

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 249**

51 Int. Cl.:

A61K 31/09	(2006.01)	C07D 211/06	(2006.01)
A61K 31/165	(2006.01)	C07D 307/52	(2006.01)
A61K 31/325	(2006.01)	C07D 277/24	(2006.01)
A61K 31/34	(2006.01)	C07C 271/52	(2006.01)
A61K 31/425	(2006.01)	C07C 271/46	(2006.01)
A61K 31/4453	(2006.01)	C07C 211/03	(2006.01)
A61K 31/496	(2006.01)	C07C 43/205	(2006.01)
A61K 31/5377	(2006.01)	C07C 43/225	(2006.01)
C07D 241/04	(2006.01)		
C07D 265/30	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2007** **E 07843675 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2076252**

54 Título: **Derivados del NDGA tetrasustituidos por medio de enlaces éter y enlaces carbamatos y sus síntesis y usos farmacéuticos**

30 Prioridad:

02.10.2006 US 827776 P

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

14.07.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 476 249 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 del NDGA tetrasustituidos por medio de enlaces éter y enlaces carbamatos y sus síntesis y usos farmacéuticos

5

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. 60/827.776, presentada el 2 de octubre de 2006.

10

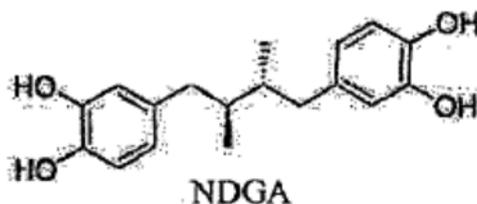
Antecedente de la invención

La presente invención se refiere a derivados del ácido nordihidroguaiarético, métodos de fabricarlos y métodos para utilizarlos para tratar infecciones víricas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, enfermedades vasculares (incluyendo las cardiovasculares) y enfermedades proliferativas, tales como el cáncer.

15

El ácido nordihidroguaiarético (NDGA, Fórmula I) tiene la estructura química siguiente, en la que hay dos grupos catecol, y un puente 2,3-dimetilbutano. El puente butano une dos restos catecol a través de una posición 4. El NDGA es un compuesto natural que se puede aislar de la resina de las hojas de *Larrea tridentata*, una planta del desierto, originaria del suroeste de los Estados Unidos y Méjico. Tiene una conformación de forma meso (2S, 3R), que es la estructura simétrica, y no es activo ópticamente.

20



Fórmula I

25

La investigación del NDGA y sus derivados ha atraído recientemente un interés creciente. Se ha informado de un gran número de derivados del NDGA, y se podrían clasificar de la siguiente manera:

30

Tipo 1: NDGA con unión éter, es el derivado más común, en el que un grupo sustituido está unido químicamente a uno o más de los grupos hidroxilo de restos de catecol.

Tipo 2: derivados del NDGA con unión éster, en los que un grupo sustituido está unido covalentemente a uno o más de los grupos hidroxilo de restos de catecol.

Tipo 3: derivados del NDGA con un anillo en el extremo, en el que dos grupos hidroxilo de los restos de catecol están unidos juntos para formar anillos de 5-6 miembros por medio de enlaces éter o carbonato.

35

Tipo 4: derivados del NDGA disustituidos, en los que un grupo hidroxilo del catecol está metilado, el otro está unido covalentemente a un grupo sustituido.

Tipo 5: modificaciones del anillo fenilo, en el que los grupos sustituidos están unidos químicamente a un anillo fenilo.

40

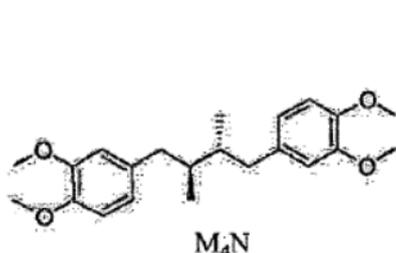
Tipo 6: modificaciones del puente butano, en el que dos grupos metilo del puente se eliminan o modifican por grupos sustituidos.

El NDGA y sus derivados tienen numerosas características. Como inhibidor de la lipooxigenasa, el NDGA puede inducir nefropatía quística en la rata.¹ Además, muestran varias bioactividades, incluyendo la inhibición de la proteína quinasa C,² inducción de la apoptosis,³ alteraciones de la membrana celular,⁴ elevación del nivel celular de Ca^{2+} ⁵ y activación de los canales del Ca^{2+} en las células del músculo liso,⁶ degradación de las fibrillas preformadas de beta-amiloide del Alzheimer en anti-oxidación *in vitro*,⁸ etc. Este producto NDGA natural se utiliza comercialmente como aditivo alimentario para conservar las grasas y la mantequilla en algunas partes del mundo. Recientemente los derivados del lignano vegetal NDGA se han utilizado para bloquear la replicación vírica por medio de la inhibición de la transcripción vírica.⁹⁻¹⁶ Estos compuestos pueden inhibir la producción de transcripciones del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH),⁹⁻¹³ virus del herpes simple (VHS),^{14,15} y del papilomavirus humano (VPH)¹⁶ desactivando los promotores dependientes de Spl. Además, el ácido (tetra-O-metil) nordihidroguaiarético (M₄N, Fórmula II, terameprocol) puede funcionar como un inhibidor de la transcripción provírico anti-VIH y produce la detención del crecimiento de varias células transformadas de ratón y humanas en cultivo y en el ratón.¹⁷⁻¹⁹ El compuesto M₄N está actualmente en ensayos clínicos contra los cánceres humanos.

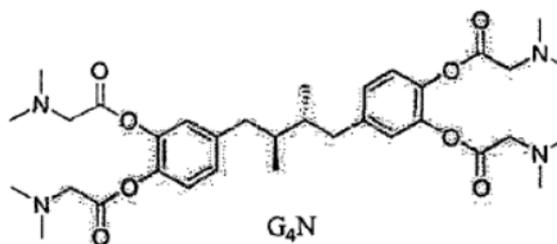
45

50

Aunque el M₄N (Fórmula II) es un agente anticáncer sorprendentemente eficaz y no tóxico, el M₄N y otros varios NDGA metilados, tienen todos poca solubilidad en agua que a veces limita su aplicación en ciertos estudios de acción de fármacos. Para sortear este problema, se ha diseñado y sintetizado un derivado del NDGA soluble, el ácido (tetra-O-dimetilglicil) nordihidroguaiarético (G₄N, Fórmula III).^{11,18} El documento WO 2006/041902 desvela los derivados del NDGA en el tratamiento del cáncer resistente a medicamentos, infección vírica y microbiológica.



Fórmula II



Fórmula III

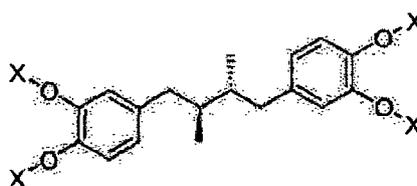
El G₄N es una mutación insensible que inhibe muy eficazmente el VIH-1, VHS-1 y VHS-2.¹⁷ Sin embargo, es algo inestable y tiene una semivida relativamente corta en solución acuosa, supuestamente debido a los enlaces éster que conectan los restos de dimetil glicina de la estructura principal del NDGA.¹⁸

Por lo tanto, hay necesidad de derivados del NDGA, algunos que tengan una mejor solubilidad en agua, así como una buena estabilidad, tanto compuestos hidrosolubles como compuestos hidrófobos que tengan los efectos farmacéuticos deseados. Los inventores han desarrollado nuevos derivados del NDGA que tienen estas ventajas y serán útiles en composiciones terapéuticas y en métodos de tratamiento.

Breve sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos derivados del ácido nordihidroguaiarético, composiciones farmacéuticas, métodos para fabricarlos, y métodos para usarlos y kits que los incluyen para el tratamiento de enfermedades y trastornos, en particular, enfermedades que resultan de o están asociadas con una infección vírica, una enfermedad inflamatoria, enfermedad metabólica, una enfermedad vascular o una enfermedad proliferativa.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto denominado "Sb₄N", que tiene la siguiente estructura general (Fórmula IV), así como sus sales farmacéuticamente aceptables:



Fórmula IV

El compuesto tiene una estructura de ácido nordihidroguaiarético (NDGA), designada por "N" en la denominación "Sb₄N". Los cuatro grupos X están sustituidos por H en los grupos NDGA hidroxilo (a veces denominado como el "grupo sustituido X") denominados por "Sb₄" en "Sb₄N".

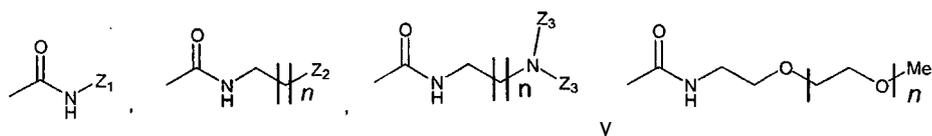
X se selecciona entre el grupo que consiste en:

-A-R;

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

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

un grupo unido a carbamato seleccionado entre el grupo que consiste en:



en las que n es un número entero de 1 a 6, Z₁ es una cadena hidrocarburo lineal saturada de 2-6 carbonos y opcionalmente 1-3 átomos de halógeno, Z₂ es un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente 0-3 dobles enlaces y opcionalmente que contiene 1-3 átomos de cualquiera de O, N y S, y Z₃ es metilo o etilo.

5 Cuando X es -A-R, R es un grupo terminal y A es una cadena lateral hidrocarburo saturada lineal con heteroátomos opcionales que está unida en un extremo a los grupos O de residuos hidroxilo respectivos por un enlace éter o un enlace carbamato y en el otro extremo a un carbono o un heteroátomo en el grupo terminal R.

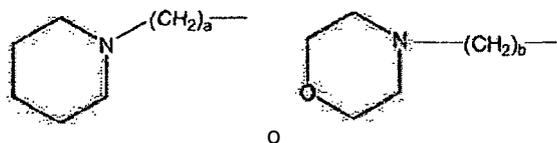
10 La cadena lateral A se selecciona entre el grupo que consiste en una cadena hidrocarburo C₂-C₁₆ saturada lineal, opcionalmente con 1-5 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, N y S, única a los grupos O de residuos hidroxilo respectivos de NDGA a través de un enlace éter; y 1-5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

15 El grupo terminal R se selecciona entre el grupo que consiste en:

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

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

Cuando X es



a es un número entero de 3 a 16 y b es un número entero de 4 a 16.

30 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende el compuesto Sb₄N y un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 Aún otro aspecto de la invención es un compuesto Sb₄N o una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento profilaxis.

Otro aspecto de la invención es el compuesto Sb₄N o una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento profilaxis de una infección vírica.

40 Aún otro aspecto de la invención es un compuesto Sb₄N o una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento profilaxis de una enfermedad proliferativa.

Otro aspecto de la invención es un compuesto Sb₄N o una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento profilaxis de una enfermedad inflamatoria.

45 Aún otro aspecto de la invención es un compuesto Sb₄N o una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento profilaxis de una enfermedad metabólica.

50 Aún otro aspecto de la invención es un compuesto Sb₄N o una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento profilaxis de una enfermedad vascular.

Todavía otro aspecto de la presente invención es un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el compuesto Sb₄N e instrucciones para su uso profiláctico o para tratar una infección vírica, una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad metabólica o una enfermedad vascular.

55

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos derivados del ácido nordihidroguaiarético, composiciones farmacéuticas que los contienen, y tales compuestos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades y trastornos, en particular, infecciones víricas, tales como, por ejemplo y sin limitación, infecciones causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), papilomavirus humano (PVH) (todos los subtipos), virus del herpes simple 1 y 2 (VHS 1 y VHS-2), virus varicela Zoster, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la viruela (viruela menor, viruela bovina, viruela del mono, vacunal), ortohepadnavirus, virus JC, y virus BK; enfermedades inflamatorias, tales como, por ejemplo y sin limitación, varios tipos de artritis y enfermedades inflamatorias del intestino grueso; enfermedades metabólicas, tales como, por ejemplo y sin limitación, diabetes; enfermedades vasculares, tales como, por ejemplo hipertensión, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular; y enfermedades proliferativas tales como varios tipos de cáncer.

La presente invención se basa en consideraciones que incluyen la experiencia con agentes utilizados para tratar el cáncer y los virus, incluyendo el VIH; derivados que tienen una estructura relacionada con NDGA; donde tales derivados tienen más potencia, mejor perfil PD/PK y menos o ningún efecto secundario con respecto al ácido (tetra-O-metil) nordihidroguaiarético (M₄N) (terameprocol), al menos algunas de sus formulaciones son biodisponibles por vía oral. Los derivados del NDGA de la presente invención están en la forma meso sin ninguna mezcla posible con sus enantiómeros, lo que los hará más fácilmente caracterizables química y biológicamente. Los grupos funcionales sustituyentes para las modificaciones del compuesto parental se seleccionan de entre los grupos químicos que se utilizan más comúnmente para las modificaciones con éxito de moléculas de fármacos. Se sintetizan fácilmente y se formulan fácilmente con una solubilidad acuosa razonable, en los que en forma de HCl u otra sal o en forma de base libre, tienen una solubilidad acuosa considerable. Otros de los derivados del NDGA de la presente invención son hidrófobos. Los derivados del NDGA de la presente invención tienen una buena estabilidad, tanto si son compuestos hidrosolubles como hidrófobos. Los derivados pueden producirse a gran escala para producción comercial.

Los derivados del NDGA de la presente invención se desarrollaron basándose en el hecho de que el NDGA es un compuesto natural con un amplio intervalo de actividades biológicas. El NDGA tiene muchos efectos secundarios, que son superados por los derivados de la invención. Los derivados han mejorado las actividades biológicas. La investigación que dio lugar al desarrollo de la presente invención también mostró que los derivados del NDGA con modificación del grupo hidroxilo, tales como el M₄N, evitan la replicación de las células tumorales e induce selectivamente la muerte de células tumorales (apoptosis). Esto se consigue evitando la producción regulada por Sp1 de cdc2 (p34) y survivina. La survivina es un inhibidor de la proteína de apoptosis (IAP) que está sobre-expresada en células precancerosas y cancerosas, y difícilmente se encuentra en células adultas sanas. El M₄N también evita la proliferación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple (VHS), y virus del papiloma humano (PVH). Esto se consigue por medio de la desactivación de los promotores dependientes del Sp1 vírico que son esenciales para la propagación vírica. Los derivados del NDGA de la presente invención mejorarán de manera importante sus actividades para evitar la producción de cdc2 regulada por Sp1 y survivina utilizando un grupo funcional adecuado para modificar el grupo hidroxilo del NDGA.

40

Definiciones

Un "tampón" adecuado para su uso en este documento incluye cualquier tampón convencional en la técnica, tal como, por ejemplo, Tris, fosfato, imidazol y bicarbonato.

45

Una "ciclodextrina", como se usa en este documento, se refiere a una ciclodextrina no modificada o una ciclodextrina modificada, e incluye, sin limitación, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina y cualquier ciclodextrina modificada que contiene modificaciones para la misma, tales como hidroxipropil- β -ciclodextrina ("HP- β -CD") o sulfobutil éter β -ciclodextrina ("SBE- β -CD"). La ciclodextrina tiene normalmente 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina) y 8 (γ -ciclodextrina) azúcares, hasta tres sustituciones por azúcar, y, por lo tanto, son posibles de 0 a 24 sustituciones primarias (las sustituciones primarias se definen como sustituciones conectadas directamente al anillo de ciclodextrina). Las ciclodextrinas modificadas y no modificadas usadas en la presente invención pueden tener cualquier número y ubicación apropiados de sustituciones primarias u otras modificaciones.

Un "derivado del NDGA" de la presente invención como se utiliza en el presente documento significa un derivado del NDGA designado como "Sb₄N" a partir de aquí.

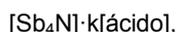
55

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación no tóxico de cualquier tipo convencional. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, el vehículo para una formulación que contiene los presentes butano catecólicos o derivados del NDGA no incluyen preferentemente agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para tales derivados. Los vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua, dextrosa, glicerol, solución salina, etanol, tampón, dimetil sulfóxido, Cremaphor EL, y combinaciones de los mismos. El vehículo puede contener agentes adicionales tales como agentes humectantes y agentes emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Se pueden añadir otros materiales tales como antioxidantes, humectantes, estabilizantes de la

65

viscosidad y agentes similares si fuera necesario.

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



en la que N es NDGA, Sb es un grupo sustituido X como se describe en las Tablas 1 y 2 que se indican a continuación, k es un número entero o no, y el ácido es un ácido orgánico o inorgánico, como se ilustra en la siguiente Tabla A no limitante:

Tabla A

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

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

Un "anillo" como se utiliza en el presente documento, a menos de que se especifique otra cosa, como se utilizan en el presente documento como en las expresiones " anillo de 4 miembros", " anillo de 6 miembros" y " anillo de 7 miembros", se refiere a un anillo carbocíclico con cualquiera de los heteroátomos indicados.

Los términos "sujeto", "huésped", y "paciente" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un animal que se trata con las presentes composiciones, que incluyen, pero sin limitarse a, simios, seres humanos, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales de granja mamíferos, animales deportivos mamíferos, y mascotas mamíferos.

Un compuesto "sustancialmente purificado" en relación con los derivados del NDGA en el presente documento es el que está sustancialmente libre de compuestos que no son el derivado del NDGA de la presente invención (de aquí en adelante, "materiales no derivados del NDGA"). Por sustancialmente libres se quiere decir que están libres en al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, y más preferentemente al menos el 90 % de materiales no derivados del NDGA.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratando", y similares, se refieren a que se obtiene un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcial de una afección o enfermedad o síntoma de las mismas y/o puede ser terapéutico en términos de curación parcial o completa de una afección o enfermedad y/o efecto adverso que se atribuye a la afección o enfermedad. "Tratamiento", por lo tanto, por ejemplo, cubre cualquier tratamiento de una afección o enfermedad en un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la afección o enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la afección o enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado como que la tiene; (b) inhibir la afección o enfermedad, tal como, detener su desarrollo; y (c) mitigar, aliviando o mejorando la afección o enfermedad, tal que, por ejemplo, se produzca la regresión de la afección o enfermedad.

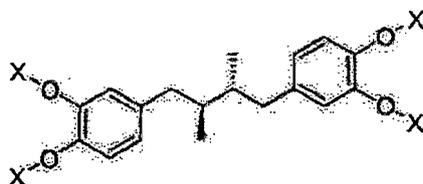
Esta invención se describe solamente por medio de ejemplos y no se interpretan de ninguna manera como limitantes de la invención. Por lo tanto, esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, que como tal pueden, por supuesto, variar. También se entenderá que la terminología utilizada en el presente documento tiene

finés solamente de describir realizaciones en particular, y no pretende ser limitante, ya que el ámbito de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas en una solicitud no provisional basada en esta solicitud provisional.

- 5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene entre el límite superior e inferior de ese intervalo es el límite inferior de la décima de unidad, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, y cualquier otro valor establecido o que interviene en ese intervalo establecido, se engloba en la invención. Los límites superior e inferior de los intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en intervalos más pequeños, y también están englobados en la invención, sujeto a cualquier límite que se excluya específicamente del intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

15 Se debe señalar que como se utiliza en el presente documento, las formas en singular de "un", "una" y "el/la" incluyen los respectivos plurales a menos que el contexto dicte otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo en referencia a "un derivado" se incluye una pluralidad de tales derivados y la referencia a "el derivado del NDGA" incluye la referencia a uno o más derivados del NDGA y los equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación.

20 Como se ha indicado anteriormente, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto del derivado de ácido nordihidroguaiarético Sb_4N que tiene la siguiente estructura general (Fórmula IV), así como sus sales farmacéuticamente aceptables:



Sb_4N

Fórmula IV

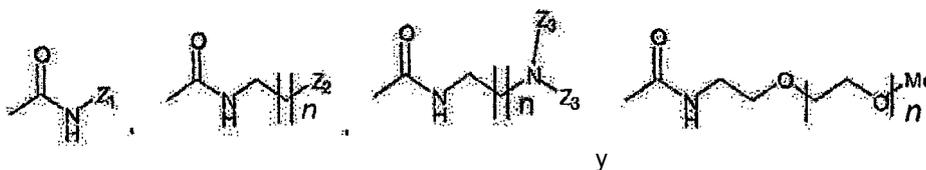
- 25 El compuesto tiene una estructura de ácido nordihidroguaiarético (NDGA), denominada por "N" en la denominación " Sb_4N ". Los cuatro grupos X están sustituidos por H en los grupos NDGA hidroxilo (a veces denominado como el "grupo sustituido X") denominado por " Sb_4 " en " Sb_4N ". X se selecciona entre el grupo que consiste en:

30 -A-R;

-(CH_2)_xHal, en la que x es un número entero de 1 a 10, y Hal es un átomo de halógeno, concretamente cualquiera de cloro, flúor, bromo o yodo;

-(CH_2CH_2O)_yH, en la que y es un número entero de 1 a 10; y

- 35 un grupo unido a carbamato seleccionado entre el grupo que consiste en:

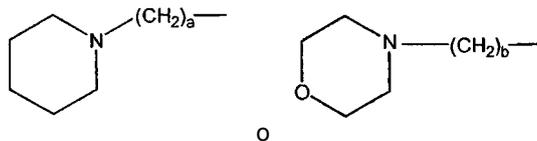


en las que n es un número entero de 1 a 6, Z_1 es una cadena hidrocarburo lineal saturada de 2-6 carbonos y opcionalmente 1-3 átomos de halógeno, Z_2 es un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente 0-3 dobles enlaces y opcionalmente que contiene 1-3 átomos de cualquiera de O, N y S, y Z_3 es metilo o etilo.

- 40 Cuando X es -(CH_2)_xHal, x es preferiblemente de 1 a 3, y Hal es cloro o flúor; más preferiblemente, en este caso, X es -(CH_2)₂F, por ejemplo.

- 45 Cuando X es -(CH_2CH_2O)_yH, y es preferiblemente de 1 a 3, y más preferiblemente, por ejemplo, en este caso, X es -(CH_2)₂OH (cuando y es 1); o -(CH_2)₂O-(CH_2)₂-OH (cuando y es 2).

Una condición es cuando X es



a es un número entero de 3 a 16 y b es un número entero de 4 a 16.

5 Con las definiciones adicionales anteriores de X y la condición, la cadena lateral A y los grupos terminales R pueden seleccionarse entre aquellos expuestos en el Breve Sumario de la Invención anterior, en el que la cadena lateral A y los grupos terminales R se exponen en forma de tabla en la siguiente Tabla 1:

10

Tabla 1

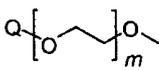
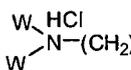
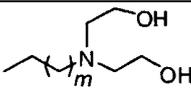
Cadena lateral A	<ul style="list-style-type: none"> cadena hidrocarburo C₂-C₁₆ saturada lineal opcionalmente con 1-5 N, O o S heteroátomos, y la cadena se une en un extremo a los grupos hidroxilo respectivos del residuo O de NDGA a través de un enlace éter y en el otro extremo a un carbono o heteroátomo del grupo terminal R 1-5 unidades de cadena de polietilenglicol (PEG)
R es un anillo de 7 miembros	<ul style="list-style-type: none"> anillo totalmente saturado de 7 a miembros con 1 a 3 N, O o S heteroátomos anillo de 7 miembros que contiene de 1 a 3 dobles enlaces con 1 a 3 N, O o S heteroátomos anillo de 7 miembros que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida
R es un anillo de 6 miembros	<ul style="list-style-type: none"> anillo totalmente saturado de 6 miembros con 1 a 3 N, O o S heteroátomos anillo de 6 miembros que contiene de 1 a 3 dobles enlaces con 1 a 3 N, O o S heteroátomos anillo de 6 miembros que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida
R es un anillo de 5 miembros	<ul style="list-style-type: none"> anillo totalmente saturado de 5 miembros con 1 a 3 N, O o S heteroátomos anillo de 5 miembros que contiene de 1 a 2 dobles enlaces con 1 a 3 N, O o S heteroátomos anillo de 5 miembros que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida
R es un grupo soluble en agua	<ul style="list-style-type: none"> una sal de metal alcalino de ácido sulfónico una sal de metal alcalino de ácido fosfónico una sal farmacéuticamente aceptable, tal como se muestra en la Tabla A un azúcar un grupo polihidroxilo

15 Ejemplos no limitantes de una cadena lateral adecuada A son una cadena lineal C₂-C₄, tal como etileno, propileno o butileno, unida en un extremo a los grupos O del residuo hidroxilo respectivo de NDGA a través de un enlace éter; cadena lineal C₂-C₄, tal como etileno, propileno o butileno, con un O o N heteroátomo, y la cadena se une a los grupos O del residuo hidroxilo respectivo de NDGA a través de un enlace éter; de 1-3 unidades de una cadena de polietilenglicol (PEG); o un enlace carbamato. La cadena lateral se une en el otro extremo a un carbono o un heteroátomo del grupo terminal R.

20 Se exponen ejemplos no limitantes de grupos terminales adecuados R en la siguiente Tabla 2:

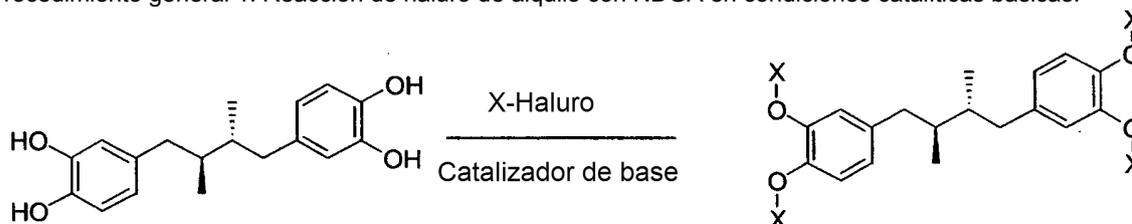
Tabla 2

<p>R es un anillo carbocíclico de 5-7 miembros que contiene 1-3 N, O o S heteroátomos</p>	
---	--

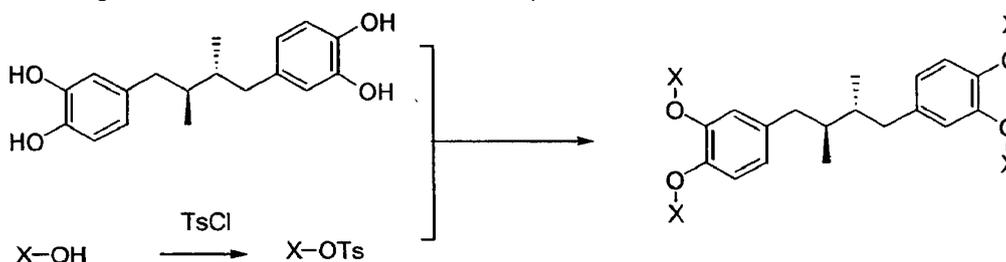
<p>R es polihidroxi, azúcar, u otro grupo soluble en agua, en el que m es un número entero de 2 a 6</p>	 <p>Q = H, Me</p>	 <p>W = Me, Et</p>		<p>-(CH₂)_mSO₃Na -(CH₂)_mPO₃Na -(CH₂)_mSO₂NH₂ Azúcar</p>
---	--	---	--	--

Los procedimientos generales para sintetizar los derivados de NDGA unidos a éter son como se indican a continuación:

- 5 Procedimiento general 1: Reacción de haluro de alquilo con NDGA en condiciones catalíticas básicas:

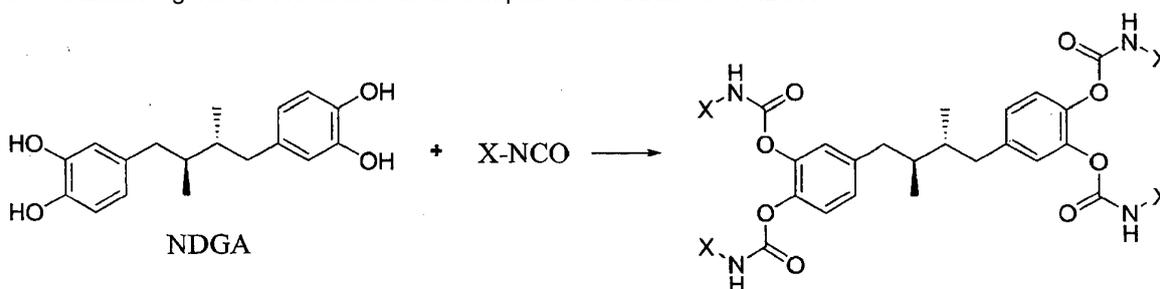


Procedimiento general 2: Reacción de alcohol activado por ácido toluenosulfónico con NDGA:

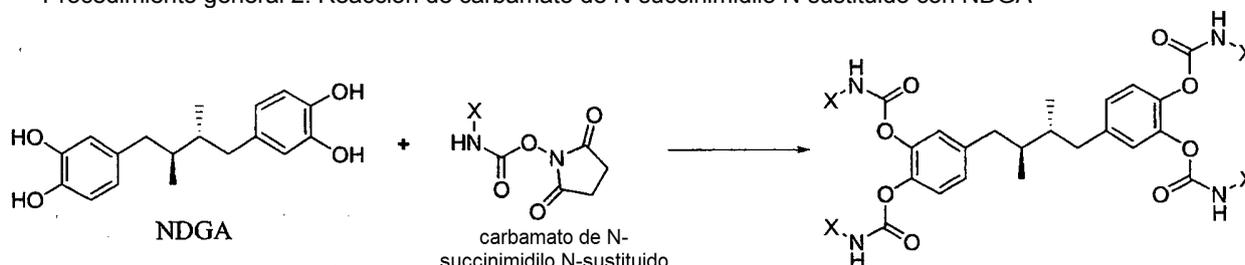


- 10 Los procedimientos generales para sintetizar los derivados de NDGA unidos a carbamato son como se indican a continuación:

Procedimiento general 1: Reacción de un compuesto isocianato con NDGA



- 15 Procedimiento general 2: Reacción de carbamato de N-succinimidilo N-sustituido con NDGA



- 20 A continuación se expondrán detalles de la preparación de compuestos del derivado NDGA específico ejemplar de acuerdo con la presente invención en la sección de Ejemplos.

- Los presentes derivados del NDGA en una formulación adecuada, preferentemente pero no exclusivamente como el principio activo o como uno de dos o más principios activos en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente donde sea apropiado, se puede administrar con seguridad a un sujeto en necesidad de tal tratamiento por suministro intranasal, por inhalación, por vía intravenosa tal como por infusión o por inyección por ejemplo en una vena central, intraarterial (con o sin oclusión) por vía intraperitoneal, intersticial,

subcutánea, transdérmica, intradérmica, intraocular, intramuscular, tópica, intracraneal, intraventricular, oral, o bucal o por implantación.

5 Además, los derivados del NDGA se pueden administrar con seguridad a un sujeto que necesita tal tratamiento en forma de solución, de suspensión, semisólida o sólida como sea apropiado, o en formulaciones de liposomas, o formulaciones micelares para la administración por medio de una o más de las vías mencionadas anteriormente.

10 Además, los derivados del NDGA en formulaciones de liposomas, formulaciones de nanopartículas, o formulaciones micelares se pueden embeber en una formulación de polímero biodegradable y administrarse con seguridad, tal como por implantación subcutánea.

15 Las composiciones para administrarse del presente documento, pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como y sin limitación, en solución, suspensión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo, en líquido que sea tanto hidrofílico como hidrofóbico, en polvo tal como el que resulta de la liofilización, en aerosol, en una composición acuosa o soluble en agua, en una composición hidrofóbica, en una composición de liposomas, en una composición en micelas tal como la que se basa en Tween® 80 o en polímeros dibloqueados, en una composición de nanopartículas, en una composición de polímero, en una composición de complejo de ciclodextrina, en una emulsión, o como nanopartículas basadas en lípidos llamadas "lipocores".

20 La presente invención engloba además composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden los derivados del NDGA y vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones pueden incluir un tampón, que se selecciona de acuerdo con el uso deseado de los derivados del NDGA, y pueden también incluir otras sustancias apropiadas para el uso que se pretende. Los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente un tampón apropiado, una amplia variedad de los cuales se conocen en la técnica, adecuados para el uso que se pretende, en vista de la presente divulgación. En algunos casos, la composición puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, varios los cuales se conocen en la técnica. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la presente invención se describen en varias publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Gennaro (Gennaro, A., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins, (1995)); Ansel, y col. (Ansel, H.C. y col., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins (1999)); y Kibbe (Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición Amer. Pharmaceutical Assoc.).

35 Las composiciones del presente documento se formulan de acuerdo con el modo de administración potencial. Por tanto, si se pretende que la composición se administre por vía intranasal o por inhalación, por ejemplo, la composición se puede convertir en una forma en polvo o en aerosol, como es convencional en la técnica, para tales fines. Otras formulaciones, tales como para suministro oral o parenteral, se utilizan también como es convencional en la técnica.

40 Las composiciones de las formulaciones adecuadas para el suministro oral o inyectable incluyen adicionalmente una composición farmacéutica que contiene un butano catecólico para el tratamiento de las enfermedades indicadas en las que la composición se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable y otros excipientes opcionales, en los que el vehículo comprende al menos uno de entre un agente solubilizante y un excipiente seleccionado de entre el grupo que consiste en: (a) un disolvente orgánico soluble en agua; (b) un tensioactivo iónico, no iónico o anfipático; (d) una celulosa modificada; (e) un lípido insoluble en agua; y una combinación de cualquiera de los vehículos (a) – (e).

50 Los disolventes orgánicos solubles en agua pueden ser preferentemente, pero no necesariamente, distintos del dimetil sulfóxido. Disolventes orgánicos solubles en agua ejemplares sin limitación incluyen el polietilenglicol ("PEG"), por ejemplo, PEG 300, PEG 400, o PEG 400 monolaurato, propilenglicol ("PG"), polivinilpirrolidona ("PVP"), etanol, alcohol bencílico o dimetilacetamida.

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

55 El tensioactivo iónico, no iónico, o anfipático puede incluir, por ejemplo sin limitación, un tensioactivo tal como polioxi-etilen monolaurato de sorbitán (también conocido como polisorbato), que es un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80, disponible comercialmente como Tween® 20 o Tween® 80, d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 succinato ("TPGS"), monooleato de glicerol (también conocido como gliceril monooleato), y ácidos grasos esterificados o un producto de reacción entre el óxido de etileno y aceite de ricino en una relación molar de 35:1, disponible comercialmente como Cremophor® EL. Preferentemente, para ciertas realizaciones, cuando el tensioactivo es un tensioactivo no iónico, el tensioactivo no iónico está presente en ausencia de goma xantana.

65 Ejemplos no limitantes de una celulosa modificada incluyen la etil celulosa ("EC"), hidroxilpropil metilcelulosa ("HPMC"), metilcelulosa ("MC") o carboximetil celulosa ("CMC"), En una realización de la invención, el butano catecólico se puede solubilizar en celulosas modificadas que pueden diluirse en etanol ("EtOH") antes de su uso.

Los lípidos insolubles en agua incluyen, por ejemplo, un aceite o aceites, tales como el aceite de ricino, aceite de sésamo o aceite de menta, una cera o ceras, tales como cera de abeja o cera de carnaúba, y composiciones de emulsión de grasas mezcladas tal como Intralipid® (Farmacia & Upjohn, ahora Pfizer), que se utiliza según las recomendaciones del fabricante. Por ejemplo, se recomienda que la dosificación de un adulto no exceda los 2 g de grasa/kg de peso corporal/día (20 ml, 20 ml y 6,7 ml/kg de Intralipid® al 10 %, 20 % y 30 %, respectivamente). Se cree que Intralipid® al 10 % contiene por cada 1.000 ml: 100 g de aceite de soja purificado, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, 22 g de glicerol anhidro, agua para inyección hasta los 1.000 ml. El pH se ajusta con hidróxido sódico a un pH de aproximadamente 8. El Intralipid® al 20 % contiene por cada 1.000 ml: 200 g de aceite de soja purificado, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, 22 g de glicerol anhidro, agua para inyección hasta los 1.000 ml. El pH se ajusta con hidróxido sódico a un pH de aproximadamente 8. El Intralipid® al 30 % contiene por cada 1.000 ml: 300 g de aceite de soja purificado, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, 16,7 g de glicerol anhidro, agua para inyección hasta los 1.000 ml. El pH se ajusta con hidróxido sódico a un pH de aproximadamente 7,5. Estos productos Intralipid® se almacenan a una temperatura controlada por debajo de 25 °C y no se deberían congelar.

El derivado del NDGA se puede disolver o puede estar disuelto o diluido en diferentes vehículos para formar una composición líquida para administración en animales, incluyendo los seres humanos. Por ejemplo, en un aspecto de esta realización el derivado del NDGA se disuelve en un disolvente orgánico soluble en agua tal como PEG 300, PEG 400, o PEG 400 monolaurato (los "compuestos PEG") o en PG. En otra realización, el derivado del NDGA se disuelve en una ciclodextrina modificada, tal como HP-β-CD o SB-β-CD. En otra realización más, el presente derivado del NDGA se solubiliza y/o diluye en una formulación de combinación que contiene un compuesto PEG y HP-β-CD. En una realización más, el derivado del NDGA del presente documento se disuelve en una celulosa modificada tal como HPMC, CMC, o EC. En otra realización más, el derivado del NDGA del presente documento se disuelve en otra formulación de combinación que contienen tanto una ciclodextrina modificada como una celulosa modificada, tales como por ejemplo, HP-β-CD y HPMC o HP-β-CD y CMC.

El derivado del NDGA se puede disolver en tensioactivos iónicos, no iónicos o anfipáticos tales como el Tween® 20, Tween® 80, TPGS o un ácido graso esterificado. Por ejemplo, los presentes compuestos se pueden disolver en TPGS solo o Tween® 20 solo, o en combinaciones tales como TPGS y PEG 400 o Tween® 20 y PEG 400.

El presente derivado del NDGA puede disolverse en un lípido insoluble en agua tal como una cera, una emulsión grasa, por ejemplo Intralipid® o un aceite. Por ejemplo, los compuestos presentes se pueden disolver en aceite de menta solo, o en combinaciones de aceite de menta con Tween® 20 y PEG 400, o aceite de menta con PEG 400, o aceite de menta con Tween® 20, o aceite de menta con aceite de sésamo.

La EC puede sustituir o añadirse en lugar de la HPMC o CMC en los ejemplos anteriores; se puede sustituir o añadir PEG 300 o PEG 400 monolaurato en lugar de PEG 400 en los ejemplos anteriores; se puede sustituir o añadir Tween® 80 en lugar de Tween® 20 en los ejemplos anteriores; y otros aceites tales como el aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite mineral o glicerol pueden sustituir el lugar del aceite de menta o aceite de sésamo en los ejemplos anteriores.

Además, se puede aplicar calor, por ejemplo, calentar a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C, en el transcurso de la formulación de cualquiera de estas composiciones para conseguir una disolución de los compuestos del presente documento o para obtener una solución distribuida uniformemente del derivado del NDGA.

En otra realización más, el derivado NDGA se puede administrar por vía oral como un sólido, sea sin el acompañamiento de algún vehículo o con el uso de vehículos. En una realización, el derivado del NDGA se disuelve primero en un vehículo líquido como en los ejemplos anteriores, y posteriormente se produce una composición sólida para su administración como una composición oral. Por ejemplo, el derivado el NDGA se disuelve en una ciclodextrina modificada tal como HP-β-CD, y la composición se liofiliza para obtener un polvo que es adecuado para la administración vía oral.

El derivado del NDGA se puede disolver o suspender en solución TPGS, calentando apropiadamente para obtener una solución o una suspensión distribuida uniformemente. Al enfriarse, la composición se vuelve cremosa y es adecuada para su administración vía oral.

El derivado del NDGA que se puede disolver en aceite y cera de abejas se añade para producir una composición cérea sólida.

En general, en la preparación de las formulaciones orales, el derivado del NDGA del presente documento primero se solubiliza antes de que se añadan otros excipientes de forma que se producen composiciones de alta estabilidad. Las formulaciones inestables no son deseables. Las formulaciones líquidas inestables forman frecuentemente precipitados cristalinos o soluciones bifásicas. Las formulaciones sólidas inestables aparecen frecuentemente granuladas o grumosas y a veces rezuman líquido. Una formulación sólida óptima tiene un aspecto suave, homogéneo, y tiene un intervalo de temperatura de fusión pequeño. En general, las proporciones de excipientes en

la formulación pueden influir en la estabilidad. Por ejemplo, demasiado poco agente de rigidez tal como la cera de abeja puede dejar la formulación demasiado líquida para una formulación oral elegante.

5 Por consiguiente, en general, para las formulaciones líquidas de la presente invención, los excipientes que se utilizan deberían ser buenos disolventes del derivado del NDGA del presente documento. En otras palabras. Los excipientes deberían ser capaces de disolver el derivado del NDGA sin calentarlos. Los excipientes deberían también ser compatibles unos con otros independientemente del derivado del NDGA de forma que puedan formar una solución, suspensión o emulsión estable. También, en general, para las formulaciones sólidas de la presente invención, los excipientes utilizados deberían ser también buenos disolventes del derivado del NDGA para evitar grumos y formulaciones no uniformes. Para evitar que las formulaciones sólidas sean demasiado líquidas o de textura heterogénea, que son indeseables, los excipientes deberían ser compatibles entre ellos tal que formen un sólido homogéneo suave, incluso en ausencia del derivado del NDGA.

15 Un método de producción de la composición farmacéutica de la presente invención implica fabricar o proporcionar el derivado del NDGA preferentemente en una forma sustancialmente purificada, que combina la composición con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y formulando la composición de manera que sea compatible con el modo de administración deseada.

20 Los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos en situaciones, por ejemplo, en las que se desea proporcionar un tratamiento a un sujeto que tiene una enfermedad proliferativa tal como un tumor maligno, premaligno o benigno, una enfermedad vírica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad metabólica o una enfermedad vascular.

25 Los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar varios tumores y cánceres que incluyen, sin limitación, enfermedades malignas hematológicas tales como leucemia, por ejemplo leucemia linfoblástica aguda o crónica, leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfocítica aguda o crónica, leucemia de células pilosas, células T cutáneas malignas, micosis fungoides, linfoma de células T cutáneo fibroso no maligno, papulosis linfomatoide, hiperplasia linfoide cutánea rica en células T, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, penfigoide bulloso, lupus eritematoso discoide, liquenificación plana, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, tumores neurológicos y enfermedades malignas tales como neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma, gliomas, glioma del tallo cerebral, tumor ependimoma cerebral, meduloblastoma, cáncer de mama femenino y masculino, tumor carcinoide gastrointestinal, carcinoma adrenocortical, carcinoma de islotes celulares, cáncer de células claras, sarcoma de células claras de la vaina tendinosa, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, tumores de la familia de los tumores de Ewing, tumor de células germinales extragonadales, cáncer extrahepático del conducto biliar, cáncer de ojo, melanoma intraocular, cáncer ductal, cáncer retinoblastoma de ojo, mucosa oral displásica, tumor oral invasivo, cáncer de vesícula, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, cáncer hepatocelular (hígado), cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, carcinoma de islotes celulares (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer laríngeo, cáncer de hígado, tumores de pulmón y cánceres tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de merkel, síndrome neoplásico endocrino múltiple, micosis fungoides, mieloma múltiple, tumores de la cavidad nasal, cáncer paranasal y sinusal, cáncer nasofaríngeo, cáncer de la cavidad oral y labios, cáncer orofaríngeo, cáncer pancreático, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentorial y pineal, tumor hipofisario, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales renales, pelvis y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivares, sarcoma de tejidos blandos del adulto, síndrome de Secary, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, tumores y cáncer testicular, timoma, cáncer de tiroides, cáncer uretral, carcinoma de células escamosas y transicionales urinarias, tumores ginecológicos y cánceres tales como el cáncer cervical, tumores y cáncer ováricos, cáncer epitelial ovárico, tumor de células germinales ováricas, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer vaginal, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms, tumores de hígado incluyendo el carcinoma hepatocelular ("HCC") y tumores del conducto biliar, otros tumores pulmonares incluyendo los cánceres de células pequeñas y de células claras, sarcomas en diferentes órganos; así como otros cánceres y tumores.

55 Ejemplos no limitantes de enfermedades víricas que se pueden tratar eficazmente por los derivados del NDGA de la presente invención, incluyen, por ejemplo y sin limitación, las infecciones víricas producidas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), papilomavirus humano (PVH) (todos los subtipos), virus del herpes simple 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), virus de la varicela Zoster, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la viruela (viruela menor, viruela bovina, viruela del mono, vacunal), ortohepadnavirus, virus JC y virus BK, entre otros.

65 Ejemplos no limitantes de enfermedades inflamatorias que se pueden tratar eficazmente con los derivados del NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, sarcoidosis, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Stills, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedades inflamatorias del intestino grueso tales como la colitis ulcerativa y de Crohn, entre otras.

Ejemplos no limitantes de enfermedades metabólicas que se pueden tratar eficazmente con los derivados del NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus (de aparición juvenil o de aparición en el adulto), diabetes insípida, síndrome X, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipoglucemia, ateroma, cetoacidosis, enfermedad de Addison, síndrome de Cushing, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, leucodistrofia y porfiria, entre otros.

5 Ejemplos no limitantes de enfermedades vasculares que se pueden tratar eficazmente con los derivados del NDGA de la presente invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, hipertensión arterial, hipertensión arterial pulmonar, enfermedad cardiovascular y degeneración macular, entre otras.

10 Como se ha mencionado anteriormente, se administra al huésped una cantidad eficaz del derivado del NDGA, donde "cantidad eficaz" significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado. En algunas realizaciones, el resultado deseado es al menos la reducción en uno o más síntomas de la infección vírica o la enfermedad inflamatoria, metabólica, proliferativa o vascular. Normalmente, las composiciones de la presente invención contendrá desde menos de aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 99 % del principio activo, es decir, el derivado del NDGA de la presente invención; opcionalmente, la presente invención contendrá aproximadamente de un 5 % a aproximadamente un 90 % del principio activo. La dosis apropiada se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar, tal como por ejemplo, la salud general del sujeto, la edad del sujeto, el estado de la enfermedad o afección, el peso del sujeto. Generalmente, se pueden administrar a un niño de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg y se pueden administrar a un adulto de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 gramos. El derivado del NDGA se puede administrar en una dosis única o, más normalmente, en dosis múltiples de forma frecuente y durante un periodo de tiempo tal como el que sea necesario para tratar la enfermedad. Las dosificaciones preferidas para un agente determinado las determinan fácilmente los expertos en la técnica por varios medios en vista de la presente divulgación, a través de ensayos de rutina que establecen las curvas de respuesta a la dosis. La cantidad del derivado del NDGA variará, por supuesto, dependiendo del derivado del NDGA que se utilice, así como la naturaleza de la formulación que contiene el derivado del NDGA, y la vía de administración, el tamaño y condición del sujeto, la naturaleza y la extensión de la enfermedad, etc.

25 La frecuencia de administración del derivado del NDGA, así como con las dosis, se determinarán por el asistente basándose en la edad, el peso, estado de la enfermedad, estado sanitario y respuesta del paciente. Por lo tanto los agentes se pueden administrar una o más veces diariamente o como sea apropiado durante el tiempo que sea necesario como se determina convencionalmente.

30 Se incluyen en la presente invención kits con dosis múltiples o unitarias del derivado del NDGA. En tales kits, además de los envases que contienen las dosis múltiples o unitarias de las composiciones que contienen el derivado del NDGA, habrá instrucciones de uso para una indicación determinada tales como una hoja informativa o un prospecto con instrucciones que describirán el uso y beneficios esperados de los fármacos en el tratamiento de la afección patológica de interés, tales como cualquiera de las distintas enfermedades inflamatorias, metabólicas, vasculares o proliferativas o por infección vírica.

35 La presente invención se describirá ahora con mayor detalle en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes de trabajo específicos, excepto como se señala donde los ejemplos se indican como que son proféticos.

40 Procedimiento General

45 Todas las reacciones realizaron en material de vidrio secado al horno (120 °C) en una atmósfera de nitrógeno, a menos que se indique otra cosa. La acetona, diclorometano, 1,4-dioxano, acetato de etilo, hexano y tetrahidrofurano se adquirieron en Mallinckrodt Chemical Co. La acetona se secó con 4 Å de tamices moleculares y se destiló. El diclorometano, el acetato de etilo y el hexano se secaron y se destilaron en CaH₂. El 1,4-dioxano y el tetrahidrofurano se secaron por destilación en sodio y benzofenona en una atmósfera de nitrógeno. El ácido nordihidroguaiarético se adquirió en Fluka Chemical Co. El clorhidrato de 4-(2-cloroetil)morfolina, clorhidrato de 4-(3-cloropropil)morfolina, monoclóhidrato de 1-(3-cloropropil)piperidina, monoclóhidrato de 1-(2-cloroetil)piperidina, 2-cloroetanol, (2-cloroetoxi)eteno, clorhidrato de 1-(2-cloroetil)pirrolidina, *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y carbonato potásico se adquirieron en Aldrich Chemical Co.

50 El punto de fusión se obtuvo con un aparato de punto de fusión Büchi Labortechnik AG 535. El análisis por cromatografía de capa fina analítica (TLC) se realizó en placas cubiertas previamente (gel de sílice 60 F-254), adquiridas en Merck Inc. Los análisis de cromatografía de gas se realizaron en un instrumento Hewlett-Packard 5890 Series II equipado con una columna capilar de goma de metil silicona reticulada 25-m (0,32 mm de d.i.). Se usó gas nitrógeno como gas vehículo y el caudal se mantuvo constante a 14,0 ml/min. El tiempo de retención T_R se midió en las siguientes condiciones: temperatura del inyector 260 °C, temperatura de la columna isotérmica 280 °C. La cromatografía de gas y los análisis de espectro de masas de baja resolución se realizaron en un sistema CG en red Agilent Technology 6890N equipado con un detector selectivo de masas en red Agilent 5973 y una columna HP-1 capilar. La purificación por cromatografía en columna por gravedad se realizó mediante el uso de Merck Reagents Silica Gel 60 (tamaño de partícula 0,063-0,200 mm, malla 70-230 ASTM). La pureza de todos los compuestos era >99,5 %, como se comprobó por HPLC o CG.

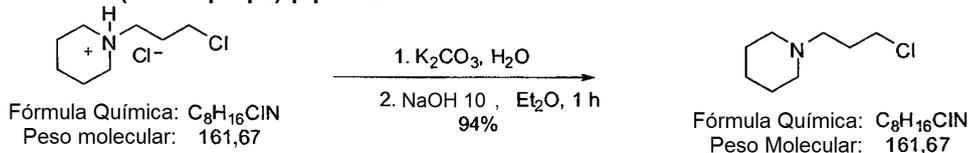
Los espectros ultravioleta (UV) se midieron en un espectrofotómetro Hitachi U3300 UV/VIS. Los espectros de infrarrojos (IR) se midieron en un espectrómetro de infrarrojos de transformada de Fourier Jasco FT-IR-5300. Los números de onda indicados hacían referencia a la absorción 1601 cm^{-1} de poliestireno. Las intensidades de absorción se registraron por las siguientes abreviaturas: s, fuerte; m, media; w, débil. La intensidad fluorescente se midió en un espectrofotómetro de Fluorescencia Hitach F-4500. Los espectros de RMN de protones se obtuvieron en un espectrómetro Varian Mercury-400 (400 MHz) mediante el uso de cloroformo-*d* como disolvente y 3-(trimetilsilil)propionato sódico como patrón interno. Los espectros de RMN de carbono-13 se obtuvieron en un espectrómetro Varian Mercury-400 (100 MHz) mediante el uso de cloroformo-*d* o D_2O como disolvente. Los desplazamientos químicos de carbono-13 hacían referencia al centro del triplete de CDCl_3 ($\delta\ 77,0\text{ ppm}$). Las multiplicidades se registraron por las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuadruplete; m, multiplete; J, constante de acoplamiento (hertzios). Los espectros de masas de alto rendimiento se obtuvieron por medio de un espectrómetro de masas JEOL JMS-HX110. Los análisis de espectrometría de masas por ionización por electronebulización (IEN-EM) se realizaron en un analizador de masas de trampa de iones con cuadrupolo equipado con una fuente de ionización por electronebulización de Finnigan LCQ, Finnigan MAT.

La computación se realizó en una estación de trabajo Silicon Graphics O2+. Se usó el software Chemoffice Ultra 10.0 para representar las estructuras químicas y los esquemas sintéticos. Se usó el software PCModel 7.5 para minimizar la energía con el campo de fuerza de valencia constante (CVFF) hasta la derivada máxima fue menor de $1,0\text{ kcal mol}^{-1}\text{ \AA}^{-1}$.

Ejemplo 1

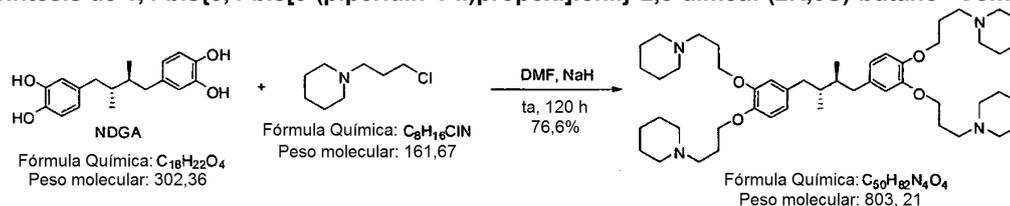
Síntesis de base libre de 1,4-bis{3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano ($\text{C}_{50}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_4$, FW = 803,21) "Compuesto A"; y sal tetraquis-clorhidrato ($\text{C}_{50}\text{H}_{86}\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}_4$, FW = 949,05) "Compuesto B"

Etapa 1: Síntesis de N-(3-cloropropil)-piperidina



Se disolvió clorhidrato de N-(3-cloropropil)-piperidina (pureza al 97 % de Aldrich Chemicals) (100 g) en agua (150 ml) y se le añadió lentamente carbonato potásico acuoso saturado (250 ml). Además, se añadieron hidróxido sódico 10 N (25 ml) y éter dietílico (250 ml) y la mezcla se agitó durante una hora. Las capas se separaron; la capa orgánica se secó sobre carbonato potásico anhidro y se concentró en un evaporador Büchi Labortechnik AG Rotavapor® para dar el compuesto del título (77,2 g, 94,4 %), que se usó sin purificación para las siguientes reacciones.

Etapa 2: Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto A"



A una solución de NDGA (15,0 g, 48,0 mmol) en DMF anhidra (1 l) se le añadió una suspensión al 60 % de hidruro sódico en parafina (10,4 g, 260 mmol, 5,4 equiv.) y la mezcla se calentó a $65\text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron el compuesto N-(3-cloropropil)-piperidina (39,0 g, 241 mmol, 5,0 equiv.) y yoduro sódico (7,2 g, 48 mmol, 1 equiv.) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 120 horas. El análisis por TLC indicó la conversión completa para dar el producto.

El tratamiento de la reacción se realizó mediante la adición lenta de la mezcla de reacción a agua (3 l) y éter dietílico (2,5 l). La capa acuosa se extrajo de nuevo con éter dietílico (2 l). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (750 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice. La columna se construyó usando gel de sílice (500 g) y una mezcla de disolventes de acetato de etilo:metanol:triethylamina (93:2:5) y se eluyó con el gradiente de acetato de etilo:metanol:triethylamina (93:2:5 a 91:4:5) para dar el producto en forma de un sólido de color blanco (28,1 g, rendimiento del 76,6 %). Este producto se cristalizó en una mezcla de acetato de etilo:hexano para dar el compuesto cristalino (22,5 g).

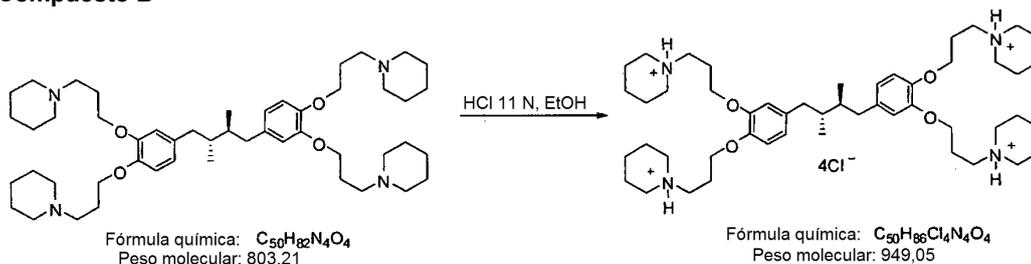
p.f. $84\text{ }^\circ\text{C}$ - $86\text{ }^\circ\text{C}$. Pureza por HPLC - 99,47 %.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ = 0,81 (d, J = 6,6 Hz, 6H), 1,35-1,50 (m, 8H), 1,53-1,65 (m, 16H), 1,67-1,80 (m, 2H), 1,90-2,2,03 (m, 8H), 2,40-2,60 (m, 26H), 2,72 (m, 2H), 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 4H), 4,00 (t, J = 6,5 Hz, 4H), 6,65 (dd, J = 1,9, 8,0 Hz, 2H), 6,67 (d, J = 1,9 Hz, 2H), 6,79 (d, J = 8,0 Hz, 2H); coherente con la estructura.

5 ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ = 16,1, 24,5, 26,0, 27,0, 38,9, 39,4, 54,7, 56,2, 67,8, 68,0, 114,1, 115,2, 121,3, 134,9, 147,0, 148,8; coherente con la estructura.

Análisis calculado para C₅₀H₈₂N₄O₄: C: 74,76, H: 10,29, N: 6,98, Observado C: 75,07, H: 10,59, N: 6,91

10 **Etapa 3: Síntesis de sal tetraquis-clorhidrato 1,4-bis{3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto B"**



15 A una solución enfriada con hielo (0 °C-5 °C) de HCl concentrado acuoso (7,2 ml de HCl 11 N, 79 mmol, 24 equiv. mol) en etanol al 95 % (21 ml) se le añadió gota a gota una solución de 1,4-bis{3,4-bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (2,658, 3,30 mmol) en etanol al 95 % (21 ml). La solución se dejó en agitación a 0 °C-5 °C durante tres horas y el disolvente se retiró en un evaporador rotatorio mientras se mantenía la temperatura del baño de agua a 45 °C. La sal clorhidrato se secó a alto vacío durante 48 horas. El producto en bruto se cristalizó en etanol: éter para dar 2,20 g del producto (rendimiento del 70,3 %) después del secado a alto vacío durante 72 horas.

20 A continuación se proporcionan los datos analíticos para este producto.

p.f. 265 °C-270 °C (desc.)

25 Pureza por HPLC: 99,2 % (% área de pico); Contenido de humedad por el procedimiento Karl Fisher: 2,3938 %.
Análisis Elemental - C₅₀H₈₆N₄O₄Cl₄, calculado: C: 63,27; H: 9,13; N: 5,90, Encontrado: C: 63,60; H: 9,59; N: 5,73.
Análisis elemental de cloro por procedimiento de titulación (base anhidra): teoría: 14,94 %; observado: 14,97 % (100,3 % del valor teórico).

30 ¹H-RMN (D₂O, 300 MHz): δ = 0,65-0,80 (ss, 6H), 1,40-2,0 (m, 26H), 2, 10-2,15 (m, 8H), 2,18-2,24 (m, 2H), 2,56-2,61 (m, 2H), 2,70-3,05 (m, 8H), 3,05-3,20 (m, 8H), 3,20-3,60 (m, 8H), 4,05 (t, J = 4,2 Hz, 8H), 6,71 (dd, J = 1,8, 8,4 Hz, 2H), 6,89 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 6,92 (d, J = 8,4 Hz, 2H).

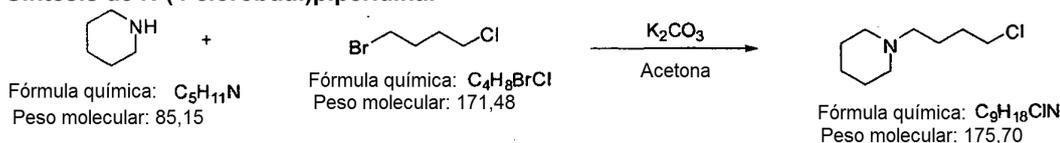
35 ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ = 16,0 (CH₃), 23,4 (CH₂), 24,5 (CH₂), 27,5 (CH₂), 38,8 (Ar-CH₂), 39,4 (CH), 54,6 (NCH₂), 54,9(NCH₂), 68,1 (OCH₂), 113,4 (Ar), 114,1 (Ar), 121,4 (Ar), 135,0 (Ar), 146,8 (Ar), 148,5 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

CL-EM, m/e = 839 (M+K), 803 (M+) coherente con la base libre C₅₀H₈₂N₄O₄.

40 **Ejemplo 2**

Síntesis de base libre de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-piperidino)butoxil]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₅₄H₉₀O₄N₄, FW = 859,32) - "Compuesto C"; y sal tetraquis-clorhidrato (C₅₄H₉₀O₄N₄·4HCl, FW = 1005,16) - "Compuesto D"

Etapa 1: Síntesis de N-(4-clorobutil)piperidina:



45 En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l se añadieron piperidina (85,15 g, 1,0 mol), acetona (1000 ml) y carbonato potásico anhidro (276,42 g, 2,0 mol, 2,0 equiv.). El matraz se equipó con un agitador mecánico y un condensador. Se añadió gota a gota 4-cloro-1-bromo-butano (188,6 g, 1,1 mol, 1,1 equiv.) en agitación continua a temperatura ambiente durante un periodo de 30 min. Después, la mezcla de suspensión se agitó a 40 °C. El progreso de la reacción se controló por TLC, que confirmó que la reacción se completó después de 4 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con diclorometano (2 x 100 ml). Los filtrados combinados se concentraron al vacío hasta que se secaron. Después, el

50

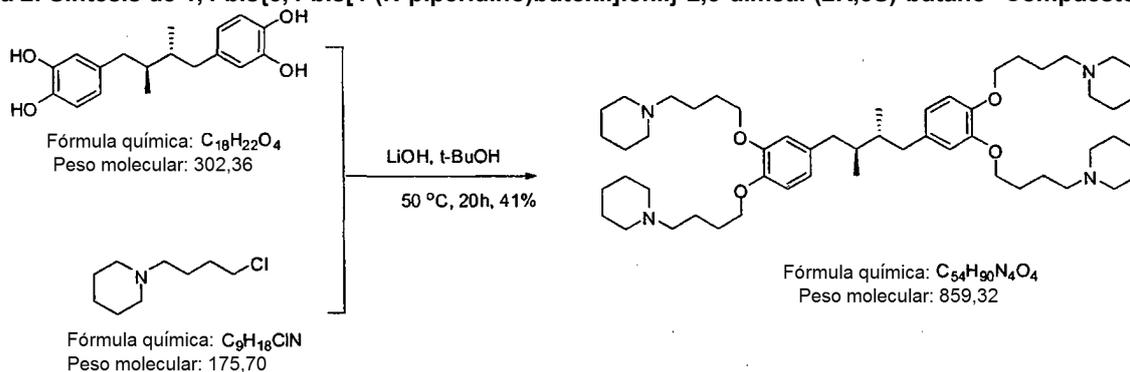
residuo se mezcló con diclorometano (500 ml). Los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con diclorometano (2 x 100 ml). El filtrado combinado y los lavados se concentraron y se purificaron a través de una columna ultrarrápida sobre gel de sílice, que dio el producto esperado en forma de un aceite de color amarillo claro (98,39 g, rendimiento del 56 %).

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ = 1,37 (m, 2H, CH₂), 1,60 (m, 8 H, 4 CH₂), 2,46 (t, J = 6,5 Hz, 4H, 2CH₂N), 2,89 (t, J = 6,8 Hz, 2H, CH₂N), 3,56 (t, J = 7,2 Hz, CH₂Cl) ppm; coherente con la estructura.

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz), δ = 24,5, 25,1, 25,5, 26,1, 44,1 (CH₂NCl), 53,1 (CH₂N), 55,4 (CH₂N) ppm; coherente con la estructura.

EM (IE), m/e = 176 (M +1); coherente con la estructura.

Etapas 2: Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-piperidino)butoxil]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto C"



A una solución que contenía ácido nordihidroguaiarético (NDGA, 602 mg, 2,0 mmol) e hidróxido de litio monohidrato (1,0 g, 24,0 mmol, 12 equiv.) en terc-butanol (100 ml) se le añadió N-(4-clorobutil)piperidina (2,11 g, 12,0 mmol, 6,0 equiv.). La solución se calentó a 50 °C en agitación continua. La reacción se controló por TLC (CH₂Cl₂:MeOH:Et₃N = 95:3:2, V/V/V), que confirmó que la reacción se completó después de 20 horas. La suspensión de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se repartió en diclorometano (200 ml) y agua (100 ml). La mezcla se agitó para mezclarla bien. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). La capa orgánica y los extractos se combinaron y se lavaron con bicarbonato sódico acuoso saturado (100 ml), y salmuera (10 ml). Después del secado sobre sulfato sódico anhidro, la solución se concentró en vacío reducido. El residuo se purificó a través de una columna sobre gel de sílice usando diclorometano, metanol y trietilamina (95:3:2, V/V/V) como eluyente, que dio el producto esperado en forma de un material semi-sólido de color blanco (704,6 mg, rendimiento del 41 %).

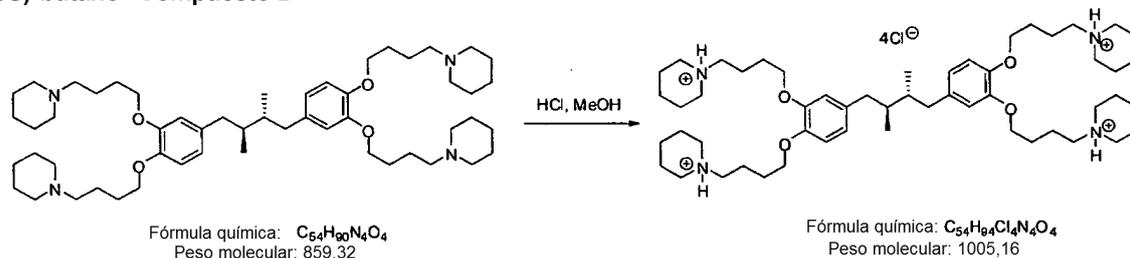
Pureza por HPLC - 98,5 %.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ = 0,81 (d, J = 6,6 Hz, 6H, 2 CH₃), 1,35- 1,50 (m, 8H, 4CH₂), 1,53-1,65 (m, 24 H, 12 CH₂), 1,67-1,80 (m, 2H), 1,90-2,2,03 (m, 8H), 2,40-2,60 (m, 26H), 2,72 (m, 2H), 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 4H), 4,00 (t, J = 6,5 Hz, 4H), 6,65 (dd, J=1,9, 8,0 Hz, 2H), 6,67 (d, J = 1,9 Hz, 2H), 6,79 (d, J = 8,0 Hz, 2H) ppm; coherente con la estructura.

¹³C RMN (CDCl₃) 16,1, 24,5, 25,4, 26,0, 27,0, 38,9, 39,4, 54,7, 56,2, 67,8, 68,0, 114,1, 115,2, 121,3, 134,9, 147,0, 148,8 ppm; coherente con la estructura.

Análisis calculado para C₅₄H₉₀N₄O₄ (859,32) C: 75,48, H: 10,56, N: 6,52, Observado C: 75,07, H: 10,59, N: 6,91; coherente con la estructura.

Etapas 3: Síntesis de sal tetraquis-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-piperidino)butoxil]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto D"



A una solución enfriada con hielo (0 °C-5 °C) de HCl concentrado acuoso (2,2 ml de 11 N HCl, 24 mmol, 24 equiv. mol) en etanol al 95 % (7 ml) se le añadió gota a gota una solución de 1,4-bis{3,4-bis[4-(piperidin-1-il)butoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (859,32 mg, 1,0 mmol) en etanol al 95 % (7 ml). La solución se dejó en agitación a 0 °C-5 °C durante tres horas y el disolvente se retiró sobre el evaporador rotatorio mientras se mantuvo la temperatura del baño de agua a 45 °C. La sal clorhidrato se secó a alto vacío durante 48 horas. Después, el producto en bruto se cristalizó en etanol:éter para dar 736,9 mg del producto (rendimiento del 73,3 %) después del secado a alto vacío durante 72 horas. A continuación se proporcionan los datos analíticos para este producto.

p.f. 225 °C-230 °C (desc.).

Pureza por HPLC: 99,2 % (% área de pico). Análisis Elemental - C₅₄H₉₀O₄N₄·4HCl, FW = 1005,16, calculado: C: 64,53; H: 9,43; N: 5,57, Encontrado: C: 64,23; H: 9,21; N: 5,43. Análisis elemental de cloro por procedimiento de titulación (base anhidra): teoría: 14,11 %; observado: 14,21 % (100,7 % del valor teórico).

¹H-RMN (D₂O, 400 MHz): δ = 0,76 (d, J = 6,4 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1,28-1,37 (m, 8 H), 1,36-1,46 (m, 8 H, 4 x piperidina CH₂), 1,43-2,56 (m, 16 H, 8 x piperidina CH₂), 1,55- 1,68 (m, 2 H, 2 x CH), 2,36-2,51 (m, 16 H, 8 x piperidina CH₂N), 2,64 (dd, J = 13,2, 1,2 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 2,71 (t, J = 6,0 Hz, 8 H, 4 x CH₂N), 4,03 (t, 8 H, 4 x CH₂O), 6,60-6,75 (m, 6 H, 6 x ArH) ppm; coherente con la estructura.

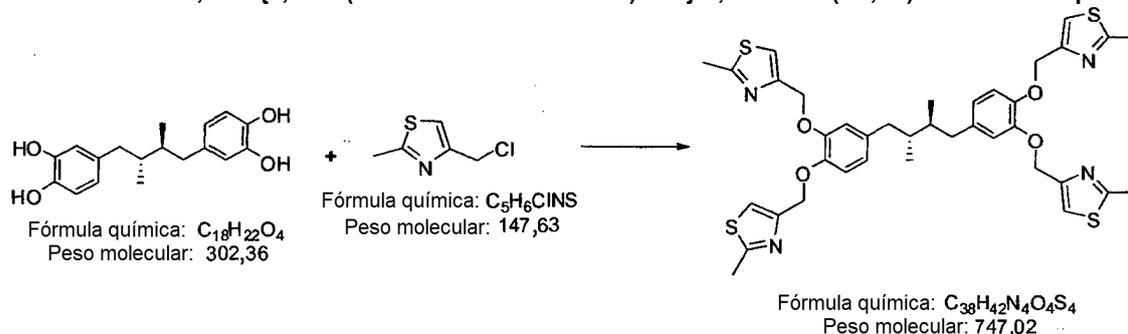
¹³C RMN (D₂O, 100 MHz), δ = 15,93, 23,85, 24,00, 25,06, 25,72, 38,92, 39,31, 54,87, 54,97, 57,87, 67,13, 67,28, 113,90, 114,96, 121,38, 134,71, 146,75, 148,48 ppm; coherente con la estructura.

EM (IE), m/e = 859 (M+), coherente con la base libre C₅₄H₉₀N₄O₄.

Ejemplo 3

Síntesis de base libre de 1,4-bis{3,4-bis(2-metil-tiazol-4-il-metoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₃₈H₄₆N₄O₄S₄, FW = 747,02) "Compuesto E"; sal tetraquis-clorhidrato (C₃₈H₄₆N₄O₄S₄·4HCl, FW = 892,87) "Compuesto F"

Etapas 1: Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis(2-metil-tiazol-4-il-metoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto E"



Preparación de 4-clorometil-2-metiltiazol a partir de su clorhidrato: Al clorhidrato de 4-clorometil-2-metil tiazol (25 g, 135 mmol) se le añadió carbonato potásico acuoso al 50 % (100 ml) y éter (400 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. La capa orgánica se separó, se secó sobre carbonato potásico anhidro y se concentró a sequedad en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 25 °C. El residuo se secó a alto vacío (0,1-0,5 mm de Hg) durante una noche a temperatura ambiente para dar 4-clorometil-2-metiltiazol (20 g, rendimiento del 99,5 %).

Preparación de 1,4-bis{3,4-bis(2-metil-tiazol-4-il-metoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano: A una solución enfriada con hielo de NDGA (1,50 g, 4,96 mol) en DMF (50 ml) se le añadió una suspensión al 60 % de hidruro sódico en parafina (1,98 g = 1,19 g de NaH, 49,6 mmol, 10 equiv. mol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y a temperatura ambiente durante 30 min. Después, se añadió una solución de 4-clorometil-2-metiltiazol (5,86 g, 39,69 mmol, 8,0 equiv. mol) en DMF (20 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se añadió al cloruro de amonio acuoso saturado (300 ml) y éter (600 ml). Después de la agitación, la capa orgánica se separó, y la capa acuosa se extrajo con éter (2 x 200 ml). La capa orgánica combinada y los extractos se lavaron con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a sequedad en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 25 °C. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se purificó por columna cromatográfica ultrarrápida sobre gel de sílice usando hexano:acetato de etilo (50:50 a 0:100) como eluyente para dar el producto esperado en forma de un sólido de color blanco (1,56 g, rendimiento del 42,09 %). Se purificó adicionalmente por cristalización en acetato-hexano.

P.f. 85 °C-87 °C, pureza por HPLC: 98,9 %.

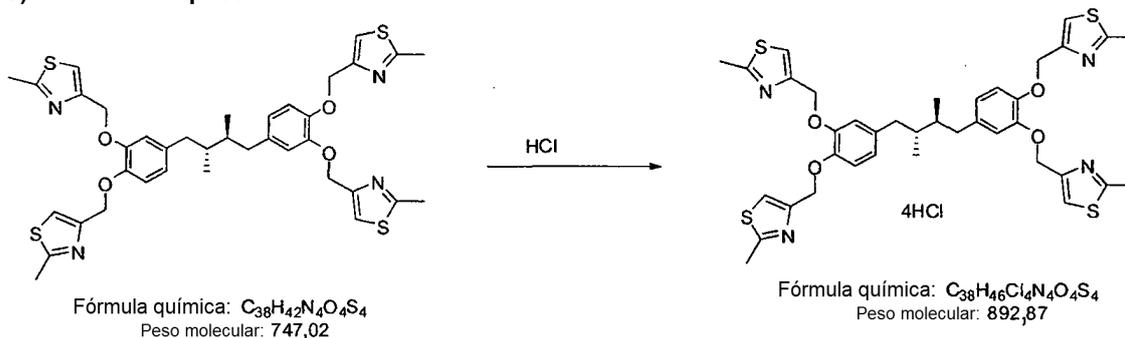
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,84 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH₃), 2,01 (m, 2H, 2 x CH), 2,65-2,70 (m, 4H, 2 x Ar-CH₂), 2,81 (s, 6H, 2 x CH₃), 5,23 (d, J = 20,7 Hz, 8H, 4 x OCH₂), 6,70-6,84 (m, 6H, 6 x Ar-H), 7,07 (s, 4H, 4-Ar-H) ppm; coherente con la estructura.

5 ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 16,5 (CH₃), 19,5 (CH₃), 38,6 (Ar-CH₂), 39,4 (CH), 72,6 (OCH₂), 112,1 (Ar), 113,8 (Ar), 115,4 (Ar), 122,8 (Ar), 131,1 (Ar), 135,0 (Ar), 147,4 (Ar), 149,5 (Ar), 159,8 (Ar), 165,3 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

CL-EM, m/e = 770 (M+Na⁺), 747 (M+).

10 Análisis calculado para C₃₈H₄₂N₄O₄S₄, FW = 747,02, C: 61,10, H: 5,67, N: 7,50, Observado C: 60,86, H: 5,86, N: 7,31.

15 **Etap 2: Síntesis de sal tetraquis-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis(2-metil-tiazol-4-il-metoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto F"**



20 A una solución de 1,4-bis{3,4-bis(2-metil-tiazol-4-il-metoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (0,50 g, 0,6 mmol) en acetona (20 ml) se burbujeó lentamente gas clorhidrato a través de la solución a temperatura ambiente durante 10 min en agitación continua. Los precipitados se recogieron por filtración por succión. Los materiales recogidos se disolvieron en una cantidad mínima de metanol y se precipitó en éter anhidro. Después, el material sólido se recogió por filtración por succión y se secó al vacío durante una noche para dar 0,51 g (rendimiento del 85 %) de la sal tetraquis-clorhidrato esperada en forma de un sólido de color blanco.

25 p.f. 91 °C-92 °C. Pureza por HPLC: 98,9 % (pureza en área de pico)

¹H RMN (300 MHz, metanol-d₄): δ = 0,74 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH₃), 2,11 (m, 2H, 2 x CH), 2,55-2,60 (m, 4H, 2 x Ar-CH₂), 2,75 (s, 6H, 2 x CH₃), 5,28 (d, J = 20,7 Hz, 8H, 4 x OCH₂), 6,77-6,87 (m, 6H, 6 x Ar-H), 7,09 (s, 4H, 4-Ar-H), 10,56 (s a, NH) ppm; coherente con la estructura.

30 ¹³C RMN (75 MHz, metanol-d₄): δ = 16,7 (CH₃), 19,5 (CH₃), 38,6 (Ar-CH₂), 39,4 (CH), 72,6 (OCH₂), 112,1 (Ar), 113,8 (Ar), 115,4 (Ar), 122,8 (Ar), 131,1 (Ar), 135,0 (Ar), 147,4 (Ar), 149,5 (Ar), 159,8 (Ar), 165,3 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

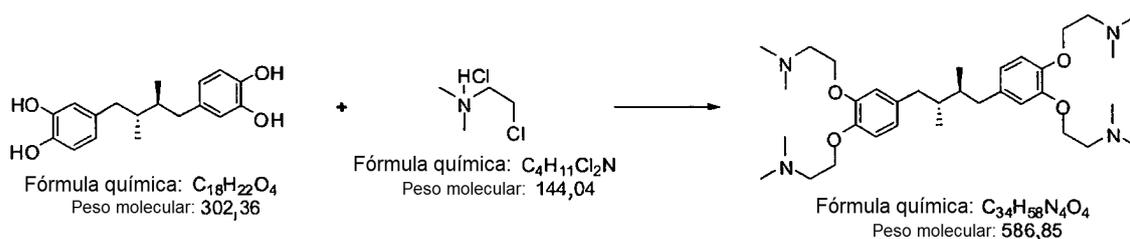
35 CL-EM, m/e = 770 (M+Na⁺), 747 (M+) coherente con la estructura del compuesto precursor.

Análisis calculado para C₃₈H₄₂N₄O₄S₄·4HCl, FW = 892,87, C: 51,12 H: 5,19, N: 6,27, Observado C: 50,86, H: 5,06, N: 6,01.

40 Ejemplo 4

Síntesis de base libre de 1,4-bis{3,4-bis(2-(N,N'-dimetilamino)-etoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₃₄H₅₈N₄O₄, FW = 586,85) "Compuesto G"; sal tetraquis-clorhidrato (C₃₄H₅₈N₄O₄·4HCl, FW = 732,69) "Compuesto H"

45 **Etap 1: Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis(2-(N,N'-dimetilamino)-etoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto G"**



A una solución de NDGA (1,50 g, 4,96 mmol) en acetona (150 ml) se le añadieron carbonato potásico anhidro (6,84 g, 49,6 mmol, 10 equiv. mol) y clorhidrato de N,N-dimetil-N-(2-cloroetil)amina (4,28 g, 29,7 mmol, 6 equiv. mol). La mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante 12 horas. El progreso de la reacción se controló por TLC (diclorometano:metanol = 95:5, v:v), y mostró una cantidad considerable de NDGA sin reaccionar. Por lo tanto, se añadió más cantidad de carbonato potásico anhidro (6,84 g, 49,6 mmol, 10 equiv. mol) y clorhidrato de N,N-dimetil-N-(2-cloroetil)amina (4,28 g, 29,7 mmol, 6 equiv. mol) y la mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante 64 horas más. El análisis de control por TLC mostró que la reacción está completa. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Los materiales insolubles se retiraron por filtración por succión y se lavaron con acetona (2 x 50 ml). El filtrado y los lavados se combinaron y se concentraron a sequedad en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 25 °C. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano. Los materiales insolubles se retiraron por filtración por succión. El filtrado se purificó por columna cromatográfica ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de elución de diclorometano:metanol:triethylamina (de 94:1:5 a 85:10:5) para dar el producto esperado en forma de un sólido de color blanco (1,56 g, rendimiento del 53,6 %). Se purificó adicionalmente por cristalización en acetato-hexano.

P.f. 98-100 °C, pureza por HPLC: 99,1 % (pureza en área de pico).

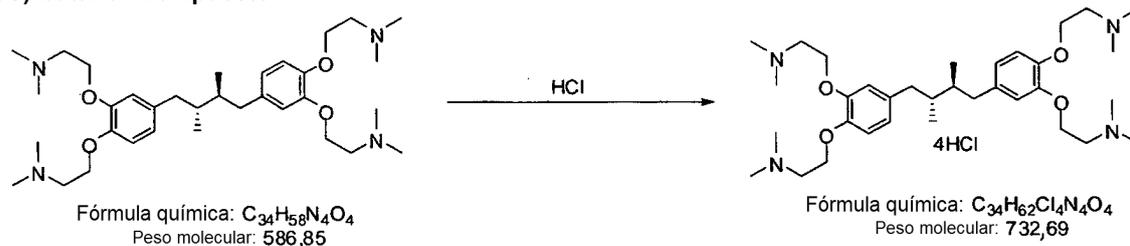
1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0,81 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH_3), 1,95 (m, 2H, 2 x CH), 2,60-2,65 (m, 4H, 2 x Ar- CH_2), 2,72 (t, J = 6,1 Hz, 8H, 4 x NCH_2) 2,86 (s, 6H, 2 x NCH_3), 4,08 (t, J = 6,1 Hz, 8H, 4 x OCH_2), 6,60-6,75 (m, 6H, 6 x Ar-H) ppm; coherente con la estructura.

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 15,2 (CH_3), 36,6 (Ar- CH_2), 38,7 (CH), 45,5 (NCH_3), 56,7 (NCH_3), 65,4 (OCH_2), 112,8 (Ar), 114,4 (Ar), 121,8 (Ar), 132,8 (Ar), 146,4 (Ar), 147,5 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

CL-EM, m/e = 609 ($M+Na^+$), 586 (M^+); coherente con la estructura.

Análisis calculado para $C_{34}H_{58}N_4O_4$, FW = 586,85, C: 69,59, H: 9,96, N: 9,55, Observado C: 69,86, H: 9,76, N: 9,31.

Etap 2: Síntesis de sal tetraquis-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis(2-(N,N'-dimetilamino)-etoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto H"



A una solución de 1,4-bis{3,4-bis(2-(N,N'-dimetilamino)-etoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (0,50 g, 0,85 mmol) en acetona (20 ml) se burbujeó lentamente gas clorhidrato a través de la solución a temperatura ambiente durante 10 min en agitación continua. Los precipitados se recogieron por filtración por succión. Los materiales recogidos se disolvieron en una cantidad mínima de metanol y se precipitaron por éter anhidro. Después, el material sólido se recogió por filtración por succión y se secó al vacío durante una noche para dar 0,44 g (rendimiento del 70 %) de la sal tetraquis-clorhidrato en forma de un sólido de color blanco.

p.f. 78 °C-80 °C. Pureza por HPLC: 99,2 % (pureza en área de pico).

1H RMN (300 MHz, metanol- d_4): δ = 0,76 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH_3), 1,85 (m, 2H, 2 x CH), 2,63-2,69 (m, 4H, 2 x Ar- CH_2), 2,75 (t, J = 6,1 Hz, 8H, 4 x NCH_2) 2,96 (s, 6H, 2 x NCH_3), 4,01 (t, J = 6,1 Hz, 8H, 4 x OCH_2), 6,65-6,77 (m, 6H, 6 x Ar-H), 10,55 (s a, NH) ppm; coherente con la estructura.

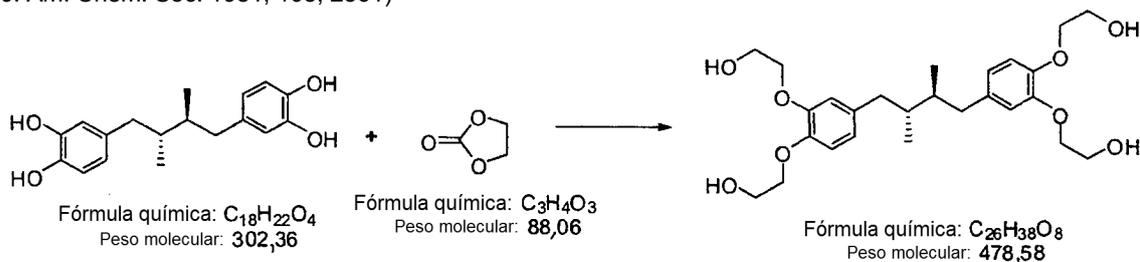
^{13}C RMN (75 MHz, metanol- d_4): δ = 16,2 (CH_3), 35,6 (Ar- CH_2), 37,9 (CH), 46,6 (NCH_3), 55,9 (NCH_3), 64,7 (OCH_2), 112,5 (Ar), 115,4 (Ar), 122,8 (Ar), 131,7 (Ar), 145,4 (Ar), 146,5 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

CL-EM, m/e = 609 (M+Na⁺), 586 (M⁺) coherente con la estructura. Análisis calculado para C₃₄H₅₈N₄O₄·4HCl, FW = 732,69, C: 55,73, H: 8,53, N: 7,65, Observado C: 55,38, H: 8,36, N: 7,31.

Ejemplo 5

5 Síntesis de base libre de 1,4-bis{3,4-bis(2-hidroxietoxi)fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₂₆H₃₈O₈, FW = 478,58) "Compuesto I"

10 Procedimiento 1: (Para procedimientos sintéticos similares véase: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987, (3), 223-224; J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 2361)



15 A una solución de NDGA (2,0 g, 6,61 mmol) en dimetilformamida anhidra (DMF) (20 ml) se le añadieron carbonato de etileno (3,49 g, 39,69 mmol, 6,0 equiv. mol) y bromuro de tetraetilamonio (69 mg, 0,33 mmol, 0,05 equiv. mol). La mezcla se agitó a 140 °C. La reacción se controló por TLC (diclorometano:metanol = 9: 1, V/V), que mostró la reacción completa después de 36 horas. Después, la DMF se eliminó en vacío reducido (20-30 mm de Hg) a 80 °C-90 °C a sequedad. Después, el residuo se recogió en diclorometano (200 ml) y se lavó con bicarbonato sódico acuoso (50 ml) y salmuera (2 x 50 ml). Después del secado sobre sulfato sódico anhidro, el disolvente se retiró en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 30 °C-40 °C a sequedad. El residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se purificó por columna cromatográfica ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de elución de diclorometano:metanol (de 10:0 a 9:1, V/V) para dar el producto esperado, que se purificó adicionalmente por recristalización en diclorometano-éter para dar 0,88 g del producto puro (rendimiento del 27,8 %).

20 p.f. 120 °C-122 °C con una pureza por HPLC del 99,4 %.

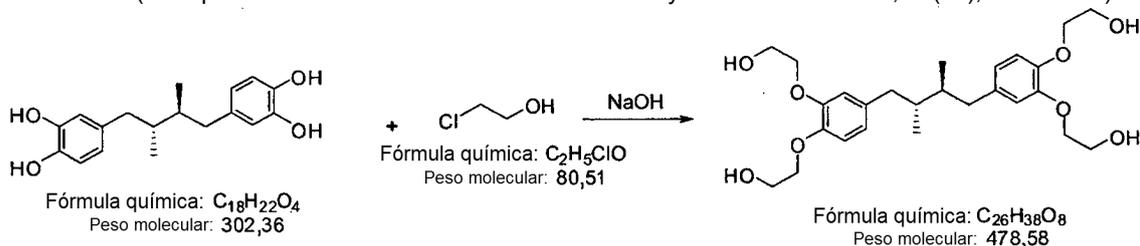
25 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ - 0,73 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH₃), 1,85 (m, 2H, 2 x CH), 2,35, 2,65 (mm, 4H, 2 x Ar-CH₂), 3,74 (t, J = 6,1 Hz, 8H, 4 x OCH₂), 3,93 (t, J = 6,1 Hz, 8H, 4 x OCH₂), 6,56-6,72 (m, 6H, 6 x Ar-H) ppm; coherente con la estructura.

30 ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 15,4 (CH₃), 35,2 (Ar-CH₂), 37,9 (CH), 61,8 (OCH₂), 68,7 (OCH₂), 112,3 (Ar), 115,4 (Ar), 122,9 (Ar), 132,8 (Ar), 146,4 (Ar), 148,1 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

CL-EM, m/e = 501 (M+Na⁺), 478 (M⁺); coherente con la estructura.

35 Análisis calculado para C₂₆H₃₈O₈, FW = 478,58, C: 65,25, H: 8,00, Observado C: 65,01, H: 8,34.

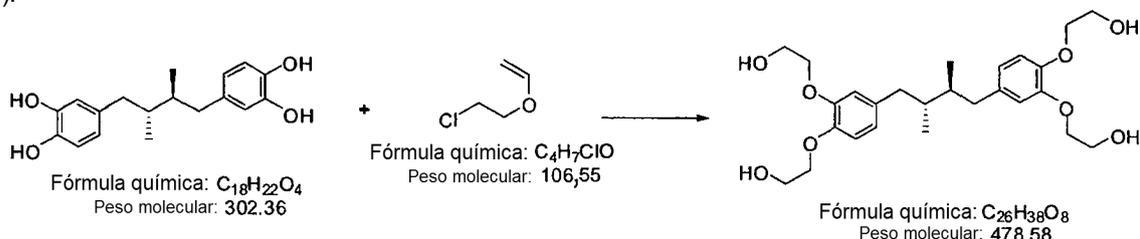
Procedimiento 2: (Para procedimientos sintéticos similares véase Synth. Commun. 2002, 32(12), 1909-1915)



40 A una solución de NDGA (1,5 g, 4,96 mmol) en n-butanol (150 ml) se le añadieron una solución de hidróxido sódico (4,0 g, 99,20 mmol, 20 equiv. mol) en agua (20 ml) y 2-cloroetanol (8,0 g, 99,22 mmol, 20 equiv. mol). La mezcla se agitó a la temperatura de reflujo. La reacción se controló por TLC (diclorometano:metanol, 9:1, V/V), y mostró que se había completado después de 36 horas. La mezcla se enfrió a 0 °C y se neutralizó cuidadosamente a pH 7,0 con ácido clorhídrico conc. La mezcla se concentró en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 70 °C-80 °C a sequedad. El residuo se mezcló y se agitó con acetato de etilo (200 ml). Los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con acetato de etilo (2 x 50 ml). El filtrado y los lavados se combinaron y se lavaron con salmuera (2 x 100 ml). Después del secado sobre sulfato sódico anhidro, la mezcla se concentró en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 30 °C-40 °C a sequedad. Después, el residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se purificó por una columna cromatográfica ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de elución de

diclorometano:metanol (de 95:5 a 80:20, V/V) para dar el compuesto esperado en forma de un sólido de color blanco, que se purificó adicionalmente por recristalización en diclorometano-éter para dar 1,32 g del producto puro (55,6 %), p.f. 120 °C-122 °C con una pureza por HPLC del 98,5 %. Los datos analíticos fueron idénticos a la muestra del Procedimiento 1.

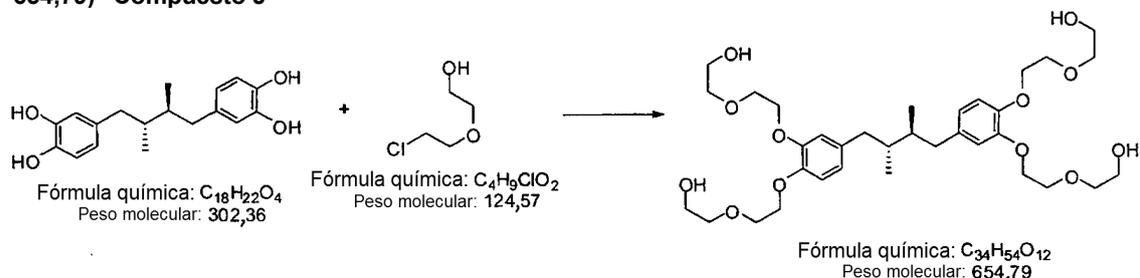
5 Procedimiento 3: (Para un procedimiento experimental similar véase Bull. Korean Chem. Soc. 2004, 25(12), 1941-1944).



10 A una solución de NDGA (1,5 g, 4,96 mmol) en DMF (150 ml) se le añadieron carbonato potásico anhidro (13,70 g, 99,20 mmol, 20 equiv. mol) y (2-cloroetoxi)etano (10,57 g, 99,22 mmol, 20 equiv. mol). La mezcla se agitó a 130 °C. La reacción se controló por TLC (diclorometano:metanol, 9:1, V/V), y mostró que se había completado después de 48 horas. La mezcla se concentró en vacío reducido (5-10 mm de Hg) a 50 °C-60 °C a sequedad. El residuo se mezcló y se agitó con acetato de etilo (200 ml). Los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con acetato de etilo (2 x 50 ml). El filtrado y los lavados se combinaron y se lavaron con salmuera (2 x 100 ml). Después del secado sobre sulfato sódico anhidro, la mezcla se concentró en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 30 °C-40 °C a sequedad. Después, el residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se purificó por una columna cromatográfica ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de elución de diclorometano:metanol (de 95:5 a 80:20, V/V) para dar el compuesto esperado en forma de un sólido de color blanco, que se purificó adicionalmente por recristalización en diclorometano-éter para dar 1,50 g del producto en bruto (rendimiento del 63,1 %), p.f. 120 °C-122 °C con una pureza por HPLC del 98,5 %. Los datos analíticos fueron idénticos a la muestra del Procedimiento 1.

Ejemplo 6

25 **Síntesis de base libre de 1,4-bis{3,4-bis[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxil}fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano ($C_{34}H_{54}N_4O_{12}$, FW = 654,79) "Compuesto J"**



30 A una solución de NDGA (1,5 g, 4,96 mmol) en DMF (150 ml) se le añadieron carbonato potásico anhidro (13,70 g, 99,20 mmol, 20 equiv. mol) y (2-cloroetoxi)etanol (12,36 g, 99,22 mmol, 20 equiv. mol). La mezcla se agitó a 130 °C. La reacción se controló por TLC (diclorometano:metanol, 9:1, V/V), y mostró que se había completado después de 72 horas. La mezcla se concentró en vacío reducido (5-10 mm de Hg) a 50 °C-60 °C a sequedad. El residuo se mezcló y se agitó con acetato de etilo (200 ml). Los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con acetato de etilo (2 x 50 ml). El filtrado y los lavados se combinaron y se lavaron con salmuera (2 x 100 ml). Después del secado sobre sulfato sódico anhidro, la mezcla se concentró en vacío reducido (30-40 mm de Hg) a 30 °C-40 °C a sequedad. Después, el residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se purificó por una columna cromatográfica ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de elución de diclorometano:metanol (de 95:5 a 80:20, V/V) para dar el compuesto esperado, que se purificó adicionalmente por recristalización en diclorometano-éter para dar 1,25 g del producto puro (rendimiento del 38,5 %) en forma de un semi-sólido de color amarillo claro, con una pureza por HPLC del 98,5 %.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0,74 (d, J = 6,4 Hz, 6H, 2 x CH_3), 1,88 (m, 2H, 2 x CH), 2,38, 2,68 (mm, 4H, 2 x Ar- CH_2), 3,60-4,01 (m, 32H, 16 x OCH_2), 6,58-6,74 (m, 6H, 6 x Ar-H) ppm; coherente con la estructura.

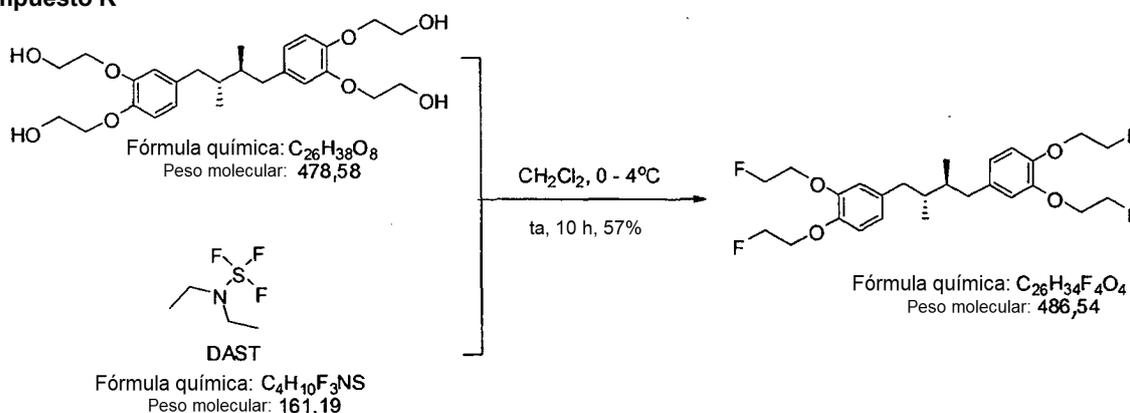
45 ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 15,4 (CH_3), 36,3 (Ar- CH_2), 38,5 (CH), 61,3 (OCH_2), 69,7 (OCH_2), 70,7 (OCH_2), 71,2 (OCH_2), 112,4 (Ar), 114,1 (Ar), 123,4 (Ar), 131,6 (Ar), 145,9 (Ar), 149,5 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

CL-EM, m/e = 677 (M+ Na^+), 672 (M+ H_2O), 655 (M+); coherente con la estructura.

Análisis calculado para C₃₄H₅₄O₁₂, FW = 654,79, C: 62,37, H: 8,31, Observado C: 62,01, H: 8,14.

Ejemplo 7

5 Síntesis de 1,4-bis[3,4-bis(2-fluoro-etoxil)fenil]-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₂₅H₃₄O₄F₄, FW = 486,54) "Compuesto K"



10 A una suspensión del Compuesto I (479 mg, 1,0 mmol) en diclorometano (10 ml) enfriado en un baño de agua enfriada con hielo se le añadió trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST, 805 mg, 5 mmol). Después de agitar la solución de color amarillento resultante a temperatura ambiente durante 10 horas, se inactivó con bicarbonato sódico saturado (2 ml) en refrigeración. La capa orgánica se lavó con salmuera saturada, se secó sobre MgSO₄(s), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (metanol al 10 % en diclorometano como eluyente) y la fracción deseada se concentró para dar el compuesto esperado en forma de un sólido de color blanquecino (277 mg, 0,47 mmol) con un rendimiento del 57 %.

p.f. 98 °C-102 °C, pureza por HPLC: 97,5 % (pureza en área de pico).

20 ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0,76 (d, J = 6,4 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1,63-1,70 (m, 2 H, 2 x CH), 2,18 (dd, J = 13 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 2,76 (dd, J = 13,2, 4,6 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 4,09 (t, J = 5,6 Hz, 8 H, 4 x CH₂O), 4,66 (m, J = 47 Hz, 8 H, 4 x CH₂F), 6,55-6,72 (m, 6H, 6 x ArH); coherente con la estructura esperada.

25 ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) : δ = 15,90, 38,68, 39,23, 64,23, 64,50, 66,49, 66,86, 113,75, 114,80, 121,56, 134,96, 146,63, 148,38; coherente con la estructura esperada.

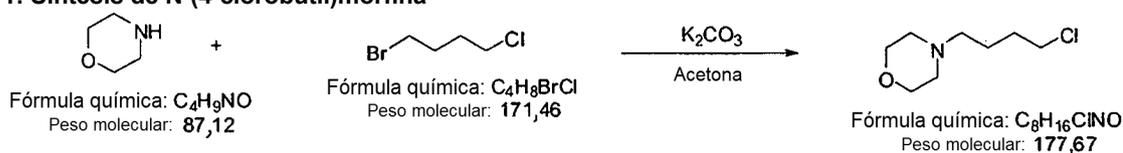
EM (IE) m/e: 486 (M+), 496(M+), 525(M+K); coherente con la estructura esperada.

Análisis calculado para C₂₅H₃₄O₄F₄, FW = 486,54, C: 64,18; H: 7,04. Observado, C: 63,95; H: 6,85.

30 Ejemplo 8

Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-morfolino)butoxil]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₅₀H₈₂N₄O₈, FW = 867,21) "Compuesto L"; sal *tetraquis*-clorhidrato (C₅₄H₈₂N₄O₉·4HCl, FW = 1013,05) "Compuesto M"

35 Etapa 1: Síntesis de N-(4-clorobutil)morfina



40 En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l se añadieron morfolina (87,12 g, 1,0 mol), acetona (1000 ml) y carbonato potásico anhidro (276,42 g, g, 2,0 mol, 2,0 equiv.). El matraz se equipó con un agitador mecánico y un condensador. Se añadió gota a gota 4-cloro-1-bromo-butano (188,6 g, 1,1 mol, 1,1 equiv.) en agitación continua a temperatura ambiente durante un periodo de 30 min. Después, la mezcla de suspensión se agitó a 40 °C. El progreso de la reacción se controló por TLC, que confirmó que la reacción se completó después de 4 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con diclorometano (2 x 100 ml). Los filtrados combinados se concentraron al vacío hasta que se secaron. Después, el residuo se mezcló con diclorometano (500 ml). Los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con diclorometano (2 x 100 ml). El filtrado combinado y los lavados se concentraron y se purificaron a través de una

columna ultrarrápida sobre gel de sílice, que dio el producto esperado en forma de un aceite de color amarillo claro (80,83 g, rendimiento del 45,5 %).

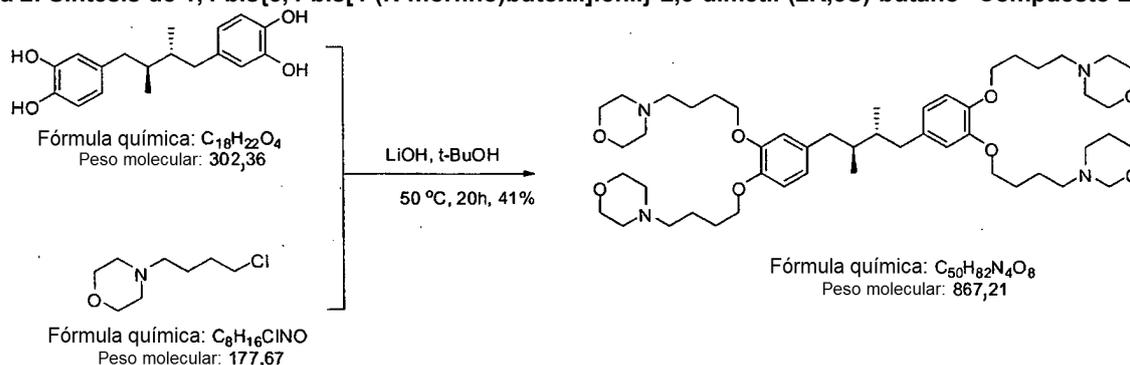
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ = 1,35 (m, 2H, CH₂), 1,75 (m, 2 H, CH₂), 2,41 (t, J = 6,5 Hz, 4H, 2CH₂N), 2,97 (t, J = 6,8 Hz, 2H, CH₂N), 3,65 (m, 6H, 2 OCH₂, CH₂Cl) ppm; coherente con la estructura.

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz), δ = 25,4, 25,8, 45,4, 53,2, 60,2, 65,5 ppm; coherente con la estructura.

EM (IE), m/e = 178 (M + 1); coherente con la estructura.

10

Etapa 2: Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-morfino)butoxil]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto L"



15

A una solución que contenía NDGA (602 mg, 2,0 mmol) e hidróxido de litio monohidrato (1,0 g, 24,0 mmol, 12 equiv.) en terc-butanol (100 ml) se le añadió N-(4-clorobutil)morfolina: (2,13 g, 12,0 mmol, 6,0 equiv.). Después, la solución se calentó a 50 °C en agitación continua. La reacción se controló por TLC (CH₂Cl₂:MeOH:Et₃N = 92:6:2, V/V/V), que confirmó que la reacción se completó después de 20 horas. La suspensión de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se repartió en diclorometano (200 ml) y agua (100 ml). La mezcla se agitó para mezclarla bien. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). La capa orgánica y los extractos se combinaron y se lavaron con bicarbonato sódico acuoso saturado (100 ml), y salmuera (10 ml). Después del secado sobre sulfato sódico anhidro, la solución se concentró en vacío reducido. El residuo se purificó a través de una columna sobre gel de sílice usando diclorometano, metanol y trietilamina (92:6: 2, V/V/V) como eluyente, que dio el producto esperado en forma de un material semi-sólido de color blanco (667,75 mg, rendimiento del 38,5 %).

20

25

Pureza por HPLC - 99,2 %. Análisis Elemental - C₅₀H₈₂N₄O₈, FW = 867,21, calculado: C: 69,25; H: 9,53; N: 6,46, Encontrado: C: 69,05; H: 9,21; N: 6,43; coherente con la estructura.

30

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0,74 (d, J = 6,4 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1,32-1,46 (m, 16 H), 1,62-1,71 (m, 2 H, 2 x CH), 2,26 (dd, J = 13,4, 9,2 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 2,75 (dd, J = 13,2, 4,6 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 2,51-2,79 (m, 16 H, 8 x morfolina CH₂), 2,89 (t, J = 12,2 Hz, 8 H, 4 x CH₂N), 3,56-3,76 (m, 16 H, 8 x morfolina CH₂), 4,11 (t, J = 5,6 Hz, 8 H, 4 x CH₂O), 6,47-6,69 (m, 6 H, 6 x ArH) ppm, coherente con la estructura.

35

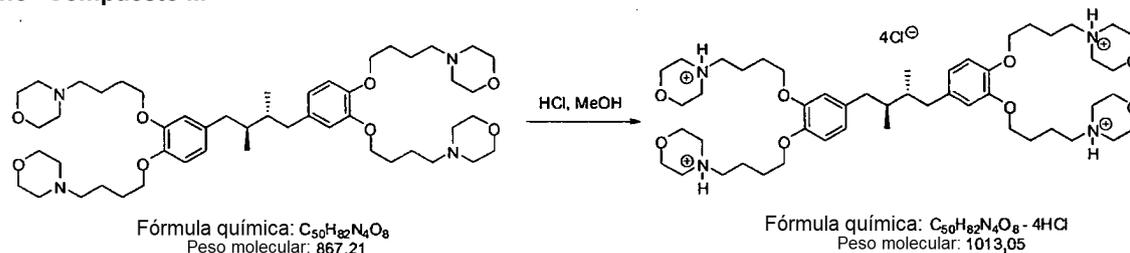
¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ = 16,96, 24,31, 24,91, 38,77, 40,18, 54,31, 55,79, 56,46, 60,59, 65,60, 67,58, 67,70, 115,68, 116,09, 122,39, 135,75, 145,39, 149,29 ppm; coherente con la estructura.

EM (FAB) m/e: 867 (M+), 434 (1/2M+), coherente con la estructura (C₅₄H₈₂O₈N₄).

Análisis calculado para C₅₀H₈₂N₄O₈ (867,21) C: 69,25, H: 9,53, N: 6,46, Observado C: 68,94, H: 9,39, N: 6,91, coherente con la estructura.

40

Etapa 3: Síntesis de tetraquis-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-morfino)butoxil]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto M"



45

A una solución enfriada con hielo (0 °C-5 °C) de HCl concentrado acuoso (2,2 ml de HCl 11 N, 24 mmol, 24 equiv. mol) en etanol al 95 % (7 ml) se le añadió gota a gota una solución de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-morfolino)butoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (867,21 mg, 1,0 mmol) en etanol al 95 % (7 ml). La solución se dejó en agitación a 0 °C-5 °C durante tres horas y el disolvente se retiró en un evaporador rotatorio mientras se mantenía la temperatura del baño de agua a 45 °C. La sal clorhidrato se secó a alto vacío durante 48 horas. Después, el producto en bruto se cristalizó en etanol: éter para dar 691,9 mg del producto (rendimiento del 68,3 %) después del secado a alto vacío durante 72 horas. A continuación se proporcionan los datos analíticos para este producto.

p.f. 215 °C-220 °C (desc.).

Pureza por HPLC: 98,2 % (% área de pico). Análisis Elemental - C₅₀H₈₂N₄O₈·4HCl, FW = 1013,05, calculado: C: 59,28; H: 8,56; N: 5,53, Encontrado: C: 58,94; H: 8,21; N: 5,43. Análisis elemental de cloro por procedimiento de titulación (base anhidra): teoría: 14,00 %; observado: 14,05 %.

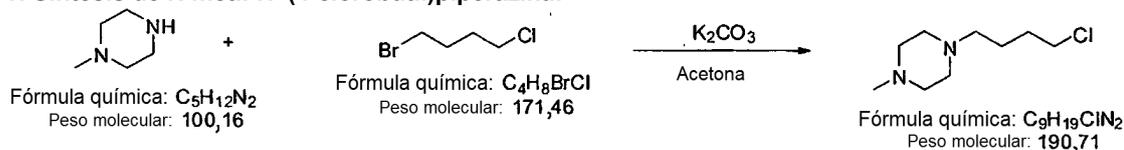
¹H RMN (D₂O, 400 MHz): δ = 0,72 (d, J = 6,4 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1,32-1,42 (m, 16 H), 1,62-1,68 (m, 2 H, 2 x CH), 2,16 (dd, J = 13,4, 9,2 Hz, 2 H, 2 * ArCH), 2,72 (dd, J = 13,2, 4,6 Hz, 2 H, 2 x ArCH), 2,41-2,59 (m, 16 H, 8 x morfolina CH₂), 2,70 (t, J = 12,2 Hz, 8 H, 4 x CH₂N), 3,46-3,72 (m, 16 H, 8 x morfolina CH₂), 4,01 (t, J = 5,6 Hz, 8 H, 4 x CH₂O), 6,57-6,70 (m, 6 H, 6 x ArH) ppm; coherente con la estructura.

¹³C RMN (D₂O, 100 MHz): δ = 15,96, 23,91, 24,89, 38,57, 39,08, 53,31, 53,79, 57,46, 59,79, 66,50, 66,58, 66,70, 113,68, 114,69, 121,39, 134,75, 146,39, 148,29 ppm; coherente con la estructura.

EM (FAB) m/e: 867 (M+), 434 (1/2M+), coherente con la estructura de la base libre (C₅₄H₈₂N₄O₈).

Ejemplo 9 Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-metil-piperazino-N'-il)butoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₅₄H₉₄N₈O₄, FW = 919,38) "Compuesto N"; sal octa-clorhidrato (C₅₄H₉₄N₈O₄·8HCl, FW = 1211,06) "Compuesto O"

Etapas 1: Síntesis de N-metil-N'-(4-clorobutil)piperazina:



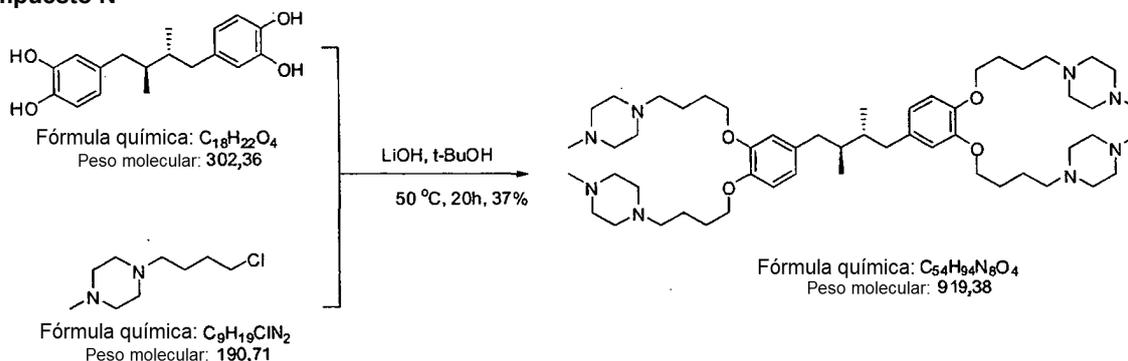
En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2 l se añadieron N-metil-piperazina (100,16 g, 1,0 mol), acetona (1000 ml) y carbonato potásico anhidro (276,42 g, 2,0 mol, 2,0 equiv.). El matraz se equipó con un agitador mecánico y un condensador. Se añadió gota a gota 4-cloro-1-bromo-butano (188,6 g, 1,1 mol, 1,1 equiv.) en agitación continua a temperatura ambiente durante un periodo de 30 min. Después, la mezcla de suspensión se agitó a 40 °C. El progreso de la reacción se controló por TLC, que confirmó que la reacción se completó después de 4 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con diclorometano (2 x 100 ml). Los filtrados combinados se concentraron al vacío hasta que se secaron. Después, el residuo se mezcló con diclorometano (500 ml). Los materiales insolubles se retiraron por filtración y se lavaron con diclorometano (2 x 100 ml). El filtrado combinado y los lavados se concentraron y se purificaron a través de una columna ultrarrápida sobre gel de sílice, que dio el producto esperado en forma de aceite de color amarillo claro. (92,5 g, rendimiento del 48,5 %).

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ = 1,37 (m, 2H, CH₂), 1,81 (m, 2 H, CH₂), 2,25 (s, 3H, NCH₃), 2,33 (m, 8H, 4 NCH₂), 3,10 (t, J = 6,5 Hz, 2H, 2CH₂N), 3,65 (t, J = 6,8 Hz, 2H, CH₂Cl) ppm; coherente con la estructura.

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz), δ = 25,4, 25,9, 44,1, 45,8, 52,1, 53,1, 55,8 ppm; coherente con la estructura.

EM (IE), m/e = 191 (M +1); coherente con la estructura.

Etapla 2: Síntesis de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-metil-piperazino-N'-il)butoxil]fenil}- 2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto N"



5 A una solución que contenía NDGA (602 mg, 2,0 mmol) e hidróxido de litio monohidrato (1,0 g, 24,0 mmol, 12 equiv.) en terc-butanol (100 ml) se le añadió N-metil-N'-(4- clorobutil)piperazina (2,29 g, 12,0 mmol, 6,0 equiv.). La solución se calentó a 50 °C en agitación continua. La reacción se controló por TLC ($CH_2Cl_2:MeOH:Et_3N = 92:6:2, V/V/V$), que confirmó que la reacción se completó después de 20 horas. La suspensión de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se repartió en diclorometano (200 ml) y agua (100 ml). La mezcla se agitó para mezclarla bien. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). La capa orgánica y los extractos se combinaron y se lavaron con bicarbonato sódico acuoso saturado (100 ml), y salmuera (10 ml). Después del secado sobre sulfato sódico anhidro, la solución se concentró en vacío reducido. El residuo se purificó a través de una columna sobre gel de sílice usando diclorometano, metanol y trietilamina (92:6:2, V/V/V) como eluyente, que dio el producto esperado en forma de un material semi-sólido de color blanco (855,02 mg, rendimiento del 46,5 %).

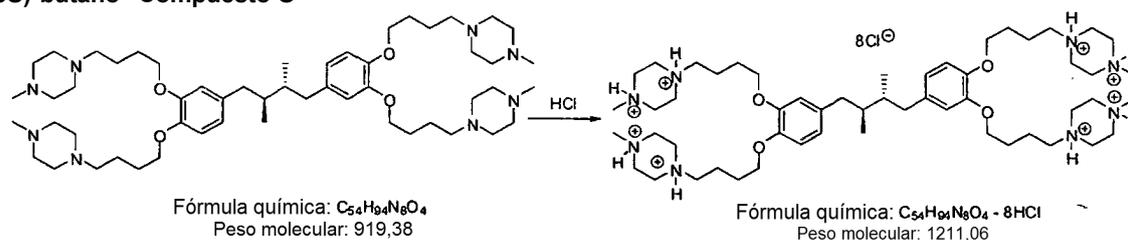
10 Pureza por HPLC: 98,2 % (% área de pico). Análisis Elemental - $C_{54}H_{94}O_8N_4$, FW = 919,38. Calculado: C: 70,55; H: 10,31; N: 12,19, Encontrado: C: 70,65; H: 10,11; N: 12,43; coherente con la estructura.

20 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 0,76$ (d, J = 6 Hz, 6 H, 2 x CH_3), 1,36-1,56 (m, 16H), 1,65-1,71 (m, 4 H), 2,42 (s, 6H), 2,45-2,65 (m, 22H), 2,85 (t, J = 6,0 Hz, 4H), 2,95 (t, J = 6,0 Hz, 4 H), 4,23 (c, J = 6,0 Hz, 8 H), 6,65-6,78 (m, 6H, 6 x ArH) ppm; coherente con la estructura.

25 ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): $\delta = 15,61, 23,55, 24,56, 32,26, 35,58, 46,27, 53,13, 55,05, 56,36, 66,44, 66,86, 113,77, 115,63, 121,15, 145,66, 147,97, 150,02$ ppm; coherente con la estructura.

EM (FAB) m/e: 920 (M+), 460 (M+), coherente con la estructura.

Etapla 3: Síntesis de octa-clorhidrato de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-metil-piperazino-N'-il)butoxil]fenil}- 2,3-dimetil-(2R,3S)-butano "Compuesto O"



30 A una solución enfriada con hielo (0 °C-5 °C) de HCl concentrado acuoso (2,2 ml de 11 N HCl, 24 mmol, 24 equiv. mol) en etanol al 95 % (7 ml) se le añadió gota a gota una solución de 1,4-bis{3,4-bis[4-(N-metil-piperazino-N'-il)butoxil]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (919,38 mg, 1,0 mmol) en etanol al 95 % (7 ml). La solución se dejó en agitación a 0 °C-5 °C durante tres horas y el disolvente se retiró en un evaporador rotatorio mientras se mantenía la temperatura del baño de agua a 45 °C. La sal clorhidrato se secó a alto vacío durante 48 horas. Después, el producto en bruto se cristalizó en etanol:éter para dar 914,35 mg del producto (rendimiento del 75,5 %) después del secado a alto vacío durante 72 horas. A continuación se proporcionan los datos analíticos para este producto.

40 p.f. 215 °C-220 °C (desc.).

45 Pureza por HPLC: 98,2 % (% área de pico). Análisis Elemental - $C_{54}H_{94}N_8O_4 \cdot 8HCl$, FW = 1211,06 calculado: C: 53,55; H: 8,49; N: 9,25, Encontrado: C: 53,24; H: 8,21; N: 9,43. Análisis elemental de cloro por procedimiento de titulación (base anhidra): teoría: 23,42 %; observado: 23,35 %; coherente con la estructura.

¹H RMN (D₂O, 400 MHz): δ = 0,75 (d, J = 6 Hz, 6 H, 2 x CH₃), 1,33-1,46 (m, 16H), 1,55-1,64 (m, 4 H), 2,32 (s, 6H), 2,35 (s, 6H), 2,45-2,65 (m, 16H), 2,83(t, J = 6,0 Hz, 4H), 2,82 (t, J = 6,0 Hz, 4 H), 4,10(c, J = 6,0 Hz, 8 H), 6,65-6,78 (m, 6H, 6 x ArH) ppm; coherente con la estructura. (Ar), 132,8 (Ar), 146,4 (Ar), 148,1 (Ar) ppm; coherente con la estructura.

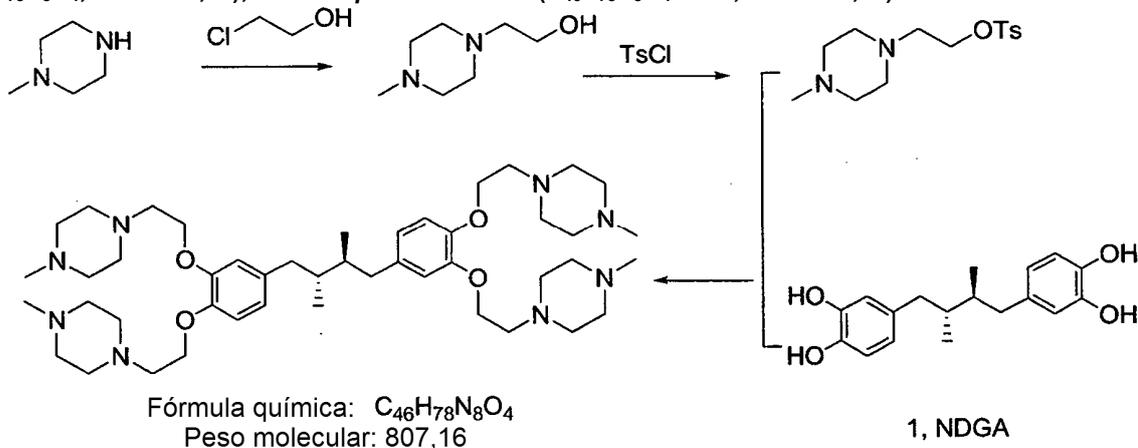
¹³C RMN (D₂O, 100 MHz): δ = 15,91, 23,85, 25,06, 31,26, 35,38, 46,17, 53,73, 55,15, 57,36, 67,34, 67,46, 114,47, 114,73, 120,95, 146,06, 148,77, 149,92 ppm; coherente con la estructura.

EM (FAB) m/e: 920 (M⁺), 460 (M⁺); coherente con la estructura.

Los siguientes Ejemplos Proféticos 1-5 muestran esquemas de reacción que se cree que son eficaces para preparar los compuestos indicados.

Ejemplo Profético A

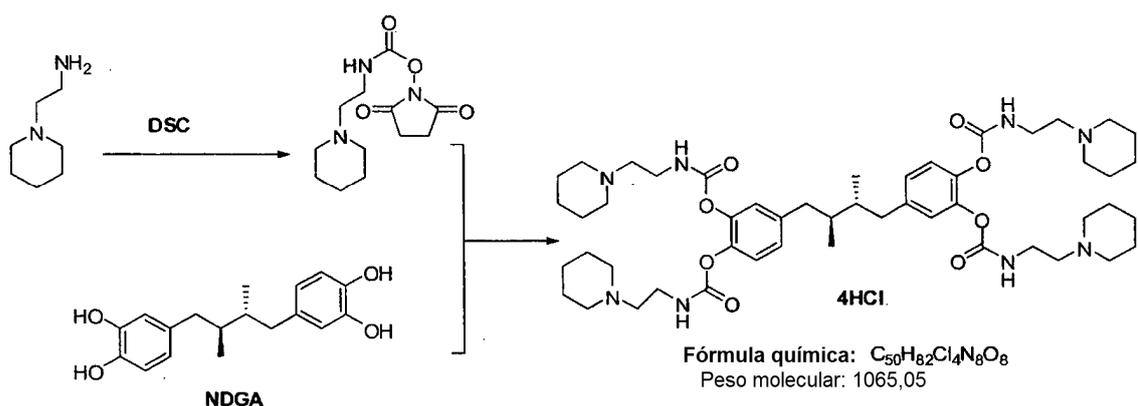
Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[2-(1-metil-piperazin-4-il)-etoxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₄₆H₇₈N₈O₄; FW = 807,16); sal tetraquis-clorhidrato (C₄₆H₇₈N₈O₄·4HCl, FW = 953,01)



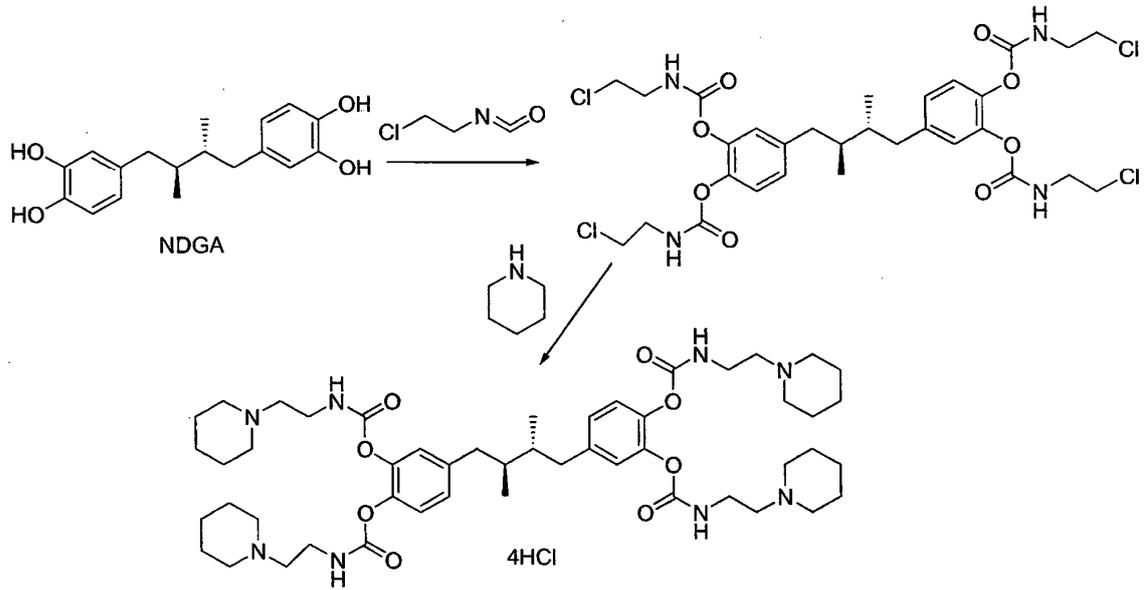
Ejemplo Profético B

Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[2-(piperidin-1-il)etilcarbamoyloxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₅₀H₇₈N₈O₈, FW = 919,20); sal tetraquis-clorhidrato (C₅₀H₇₈N₈O₈·4HCl, FW = 1065,05)

Procedimiento 1

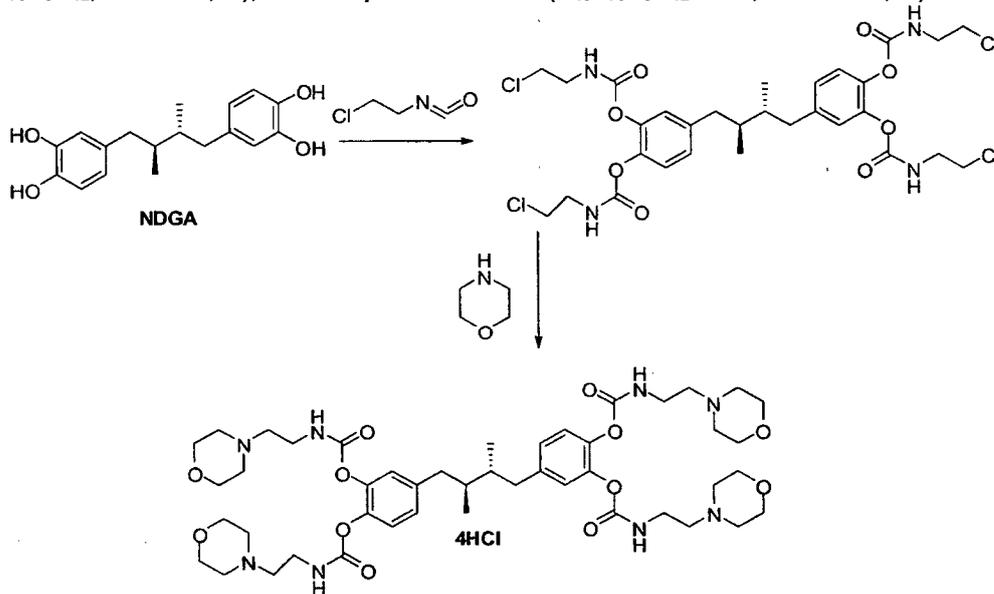


Procedimiento 2



Ejemplo Profético C:

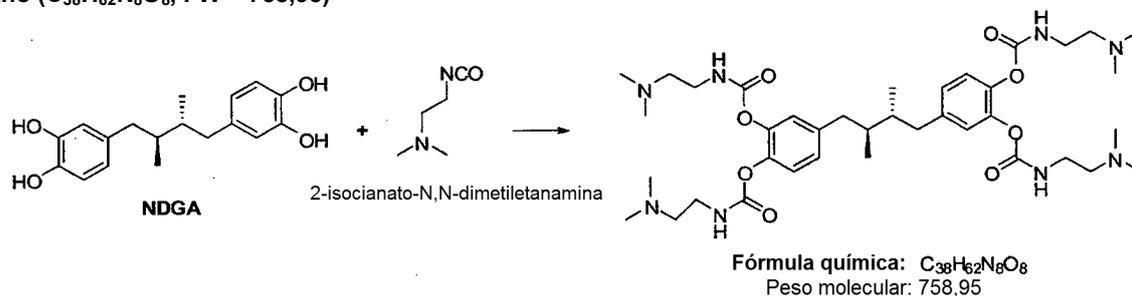
- 5 Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[2-(morfolin-1-il)etilcarbamoi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano ($C_{40}H_{70}N_8O_{12}$, FW = 927,09); sal *tetraquis*-clorhidrato ($C_{46}H_{70}N_8O_{12} \cdot 4HCl$, FW = 1072,94)



Fórmula química: $C_{46}H_{74}Cl_4N_8O_{12}$
 Peso molecular: 1072,94

Ejemplo Profético D

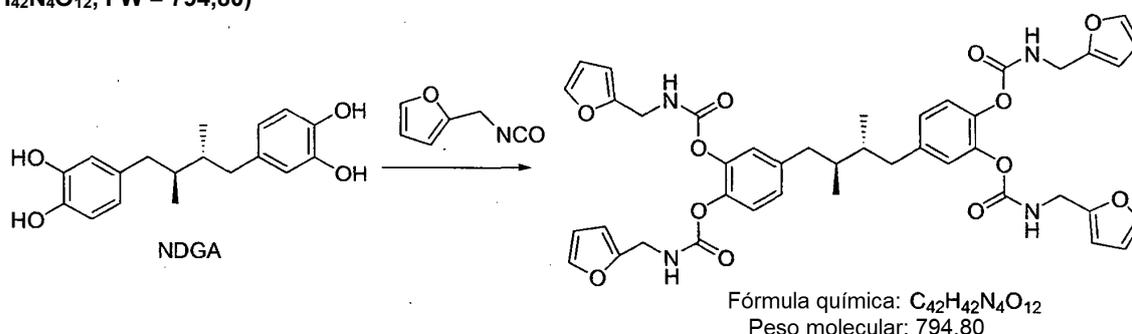
Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[(2-N,N-dimetilaminoetil)carbamoiloxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₃₈H₆₂N₈O₈, FW = 758,95)



5

Ejemplo Profético E

Síntesis de la base libre de 1,4-bis{3,4-bis[(furan-2-il)metil-carbamoiloxi]fenil}-2,3-dimetil-(2R,3S)-butano (C₄₂H₄₂N₄O₁₂, FW = 794,80)



10

La invención se describirá además con respecto a los siguientes ejemplos específicos de trabajo, no limitantes, en lo que se refiere a la citotoxicidad *in vitro* y los estudios de eficacia, siguiendo los protocolos generales que se llevaron a cabo.

15

Estudios de citotoxicidad y eficacia

Ciertos compuestos de la presente invención se han estudiado *in vitro*. Los estudios *in vitro* han establecido que varias clases de derivados del NDGA de la presente invención serían seguras y eficaces para el tratamiento profiláctico o después de la aparición de una infección vírica o una enfermedad proliferativa, inflamatoria, metabólica o vascular. Los siguientes ejemplos explican los estudios implicados en tales ensayos.

20

Estudios de citotoxicidad

Los estudios que se llevaron a cabo con respecto a la citotoxicidad incluyen los protocolos bien conocidos MTS, azul tripán y MTT. Los estudios MTS se hicieron utilizando el CellTiter 96@AQU_{eous} en el Ensayo de Proliferación Celular en Una Solución (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE. UU). Las células metabólicamente activas, a saber viables, convierten el MTS, un compuesto tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna) en formazán coloreado, que es soluble en el medio de cultivo tisular. La medición de absorbancia del formazán se lee a 490 nm. Se añade el reactivo listo para su uso directamente a las células en el medio en placas de 96 pocillos, se incuban 1-4 horas y los resultados se registran con el lector de placas. Se estimó la CI₅₀ poniendo en gráficos los datos acumulados. La CI₅₀ es la concentración del material ensayado que inhibe el 50 % del crecimiento o viabilidad del material ensayado comparado con un control.

30

35

En el ensayo del azul tripán, las células se tripsinizan y se añade una muestra a una solución del colorante azul tripán y solución salina. Las células viables son capaces de mantener el colorante fuera de su membrana, las células dañadas o muertas no. Las células viables y no viables (azules) se cuentan, y se calcula el porcentaje de viables. La tasa de proliferación se calcula utilizando los valores de las células tratadas con placebo y comparando la viabilidad de las células tratadas con las células no tratadas.

40

El ensayo MTT es un método colorimétrico para determinar el número de células viables. Las células metabólicamente activas convierten el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), en cristales de formazán color púrpura que se solubilizan en dimetil sulfoxido (DMSO). El reactivo MTT se añade al medio MTT (sin color). El medio se añade a las células y se incuban durante 4 horas. El DMSO se añade a las

45

células y se mezclan. Las soluciones coloreadas se leen entonces a 540 nm y se corrigen a 630 nm. La Cl_{50} se estima poniendo en un gráfico los datos acumulados.

Ensayo SEAP de actividad antivírica

5 La actividad antivírica se determina utilizando un ensayo SEAP (Fosfatasa Alcalina Segregada), en el que las células se transfectan con plásmidos SEAP y TAT. El TAT es un transactivador de la expresión genética del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y es uno de los dos o más factores de regulación vírica (TAT y REV) para la expresión genética del VIH. El TAT actúa uniéndose al elemento ARN TAR y activando la transcripción del promotor largo de extremo repetido (LTR). La proteína TAT estabiliza el alargamiento de la transcripción y también se ha demostrado que está implicada en el inicio de la transcripción. Estudios previos habían demostrado que la TAT media en la reducción de la proliferación de células T dependiente de anticuerpo, contribuyendo sustancialmente al fallo de la respuesta inmunitaria. La TAT estimula también directamente el crecimiento de las células de Kaposi.

15 Como el TAT no tiene homólogos celulares aparentes, este regulador fuertemente positivo ha llegado a ser una diana atractiva para el desarrollo de fármacos contra el SIDA. Al contrario que con los inhibidores de la transcriptasa inversa disponibles actualmente (AZT, DDI) o los inhibidores potenciales de proteasas que evitan nuevas rondas de infección, un inhibidor que suprima la expresión regulada por el gen TAT vírico integrado en el ADN provírico detendrá el virus en un estado temprano (Hsu y col., Science 254:1799-1802, 1991). Los esfuerzos que ayudan al esclarecimiento de los factores que controlan la expresión génica a niveles transcripcional y post- transcripcional en eucariotas huésped han hecho posible recientemente la evaluación cuantitativa de la función del TAT (Sim, Ann. N.Y. Acad. Sci. 616: 64-70, 1990). Para seleccionar los inhibidores de la transactivación regulada por TAT (TAT-TRS), el gen indicador SEAP se pone bajo el control del promotor LTR de VIH-1 en el plásmido pBC12/VIH/SEAP. La actividad codificada por el TAT se suministra por una segunda construcción en el plásmido pBC12/CMV/t2. La co-transfección transitoria de las células COS-7 con estos dos plásmidos da lugar a la secreción de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo lo que se analiza con un simple ensayo colorimétrico (Berger y col., Gene 66: 1-10, 1988). El ensayo SEAP, por tanto, proporciona una determinación indirecta de la determinación de la transactivación del TAT.

30 En el ensayo SEAP, un inhibidor debería producir la reducción de la expresión del gen indicador SEAP por medio de la transactivación del promotor LTR de VIH-1 por la proteína TAT (TAT-TRS). La proteína TAT se expresa bajo el control de un promotor citomegalovirus e induce la expresión de una forma no endógena, resistente al calor de la fosfatasa alcalina segregada. Si se bloquea la transactivación de TAT por un fármaco el indicador SEAP no se excretará en el medio. La SEAP se detecta colorimétricamente por el sustrato para-nitrofenil fosfato a 405 nm. Véase Gnabre¹³. Las células se analizan por ensayo MTT para comparar la citotoxicidad por inhibición de SEAP. La meta del fármaco es inhibir la SEAP sin que sea demasiado tóxico.

Actividad antiproliferativa

40 La actividad antiproliferativa se determina utilizando el kit de detección de apoptosis TiterTACS® (R&D Systems Inc., Minneapolis, EE. UU) relacionando la apoptosis de las células basándose en la fragmentación del ADN, y ensayos ELISA VEGF (factor de crecimiento vascular epitelial) y survivina.

45 En el ensayo de fragmentación de ADN, la detección *in situ* de apoptosis se consigue específicamente con el kit de detección de apoptosis de 96 pocillos TiterTACS®, N° de catálogo TA600 (R&D Systems, Inc.). El ensayo TiterTACS® proporciona una cuantificación de la apoptosis en células cultivadas sin el recuento directo de células marcadas que se usa en la detección colorimétrica. Las células se tratan con los compuestos de ensayo, se dejan sin tratar los controles experimentales negativos, o se tratan con TACS nucleasa los controles positivos. La TACS nucleasa permite que los controles positivos se generen para cada sistema experimental: un breve tratamiento de las células con la nucleasa TACS antes del marcado genera roturas de ADN en cada célula, proporcionando un control positivo apropiado específico para el sistema que se estudia. La enzima TdT que cataliza la adición de dNTP a los fragmentos de ADN permite la detección colorimétrica a 450 nm utilizando una solución de HRP-estreptavidina y a continuación el sustrato TACS-Sapphire. Una alta absorbancia a 450 nm indica la apoptosis de las células. Las células tratadas se comparan con las células sin tratar y las células escindidas por nucleasa para evaluar la extensión de la apoptosis.

55 Los estudios ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) VEGF se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el kit ELISA VEGF humano Endogen®, N° de catálogo EHVEGF (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Illinois EE.UU.). Se crean condiciones hipóxicas en las células tratándolas con desferrioxamina (DFO), que quela el hierro y produce que las células segreguen VEGF en el medio. El sobrenadante (del medio) se retiró y se congeló para ensayarlo, y las células se contaron con el ensayo de azul tripán de forma que los resultados pudieran normalizarse para el recuento celular. El VEGF se midió con un ELISA sándwich que captura la proteína del medio sobre una microplaca revestida de anticuerpos, y luego se utiliza un reactivo con un anticuerpo biotinilado para detectar la proteína. Los resultados de una curva de referencia capacita al usuario para cuantificar la cantidad de proteína en cada muestra.

65

Ensayo de ELISA survivina

La survivina es un inhibidor de la apoptosis que se expresa abundantemente en muchos cánceres humanos, pero no en los tejidos normales de seres humanos adultos, y se considera como un posible modulador de la fase terminal efectora de la muerte/supervivencia celular. La survivina se expresa en G₂-M de una manera dependiente del ciclo celular, uniéndose directamente a los microtúbulos del huso mitótico. Parece que la fosforilación de la survivina en Thr34 puede ser necesaria para mantener la viabilidad celular en la división celular, y la expresión de una survivina mutante deficiente de fosforilación se ha demostrado que desencadena la apoptosis en varias líneas celulares de melanomas humanos. La survivina fosforilada actúa sobre la ruta de la caspasa suprimiendo la formación de caspasa-3 y caspasa-8, y por lo tanto inhibe la apoptosis. Por lo tanto, se espera que los compuestos que reducen la expresión de la survivina aumenten la tasa de apoptosis y muerte celular.

Los efectos de los compuestos ensayados sobre la survivina se estudiaron siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el inmunoensayo de survivina total humana Surveyor™ IC, N° de catálogo SUV647 (R&D Systems, Inc.). Se analizaron los lisados celulares para hallar el contenido en proteína survivina. El kit incluye una placa revestida con un anticuerpo específico para la survivina y un reactivo de anticuerpo biotinilado que reconoce la unión de la survivina a la placa. La placa se lee en un lector de placas fijado a 450 nm y se corrige a 540 nm. Se utilizó un ensayo proteico de acuerdo con el método Bradford (Bradford, M. 1976, Anal Biochem 72: 248-254) para cuantificar y normalizar las muestras de acuerdo con el contenido total de proteínas. Los resultados a partir de una curva de referencia capacita al usuario para cuantificar la cantidad de proteína survivina en cada muestra.

Actividad anti-inflamatoria

La actividad anti-inflamatoria se determinó basándose en el efecto de los compuestos ensayados sobre queratinocitos primarios humanos (PHK). Los PHK tienen un papel importante en los procesos inflamatorios, sintetizando varias citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento. Los estudios se llevaron a cabo para determinar si los compuestos ensayados podían inhibir los queratinocitos para evitar o reducir la producción de interferón gamma (IFN- γ), interleucina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos /macrófagos (GM-CSF), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, conocida también como CD 54) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1). Los PHK se trataron primero con TNF- α para inducir un estado pro-inflamatorio y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Las citoquinas específicas se ensayaron entonces siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando ensayos proteicos de R&D Systems, Inc. (Quantikine ELISA kits; N°s de catálogo DCP00 para el kit MCP-1, DGM00 para el kit GM-CSF, y DIF50 para el IFN- γ).

35 Protocolos generales de estudios de citotoxicidad en relación a la actividad antivírica y antiproliferativa

Se ensayaron tres líneas celulares obtenidas en la ATCC y se mantuvieron según las directivas de ATCC: HeLa (adenocarcinoma cervical), A549 (carcinoma de pulmón), y COS-7 (SV40 de riñón de mono transformadas). Los estudios de estas líneas celulares se consideran indicativos del efecto de sustancias de ensayo en enfermedades de mamíferos incluyendo el ser humano.

Todos los compuestos se disolvieron en DMSO y se utilizó DMSO solo como placebo. Las muestras se disolvieron en primer lugar en diluciones de DMSO 10 mM y luego se diluyeron más en soluciones de 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 mM. Estas soluciones se añadieron al medio a una concentración del 1 % (1 μ l en 100 μ l de medio) para tratar las células con el compuesto 100, 50, 10, 5, 1, 0,5 y 0,1 μ M. Los compuestos en los que se encontró que tenían CI₅₀ bajas se diluyeron más en DMSO. Las soluciones se comprobaron antes de su uso por precipitación, especialmente las soluciones 10 mM. Si había precipitación, se calentaron a 65 °C y se añadieron al medio calentado.

Se sembraron los pocillos de las placas de 96 pocillos con $1,5-8 \times 10^4$ células en 100 μ l de medio y se incubaron una noche. Los pocillos exteriores de la placa se llenaron con 200 μ l de agua estéril desionizada (DI) para contener la evaporación del medio. Tras 24 horas, se prepararon los ensayos clínicos en el medio a una concentración del 1 % del volumen de medio. Se añadieron los medios de muestras de ensayo, mezclando con la pipeta antes de añadir 100 μ l por pocillo. Se añadió el medio a los pocillos con "solo medio". La placa con pocillos y sus contenidos se incubaron durante 24-72 horas, dependiendo del estudio realizado. El día del ensayo MTS, se retiró el reactivo MTS del refrigerador y se llevó a temperatura ambiente. Utilizando la pipeta multicanal, se añadieron 20 μ l de reactivo MTS a cada pocillo y se incubaron durante una a cuatro horas. La placa se leyó a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 690 nm tras una hora en la incubadora a partir de entonces hasta que los pocillos con blancos tenían una DO de 0,2. Los resultados se analizaron en una plantilla de Microsoft® Excel® diseñada para llevar a cabo todos los cálculos necesarios al introducirse los datos. Se comprobaron los errores estadísticos de los datos; los puntos de datos que estaban en el 10 % de la media de los puntos de datos para ese grupo se incluyeron. La media de los blancos ("solamente la media") se sustrajeron y los datos se insertaron en una gráfica que representa la respuesta al crecimiento, tratados/no tratados.

Protocolo SEAP

El protocolo SEAP siguiente se utilizó como un sistema indicador de la medición de la actividad de la transactivación de la transcripción de VIH mediada por TAT. El ensayo MTT mide la proliferación y se utiliza para verificar que los niveles de actividad SEAP no son debidos solamente a la citotoxicidad. Estos ensayos se utilizaron para seleccionar los compuestos fármacos potenciales que se dirigían como agentes antivíricos, y particularmente los candidatos anti-VIH.

Las células COS-7 (de riñón de mono verde) se co-transfectaron utilizando el reactivo Fugene 6 (Roche Applied Science, Cat. N° 118115091001, Indianapolis, Indiana, EE. UU.) con dos plásmidos pHIVSEAP (vector de expresión SEAP bajo el control del promotor LTR VIH) y pCTAT (vector de expresión de transcripción TAT VIH bajo el control de un promotor CMV (citomegalovirus)). Después del tratamiento con el compuesto de ensayo durante 48 horas, las muestras se examinaron para hallar la actividad SEAP a 405 nm después de la adición del sustrato p-nitrofenil fosfato. El porcentaje de inhibición de la actividad de SEAP se calculó en relación con el control placebo.

Ejemplo 10

Estudios SEAP/MTT y MTS – Citotoxicidad y eficacia antivírica

Los resultados de los estudios SEAP/MTT y MTS de los compuestos indicados en los Ejemplos de trabajo anteriores se basan en los protocolos generales expuestos anteriormente y se exponen en la Tabla 3 siguiente, en donde la columna a mano izquierda identifica el compuesto ensayado y la CE₅₀ indica la concentración del compuesto que tiene el 50 % del efecto del control. La CI₅₀ se ha definido anteriormente.

Tabla 3

Compuesto	CE ₅₀ SEAP	CI ₅₀ COS-7	CI ₅₀ A549	CI ₅₀ HeLa
A	0,5-1 µM	0,7-0,9 µM	0,8-0,9 µM	2-3 µM
B				1-5 µM
D			1-5 µM	5-10 µM
M			1-5 µM	5-10 µM
O			8-9 µM	10-30 µM
F	Respuesta variable	Respuesta variable	>100 µM	>100 µM
G en H ₂ O			15-20 µM	15-20 µM
H en H ₂ O			15-20 µM	15-20 µM
I	60-80 µM	70-80 µM	65-70 µM	20-30 µM
K			>100 µM	>100 µM
J	80-90 µM	80-90 µM	80-90 µM	>100 µM

Se muestran en la Tabla 3 los resultados de los compuestos con actividad biológica en dos de las líneas celulares ensayadas utilizando el ensayo MTS como indicador de la viabilidad celular. Las concentraciones CI₅₀ muestran varios grados de inhibición de la viabilidad celular para estos compuestos. Todos los compuestos son capaces de reducir la viabilidad celular, y por tanto, inducen apoptosis, de manera dependiente de la dosis. El compuesto A mostró la mayor inhibición de la viabilidad celular en células A549, mientras que su sal hidrocloreuro (Compuesto B) mostró la mayor inhibición en células HeLa.

El alcance de la inhibición de la transactivación TAT que se determinó por el ensayo SEAP también variaba entre los compuestos, como se muestra en la Tabla 3. El compuesto A también mostró una actividad antivírica significativa con una CE₅₀ alrededor de 0,5-1,0 µM. Las concentraciones inhibitoras de viabilidad celular en las células de ensayo (COS-7) que se determinaron por MTT fueron normalmente similares a las concentraciones eficaces para la transactivación TAT.

Ejemplo 11

Actividad antiproliferativa basada en estudios TiterTACS®, VEGF y Survivina

Los resultados de la fragmentación de ADN con TiterTACS®, y los estudios de apoptosis con ELISA VEGF y ELISA survivina en los compuestos indicados a partir de los Ejemplos de trabajo anteriores, basados en los protocolos generales anteriores, se exponen en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4

Compuesto	Fragmentación ADN	CI ₅₀ Survivina	CI ₅₀ VEGF
B	Negativo		2 μ M
D	Positivo	4 μ M	9 μ M
M	Positivo	5 μ M	9 μ M
O	Positivo	14 μ M	18 μ M
G en H ₂ O			25 μ M
H en H ₂ O	Positivo	10 μ M	23 μ M
Positivo = induce apoptosis			
Negativo = no induce apoptosis			

Los compuestos ensayados han mostrado una reducción significativa de los niveles de proteína survivina a concentraciones micromolares bajas. En consecuencia, también han mostrado una fuerte inducción de la apoptosis según el ensayo de fragmentación de ADN. Los compuestos D, M, O y H reducen la expresión de proteína survivina y por lo tanto son capaces de inducir apoptosis. Estos compuestos son capaces de disminuir la survivina e inducen apoptosis de manera dependiente de la dosis. El compuesto D era el inhibidor más potente de la producción de survivina con una CI₅₀ de producción de survivina alrededor de 4 μ M...

La liberación de proteína VEGF también disminuyó con estos compuestos. La inhibición de la producción de proteína VEGF variaba en las concentraciones molares bajas para los compuestos B, D, M, O, G y H. Se observó inhibición con todos los productos de forma dependiente de la dosis. El compuesto B mostró una CI₅₀ para la producción de VEGF alrededor de 2 μ M, mientras que los compuestos D y M mostraron ambos una CI₅₀ de VEGF de aproximadamente 9 μ M.

Los resultados de la Tabla 4 indican que los compuestos de la presente invención son eficaces en la inhibición de la actividad vírica y que producen la muerte celular (apoptosis) de las líneas celulares ensayadas. De los compuestos ensayados, los Compuestos A, B, C, G, H, M y O parecen ser más eficaces que los otros debido a sus valores EC₅₀ y IC₅₀ más bajos. El compuesto A parece ser el más eficaz.

Ejemplo 12

Selección de líneas celulares tumorales humanas del DTP del Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU.

El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI) proporciona un programa de desarrollo terapéutico (DTP) (<http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>) para seleccionar sustancias remitidas con el fin de apoyar el descubrimiento de fármacos contra el cáncer. El Proyecto de Selección en Líneas celulares *In vitro* (IVCLSP) es un servicio dedicado a proporcionar apoyo directo al programa de descubrimiento de fármacos anticáncer del DTP y está diseñado para seleccionar hasta 3.000 compuestos por año por su potencial actividad anticáncer. La operación de esta selección utiliza 60 líneas celulares tumorales humanas diferentes, que representan leucemia, melanoma y cánceres del pulmón, colon, cerebro, ovario, mama, próstata y riñón. El objetivo es priorizar para posterior evaluación, muestras de compuestos sintéticos o productos naturales que muestren una inhibición selectiva del crecimiento o destrucción de las células de líneas tumorales particulares. Esta selección es única en que la complejidad de la respuesta a la dosis producida por un compuesto determinado en 60 líneas celulares da como resultado un patrón de respuesta biológica que se puede utilizar en algoritmos de reconocimiento de patrones (programa COMPARE. Véase: <http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare.html>). Utilizando estos algoritmos, es posible asignar un supuesto mecanismo de acción a un compuesto de ensayo, o determinar si el patrón de respuesta es único y no es similar a ninguno de los compuestos prototipo de referencia incluidos en la base de datos del NCI. Además, después de la caracterización de varias dianas moleculares celulares en las 60 líneas celulares, puede ser posible seleccionar compuestos que interactúan más probablemente con una diana molecular específica.

La selección es un proceso en dos etapas, empieza con la evaluación de todos los compuestos contra las 60 líneas celulares a una dosis única de 10 μ M. El resultado de la selección de la dosis única se plasma en un gráfico de medias y está disponible para el análisis por el programa COMPARE. Los compuestos que muestren una inhibición del crecimiento significativo se evalúan contra el panel de 60 células a cinco niveles de concentración.

Metodología de la selección de cáncer *in vitro*

Las líneas celulares tumorales humanas de cáncer del panel de selección se cultivan en medio RPMI 1640 que contiene un 5 % de suero fetal bovino y L-glutamina 2 mM. En un experimento típico de selección, las células se

inoculan en placas microtiter de 96 pocillos en 100 µl con densidades que varían de 5.000 a 40.000 células /pocillo dependiendo del tiempo de doblaje de las líneas celulares individuales. Después de la inoculación celular, las placas microtiter se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂, el 95 % de aire y el 100 % de humedad relativa durante 24 horas antes de la adición de los fármacos experimentales.

5 Tras 24 horas, se fijan dos placas de cada línea celular *in situ* con ácido tricloroacético (TCA), para representar una medición de la población celular de cada línea celular en el momento de la adición del fármaco (Tz). Los fármacos experimentales se solubilizan en DMSO a 400 veces la concentración final máxima de ensayo deseada y se almacenan congeladas antes de usarse. En el momento de la adición del fármaco, se descongela una alícuota del
10 concentrado congelado y se diluye a dos veces la concentración final máxima de ensayo deseada con medio completo que contenía 50 µg/ml de gentamicina. Se hacen diluciones seriadas de cuatro, 10 veces o 1/2 log para proporcionar un total de cinco concentraciones de fármaco más el control. Se añaden alícuotas de 100 µl de los diferentes fármacos a los pocillos microtiter adecuados que ya contienen 100 µl de medio, dando como resultado las concentraciones de fármacos finales necesarias.

15 Después de la adición de los fármacos, se incuban las placas durante 48 horas adicionales a 37 °C, 5 % de CO₂, 95 % de aire, y una humedad relativa del 100 %. Para las células adherentes, los ensayos se terminan por adición de TCA frío. Las células se fijan *in situ* con la adición cuidadosa de 50 µl de TCA frío al 50 % (p/v) (con una concentración final de TCA del 10 %) y se incuban durante 60 minutos a 4 °C. Se descarga el sobrenadante, y las
20 placas se lavan cinco veces con agua corriente y se secan al aire. Se añade una solución de Sulforrodamina B (SRB) (100 µl) a 0,4 % (p/v) en un 1 % de ácido acético en cada pocillo, y se incuban las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, el colorante no unido se elimina lavando cinco veces con ácido acético al 1 % y las placas se secan al aire. Los enlaces teñidos se solubilizan posteriormente con base Trizma 10 mM, y se lee la absorbancia en un lector automático de placas con una longitud de onda de 515 nm. Para suspender
25 las células, la metodología es la misma salvo que el ensayo se termina fijando las células asentadas en el fondo de los pocillos añadiendo cuidadosamente 50 µl de TCA al 80 % (concentración final de TCA 16 %). Utilizando las siete medidas de absorbancia [tiempo cero, (Tz), crecimiento del control (C), y crecimiento de ensayo en presencia del fármaco a los cinco niveles de concentración (Ti)], se calcula el porcentaje de crecimiento en cada nivel de concentración de fármaco. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula como:

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

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

35 Se calculan tres parámetros de respuesta a la dosis para cada agente experimental. Se calcula la inhibición del crecimiento (IC₅₀) a partir de $[(Ti-Tz) / (C-Tz)] \times 100 = 50$, que es la concentración de fármaco que da lugar al 50 % de reducción en el aumento neto de proteína (medida por tinción de SRB) en las células control durante la incubación con el fármaco. La concentración de fármaco resultante en la inhibición del crecimiento total (ICT) se calcula a partir de $Ti = Tz$. La CL50 (concentración de fármaco que da como resultado el 50 % de reducción de la proteína medida al final del tratamiento con el fármaco en comparación con la del principio) indica la pérdida neta de células después del tratamiento y se calcula a partir de $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = -50$. Los valores se calculan para cada
40 uno de estos tres parámetros si el nivel de actividad se alcanza; sin embargo, si el efecto no se consigue o se excede, el valor para este parámetro se expresa como mayor o menor del máximo o mínimo de la concentración ensayada.

45 En la Tabla 5 se expone un resumen de los resultados del estudio NCI DTP descrito anteriormente para el Compuesto A 10 µM:

Tabla 5

Panel de línea celular 4 (nº de líneas celulares)	Porcentaje del crecimiento medio con el Compuesto A 10µM
NSCLC (8)	-90,92
Cáncer de colon (7)	-94,08
Cáncer de mama (6)	-67,95
Cáncer ovárico (6)	-85,89
Leucemia (6)	-81,93
Cáncer renal (6)	-95,54
Melanoma (8)	-92,38
Próstata (2)	-95,47
SNC (6)	-93,97

Los resultados indican que el Compuesto A a una concentración de 10 µM tiene una amplia actividad contra varios

tipos de las 60 líneas celulares. Los efectos inhibidores mayores se demostraron contra las líneas celulares de cáncer renal, seguidos de cerca por las líneas celulares de cáncer de próstata, con efectos inhibidores menores que se mostraron contra el cáncer de mama.

5 Ejemplo 13

Estudios de la actividad sobre los PHK contra enfermedades inflamatorias y vasculares

La actividad antiinflamatoria de varios de los compuestos de los ejemplos de trabajo descritos anteriormente se determinó basándose en los efectos de los compuestos ensayados sobre los queratinocitos primarios humanos (PHK) como se ha descrito anteriormente y siguiendo las instrucciones del fabricante de varios kits utilizados en los estudios. Aunque estos estudios se utilizan más normalmente principalmente para las investigaciones antiinflamatorias, también se pueden aplicar a las enfermedades vasculares, ya que los resultados con los queratinocitos se pueden extrapolar al endotelio vascular.

Solo los datos de la MCP-1 con los PHK son dependientes de la dosis, por lo tanto se puede calcular la CI_{50} para MCP-1, pero no para otras citoquinas. Los resultados de los estudios de la MCP-1 sobre varios compuestos se muestran en la Tabla 6 siguiente.

Tabla 6

Compuesto	CI_{50} MCP-1
B	2 μ M
F	>100 μ M
I	25 μ M
J	70 μ M

Los resultados de los compuestos con actividad antiinflamatoria en los PHK tratados con TNF- α como se ensaya para la producción de proteína MCP-1 se muestran en la Tabla 6. Las concentraciones CI_{50} para la proteína MCP-1 muestra varios grados de inhibición de esta citoquina inflamatoria. En los resultados de los otros ensayos, todos los compuestos que se ensayaron fueron capaces de reducir la producción de proteína MCP-1 de una manera dependiente de la dosis. El compuesto B mostró la inhibición más fuerte de MCP-1 en PHK tratados con TNF- α .

Ejemplo 14

Estudios de permeabilidad como indicativo de biodisponibilidad vía oral

Se llevaron a cabo los estudios de permeabilidad con un contratista externo en representación del cesionario de la presente invención y solicitud para determinar la permeabilidad del compuesto A por medio de monocapas Caco-2. Un factor importante de biodisponibilidad vía oral es la capacidad de un compuesto para absorberse en el intestino delgado. La medición de la permeabilidad aparente de un fármaco (P_{app}) a través de monocapas celulares se correlaciona bien con la absorción intestinal humana, y son apropiadas para esta medición varias líneas celulares de mamífero, incluyendo Caco-2, LL-PK1 y MDCK, (Artursson, P. y col., Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Comm* 175:880-885 (1991); Stewart, B.H., y col., Comparison of intestinal permeabilities in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in humans. *Pharm Res* 12:693 (1995)). La glicoproteína P (P-gp, codificada por MDR1) es un miembro de la superfamilia transportadora ABC y se expresa en el intestino humano, hígado y otros tejidos. La expresión intestinal de P-gp puede afectar a la biodisponibilidad vía oral de las moléculas de fármaco que son sustratos para este transportador. Se puede estudiar la interacción con P-gp utilizando ensayos directos de transporte de fármacos en sistemas celulares polarizados tales como células Caco-2 monocapas, y células monocapas humanas LLC-PK₁ que expresan ADNc P-gp y células MDCK.

Las células Caco-2 (línea celular Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano, n° de registro ATCC HTB-37, usada entre los pasajes 18 y 45) se sembraron en HTS24-Multipocillo BD Falcon™, con 1 μ m de inserciones de cultivo (n° de catálogo BD 351180) (BD Biosciences Discovery Labware, Woburn, MA, EE. UU.). Las células se cultivaron durante 21-25 días con sustitución del medio cada 3-4 días. Se evaluó la integridad de la monocapa por mediciones pre-experimentales de la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) y determinaciones post-experimentales del flujo de amarillo lucifer de A a B.

El tampón de transporte era HBSS (Solución salina equilibrada de Hank) tamponada con la adición de HEPES (N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2- ácido etansulfónico]), 10 mM, y el pH ajustado a 7,4 con NaOH. La solución receptora se preparó añadiendo DMSO 1 % al tampón de transporte. La solución de ensayo era del Compuesto A en DMSO en el tampón de transporte a una concentración final de DMSO del 1 %. Se prepararon soluciones donantes de comparación de permeabilidad de dos compuestos (50 μ M [H^3]- propranolol como "Alta" y 50 μ M de [^{14}C]-manitol como "baja") así como el sustrato control positivo de P-gp (5 μ M de [3H]-digoxina) diluyendo las alícuotas de

soluciones madre radiomarcadas y no radiomarcadas en el tampón de transporte a una concentración final de DMSO del 1 %.

5 Los artículos de ensayo se ensayaron a una concentración única (1 μM) en ambas direcciones de A a B y de B a A. Las soluciones donante y receptora se añadieron a las cámaras apical y basolateral de las monocapas (dependiendo de la dirección del transporte a medirse). Se incubaron las monocapas en un agitador orbital (50 rpm) a 37 °C, con humedad ambiente y CO₂. Después de 90 minutos, las muestras de las cámaras de donante y receptor se retiraron para su análisis.

10 Para determinar la cantidad de enlaces no específicos de la muestra a la placa de ensayo, se incubó la solución de ensayo bajo las condiciones descritas anteriormente en un único pocillo de la placa de ensayo de 24 pocillos. Después de 90 minutos, la muestra se retiró de cada pocillo para el análisis. Después de recolectar todas las muestras, se añadió la solución de amarillo lucifer a cada monocapa a una concentración final de 100 μM . Las inserciones se colocaron en una nueva placa receptora que contenía el tampón de transporte. Después de 30 min.
15 en un agitador orbital (50 rpm) a 37 °C, con ambiente de humedad y CO₂, se retiraron las muestras de la cámara receptora para medir el porcentaje de flujo de amarillo lucifer.

Se ensayaron los dos compuestos comparadores de permeabilidad que representaban la alta permeabilidad (50 μM [H³]- propranolol) y de baja permeabilidad (50 μM de [¹⁴C]-manitol en la dirección de A a B, con las muestras de las
20 cámaras donante y receptora tomadas a la vez a los 90 minutos. El sustrato control de P-gp era 5 μM de [³H]-digoxina y se ensayó en ambas direcciones de A a B y de B a A, con las muestras de la cámara donante y receptoras tomadas a la vez a los 90 minutos. Se utilizaron monocapas duplicadas para cada incubación.

25 Las muestras se analizaron por LC/MS/MS utilizando el área del pico de las relaciones con una referencia interna. Las concentraciones del artículo de ensayo se calcularon basándose en el área del pico de las relaciones obtenidas por las diluciones apropiadas de la solución donante que contenía el artículo de ensayo y la concentración nominal en el tampón de transporte. Las muestras se diluyeron apropiadamente para asegurar que la respuesta estaba en el intervalo lineal del detector de espectros de masa. Las muestras del comparador y el control se analizaron por recuento de centelleo líquido. Las concentraciones de amarillo lucifer se determinaron utilizando un lector de fluorescencia de placas.
30

Las mediciones pre-experimentales de la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) (411 Ωcm^2 de media) y el flujo de amarillo lucifer post-experimental de A a B (media 0,1 %) confirmaron la integridad de la monocapa. La polarización del control positivo digoxina confirmó un modelo de transporte P-gp en funcionamiento. Los valores P_{app}
35 de los comparadores de permeabilidad manitol y propranolol estaban dentro de los intervalos históricos observados en las instalaciones de ensayo con este sistema de ensayo (media $4,1 \times 10^{-7} \pm \text{DS } 2,4 \times 10^{-7}$ para el manitol, $1,5 \times 10^{-5}$ para el propranolol) indicando un funcionamiento apropiado del modelo.

40 Los resultados de los comparadores de permeabilidad manitol y propranolol así como el sustrato control de P-gp digoxina se presentan en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 7

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

45 Los datos de permeabilidad bidireccional así como las relaciones de polarización obtenidas por el ensayo del compuesto de ensayo en células Casco-2 monocapa se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

Artículo de ensayo	Conc. nominal [μM]	P _{app} [cm/s]				Relación de polarización [B-A/A-B]
		A a B		B a A		
Compuesto A	1,0	9,75E-06	9,61E-06	1,74E-06	1,72E-06	0,18

La recuperación del compuesto A de las cámaras apical y basolateral (equilibrio de masas) así como a partir de un pocillo único de una placa de cultivo de 24 pocillos sin células (unión no específica) al final de la incubación se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9

Artículo de ensayo	Conc. nominal [µM]	Equilibrio de masas*				Unión no específica % de recuperación
		A a B		B a A		
Compuesto A	1,0	36 %	39 %	38 %	30 %	13 %

* Valores de recuperación/equilibrio de masas >100 % se deben normalmente al aumento de solubilidad en el curso de la incubación

Conclusiones

- 5 Los resultados fueron bastante esperanzadores. Los estudios de permeabilidad en células Casco-2 monocapa como un modelo *in vitro* de la absorción intestinal demostraba que el Compuesto A está entre la clase moderada como se determinó por el sistema de clasificación de la permeabilidad BCS.
- 10 Los resultados de la TEER monocapa así como el flujo de amarillo lucifer post-experimental indicaron la presencia de células monocapas funcionales por medio del ensayo. El control positivo del transporte de P-gp, la digoxina, mostraba el transporte polarizado (relación de polarización de 5,4, Tabla 7) indicando un funcionamiento adecuado del sistema de ensayo.
- 15 El equilibrio de masas y las determinaciones de las uniones no específicas mostraron que el Compuesto A estaba unido al plástico de la placa y/o a las células en un grado que podía reducir la cantidad de compuesto disponible para la difusión y el transporte. Como resultado, los valores aparentes de P_{app} y las relaciones de la polarización resultantes (Tabla 8) pueden hacer que se estime peor la permeabilidad del Compuesto A y deberían utilizarse con precaución cuando se asignan a una clase BCS de permeabilidad como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Clase de Permeabilidad ^[3]	Absorción en humanos ^[4]	P_{app} (cm/s)
baja	< 50 %	≤ manitol
moderada	50-89 %	> manitol y < propranolol
alta	≥ 90 %	≥ propranolol

- 20 La permeabilidad de A-B que se observa en el Compuesto A estaba entre las observadas para el manitol y el propranolol. Basándose en la clasificación de permeabilidad BCS (Tabla 10), el Compuesto A se consideraría como un compuesto de permeabilidad moderada.
- 25 El compuesto A mostraba relaciones de polarización de 0,1-0,2, indicando que la permeabilidad de A-B excedía la permeabilidad de B-A para este compuesto. Este hallazgo no es consistente con el flujo de B-A mediado por P-gp, y puede sugerir la implicación de un transportador distinto de la P-gp en el flujo de A-B.
- 30 Los estudios anteriores demuestran que los compuestos representativos de los derivados del NDGA de la presente invención serían útiles como compuestos farmacéuticos.

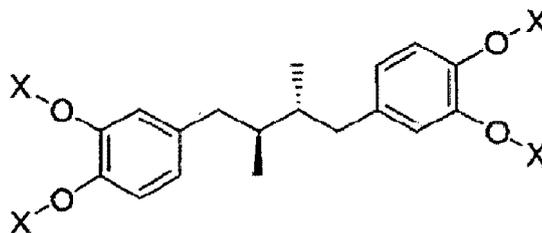
Referencias:

- 35 1. Trang, T.; Stutak, M.; Quirion, R.; Jhamandas, K. Br. J. Pharmacol. 2003, 140, 295-304.
 2. Nakadate, T. Jpn. J. Pharmacol. 1989, 49, 1-9.
 3. Hausott, B.; Greger, H.; Marian, B. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2003, 129, 569-576.
 4. Fujiwara, T.; Misumi, Y.; Ikehara, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 301, 927-933.
 5. (a) Cheng, J. S.; Jan, C. R. Toxicol. *In vitro* 2002, 16, 485-490. (b) Wang, J. L.; Chang, H. J.; Tseng, L. L.; Liu, C. P.; Lee, K. C.; Chou, K. J.; Cheng, J. S.; Lo, Y. K.; Su, W.; Law, Y. P.; Chen, W. C.; Chan, R. C.; Jan, C. R. Pharmacol. Toxicol. 2001, 89, 301-305. (c) Su, W.; Tseng, L. L.; Lin, M. C.; Chang, H. J.; Lee, K. C.; Chou, K. J.; Lo, Y. K.; Cheng, J. S. Chang, H. T.; Wang, J. L.; Liu, C. P.; Chen, W. C.; Jan, C. R. Neurochem. Int. 2002, 40, 249-254. (d) Huang, J. K.; Chen, W. C.; Huang, C. J.; Hsu, S. S.; Chen, J. S.; Cheng, H. H.; Chang, H. T.; Jiann, B. P.; Jan, C. R. Life Sciences 2004, 75, 2341-2351.
 6. Yamamura, H.; Nagano, N.; Hirano, M.; Muraki, K.; Watanabe, M. Imaizumi, Y. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 291, 140-146.
 7. Ono, K.; Hasegawa, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Yamada, M.; Naiki, H. J. Neurochem. 2002, 81, 434-440.
 8. Lee, C. H.; Jang, Y. S.; Her, S. J.; Moon, Y. M.; Baek, S. J.; Eling, T. Exp. Cell. Res. 2003, 289, 335-341.
 9. Hwu, J. R.; Tseng, W. N.; Gnable, J.; Giza, P.; Huang, R. C. J. Med. Chem. 1998, 41, 2994-3000.
 10. Huang, R. C.; Li, Y.; Giza, P. E.; Gnable, J. N.; Abd-Elazem, I. S.; King, K. Y.; Hwu, J. R. Antiviral Res. 2003, 58, 57-64.
 11. King, K. Y.; Hakimelahi, G. H.; Huang, R. C.; Hwu, J. R. J. Genetics Mol. Biol. 2002, 13, 248-257.
 12. Gnable, J. N.; Brady, J. N.; Clanton, D. J.; Ito, Y.; Dittmer, J.; Bates, R. B.; Huang, R. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 11239-11243.

13. Gnanapavan, J.; Ito, Y.; Ma, Y.; Huang, R. C. J. Chromatogr. A. 1996, 719, 353-364
14. Chen, H.; Teng, L.; Li, J.; Park, R.; Mold, D. E.; Gnanapavan, J.; Hwu, J. R.; Tseng, W. N.; Huang, R. C. J. Med. Chem. 1998, 41, 3001-3007.
- 5 15. Park, R.; Giza, P. E.; Mold, D. E.; Huang, R. C. Antiviral Res. 2003, 58, 35-45.
16. Craig, J.; Callahan, M.; Huang, R. C.; DeLucia, A. Antiviral Res. 2000, 47, 19-28.
17. Chang, C.-C.; Heller, J. D.; Kuo, J.; Huang, R. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 13239-13244.
18. Heller, J. D.; Kuo, J.; Wu, T. C.; Kast, W. M.; Huang, R. C. Cancer Res. 2001, 61, 5499-5504.
19. ((a). Park, R.; Chang, C.C.; Liang, Y.C.; Chung, Y.; Henry, R.A.; Lin, E.; Mold, D.E.; Huang, R.C. Clin. Cancer Res., 2005, 11(12), 4601-4609. (b). Chang, C.C.; Liang, Y.C.; Kultz, A.; Hsu, C.I.; Lin, C.F.; Mold, D.E.; Chou, T.C.;
- 10 Lee, Y.C.; Huang R.C. Published on line March 17, 2006 Cancer Chemotherapy and Pharmacology.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente estructura general (Fórmula IV), y sus sales farmacéuticamente aceptables:



Fórmula IV

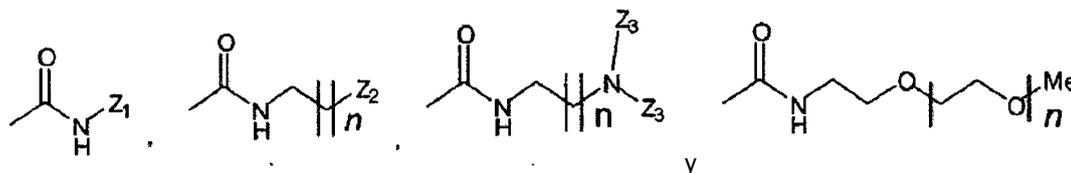
en la que X se selecciona entre el grupo que consiste en:

-A-R;

-(CH₂)_xHal, en la que x es un número entero de 1 a 10 y Hal es un átomo de halógeno, y

-(CH₂CH₂C)_yH, en la que y es un número entero de 1 a 10; y

un grupo unido a carbamato seleccionado entre el grupo que consiste en:



en las que n es un número entero de 1 a 6, Z₁ es una cadena de hidrocarburo lineal saturada de 2-6 carbonos y opcionalmente 1-3 átomos de halógeno, Z₂ es un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente 0-3 dobles enlaces y opcionalmente que contiene 1-3 átomos de cualquiera de O, N y S, y Z₃ es metilo o etilo;

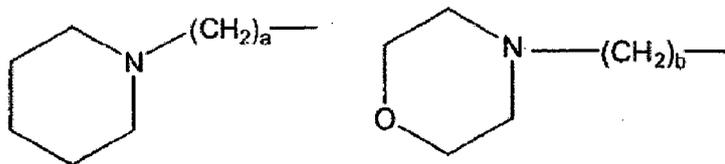
en la que cuando X es -A-R, R es un grupo terminal y A es una cadena lateral de hidrocarburo saturada lineal unida en un extremo a los grupos O de un residuo hidroxil respectivo por un enlace éter o un enlace carbamato y en el otro extremo a un carbono o un heteroátomo en el grupo terminal R;

en la que la cadena lateral A se selecciona entre el grupo que consiste en una cadena hidrocarburo C₂-C₁₆ lineal saturada opcionalmente con 1-5 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, N y S, unida a los grupos O de un residuo hidroxil respectivo de NDGA a través de un enlace éter; y 1-5 unidades de una cadena de polietilenglicol (PEG);

en la que R se selecciona entre el grupo que consiste en:

un anillo carbocíclico de 5 a 7 miembros seleccionado entre el grupo que consiste en un anillo totalmente saturado con 1 a 3 N, O o S heteroátomos; un anillo que contiene de 1 a 3 dobles enlaces con 1 a 3 heteroátomos N, O o S; un anillo que contiene un enlace carbamato, un enlace urea, un enlace carbonato o un enlace amida; y un grupo soluble en agua seleccionado entre el grupo que consiste en una sal de metal alcalino de ácido sulfónico; una sal de metal alcalino de ácido fosfónico; una sal farmacéuticamente aceptable; un azúcar y un grupo polihidroxil; y

en la que cuando X es



a es un número entero de 3 a 16 y b es un número entero de 4 a 16.

2. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento de tratamiento o de profilaxis.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento de tratamiento o de profilaxis de una infección vírica.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento de tratamiento o de profilaxis de una enfermedad proliferativa.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento de tratamiento o de profilaxis de una enfermedad inflamatoria.
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento de tratamiento o de profilaxis de una enfermedad metabólica.
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento de tratamiento o de profilaxis de una enfermedad vascular.
9. Un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 e instrucciones para su uso profiláctico o para tratar al menos una de una infección vírica, una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad metabólica y una enfermedad vascular.