-3b en A en comparación con la de en B aumentó en un 28,9% ($p < 0,001$).

50 Ejemplo 60. Evaluación comparativa de la citotoxicidad del compuesto II-1a en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B)

Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto II-1a en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvió otra en solución salina normal para formar disoluciones iniciales del compuesto II-1a en una concentración de 10^{-3} M. Se prepararon las dos disoluciones de trabajo del compuesto II-1a en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) en una concentración de 10^{-5} M a partir de estas disoluciones
55 iniciales.

Se trataron cultivos de células A549 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones del compuesto II-1a en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A) y solución salina normal (B) a cultivos de 200 μl hasta concentraciones finales del compuesto II-1a de
60 desde 1×10^{-9} hasta 1×10^{-7} mol/l en los cultivos. Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos y se calculó el grado de inhibición del crecimiento de células A549 con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba del compuesto II-1a.

65 Tras tres días de cultivo, los cultivos control contenían ($55,8 \pm 1,90$) $\times 10^3$ células.

ES 2 452 540 T3

Los cultivos, tratados mediante disoluciones del compuesto II-1a en A y en B tenían el siguiente número de células viables:

- 5 10^{-9} mol/l: A $(44,4 \pm 2,03) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 20,4% ($p < 0,002$)
 B $(51,8 \pm 2,48) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 7,2% ($p > 0,05$).

La inhibición del crecimiento celular mediante II-1a en A en comparación con la de en B aumentó en un 14,3% ($p < 0,05$);

- 10 10^{-8} mol/l: A $(40,8 \pm 1,14) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 26,9% ($p < 0,001$)
 B $(47,1 \pm 1,43) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 15,6% ($p < 0,01$).

La inhibición del crecimiento celular mediante II-1a en A en comparación con la de en B aumentó en un 13,4% ($p < 0,01$);

- 15 10^{-7} mol/l: A $(36,6 \pm 1,13) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 34,4% ($p < 0,001$)
 B $(41,5 \pm 1,80) \times 10^3$, la inhibición del crecimiento celular fue del 25,6% ($p < 0,001$).

- 20 La inhibición del crecimiento celular mediante II-1a en A en comparación con la de en B aumentó en un 11,8% ($p < 0,05$).

25 Ejemplo 61. Evaluación comparativa de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1a + compuesto II-1a en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de docetaxel : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (2,5 + 2,5) con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio de cultivo con FBS al 5% (C)

30 Se mezclaron alícuotas de disoluciones madre de la sal de sodio del compuesto I-1a y la sal de sodio del compuesto II-1a en etanol-agua (2:1, v/v) y se evaporaron en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvieron las películas secadas resultantes en metanol. Se añadieron alícuotas iguales de disolución de docetaxel en metanol a tres disoluciones idénticas, que contenían compuesto I-1a y compuesto II-1a en metanol para formar disoluciones con la razón molar deseada de docetaxel : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (2,5 + 2,5). Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió una de las películas secadas resultantes en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvieron las otras en solución salina normal. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-3} M en tres disoluciones iniciales de la formulación. Se prepararon las tres disoluciones de trabajo de la formulación en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a partir de estas disoluciones iniciales para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10^{-5} M en tres disoluciones de trabajo.

40 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones de formulación en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a cultivos de 200 μl hasta una concentración final de docetaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

45 Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 17)

Tabla 17

Fármaco	Docetaxel, mol/l	Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI_{50} mol/l (a)
Control negativo	0	57,9±2,14			
Docetaxel	10^{-9}	36,8±1,70	36,4*		$4,6 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	25,3±1,18	56,3*		
	10^{-7}	13,6±0,72	76,5*		
Formulación en (A)	10^{-9}	26,6±0,98	54,1*	+27,7*	$8,0 \times 10^{-10}$ (b)
	10^{-8}	15,1±0,74	73,9*	+40,3*	
	10^{-7}	8,0±0,41	86,2*	+41,2*	
Formulación en (B)	10^{-9}	31,1±1,56	46,3*	+15,5**	$1,4 \times 10^{-9}$

	10 ⁻⁸	18,9±0,86	67,4*	+25,3*	
	10 ⁻⁷	11,2±0,65	80,7*	+17,6**	
Formulación en (C)	10 ⁻⁹	26,0±1,31	55,1*	+29,3*	6,0 X 10 ⁻¹⁰ (b)
	10 ⁻⁸	13,9±0,62	76,0*	+45,1*	
	10 ⁻⁷	7,8±0,53	86,5*	+42,6*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

5

(b) Extrapolado

(*) p < 0,001

10 (***) p < 0,05

(•) p < 0,002

Ejemplo 62. Evaluación comparativa de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto I-1a + compuesto II-1a en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de doxorubicina : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (1,5 + 1,5) con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio de cultivo con FBS al 5% (C)

15

Se mezclaron alícuotas de disoluciones madre de la sal de sodio del compuesto I-1a y la sal de sodio del compuesto II-1a en etanol-agua (2:1, v/v) y se evaporaron en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvieron las películas secadas resultantes en agua. Se añadieron alícuotas iguales de disolución de doxorubicina en agua a tres disoluciones idénticas, que contenían compuesto I-1a y compuesto II-1a en agua para formar disoluciones iniciales de la formulación con la razón molar deseada de doxorubicina : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (1,5 + 1,5). La concentración de doxorubicina fue igual a 10⁻³ M en tres disoluciones iniciales de la formulación.

20

Se prepararon las tres disoluciones de trabajo de la formulación en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a partir de estas disoluciones iniciales para añadir a los cultivos. La concentración de doxorubicina fue igual a 10⁻⁵ M en tres disoluciones de trabajo.

25

Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de doxorubicina de 1 X 10⁻⁹, 1 X 10⁻⁸ y 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos.

30

Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 18).

35

Tabla 18

Fármaco	Doxorubicina, mol/l	Número de células tumorales, 10 ³	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	Cl ₅₀ mol/l (a)
Control negativo	0	57,2±1,60			
Doxorubicina	10 ⁻⁹	46,1±2,07	19,4*		6,2 X 10 ⁻⁸
	10 ⁻⁸	40,4±1,65	29,4*		
	10 ⁻⁷	25,5±0,71	55,4*		
Formulación en (A)	10 ⁻⁹	30,3±1,87	47,0*	+34,3*	3,4 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	26,0±1,08	54,5*	+35,6*	
	10 ⁻⁷	13,2±0,25	76,9*	+48,2*	
Formulación en (B)	10 ⁻⁹	38,3±1,34	33,0*	+16,9**	2,2 X 10 ⁻⁸
	10 ⁻⁸	33,1±1,31	42,1*	+18,1**	
	10 ⁻⁷	19,2±1,14	66,4*	+24,7*	
Formulación en (C)	10 ⁻⁹	29,5±1,26	48,4*	+36,0*	1,8 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	25,3±0,24	55,8*	+37,4*	
	10 ⁻⁷	12,5±0,69	78,1*	+51,0*	

40

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para

calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) $p < 0,001$

(**) $p < 0,01$

(•) $p < 0,002$

10 Ejemplo 63. Evaluación comparativa de la citotoxicidad de la formulación de doxorubicina/compuesto I-1f en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de doxorubicina : compuesto I-1f (1 : 3) con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio de cultivo con FBS al 5% (C)

15 Se evaporaron alícuotas de una disolución madre de la sal de sodio del compuesto I-1f en etanol-agua (2:1, v/v) en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvieron las películas secadas resultantes en agua. Se añadieron alícuotas iguales de disolución de doxorubicina en agua a tres disoluciones idénticas, que contenían compuesto I-1f en agua para formar disoluciones iniciales de la formulación con la razón molar deseada de doxorubicina : compuesto I-1f (1 : 3). La concentración de doxorubicina fue igual a 10^{-3} M en tres disoluciones iniciales de formulación.

20 Se prepararon las tres disoluciones de trabajo de la formulación en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a partir de estas disoluciones iniciales para añadir a los cultivos. La concentración de doxorubicina fue igual a 10^{-5} M en tres disoluciones de trabajo.

25 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones de formulación en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a cultivos de 200 μl hasta una concentración final de doxorubicina de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

30 Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 19).

Tabla 19

35

Fármaco	Doxorubicina, mol/l	Número de células tumorales, $\times 10^3$	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI_{50} mol/l (a)
Control negativo	0	56,461,78			
Doxorubicina	10^{-9}	45,6 \pm 1,38	19,1*		6,4 $\times 10^{-8}$
	10^{-8}	41,0 \pm 0,96	27,3*		
	10^{-7}	25,2 \pm 1,56	55,3*		
Formulación en (A)	10^{-9}	30,3 \pm 1,55	46,3*	+33,6*	3,7 $\times 10^{-9}$
	10^{-8}	25,5 \pm 1,15	54,8*	+37,8*	
	10^{-7}	10,8 \pm 0,55	80,9*	+57,1*	
Formulación en (B)	10^{-9}	36,7 \pm 1,07	34,9*	+19,5*	2,1 $\times 10^{-8}$
	10^{-8}	32,6 \pm 0,93	42,2*	+20,5*	
	10^{-7}	16,8 \pm 0,91	70,2*	+33,3*	
Formulación en (C)	10^{-9}	29,5 \pm 1,14	47,7*	+35,3*	2,1 $\times 10^{-9}$
	10^{-8}	24,6 \pm 0,53	56,4*	+40,0*	
	10^{-7}	10,0 \pm 0,42	82,3*	+60,3*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

40

(*) $p < 0,001$

45 Ejemplo 64. Evaluación comparativa de la citotoxicidad de la formulación de docetaxel/compuesto I-1a + compuesto II-1a en cultivos de línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano a una razón molar de docetaxel : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (2,5 + 2,5) con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio de cultivo con FBS al 5% (C)

Se mezclaron alícuotas de disoluciones madre de la sal de sodio del compuesto I-1a y la sal de sodio del compuesto

5 II-1a en etanol-agua (2:1, v/v) y se evaporaron en el evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvieron las películas secadas resultantes en metanol. Se añadieron alícuotas iguales de disolución de docetaxel en metanol a tres disoluciones idénticas, que contenían compuesto I-1a y compuesto II-1a en metanol para formar disoluciones con la razón molar deseada de docetaxel : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (2,5 + 2,5). Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM y se disolvieron otras en solución salina normal. La concentración de docetaxel fue igual a 10⁻³ M en tres disoluciones iniciales de la formulación. Se prepararon las tres disoluciones de trabajo de la formulación en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a partir de estas disoluciones iniciales para añadir a los cultivos. La concentración de docetaxel fue igual a 10⁻⁵ M en tres disoluciones de trabajo.

10 Se trataron cultivos de células A549 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 µl) con diferentes concentraciones de formulación en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de docetaxel de 1 X 10⁻⁹, 1 X 10⁻⁸ y 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos.

15 Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 20).

20 Tabla 20

Fármaco	Docetaxel, mol/l	Número de células tumorales, X 10 ³	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
Control negativo	0	55,861,90			
Docetaxel	10 ⁻⁹	35,7±1,51	36,0*		2,2 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	16,2±0,75	71,0*		
	10 ⁻⁷	11,0±0,73	80,3*		
Formulación en (A)	10 ⁻⁹	27,9±1,03	50,0*	+21,8*	1,0310 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	9,5±0,53	83,0*	+41,4*	
	10 ⁻⁷	6,6±0,45	88,2*	+40,0*	
Formulación en (B)	10 ⁻⁹	32,4±1,64	41,9*	+9,2 ^o	1,5 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	12,8±0,65	77,1*	+21,0**	
	10 ⁻⁷	8,5±0,60	84,8*	+22,7***	
Formulación en (C)	10 ⁻⁹	27,7±1,22	50,4*	+22,4*	1,0 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	9,3±0,58	83,3*	+42,6*	
	10 ⁻⁷	6,5±0,47	88,4*	+40,9*	

(a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

25 (*) p < 0,001

(**) p < 0,01

30 (***) p < 0,05

(•) p < 0,002

35 (°) p > 0,05

Ejemplo 65. Evaluación comparativa de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto I-1 en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de paclitaxel : compuesto I-1 (1:6) con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio de cultivo con FBS al 5% (C)

40 Se convirtió la sal de sodio del compuesto I-1 en la forma ácida del compuesto I-1 y se disolvió en metanol. Se añadieron alícuotas iguales de disolución de paclitaxel en metanol a tres disoluciones idénticas del compuesto I-1 en metanol para formar disoluciones con una razón molar de paclitaxel : compuesto I-1 (1:3).

45 Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl₂ 2,3 mM, que contenía sal de sodio del compuesto I-1 y se disolvieron otras en solución salina normal, que contenían sal de sodio del compuesto I-1 para formar disoluciones iniciales de la formulación con una razón molar

deseada de paclitaxel : compuesto I-1 (1:6). La concentración de paclitaxel fue igual a 10^{-3} M en las tres disoluciones iniciales de la formulación.

5 Se prepararon las tres disoluciones de trabajo de la formulación en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a partir de estas disoluciones iniciales para añadir a los cultivos. La concentración de paclitaxel fue igual a 10^{-5} M en tres disoluciones de trabajo.

10 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones de formulación en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a cultivos de 200 μl hasta una concentración final de paclitaxel de 1×10^{-9} , 1×10^{-8} y 1×10^{-7} mol/l en los cultivos.

15 Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 21).

Tabla 21

Fármaco	Paclitaxel, mol/l	Número de células tumorales, 10^3	X	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
Control negativo	0	56,8±2,94				
Paclitaxel	10^{-9}	41,3±1,93		27,3*		$1,7 \times 10^{-8}$
	10^{-8}	32,2±1,60		43,3*		
	10^{-7}	16,0±0,72		71,8*		
Formulación en (A)	10^{-9}	29,9±1,06		47,4*	+27,6*	$1,5 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	22,8±0,75		59,9*	+29,2*	
	10^{-7}	9,7±0,42		82,9*	+39,4*	
Formulación en (B)	10^{-9}	34,0±1,49		40,1*	+17,7***	$6,0 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	26,2±0,86		53,9*	+18,6**	
	10^{-7}	11,9±0,61		79,0*	+25,6*	
Formulación en (C)	10^{-9}	29,2±0,94		48,6*	+29,3*	$1,2 \times 10^{-9}$
	10^{-8}	22,3±0,89		60,7*	+30,7*	
	10^{-7}	9,3±0,38		83,6*	+41,9*	

20 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) $p < 0,001$

25 (**) $p < 0,01$

(***) $p < 0,02$

30 (•) $p < 0,002$

35 Ejemplo 66. Evaluación comparativa de la citotoxicidad de la formulación de paclitaxel/compuesto I-1a + compuesto II-1a en cultivos de línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama humano a una razón molar de paclitaxel : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (2,5 + 2,5) con respecto a diluciones de su disolución inicial en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio de cultivo con FBS al 5% (C)

35 Se mezclaron alícuotas de disoluciones madre de la sal de sodio del compuesto I-1a y la sal de sodio del compuesto II-1a en etanol-agua (2:1, v/v) y se evaporaron en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se disolvieron las películas secadas resultantes en metanol. Se añadieron alícuotas iguales de disolución de paclitaxel en metanol a tres disoluciones idénticas, que contenían compuesto I-1a y compuesto II-1a en metanol para formar disoluciones con la razón molar deseada de paclitaxel : (compuesto I-1a + compuesto II-1a) de 1 : (2,5 + 2,5). Tras agitar, se evaporó el disolvente orgánico. Se disolvió una película secada resultante en solución salina con CaCl_2 2,3 mM y se disolvieron otras en solución salina normal. La concentración de paclitaxel fue igual a 10^{-3} M en las tres disoluciones iniciales de la formulación. Se prepararon las tres disoluciones de trabajo de la formulación en solución salina con CaCl_2 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a partir de estas disoluciones iniciales para añadir a los cultivos. La concentración de paclitaxel fue igual a 10^{-5} M en las tres disoluciones de trabajo.

45 Se trataron cultivos de células MDA-MB-231 con disoluciones de fármaco en el día 1 tras la siembra. Se añadieron alícuotas de disoluciones de trabajo (2 μl) con diferentes concentraciones de formulación en solución salina con

CaCl₂ 2,3 mM (A), solución salina normal (B) y medio con FBS al 5% (C) a cultivos de 200 µl hasta una concentración final de paclitaxel de 1 X 10⁻⁹, 1 X 10⁻⁸ y 1 X 10⁻⁷ mol/l en los cultivos.

5 Tras el cultivo durante dos días consecutivos, se contó el número de células viables en cultivos con el fin de evaluar la citotoxicidad de las disoluciones sometidas a prueba de la formulación (tabla 22).

Tabla 22

Fármaco	Paclitaxel, mol/l	Número de células tumorales, X 10 ³	Inhibición del crecimiento celular, %	Efecto positivo, %	CI ₅₀ mol/l (a)
Control negativo	0	58,5±1,76			
Paclitaxel	10 ⁻⁹	42,3±1,55	27,7*		1,7 X 10 ⁻⁸
	10 ⁻⁸	32,8±1,07	43,9*		
	10 ⁻⁷	16,6±0,86	71,6*		
Formulación en (A)	10 ⁻⁹	31,6±1,24	46,0*	+25,3*	2,2 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	24,4±1,06	58,3*	+25,6*	
	10 ⁻⁷	9,1±0,43	84,4*	+45,2*	
Formulación en (B)	10 ⁻⁹	36,8±1,94	37,1*	+13,0*	8,0 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	28,1±1,19	52,0*	+14,3***	
	10 ⁻⁷	12,4±0,85	78,8*	+25,3**	
Formulación en (C)	10 ⁻⁹	31,0±1,36	47,0*	+26,7*	1,7 X 10 ⁻⁹
	10 ⁻⁸	23,7±0,81	59,5*	+27,7*	
	10 ⁻⁷	8,7±0,52	85,1	+47,6*	

10 (a) Se usaron los datos de la inhibición del crecimiento celular, determinados a tres concentraciones diferentes, para calcular las concentraciones de fármaco que inhibían el crecimiento celular en un 50% en comparación con cultivos control sin tratar. Todos los datos son las medias de tres determinaciones, cada una en seis repeticiones.

(*) p < 0,001

15 (***) p < 0,01

(**) p < 0,02

20 (*) p < 0,05

Bibliografía

25 L. Collins-Gold, *et al.*, *Modern Drug Discovery*, 2000, vol. 3, n.º 3, págs. 44 - 46, 48 J.

E. Cortes, R. Pazdur, *J. Clin. Oncology*, 1995, vol. 13, págs. 2643-2655

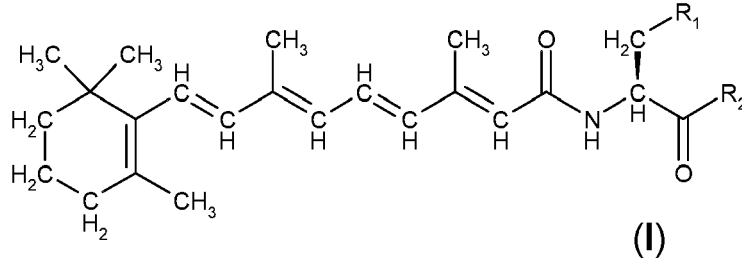
D. Faulds *et al.*, *Drugs*, 1991, vol. 41, n.º 3, págs. 400-449

30 D. A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.*, 1999, vol. 57, n.º 7, págs. 727-741

C. L. Vogel, J-M. Nabholz, *The Oncologist*, 1999, vol. 4, págs. 17-33

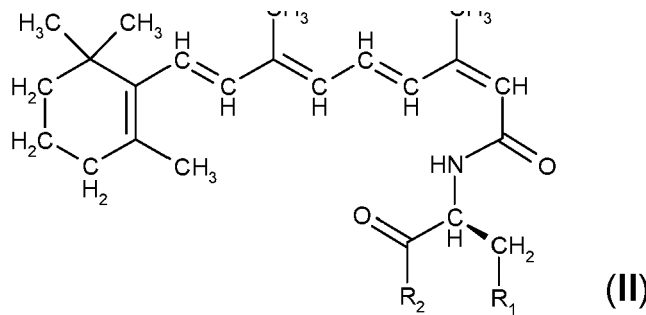
REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula estructural



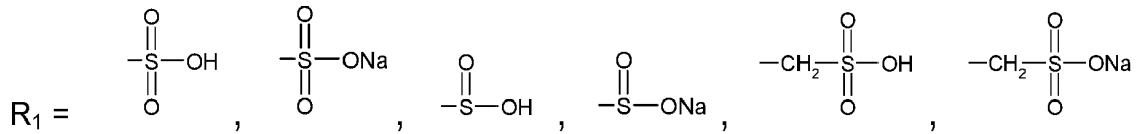
5

o



10

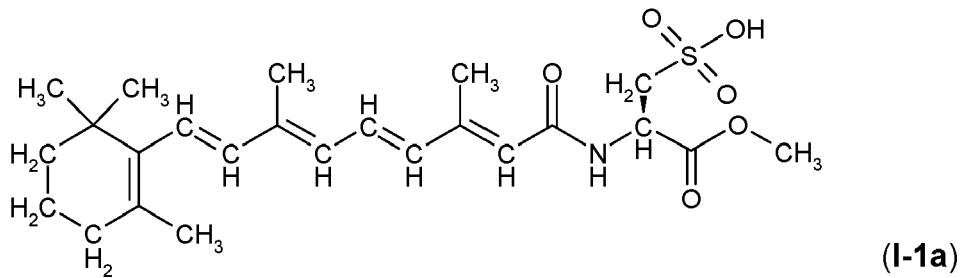
en las que R₁ se elige de



15

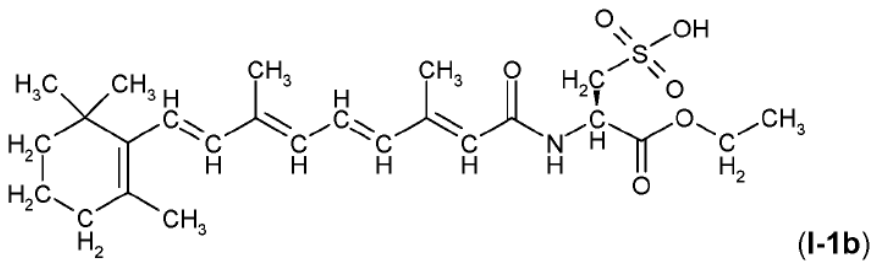
y R₂ se elige de NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂ u OX en el que X es un alquilo C₁-C₄.

2. Compuesto según la reivindicación 1, eligiéndose el compuesto de los siguientes



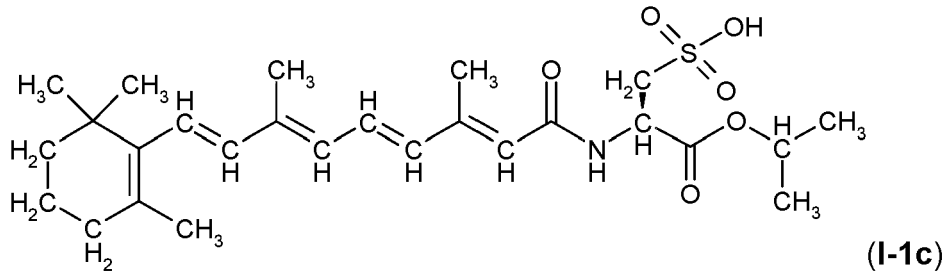
20

éster metílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

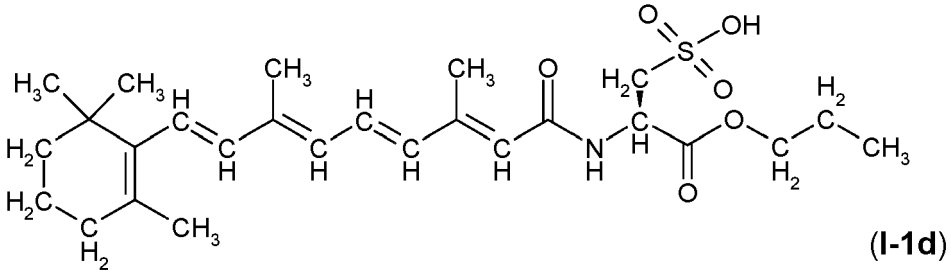


25

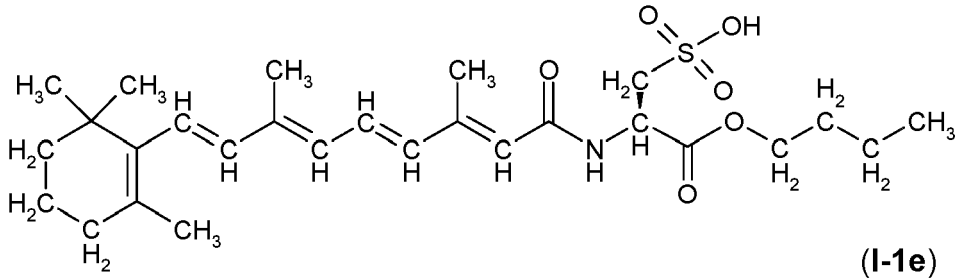
éster etílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



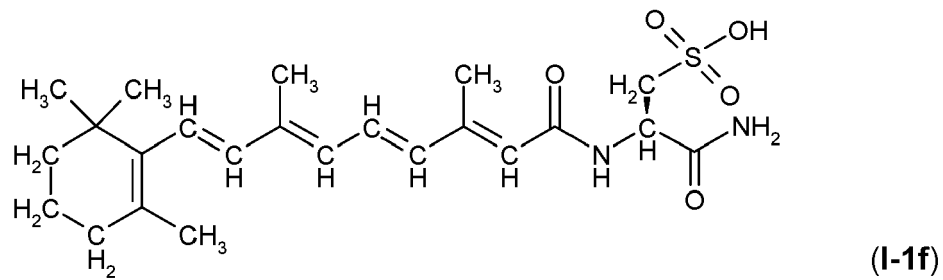
5 éster isopropílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



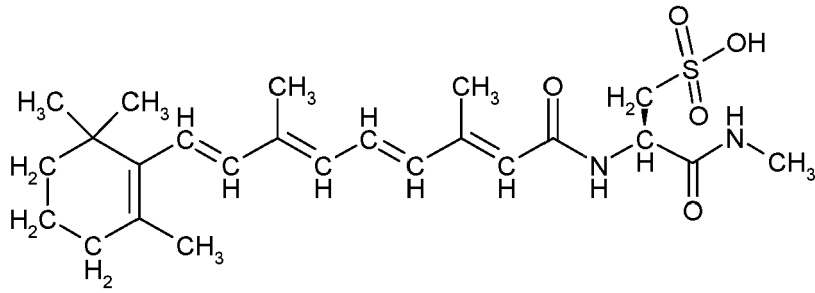
10 éster propílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



éster butílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico

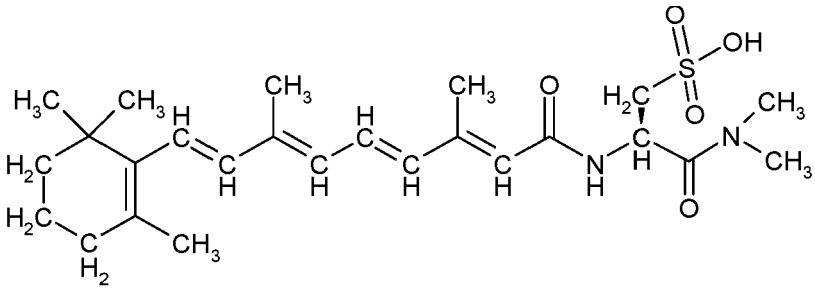


15 amida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



(I-1g)

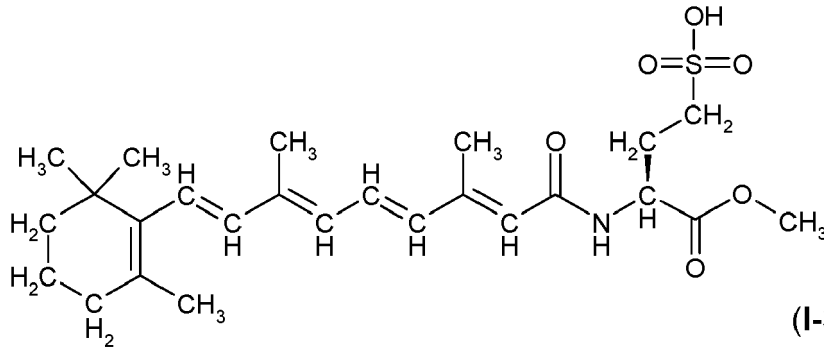
metilamida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



(I-1h)

5

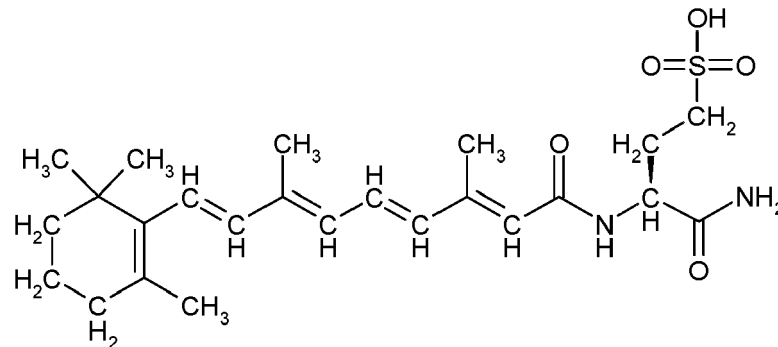
dimetilamida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-cisteico



(I-3a)

10

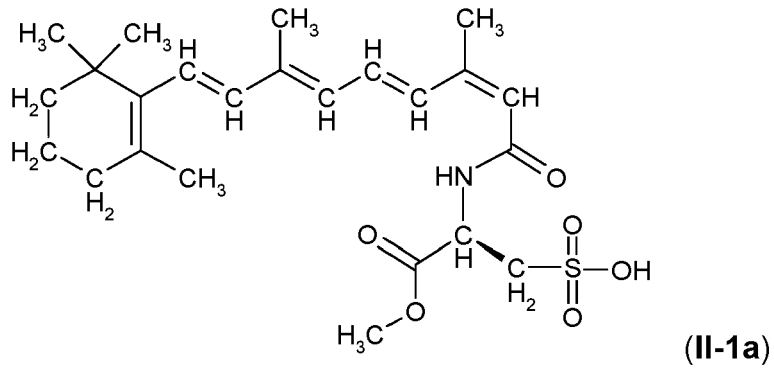
éster metílico del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico



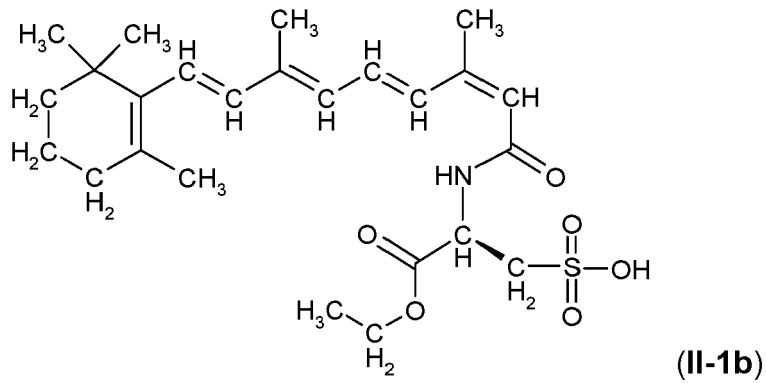
(I-3f)

15

amida del ácido N-(todo trans-retinoil)-L-homocisteico

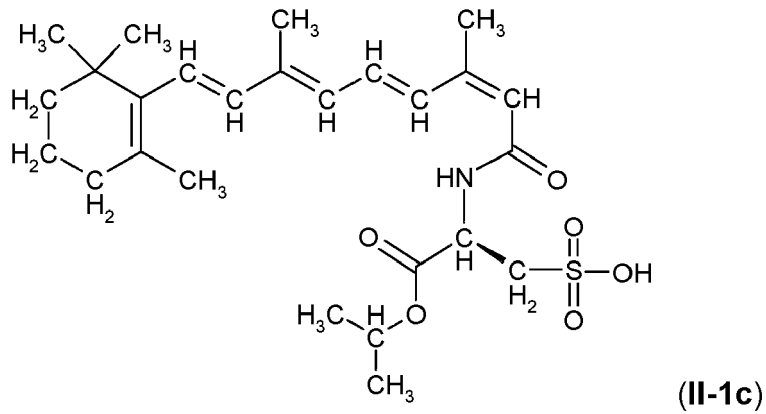


éster metílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



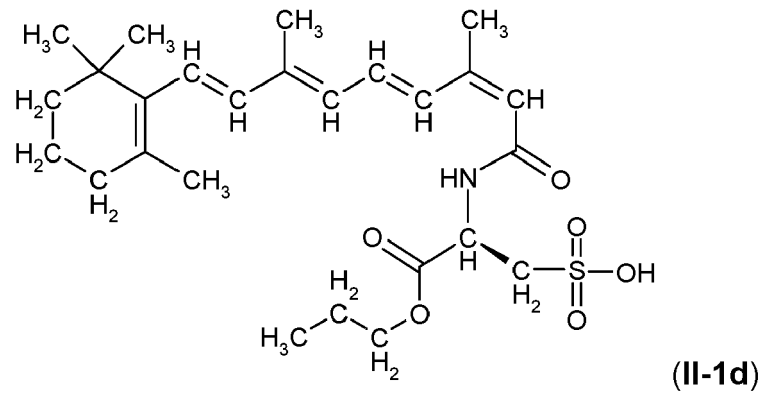
5

éster etílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico

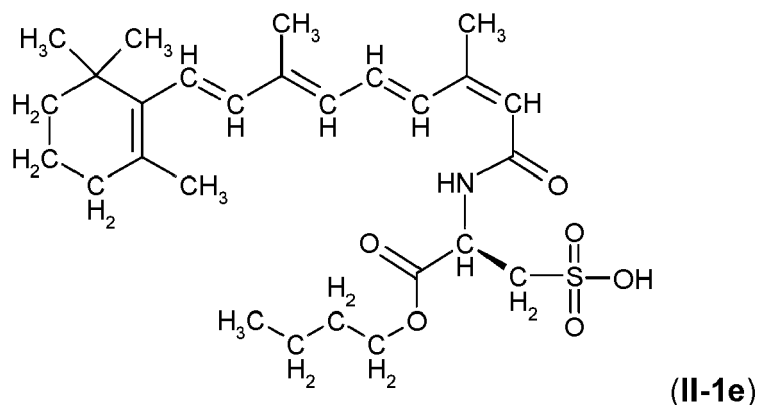


10

éster isopropílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico

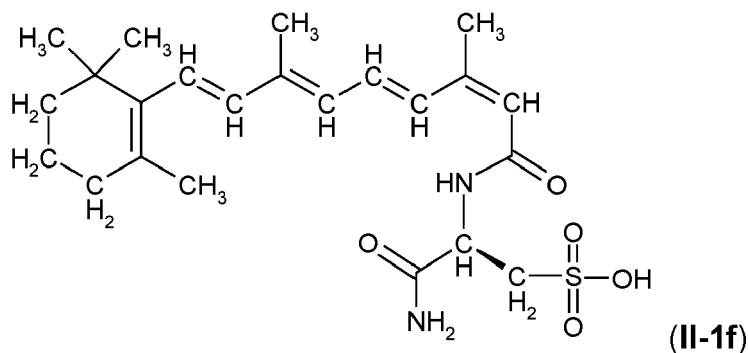


éster propílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



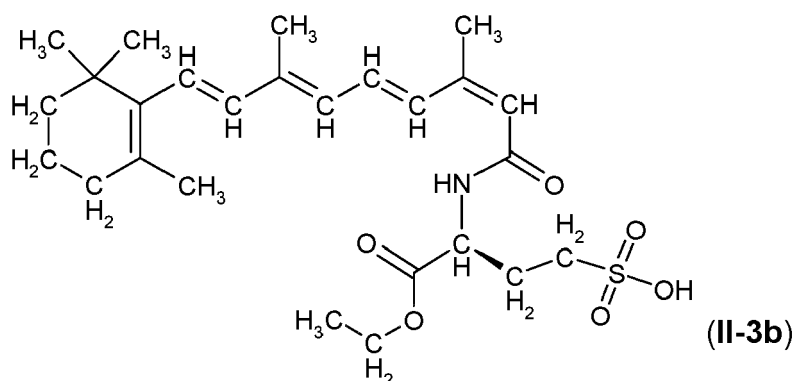
5

éster butílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



10

amida del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cisteico



15

éster etílico del ácido N-(13-cis-retinoil)-L-homocisteico

3. Sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto según la reivindicación 1 ó 2.
4. Sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto según la reivindicación 3, estando la sal caracterizada porque es una sal de sodio.
5. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 ó 2 para la preparación de un medicamento.
6. Uso según la reivindicación 5, caracterizado porque el medicamento es un medicamento para el tratamiento del cáncer.
7. Composición farmacéutica que comprende una sustancia activa en una cantidad terapéuticamente eficaz, estando dicha composición caracterizada porque comprende además un compuesto según la reivindicación

25

- 1.
- 5 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, caracterizada porque la sustancia activa es un compuesto citotóxico.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, caracterizada porque la sustancia activa se elige de docetaxel, paclitaxel, doxorubicina y mitoxantrona.
- 10 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, caracterizada porque la sustancia activa es paclitaxel presente en forma de Taxol[®].
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, caracterizada porque el compuesto según la reivindicación 1 está presente en forma de su sal de sodio.
- 15 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, caracterizada porque el compuesto según la reivindicación 1 está presente en forma de ácido.
- 20 13. Método para potenciar la eficacia de una sustancia farmacéuticamente activa, caracterizado porque dicha sustancia se prepara en forma micelar con un compuesto según la reivindicación 1.
- 25 14. Método para aumentar la solubilidad de una sustancia farmacéuticamente activa, caracterizado porque dicha sustancia se prepara en forma micelar con un compuesto según la reivindicación 1.
- 30 15. Método para mejorar la biodisponibilidad de una sustancia farmacéuticamente activa, caracterizado porque dicha sustancia se prepara en forma micelar con un compuesto según la reivindicación 1.
- 35 16. Método para mejorar las propiedades en almacenamiento de una sustancia farmacéuticamente activa, caracterizado porque dicha sustancia se prepara en forma micelar con un compuesto según la reivindicación 1.
- 40 17. Método para preparar una formulación soluble en agua de un compuesto farmacéutico escasamente soluble, que comprende las etapas de disolver dicho primer compuesto en un primer disolvente, disolver un segundo compuesto según la reivindicación 1 en un segundo disolvente, mezclar alícuotas de las disoluciones resultantes de dicho primer y dicho segundo compuesto en una razón molar deseada, y evaporar la mezcla resultante hasta sequedad.
- 45 18. Método para preparar una formulación de almacenamiento estable de un compuesto farmacéutico escasamente soluble, que comprende las etapas de disolver dicho primer compuesto en un primer disolvente, disolver un segundo compuesto según la reivindicación 1 en un segundo disolvente, mezclar alícuotas de las disoluciones resultantes de dicho primer y dicho segundo compuesto en una razón molar deseada.
- 50 19. Método para preparar una formulación de un compuesto farmacéutico escasamente soluble para su administración a un paciente, que comprende las etapas de disolver dicho primer compuesto en un primer disolvente, disolver un segundo compuesto según la reivindicación 1 en un segundo disolvente, mezclar alícuotas de las disoluciones resultantes de dicho primer compuesto y dicho segundo compuesto en una razón molar deseada, evaporar la mezcla resultante hasta sequedad formando un residuo de dicho primer compuesto y dicho segundo compuesto, disolver dicho residuo en agua, liofilizar la disolución resultante y reconstituir el residuo con un tercer disolvente adecuado para su administración a un paciente.
- 55 20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, caracterizado porque dichos disolventes primero y segundo son al menos un alcohol alifático.
21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, caracterizado porque dichos disolventes primero y segundo son etanol.
22. Método según la reivindicación 19, caracterizado porque dichos disolventes primero y segundo son al menos un alcohol alifático y el tercer disolvente es solución salina acuosa que contiene iones de calcio.