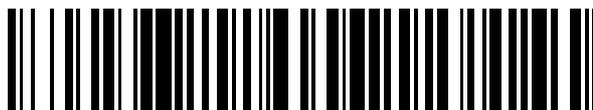


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 496**

51 Int. Cl.:

**C07C 217/84** (2006.01)

**C07C 237/04** (2006.01)

**C07F 9/06** (2006.01)

**A61K 31/661** (2006.01)

**A61K 31/09** (2006.01)

**A61K 31/165** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2009 E 09820256 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2351730**

54 Título: **Derivados de etoxi-difeniletano, procesos de preparación y usos del mismo**

30 Prioridad:

**15.10.2008 CN 200810201182**

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

**09.09.2014**

73 Titular/es:

**SHANGHAI ECUST BIOMEDICINE CO., LTD  
(50.0%)**

**4th Floor, Building B No. 18, 1305 Huajing Road  
Xuhui, Shanghai 200231, CN y**

**ZHEJIANG WILD WIND PHARMACEUTICAL CO.,  
LTD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WU, FANHONG;  
ZHOU, WEIGUO;  
XU, FANGMING y  
XIAO, FANHUA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 492 496 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Derivados de etoxi-difeniletano, procesos de preparación y usos del mismo

**Campos técnicos:**

5 La invención se refiere al campo de la síntesis de fármacos, concretamente a la síntesis de un fármaco contra el cáncer derivado del difeniletano.

**Antecedentes:**

10 Un nuevo factor de despolimerización de la tubulina descubierto recientemente puede causar oclusión vascular a una dosis inferior a la DMT (Expert Opin Investig Drugs 2004 Sep; 13(9) 1171-82). En 2005, Loin Vincent et al. descubrieron un nuevo factor de despolimerización de la tubulina con atributos similares que pueden, como agentes diana vasculares (VTA, por sus siglas en inglés), dañar la estructura de la tubulina, y los datos documentales demuestran que los agentes diana vasculares pueden inducir de forma selectiva el deterioro de los vasos tumorales, parcialmente a través de las vías de la señal de VE-cadherina. Este factor de despolimerización de la tubulina causa daños selectivos a los vasos tumorales y previene la angiogénesis del tumor, sin afectar al sistema vascular normal. Por otra parte, puede inhibir la agregación de tubulina, causar de forma selectiva la disfunción de los vasos tumorales y daños estructurales en los mismos, así como inducir la apoptosis de las células endoteliales vasculares, a fin de desempeñar la función de destruir células tumorales o inhibir la metástasis del tumor, en caso de que las células tumorales estén libres del aporte de nutrición y oxígeno.

20 En 2005, Gillian M. Tozer et al. publicaron en la prestigiosa revista *Nature Rev Cancer* que estos compuestos influyen no solamente en la proliferación de las células endoteliales vasculares, sino también en la migración de las células endoteliales para modificar también rápidamente la morfología de las células endoteliales vasculares, provocar la apoptosis de las células endoteliales y romper la conexión de las células endoteliales vasculares, provocando así rápidamente la disfunción y el daño estructural de los vasos tumorales. Dado que por lo general todos los vasos normales están soportados por células de músculo liso, los compuestos que solamente actúan sobre los vasos que no cuentan con el soporte de células de músculo liso no influyen sobre los vasos soportados por músculo liso, a fin de provocar rápida y selectivamente la disfunción de los vasos tumorales y daños musculares en los mismos, para actuar también selectivamente sobre las células tumorales y reducir en gran medida la toxicidad sobre las células normales (Natural Rev Cancer, junio de 2005, 5 (6) 423-35, J. Clin Invest, 1 de noviembre, 2005; 115 (11) 2992-3006). Estos se consideran uno de los fármacos antitumorales más prometedores en la actualidad.

30 Actualmente, entre todas las investigaciones que se están realizando en el territorio nacional y en el extranjero sobre estos fármacos, solamente los compuestos de difeniletano de combretastatina A-4 se encuentran en investigación clínica. La patente de la invención titulada "Etoxicombretastatina y preparación y usos de su profármaco" (Publicación internacional n° WO2008/031333A1) divulga que el grupo alcoxi de la posición 4' del anillo aromático B del difeniletano de la combretastatina A-4 es un sitio de acción activa. El metilo original de la posición 4' del anillo aromático B del difeniletano es modificado por etilo que puede formar una diana activa con hidroxilo, amino y otros grupos en la posición 3', por lo que se puede intensificar la actividad seleccionada del mismo para los vasos tumorales. Sin embargo, debido a una conexión de doble enlace, las unidades de la familia en la configuración cis de la combretastatina causan el daño más efectivo en los vasos tumorales, mientras que los compuestos de la familia en la configuración trans no tienen ningún efecto inhibitorio sobre los tumores. La reacción de isomerización cis-trans existe y la configuración trans no provoca ningún efecto del fármaco, sino determinados efectos secundarios y tóxicos, por lo que los requisitos de las tecnologías de separación y purificación son exigentes, se requiere una cromatografía en columna, el consumo de materias primas es elevado, el coste tecnológico considerable, su rendimiento escaso y, al mismo tiempo, los compuestos de difeniletano se transforman a la configuración trans con iluminación ultravioleta, por lo que deben ser almacenados alejados de la luz solar y a bajas temperaturas, lo que dificulta enormemente el almacenamiento y la aplicación real de los compuestos de difeniletano.

45 La patente (Cushman, Mark et al. Synthesis and evaluation of analogs of (Z)-1-(4-methoxyphenyl)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethane as potential cytotoxic and antimitotic agents, Journal of Medicinal Chemistry, 1992, Vol.35, N° 12, 2293-306) divulga un compuesto, es decir (Z)-1-(3, 4, 5-trimetoxi)fenil-2-(4'-etoxi) feniletano. Sin embargo, la diana activa sinérgica no se puede formar, dado que los grupos sustituidos como -OH, -NH<sub>2</sub> no están presentes en la posición 3' y el efecto del fármaco contra el cáncer se reduce gradualmente de 4'-metoxi, etoxi, propoxi en la posición 4'; y la Patente estadounidense US6054598 divulga un método sintético para cambiar 2-metoxiestradiol por 2-etoxiestradiol. El 2-etoxiestradiol incluye una actividad anticancerígena *in vitro* 1000 veces más potente que el 2-metoxiestradiol y los investigadores han averiguado que los derivados de etoxidifeniletano, 4'-etoxi y 3'-hidroxilo, amino tienen el mismo efecto sinérgico y pueden obviamente intensificar el efecto anticancerígeno, aunque este efecto anticancerígeno de los mismos se ve notablemente reducido tras la modificación en la posición 4' por propoxi.

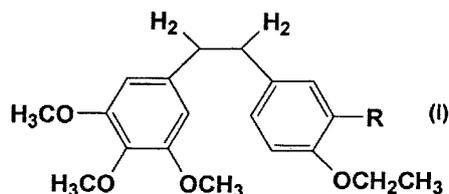
55 EP2065358A1 divulga la preparación y el uso de etoxi combrestatinas y sus profármacos.

US5430062A divulga los derivados de estilbeno como agentes anticancerígenos.

CN101139358A divulga etoxi combrestatinas y la preparación y usos de su profármaco.

**Contenido de la invención**

5 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un derivado de etoxi-difeniletano, que se caracteriza porque su estructura se muestra como la fórmula (I):



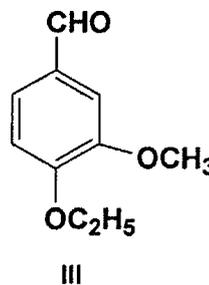
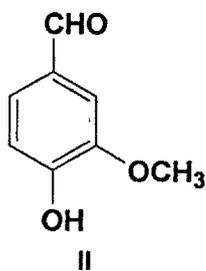
donde R es hidroxilo, amino, fosfato, sulfato, fosfato de colina o una cadena lateral de los aminoácidos y sales de amonio solubles en agua de los mismos.

10 Preferiblemente, donde R es hidroxilo, amino, sal de fosfato de disodio, sal de fosfato de amonio, sal de sulfato, sal interna de fosfato de colina, una cadena lateral natural de aminoácidos y sal de amonio soluble en agua de los mismos, o -NH (COCHR' NH) m-H (donde R' , es hidrógeno, fenilo, y m representa un número entero entre 1 y 3) y sal de amonio soluble en agua de los mismos.

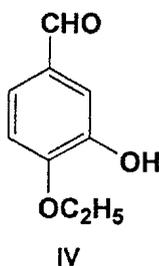
Más preferiblemente, donde R es -OH, -NH<sub>2</sub>, -OPO<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>, -NHCOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -NHCOCHNH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH.

15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un compuesto de la fórmula (I), donde el método comprende los pasos siguientes:

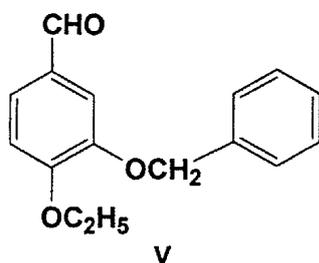
(1) Bajo catálisis por transferencia de fase, 4-hidroxil-3-metoxibenzaldehído (II) se somete a etoxilación con bromometilo para formar 4-etoxil-3-metoxibenzaldehído (III);



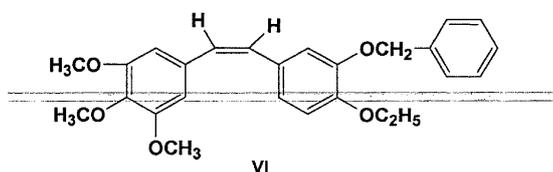
20 (2) se retira selectivamente el meta-metilo con difenilfosfuro de litio y se convierte en hidroxilo, al objeto de obtener 4-etoxil-3-hidroxibenzaldehído (IV);



(3) el 4-etoxil-3-hidroxibenzaldehído (IV) se prepara con cloruro de bencilo para obtener 4-etoxil-3-benciloxibenzaldehído (V);

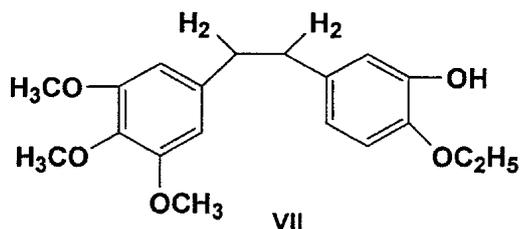


(4) se somete una solución de 3,4,5-trimetoxi trifenil bencilideno bromuro fosfonio bromuro tetrahidrofurano y 4-etoxi-3-benciloxibenzaldehído a vinilación mediante la adición de terc-butóxido de potasio, a fin de sintetizar 3,4,5-trimetoxi-3'-benciloxi-4'-etoxidifeniletieno (VI);



5

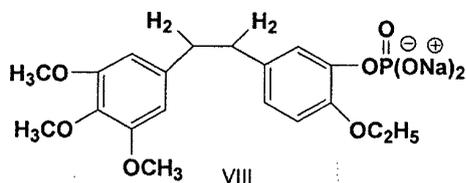
(5) el 3,4,5-trimetoxi-3'-benciloxi-4'-etoxidifeniletieno (VI) es hidrogenado bajo paladio-carbono para hidrogenar enlaces olefínicos y se consigue una desbencilación para obtener 3,4,5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletano (VII) (en adelante denominado con el código: ECB1);



10 Preferiblemente, donde el 3, 4, 5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletano (VII) se somete a fosforilación, esterificación de fosfato y sulfatación para formar un derivado de etoxihidroxidifeniletano soluble en agua: sal de fosfato de disodio, sal de sulfato, sal de fosfato de amonio o sal interna de fosfato de colina.

Más preferiblemente, donde:

15 el 3, 4, 5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletano (VII) forma 3, 4, 5-trimetoxi-4'-etoxidifeniletano-3'-o-sal de fosfato de disodio (VIII) (en adelante denominado por el código: ECB1P) bajo la acción del agente de fosforilación oxiclورو de fósforo y 2mol/l de NaOH;

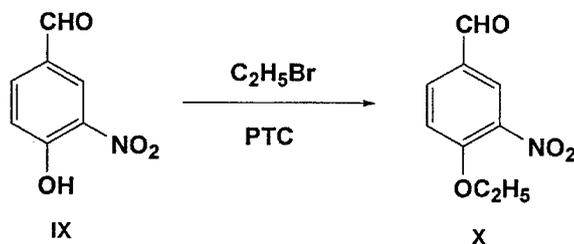


y/o

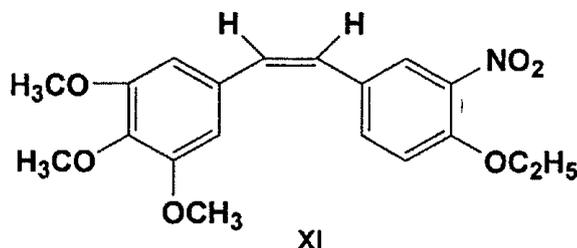
20 el 3,4,5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletano (VII) se hace reaccionar con fosfato de dibencilo para formar fosfato de bencilo, y se añade metóxido de sodio/metanol absoluto bajo trimetilbromosilano (TMBS) para obtener 3,4,5-trimetoxi-4'-etoxidifeniletano-3'-o-sal de fosfato de disodio (en adelante denominado con el código: ECB1P).

Ventajosamente, donde el método comprende también los pasos siguientes:

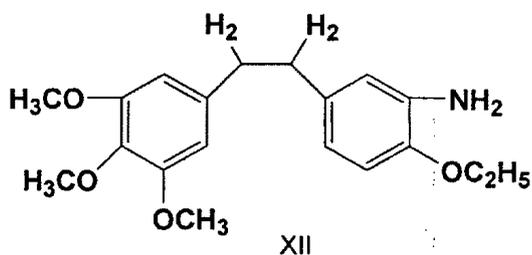
(1) Bajo catálisis por transferencia de fase, se somete 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (IX) a etoxilación mediante bromometilo para formar 4-etoxi-3-nitrobenzaldehído (X);



5 (2) se somete trimetoxifenil bromuro trifenilfosfonio metiluro y el 4-etoxi-3-nitrobenzaldehído (X) a reacción de Wittig para generar 3,4,5-trimetoxi-3'-nitro-4'-etoxidifeniletileno (XI);



(3) el 3,4,5-trimetoxi-3'-nitro-4'-etoxidifeniletileno (XI) se somete a reducción por hidrogenación bajo el catalizador paladio-carbono/borohidruro de sodio para reducir el nitrilo a amino y los enlaces olefínicos a enlaces simples de etano, a fin de obtener 3,4,5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano (XII) (en adelante denominado por el código: ECB1N).



10

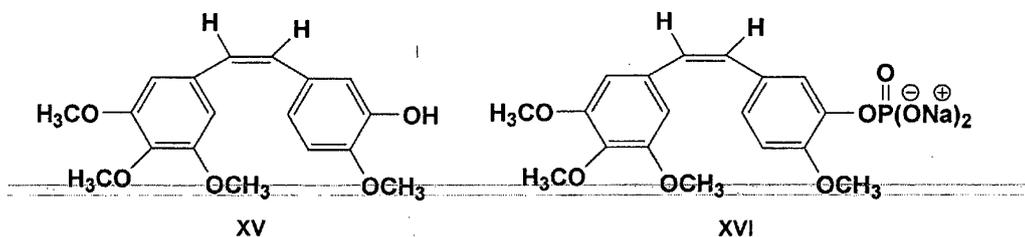
Preferiblemente, donde el 3,4,5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano (XII) y derivados de aminoácidos se someten a reacción para formar el derivado de la amida de aminoácidos de etoxiaminodifeniletano que tiene la cadena lateral del aminoácido siguiente: cadena lateral del aminoácido natural, o -NH (COCHR' NH) m-H (donde R' es hidrógeno, fenilo y m representa un número entero entre 1 y 3).

15

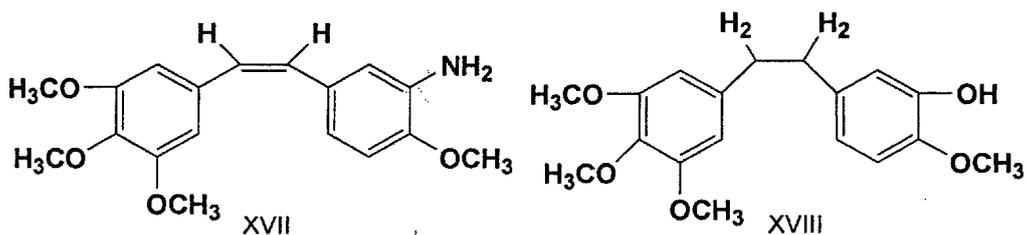
Más preferiblemente, donde bajo catálisis de diclohexilcarbo-diimida (DCC) y 1-hidroxibenzotrizol (HOBt) o hexafluorofosfatobenzotrizol-1-il-oxo-tri(dimetilamino)fosfor(agente BOP), el 3,4,5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano (XII) se hace reaccionar con el derivado del aminoácido de N-a-9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc AA), el amino de la posición 3' se convierte en amida del aminoácido-Fmoc, Fmoc se retira para generar los derivados de la amida del aminoácido de etoxidifeniletano, que respectivamente son 3,4,5-trimetoxi-3'-glicilamino-4'-etoxidifeniletano (XIII) (en adelante denominado por el código: ECB1GN) y 3,4,5-trimetoxi-3'-serilamino-4'-etoxidifeniletano (XIV) (en adelante denominado por el código: ECB1SN).

20



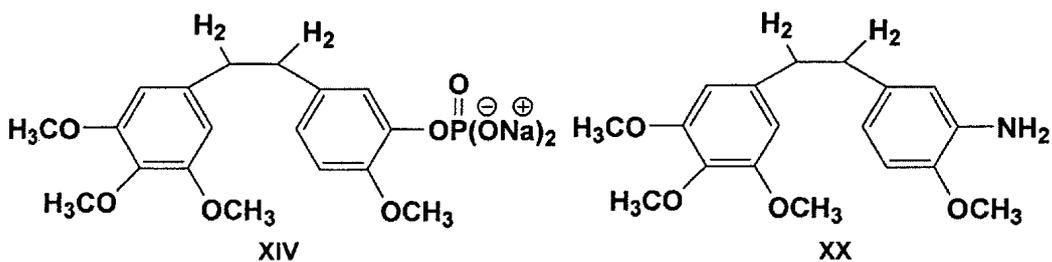


(Z)-3, 4, 5-trimetoxi-3'-amino-4'-metoxidifeniletileno XVII (en adelante denominado por el código: CA4N);



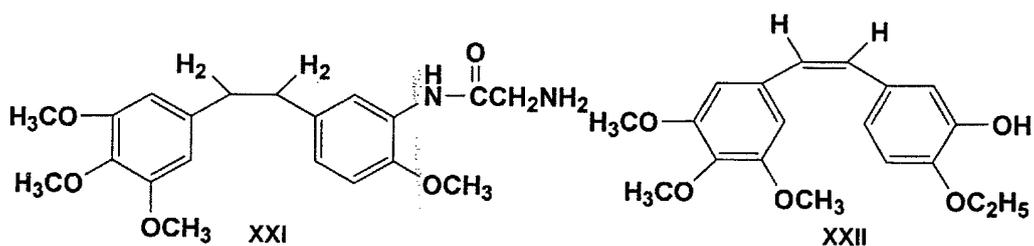
3,4, 5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-metoxidifeniletano XVIII (en adelante denominado por el código: CB1)

5 3,4,5-trimetoxi-4'-metoxidifeniletano-3'-o-sal de fosfato de disodio XIV (en adelante denominado por el código: CB1P);



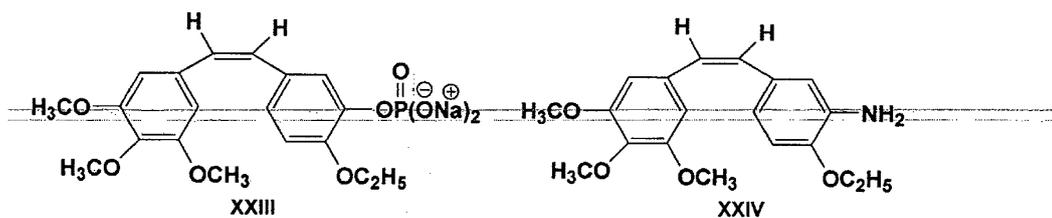
3,4, 5-trimetoxi-3'-amino-4'-metoxidifeniletano XX (en adelante denominado por el código:CB1N)

3, 4, 5-trimetoxi-3'-glicilamino-4'-etoxidifeniletano XXI (en adelante denominado por el código: CB1GN)



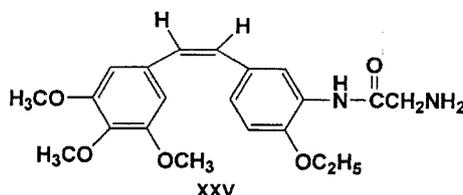
10 (Z)-3,4, 5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletileno XXII (en adelante denominado por el código: ECA4);

(Z)-3, 4, 5-trimetoxi-4'-etoxidifeniletileno-3'-o-sal de fosfato de disodio XXIII (en adelante denominado por el código: ECA4P);



(Z)-3, 4, 5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano XXIV (en adelante denominado por el código: ECA4N);

(Z)-3,4, 5-trimetoxi-3'-glicilamino-4'-etoxidifeniletano XXV (en adelante denominado por el código: ECA4GN)



El efecto del fármaco y los resultados de la evaluación de la seguridad del compuesto de la fórmula (I) son los siguientes:

5 (1) el resultado de la evaluación de la actividad antitumoral para células tumorales cultivadas in vitro demuestra que, en comparación, los compuestos con etoxidifeniletano en la posición 4' ECB1 y ECB1N, así como los compuestos de control positivo con etoxidifeniletano en la posición 4' ECA4 y ECA4N presentan actividades antitumorales obvias y básicamente equivalentes para múltiples células tumorales cultivadas in vitro, cuyas actividades antitumorales son notablemente más potentes que las de los compuestos de control positivo con el grupo metoxi en la posición 4' CA4, CB1 y CB1N (entre 10 y 200 más potentes), y que para el cáncer colorrectal HT-29, ECB1N es aproximadamente 200 veces más potente que el control positivo con el grupo metoxi en la posición 4' CB1 y ECB1 es unas 100 veces más potente que el control positivo CB1.

10 (2) el crecimiento de tumores sólidos depende del sistema vascular, una parte de las células endoteliales vasculares del tumor sujetas a una rápida proliferación dependen más de los microtúbulos para mantener una estructura intacta, debido a la carencia de estructuras con los miofilamentos intactos, la rápida proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) depende más del microtúbulo para mantener la estructura intacta, por lo que el microtúbulo se utiliza habitualmente como modelo in vitro para las células endoteliales vasculares de tumor y las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se utilizan como objetos de acción, a fin de evaluar las propiedades antitumorales sobre los vasos de los derivados de etoxidifeniletano. El derivado de etoxidifenil etano ECB1N con el  $IC_{50}$  de  $6,8 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/L}$  y el derivado de etoxidifeniletano ECB1 con el  $IC_{50}$  de  $7,5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/L}$  tienen un efecto inhibitor de la proliferación para las células endoteliales de la vena umbilical humana, por lo que se muestra un inhibidor de la agregación de la tubulina, que es obviamente más potente que los compuestos de control positivo con metoxi en la posición 4' CA4, CB1 y CB1N (con el  $IC_{50}$  entre  $4,8 \times 10^{-3}$  y  $7,7 \times 10^{-3}$ ), lo que indica que el derivado de etoxidifeniletano es un potencial fármaco diana vascular tumoral bastante potente.

15 (3) el resultado del experimento de la tasa de inhibición tumoral de los fármacos testados por inyección intravenosa in vivo para tumor trasplantado de sarcoma S180 en ratones demuestra que, de acuerdo con la propuesta de administración, todos los compuestos testados pueden obviamente inhibir el crecimiento del tumor trasplantado de sarcoma S180 en ratones, y se puede observar que aproximadamente al octavo día tras la administración del fármaco, por comparación, los derivados con etoxidifeniletano en la posición 4' ECB1P, ECB1GN hidrocloreuro y ECB1SN hidrocloreuro, así como los compuestos de control positivo con etoxidifeniletano en la posición 4' ECA4P y ECA4GN hidrocloreuro consiguen la tendencia de reducir el tumor en el grupo al que se le administró el fármaco, alcanzan una tasa de inhibición tumoral superior al 60% en el caso de la dosis de 50 mg/kg y tienen fundamentalmente unos efectos terapéuticos equivalentes, que son obviamente superiores a los efectos terapéuticos (es decir, aproximadamente una tasa de inhibición tumoral del 40%) de los controles positivos de metoxi CB1GN hidrocloreuro, CB1P y CA4P en el caso de la dosis de 100 mg/kg.

20 (4) en el test de toxicidad aguda de una única administración de inyección intraperitoneal a ratones, la administración de una inyección de alta dosis causa la muerte del ratón 40 minutos y una hora después, no se encuentra líquido residual evidente tras la disección, lo que indica la rápida absorción de los fármacos, y el resto de los ratones mueren principalmente entre uno y dos días después de la administración, sin que se observe ninguna muerte de ratones a partir del quinto día. No se encuentra ninguna anomalía en el corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón ni otros órganos de los ratones muertos durante la disección y los ratones supervivientes padecen diarrea no severa, lo que indica que los fármacos testados provocan principalmente una respuesta tóxica aguda sin una toxicidad retardada evidente. Por tanto, el resultado del test demuestra que los compuestos de etoxidifeniletano ECB1P, ECB1GN hidrocloreuro tienen una toxicidad inferior que los compuestos de control positivo de etoxidifeniletano ECA4P y ECA4GN en el grupo de administración.

La investigación de la invención ha averiguado que los compuestos de etoxidifeniletano, es decir los compuestos de la fórmula (I), pueden formar una diana activa con hidroxilo y amino en la posición 3', modificando el metoxi original de la posición 4' del anillo aromático B de difeniletano por etoxi, y pueden potenciar notablemente la actividad diana vascular

tumoral de los mismos en comparación con los compuestos de metoxidifeniletano con metoxi original en la posición 4' del anillo aromático B e hidroxilo y amino en la posición 3'. El experimento demuestra que los compuestos con etixodifeniletano en la posición 4' ECB1 y ECB1N presentan una clara actividad antitumoral para múltiples células tumorales cultivadas *in vitro* y son notablemente más potentes que los compuestos de control positivo con etoxi en la posición 4' CA4, CB1 y CB1N (entre 10 y 200 veces), y que en el caso del cáncer colorrectal HT-29, ECB1N es unas 200 veces más potente que el control positivo CB1 y ECB1 es unas 100 veces más potente que el control positivo CB1.

Dos anillos de benceno están conectados a través de enlaces simples, de forma que el compuesto tiene la estructura, conformación, fuerza de unión y efecto inverso diferentes del compuesto de difeniletano combretastatina A-4. Por otra parte, no existe diferencia en la configuración *cis-trans*, la estabilidad del fármaco se puede aumentar notablemente, mientras que la toxicidad se puede reducir, la tecnología de preparación se puede simplificar, no es necesaria la separación por cromatografía en columna, el rendimiento tecnológico se incrementa de forma notable, el consumo de materias primas se reduce de forma considerable, el coste tecnológico de la síntesis de la unidad también disminuye de forma extraordinaria, se mejora la estabilidad del fármaco, no es necesario el almacenamiento alejado de la luz, lo que permite gran comodidad de almacenamiento y una aplicación real, y se obtienen efectos inesperados.

### 15 Breve descripción de las ilustraciones:

Figura 1: una vía sintética del compuesto de hidroxietoxidifeniletano y su profármaco soluble en agua.

Figura 2: una vía sintética del compuesto de aminoetoxidifeniletano y el derivado de la amida de su aminoácido.

### Descripción detallada de las realizaciones:

#### 20 Realización 1

Preparación de 4-etoxi-3-metoxibenzaldehído:

se añaden 76 gramos de 4-hidroxilo-3-metoxibenzaldehído (0,5 mol) y 500 ml de isopropanol a un matraz de cuatro bocas y se agita durante 20 minutos. Se utiliza un embudo de goteo a presión constante para añadir lentamente 150 ml de solución acuosa de 6,5 gramos de éter 18-corona-6 y 133 gramos de hidróxido de sodio y se agita durante 30 minutos. El sistema de reacción se calienta hasta 60°C y, a continuación, se añaden 85 gramos de brometo y se deja reaccionar entre 5 y 6 horas mientras se realiza el seguimiento por TLC. Una vez que concluye la reacción, el sistema de reacción se enfría (hasta 15°C) y se le añaden 500 ml de agua a la reacción detenida. Se extrae el producto con éter (3 x 300 ml). La fase orgánica se lava con agua para que sea neutra, se seca el MgSO<sub>4</sub> anhidro, el éter se destila parcialmente y se añade una gran cantidad de éter de petróleo para precipitar el producto crudo. A continuación, el producto crudo se somete a recristalización con éter/éter de petróleo para obtener 83 gramos de 4-etoxi-3-metoxibenzaldehído y el rendimiento es del 92%.

#### Realización 2

Preparación de 4-etoxi-3-hidroxibenzaldehído

Paso 1: bajo la protección de argón, se añaden 54 gramos de 4-etoxi-3-metoxibenzaldehído (0,3 mol) a un matraz de tres bocas y, a continuación, se añaden 130 gramos de glicol de etileno (2,1 mol) y 133 gramos de ortoformiato de dietilo (0,9 mol) para el reflujo a unos 100°C y se añade 1 ml de solución de éter de trifluoruro de boro como catalizador. La reacción se realiza durante 24 horas mientras se efectúa el seguimiento por TLC. A continuación, el producto de la reacción se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añaden 200 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 15%, seguida de extracción con 300 ml de éter, lavado con solución salina saturada y secado con sulfato de magnesio anhidro. Se obtiene una sustancia oleaginosa amarilla por medio de destilación a presión reducida de glicol de etileno y ortoformiato de dietilo.

Paso 2: se añaden 56 gramos de acetal (0,25 mol) en lotes a 200 ml de 1,28 M solución de tetrahydrofurano de difenilfosfuro de litio, agitando a temperatura ambiente durante tres o cuatro horas, mientras se realiza un seguimiento por TLC. Se añade agua para detener la reacción y al producto de la reacción se le añaden 200 ml de solución de hidróxido de sodio al 30% y, a continuación, se extrae con 300 ml de éter, acidificado con ácido clorhídrico, con un pH ajustado de entre 3 y 4, y finalmente se extrae con 500 ml de éter. Los líquidos del producto extraído con éter se sumergen, se lavan con agua y solución salina saturada, se secan con sulfato de magnesio anhidro y se filtran. Se obtiene un producto sólido amarillo mediante extracción a presión reducida del solvente y, a continuación, se somete a recristalización con benceno/éter de petróleo para obtener 38,1 gramos de cristales amarillentos. El rendimiento es del 76%.

#### Realización 3

Preparación de 4-etoxi-3-benciloxibenzaldehído:

5 se añaden 16,6 gramos de 4-etoxi-3-hidroxibenzaldehído (100 mmol) y 200 ml de alcohol etílico absoluto a un matraz de tres bocas y, a continuación, se calientan hasta 40°C para su disolución. Se añaden 9 gramos de carbonato de potasio (65,07mmol.) y 15 ml de cloruro de bencilo (130,13 mmol.) bajo agitación. Se calienta el reflujo durante una hora, se enfría el producto de la reacción hasta 50°C una vez que se detecta por TLC que se ha completado la reacción y, a continuación, se filtra mientras está caliente. El producto del filtrado se pone en el frigorífico hasta el día siguiente. A continuación, se separan los cristales y se filtran con una bomba. El producto del filtrado se lava con 30 ml de alcohol etílico absoluto y se seca al vacío para obtener 21,5 gramos de cristales de aguja. El rendimiento es del 83,9%.

#### Realización 4

Preparación de 3, 4, 5-trimetoxi-3-benciloxi-4-etoxidifeniletano

10 A una botella de tres bocas se añaden 20 gramos de 3, 4, 5-trimetoxi trimetoxi trifenil bencilideno bromuro fosfonio bromuro y 150 ml de tetrahidrofurano. La suspensión se agita para disolver 10,5 g de 4-etoxi-3-benciloxibenzaldehído (41.0 mmol.) en 70 ml de tetrahidrofurano, y el tetrahidrofurano se pone en un embudo de goteo con capacidad para 100 ml. A un matraz de reacción se añaden 7,5 gramos de terc-butóxido de potasio sólido (66.5mmol.). El sistema de reacción se vuelve sanguino. Se agita a temperatura ambiente durante 5 minutos. La solución de 4-etoxi-3-benciloxibenzaldehído se deja caer lentamente. Se agita a temperatura ambiente durante otros 20 minutos y el producto de la reacción se vierte en un embudo de separación con capacidad para 500 ml una vez que se detecta por TLC que se ha completado la reacción. La solución se separa en capas una vez que se han añadido 140 ml de agua desionizada. Tras añadir 300 ml x 2 de éter para la extracción, la fusión de las capas de éter, el secado con sulfato de magnesio anhidroso y el filtrado, el producto del filtrado se lava con 50 ml de éter y se seca con un evaporador giratorio mediante concentración para obtener 25 gramos de sustancia oleaginosa. A esta sustancia oleaginosa se le añaden 20 ml de alcohol etílico absoluto y, a continuación, se filtra con una bomba para obtener 14,1 gramos de un producto sólido amarillento. Este producto sólido amarillento se coloca en un matraz de fondo redondo y se le añaden 25 ml de alcohol etílico absoluto, seguido de disolución de sólidos parciales mediante calentamiento. Se agita a temperatura ambiente y se realiza un filtrado con bomba. El producto del filtrado se lava con 10 ml de alcohol etílico absoluto y, a continuación, se seca con una lámpara de infrarrojos para obtener 10,6 gramos de 3,4, 5-trimetoxi-3-benciloxi-4-etoxidifeniletano puro, es decir sólidos en polvo de color amarillento. El rendimiento es del 61,6%.

#### Realización 5

Preparación de 3, 4, 5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletano (en adelante denominado por el código ECB1)

30 Paso 1: se añaden 10,6 gramos de 3, 4, 5-trimetoxi-3'-benciloxi-4'-etoxidifeniletano puro (25,8 mmol.) a un matraz de tres bocas y se disuelven en 200 ml de acetato de etilo y 120 ml de alcohol etílico absoluto. A la solución amarillenta resultante se le añade 1,0 gramo de carbono de paladio al 5% y se añade hidrógeno bajo agitación. La solución se agita a temperatura ambiente durante una hora y se filtra para obtener una solución anhidrosa. Esta solución anhidrosa se seca en un evaporador giratorio mediante concentración para obtener 8,06 gramos de sustancia oleaginosa, es decir, el producto crudo de 3, 4, 5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletano. El rendimiento es del 96,8%.

35 Paso 2: se añaden 8,06 gramos del producto crudo o 3, 4, 5-trimetoxi-3'-hidroxi-4'-etoxidifeniletano a un matraz de fondo redondo y se disuelven en 40 ml de alcohol etílico absoluto. Las sustancias insolubles se retiran mediante filtrado, en caso de que existan. La solución se mantiene a temperatura ambiente mientras los cristales se separan y se deja reposar hasta el día siguiente para que el solvente se volatilice por completo. Entonces se separan los cristales blancos en grandes cantidades. Los cristales blancos se filtran y el producto del filtrado se lava con etanol para obtener 6,7

40 gramos de cristales blancos. El rendimiento es del 83%.

#### Realización 6

Preparación (esterificación de fosfato 1) de 3,4,5-trimetoxi-4'-etoxidifeniletano-3'-o-sal de fosfato de disodio (en adelante denominado por el código: ECB1P)

45 A un matraz de fondo redondo se le añaden 4,4 ml de oxiclورو de fósforo (47,4mmol.) y 25ml de diclorometano. La solución resultante de 5 gramos de 3, 4, 5-trimetoxi-3-hidroxi-4-etoxidifeniletano (15,1mmol.) en 10ml de diclorometano se vierte y se agita durante 5 minutos. La solución resultante de 3,3 ml de trietilamina (23,8 mmol) en 50 ml de diclorometano se vierte y se agita a temperatura ambiente durante tres horas y se somete a detección por TLC. Se añaden 100 ml de agua fría para su posterior enfriamiento, a fin de completar la reacción. La fase orgánica se separa mediante oscilación suficiente y se lava con 50 ml x 2 de agua. Las capas orgánicas se fusionan tras extraer la capa acuosa con diclorometano. Se dejan secar hasta el día siguiente con una cantidad adecuada de sulfato de sodio anhidroso y se filtran con una bomba. El resultante del filtrado se somete a destilación a presión reducida para eliminar el líquido denso del solvente y bajo refrigeración con baño de hielo se añaden 2 mol/l de solución de NaOH bajo agitación hasta que el pH de la solución mezclada se sitúe entre 8 y 10. Se agita a 65 °C durante ocho horas y se retiran las sustancias insolubles mediante filtrado. La mayoría de la solución se somete a destilación a presión reducida. Los

55 cristales se separan mediante refrigeración, para obtener sólidos de color blanco, es decir el producto crudo de 3,4,5-

trimetoxi-4'-etoxidifeniletano-3'-O-sal de fosfato de disodio. El producto crudo se disuelve en etanol mediante calentamiento. El producto disuelto en etanol se filtra mientras está caliente para retirar los sólidos insolubles y el producto del filtrado se enfría para separar los cristales, a fin de obtener unos 5,6 gramos de producto cristalizado de color blanco, es decir el producto puro. El rendimiento es del 81,6%.

$^1\text{H-NMR}$  (ppm)  $\delta$ : 7.33 (d, 1H, 2' -H); 6.89 (d, 1H, 6' -H ); 6.67 (d, 1H, 5'-H); 6.58 (s, 2H, 2, 6-H); 4.18 (2H, q; -OCH<sub>2</sub>); 3.80(s, 3H, 4-OCH<sub>3</sub>); 3.76(s, 6H, 3, 5-OCH<sub>3</sub>); 2.82(d, 1H, J=13.2Hz, la-H); 2.79 (d, 1H, J=13.3Hz, la'-H); 1.52 (3H, t; -CH<sub>3</sub>)

$^{13}\text{C NMR}$ (ppm)  $\delta$ : 14.9, 37.8, 38.2, 56.1, 56.3, 64.7, 105.3, 114.3, 115.2, 138.4, 121.6,

132.2, 133.8, 145.0, 150.1, 136.7

#### Realización 7

Preparación (esterificación de fosfato 2) de 3,4,5-trimetoxi-4'-etoxidifeniletano-3'-O-sal de fosfato de disodio (en adelante denominado por el código: ECB1P)

10 Paso 1: bajo atmósfera de argón, se añaden 4,2 gramos de 3,4,5-trimetoxi-3-hidroxi-4'-etoxidifeniletano (12,6 mmol.) a un matraz de cuatro bocas y, a continuación, se disuelven con 40 ml de acetonitrilo seco y se enfrían hasta -2,5°C. Se añaden 6 ml de tetracloruro de carbono, 4,7 ml de diisopropiletilamina y 0,15 gramos de 4-dimetilaminopiridina y se agita de forma constante durante 5 minutos. Un minuto después se añaden 4 ml de fosfato de dibencilo (80%) lentamente. La temperatura se mantiene por debajo de -10°C y la reacción se realiza de forma continua durante 3,5 horas mientras se realiza el seguimiento por TLC. Una vez que se ha completado la reacción se añaden 10 ml de 10,5M KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, seguido de una elevación natural de la temperatura hasta la temperatura ambiente. Se realiza la extracción con acetato de etilo, la fusión de las capas orgánicas, el lavado secuencial con agua destilada y agua salina saturada, el secado con sulfato de magnesio anhidroso y la destilación a presión reducida del solvente para obtener una sustancia oleaginosa turbia. Esta sustancia oleaginosa se somete a recristalización con etil acetato-n-hexano para obtener 6,6 gramos de cristales de aguja incoloros. El rendimiento es del 88%.

20 Paso 2: se añaden 6,5 gramos del fosfato de bencilo seco resultante (10,8 mmol) a un matraz de cuatro bocas y se disuelven con 25 ml de acetonitrilo anhidroso seco. Se agita a 15°C bajo atmósfera de argón y se vierten rápidamente 4,5 ml de trimetilbromosilano (TMBS). Se añaden 7 ml de solución de metanol absoluto que contiene 1,8 gramos de metóxido de sodio, 5 y 10 minutos más tarde, para que el sistema de la reacción se convierta inmediatamente en una suspensión de color blanco lechoso. Se añaden 3,6 ml de metanol absoluto y 3,6 ml de acetona media hora después. La suspensión se deja hasta el día siguiente bajo agitación y, a continuación, se filtra con una bomba para obtener sólidos de color blanco. Estos sólidos de color blanco se lavan con metanol absoluto y acetona, y se secan al vacío. Se obtienen 4,1 gramos de polvo blanco mediante recristalización con agua/metanol/acetona y el rendimiento es del 83,6%.

$^1\text{H-NMR}$  (ppm)  $\delta$ : 7.34 (d, 1H, 2' -H); 6.88 (d, 1H, 6' -H ); 6.68 (d, 1H, 5'-H); 6.60 (s, 2H, 2, 6-H); 4.20 (2H, q; -OCH<sub>2</sub>); 3.76(s, 3H, 4-OCH<sub>3</sub>); 3.75(s, 6H, 3, 5-OCH<sub>3</sub>); 2.81(d, 1H, J=13.6Hz, la-H); 2.79 (d, 1H, J=13.6Hz, la'-H); 1.54 (3H, t; -CH<sub>3</sub>)

$^{13}\text{C NMR}$ (ppm)  $\delta$ : 14.8, 37.8, 38.3, 56.1, 56.3, 64.6, 105.5, 114.6, 115.3, 138.3, 121.7, 132.4, 133.8, 145.1, 150.1, 136.7

#### Realización 8

30 Preparación de 4-etoxi-3-nitrobenzaldehído

35 Se añaden 83,5 gramos de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (0,5 mol), 668 ml de N, N-dimetil formamida, 167 gramos de carbonato de potasio y 8,35 gramos de éter 18-corona-6 a un matraz de cuatro bocas y se agitan a una temperatura de entre 55 a 65 °C. A continuación, se añaden unos 80 gramos de brometilo para realizar una reacción durante 5 o 6 horas, mientras se efectúa el seguimiento por TLC. El producto de la reacción se enfría hasta 40°C una vez que ha concluido la reacción y se le añaden 600 ml de agua purificada para detener la reacción. El producto de esta reacción se extrae con éter (3 x 300 ml), se lava la fase orgánica con agua para que sea neutra, seguida de secado con MgSO<sub>4</sub> anhidroso, destilación del éter parcial y adición de éter de petróleo en cantidades mayores para precipitar la producción del crudo. El producto crudo se somete a recristalización con éter/éter de petróleo para obtener 80,9 gramos de 4-etoxi-3-nitrobenzaldehído y el rendimiento es del 83%.

**Realización 9**

Preparación de 3, 4, 5-trimetoxifenil-3'-nitril-4'-etoxidifeniletano

- 5 Bajo protección de argón, se suspenden 15 gramos de trimetoxifenil bromuro trifenilfosfonio metiluro (28,7 mmol) en 300 ml de THF con la temperatura enfriada hasta -15 °C aproximadamente. Se vierten 22 ml de solución de ciclohexano de n-butilio (1,6 mol/l) para realizar una reacción durante una hora. Se vierten lentamente 24 ml de solución de THF que contiene 5,7 gramos de 4-etoxi-3-nitrobenzaldehído (29 mmol.) en la reacción mientras se realiza el seguimiento por TLC. A continuación, se agita hasta el día siguiente y se sube la temperatura de la reacción hasta la temperatura ambiente. Se baja la temperatura de la solución hasta -5 °C, se añade agua salina saturada para detener la reacción y se separan las capas orgánicas. Se retiran tres cuartas partes del solvente y se añade alcohol etílico absoluto en una cantidad cuatro veces mayor que el resto de la solución madre para la recristalización a una temperatura de entre 0 y -5°C. Se obtienen 6,8 gramos de una sustancia amarillenta mediante filtrado y el rendimiento es del 65%.

**Realización 10**

Preparación de 3, 4, 5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano (en adelante denominado por el código: ECB1N)

- 15 Se añaden 100 ml de agua, 0,5 gramos de catalizador de carbono de paladio al 10% y la solución resultante de 8 gramos de borohidruro de sodio disueltos en 150 ml de agua a un matraz de reacción. Se suministra nitrógeno al matraz de reacción, se vierten 6,8 gramos de 3, 4, 5-trimetoxi-3'-nitril-4'-etoxidifeniletano (16,6 mmol) bajo agitación para disolverlos en 2 mol/l de una solución resultante de 250 ml de NaOH. El proceso de vertido se prolonga unos 20 minutos. A continuación se filtra la solución. El producto del filtrado se acidifica con 2 mol/l de HCL para descomponer el exceso de borohidruro de sodio y, a continuación, se neutraliza con NaOH diluido y por último se extrae con éter (100 ml x 4). Los productos líquidos extraídos con éter se fusionan y secan con sulfato de magnesio anhidroso para destilar el éter. Se obtienen 4,8 gramos de cristales incoloros mediante recristalización con acetato de etilo/n-hexano, en un ratio aproximado de 9:1. El rendimiento es del 83%.

<sup>1</sup>H-NMR (ppm) δ: 7.14 (d, 1H, 2' -H); 6.88 (d, 1H, 6' -H ); 6.68 (d, 1H, 5'-H); 6.60 (s, 2H, 2, 6-H); 4.48(brs, 2H, NH<sub>2</sub>); 4.08(q, 2H,-CH<sub>2</sub>); 3.77(s, 3H, 4-OCH<sub>3</sub>); 3.75(s, 6H, 3, 5-OCH<sub>3</sub>); 2.85(d, 1H , J=12.5Hz, la'-H); 2.78 (d, 1H, J=12.5Hz, la'-H); 1.56 (3H, t, -CH<sub>3</sub>).

- 25 MS (m/Z):331 (M<sup>+</sup>); espectrometría de masa de alta resolución, valor calculado: 331,1784, valor medido: 331,1753.

**Realización 11**

Preparación de 3, 4, 5-trimetoxi-3'-glicilamino-4'-etoxidifeniletano XIII (en adelante denominado por el código: ECB1GN)

- 30 Paso 1: Se disuelven 4,8 gramos de 3, 4, 5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxifenil-difeniletano (14,5 mmol), 5,27 gramos de glicina-Fmoc (17,8 mmol) y 25 gramos de reactivo BOP en 100 ml de DMF. La mezcla de la reacción se calienta hasta 60 °C bajo agitación y se somete a reacción durante dos horas, mientras se realiza el seguimiento por TLC. El producto de la reacción se enfría tras completarse la reacción y se añaden 100 ml de solución de bicarbonato sódico saturado para que se mezcle de forma uniforme. La mezcla se extrae con 120 ml x 3 de diclorometano. Las capas orgánicas se secan con sulfato de magnesio anhidroso y se obtienen 6,6 gramos de sustancia blanca por concentración de presión reducida. El rendimiento es del 75%.

- 35 Paso 2: Se disuelven 6,6 gramos de la 3, 4, 5-trimetoxifenil-3'-amino-4'-etoxidifeniletano-Fmoc-glicinamida resultante (10,8 mmol) en 120 ml de metanol. A continuación, al metanol se le añaden 6 ml de 2N solución de hidróxido de sodio bajo agitación, para realizar una reacción durante tres horas, mientras se efectúa el seguimiento por TLC. El producto de la reacción se enfría al terminar la reacción y se añaden 60 ml de solución de bicarbonato sódico saturado para que se mezcle de forma uniforme. La mezcla se extrae con 150 ml x 3 de diclorometano. Las capas orgánicas se secan con sulfato de magnesio anhidroso y se obtienen 3,2 gramos de sustancia en polvo de color blanco, por filtrado seguido de concentración de presión reducida. El rendimiento es del 77%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500M)δ: 9.54 (brs, 1H, -NH); 7.04 (d, 1H, 2'-H); 6.92 (d, 1H, 6' -H ); 6.78 (d, 1H, 5'-H); 6.65 (s, 2H, 2, 6-H); 4.77 (brs, 2H, Gly-NH<sub>2</sub>); 4.20 (brs, 2H, Gly-CH<sub>2</sub>); 4.02 (q, 2H,-CH<sub>2</sub>); 3.76 (s, 3H, 4-OCH<sub>3</sub>); 3.75 (s, 6H, 3, 5-OCH<sub>3</sub>); 2.88 (d, 1H, J=12.8Hz, la'-H); 2.78 (d, 1H, J=12.8Hz, la'-H); 1.55 (3H, t, -CH<sub>3</sub>).

- MS (m/Z): 338 (M<sup>+</sup>); espectrometría de masas de alta resolución, valor calculado: 338,1998, valor medido: 338,1945.

**Realización 12**

Preparación de 3,4,5-trimetoxi-3'-serilamino-4'-etoxidifeniletano (en adelante denominado por el código: ECB1SN)

5 Paso 1: Se disuelven 4,8 gramos de 3,4,5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxifenil-difeniletano (14,5 mmol), 6,5 gramos de serina-Fmoc (17,8 mmol), 3,7 gramos de DCC (diciclohexilcarbo-diimida) (17,8 mmol) y 2,7 gramos de HOBt (1-hidroxi-benzo-triazol) en 90 ml de DMF. La mezcla de la reacción se somete a reacción bajo agitación a temperatura ambiente durante cinco horas, mientras se efectúa el seguimiento por TLC. El producto de la reacción se enfría al concluir la reacción y se añaden 60 ml de acetato de etilo para que se mezcle de forma uniforme. La mezcla se filtra y se seca con sulfato de magnesio anhidroso. Se obtienen 6,5 gramos de sustancia blanca mediante concentración de presión reducida y el rendimiento es del 74%.

15 Paso 2: Se disuelven 6,5 gramos de la materia resultante del paso anterior en el solvente combinado de 70 ml de metanol y 70 ml de diclorometano. Al solvente combinado se le añaden 12 ml de 2N solución de hidróxido de sodio bajo agitación para conseguir la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas, mientras se efectúa el seguimiento por TLC. El producto de la reacción se enfría al concluir la reacción y se añaden 670 ml de solución saturada de bicarbonato sódico para que se mezcle de forma uniforme. La mezcla se extrae con 150 ml x 3 de diclorometano. Las capas orgánicas se secan con sulfato de magnesio anhidroso y se obtienen 3,3 gramos de sustancia en polvo de color blanco mediante filtrado en primer lugar y concentración de presión reducida a continuación. El rendimiento es del 79%.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500M) $\delta$ : 9.65 (brs, 1H, -NH); 7.06 (d, 1H, 2'-H); 6.90 (d, 1H, 6' -H); 6.76 (d, 1H, 5'-H); 6.66 (s, 2H, 2, 6-H); 5.27 (brs, 2H, Ser-NH<sub>2</sub>); 4.50 (brs, 2H, Ser-OH); 4.19 (q, 2H, -CH<sub>2</sub>); 3.93 (m, 1H, Ser-CH); 3.86 (s, 3H, 4-OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 6H, 3, 5-OCH<sub>3</sub>); 2.92 (d, 1H, J=13.2Hz, la-H); 2.85 (d, 1H, J=13.2Hz, la'-H); 2.67 (m, 2H, Ser-CH<sub>2</sub>); 1.54 (3H, t, -CH<sub>3</sub>).

20 MS (m/Z): 418 (M<sup>+</sup>); espectrometría de masa de alta resolución, valor calculado: 418,2104, valor medido: 418,2114.

**Realización 13**

(Evaluación de la actividad antitumoral para células tumorales cultivadas *in vitro*)

## 1. Método de ensayo

25 Las células se cultivan con una solución de cultivo RPMI 1640 que contiene 200 ml/l de suero bovino fetal para que se encuentre constantemente en fase logarítmica y se inoculan en una placa de 96 pocillos a una densidad de 4 a 8 x 10<sup>4</sup>/ml (densidad HUVEC de 3 x 10<sup>4</sup>/ml). La administración con los fármacos que tienen 6 concentraciones se efectúa constantemente a 37 °C durante 48 horas en caso de 3 pocillos dobles para cada fármaco. 24 horas después del precultivo, la solución de cultivo se separa y se seca al aire. A cada pocillo se le añaden 50  $\mu$ l de ácido tricloroacético frío con una concentración de 500 g/l (cuya concentración final es de 100 g/l), seguido de fijación durante 60 minutos. A continuación, se procede al lavado con agua desionizada en cuatro o cinco ocasiones, y finalmente al secado. A cada pocillo se le añaden 100  $\mu$ l de SRB con una concentración de 4 g/l para que reaccione durante 30 minutos. Después se realiza un lavado suave con 10 ml/l de ácido acético en cuatro ocasiones y se procede al secado. A cada pocillo se le añaden 200  $\mu$ l de base Tris (10 mmol) para una agitación y mezclado uniformes y se someten a oscilación durante 5 minutos en un oscilador plano. El valor A se determina a través de un lector de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas y está fijado a cero mediante control en blanco a una longitud de onda de 490 nm. La tasa de inhibición tumoral (%) = (valor medio del valor A del pocillo de control de células libres de fármaco - valor medio del valor A del pocillo con el fármaco aplicado)/(valor medio del valor A del pocillo de control de células libres de fármaco x 100%). Los controles positivos son CA4, CB1 y CB1N, y basándose en el método Logit, el intervalo de confianza (IC<sub>50</sub>) se calcula en función de las tasas de inhibición del crecimiento celular de los fármacos a diferentes concentraciones.

## 2. Resultados del ensayo:

45 En comparación, los compuestos con etoxidifeniletano en la posición 4' ECB1 y ECB1N, así como los compuestos de control positivo con etoxidifeniletano en la posición 4' ECA4 y ECA4N presentan actividades antitumorales obvias y básicamente equivalentes para múltiples células tumorales cultivadas *in vitro*. Las actividades antitumorales de estos compuestos son notablemente más potentes que las de los compuestos de control positivo con metoxi en la posición 4'

CA4, CB1 y CB1N (entre 10 y 200 veces superior), y, en el caso del cáncer colorrectal HT-29, ECB1N es aproximadamente 200 veces más potente que CB1 y ECB1 es aproximadamente 100 más potente que CB1.

5 El crecimiento de tumores sólidos depende del sistema vascular, una parte de las células endoteliales vasculares del tumor sujetas a una rápida proliferación dependen más de los microtúbulos para mantener una estructura intacta, debido a la carencia de estructuras con los miofilamentos intactos, la rápida proliferación de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) depende más del microtúbulo para mantener la estructura intacta, por lo que el microtúbulo se utiliza habitualmente como modelo in vitro para las células endoteliales vasculares de tumor y las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se utilizan como objetos de acción, a fin de evaluar las propiedades antitumorales sobre los vasos de los derivados de etoxidifeniletano. El derivado de etoxidifeniletano ECB1N con el  $IC_{50}$  de  $6,8 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/L}$  y el derivado de etoxidifeniletano ECB1 con el  $IC_{50}$  de  $7,5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/L}$  tienen un efecto inhibitorio de la proliferación para las células endoteliales de la vena umbilical humana que es obviamente más potente que los compuestos de control positivo con metoxi en la posición 4' CA4, CB1 y CB1N (con el  $IC_{50}$  entre  $4,8 \times 10^{-3}$  y  $7,7 \times 10^{-3}$ ), lo que indica que el derivado de etoxidifeniletano es un potencial fármaco diana vascular tumoral bastante potente.

15

Resultado de la evaluación de la actividad antitumoral para células tumorales cultivadas in vitro

$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	CA4	CB1	CB1N	ECA4	ECA4N	ECB1	ECB1N
Tumor							
Célula de cáncer colorrectal humano HT-29	$2,1 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,9 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$
Célula de cáncer de pulmón no microcítico HCl-H292,	2,4	2,8	3,0	0,16	0,10	0,17	0,12
Cáncer de estómago SGC-7901	$3,6 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$
Cáncer de hígado	0,83	1,7	2,5	$6,3 \times 10^{-2}$	$3,9 \times 10^{-2}$	$5,7 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-2}$
Célula endotelial de vena umbilical humana (HUVEC)	$4,8 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-3}$	$7,7 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-4}$	$6,8 \times 10^{-4}$

#### Realización 14

20 (Experimento de la tasa de inhibición tumoral de inyección intravenosa *in vivo* de los fármacos testados para el tumor trasplantado de sarcoma S180 en ratones)

##### 1. Método experimental

25 Tras una semana de adaptación, a los ratones se les inocularon bajo la piel tejidos de sarcoma S180 y se agruparon aleatoriamente después de que el tumor hubiera adquirido una superficie de entre 100 y 300  $\text{mm}^3$ . Cada compuesto se utilizó para 6 ratones del grupo de administración del fármaco y para 12 ratones del grupo de control. Las dosis de administración fueron las siguientes: 25, 50mg/kg de ECB1P, ECB1GN hidrocloreuro, ECB1SN hidrocloreuro y controles positivos ECA4P, ECA4GN hidrocloreuro, así como 50, 100mg/kg de controles positivos CB1GA hidrocloreuro, CB1P y CA4P. La administración se realizó por vía intravenosa el día 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12, un total de siete veces. La medición del volumen del tumor, el pesado de los ratones y el registro de datos se realizaron tres veces por semana. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la inoculación. Se pesaron los tejidos tumorales para calcular la tasa de inhibición tumoral. La tasa (%) de inhibición del peso tumoral =  $(1 - \text{peso del tumor medio en el grupo de tratamiento} / \text{peso del tumor medio en el grupo de control}) \times 100\%$ .

##### 2. Resultado del experimento:

35 De acuerdo con la propuesta de administración, todos los compuestos anteriores pueden inhibir obviamente el crecimiento del tumor de sarcoma S180 trasplantado a ratones y se puede observar aproximadamente ocho días después de la administración del fármaco que, en comparación, los derivados con etoxidifeniletano en la posición 4'

5 ECB1P, ECB1GN hidrocloreuro y ECB1SN hidrocloreuro, así como los compuestos de control positivo con etoxidifeniletieno en la posición 4' ECA4P y ECA4GN hidrocloreuro consiguen la tendencia de reducir el tumor en el grupo al que se le administró el fármaco, alcanzan una tasa de inhibición tumoral superior al 60% en el caso de la dosis de 50 mg/kg y tienen fundamentalmente unos efectos terapéuticos equivalentes, que son obviamente superiores a los efectos terapéuticos (es decir, aproximadamente una tasa de inhibición tumoral del 40%) de los controles positivos de metoxi CB1GN hidrocloreuro, CB1P y CA4P en el caso de la dosis de 100 mg/kg.

Tasa de inhibición del tumor (%) de los fármacos testados por inyección intravenosa para el tumor de sarcoma S180 trasplantado en ratones

Grupo	ECB1P	ECB1GN hidrocloruro	ECB1SN hidrocloruro	ECA4P	ECA4GN hidrocloruro	CB1GN hidrocloruro	CB1P	CA4P
Dosis (mg/kg)	25 50	25 50	25 50	25 50	25 50	50 100	50 100	50 100
Tasa de inhibición del tumor (%)	42 65	40 63	45 66	43 69	39 64	26 43	28 38	28 42

### Realización 15

(Prueba de toxicidad aguda en ratones de una única inyección intraperitoneal de los fármacos testados)

#### 1. Método de ensayo

5 Se agruparon aleatoriamente ratones Kunming (mitad machos y mitad hembras de entre 17 y 22 gramos de peso) en función de su peso y, durante el ensayo, los ratones se dividieron, basándose en una proporción de 0,9, en 10 grupos de dosis, compuesto cada uno por 10 ratones y con una dosis máxima de 1500 mg/kg. Los fármacos testados se administraron a las respectivas dosis de 1500, 1350, 1215, 1093, 984, 885, 797, 717, 645 y 581 mg/kg, a través de una única inyección intraperitoneal. La observación de los ratones y el registro del índice de muertes se realizaron respectivamente una vez a las 0,25 horas, 0,5 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 24 horas después de la administración del fármaco. Posteriormente la observación de los ratones se realizó diariamente y se llevó un registro de las muertes durante 14 días. Los ratones supervivientes fueron sacrificados a los 15 días y se sometieron a anatomía patológica.

#### 2. Resultado del ensayo

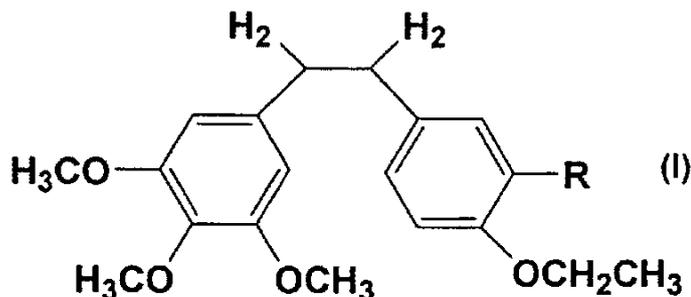
15 La administración de una única inyección intraperitoneal a alta dosis causa la muerte del ratón 40 minutos y una hora después. No se encuentra líquido residual evidente tras la disección, lo que indica la rápida absorción de los fármacos, y el resto de los ratones mueren principalmente entre uno y dos días después de la administración, sin que se observe ninguna muerte de ratones a partir del quinto día. No se encuentra ninguna anomalía en el corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón ni otros órganos de los ratones muertos durante la disección y los ratones supervivientes padecen diarrea no severa, lo que indica que los fármacos testados provocan principalmente una respuesta tóxica aguda sin una toxicidad retardada evidente. Por tanto, el resultado del ensayo demuestra que los compuestos de etoxidifeniletano ECB1P, ECB1GN hidrocloreuro y ECB1SN hidrocloreuro tienen una toxicidad inferior que los compuestos de control positivo de etoxidifeniletano ECA4P y ECA4GN hidrocloreuro en el grupo de administración.

20 Resultado del ensayo de toxicidad aguda en ratones de una única inyección intraperitoneal de los fármacos testados

	ECB1P	ECB1GN hidrocloro- ruro	ECB1SN hidrocloro- ruro	ECA4P	ECA4GN hidrocloro- ruro	CB1P	CA4P
LD50 (mg/kg)	1056	1012	1185	906	912	1228	1276
confianza 95% límite de	815- 1392	787- 1296	840- 1338	714- 1186	654- 1208	1050- 1438	1047- 1455

## REVINDICACIONES

1. Un derivado de etoxi-difeniletano que se caracteriza porque su estructura se muestra como la fórmula (KI):



- 5 donde R es hidroxilo, amino, fosfato, sulfato, fosfato de colina o una cadena lateral de aminoácidos y sales de amonio solubles en agua de los mismos.
2. El compuesto conforme a la reivindicación 1, donde R es hidroxilo, amino, sal de fosfato de disodio, sal de fosfato de amonio, sal de sulfato, sal interna de fosfato de colina, una cadena lateral natural de aminoácidos y sal de amonio soluble en agua de los mismos, o -NH (COCHR' NH) m-H (donde R' , es hidrógeno, fenilo, y m representa un número entero entre 1 y 3) y sal de amonio soluble en agua de los mismos.
- 10 3. El compuesto conforme a la reivindicación 1, donde R es -OH, -NH<sub>2</sub>, -OPO<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>, -NHCOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -NHCOCHNH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH.
4. Un método para preparar un compuesto conforme a la reivindicación 1, donde el método comprende los pasos siguientes:
- 15 (1) Bajo catálisis por transferencia de fase, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (II) se somete a etoxilación con bromometilo para formar 4-etoxi-3-metoxibenzaldehído (III);
- (2) se retira selectivamente el meta-metilo con difenilfosfuro de litio y se convierte en hidroxilo, al objeto de obtener 4-etoxi-3-hidroxibenzaldehído (IV);
- 20 (3) el 4-etoxi-3-hidroxibenzaldehído (IV) se prepara con cloruro de bencilo para obtener 4-etoxi-3-benciloxibenzaldehído (V);
- (4) se somete una solución de 3,4,5-trimetoxi trifenil bencilideno bromuro fosfonio bromuro tetrahidrofurano y 4-etoxi-3-benciloxibenzaldehído a vinilación mediante la adición de terc-butóxido de potasio, a fin de sintetizar 3,4,5-trimetoxi-3'-benciloxi-4'-etoxidifeniletano (VI);
- 25 (5) el 3,4,5-trimetoxi-3'-benciloxi-4'-etoxidifeniletano (VI) es hidrogenado bajo paladio-carbono para hidrogenar enlaces olefínicos y se realiza una desbencilación para obtener 3,4,5-trimetoxi-3'-hidroxilo-4'-etoxidifeniletano (VII).
5. El método conforme a la reivindicación 4, donde el 3, 4, 5-trimetoxi-3'-hidroxilo-4'-etoxidifeniletano (VII) se somete a fosforilación, esterificación de fosfato y sulfatación para formar un derivado de etoxihidroxidifeniletano soluble en agua: sal de fosfato de disodio, sal de sulfato, sal de fosfato de amonio o sal interna de fosfato de colina.
6. El método conforme a la reivindicación 5, donde:
- 30 el 3, 4, 5-trimetoxi-3'-hidroxilo-4'-etoxidifeniletano (VII) forma 3, 4, 5-trimetoxi-4'-etoxidifeniletano-3'-o-sal de fosfato de disodio (VIII) bajo la acción del agente de fosforilación oxiclorigenato de fósforo y 2mol/l de NaOH; y/o,
- el 3,4,5-trimetoxi-3'-hidroxilo-4'-etoxidifeniletano (VII) se hace reaccionar con fosfato de dibencilo para formar fosfato de bencilo, y se añade metóxido de sodio/metanol absoluto bajo trimetilbromosilano (TMBS) para obtener 3,4,5-trimetoxi-4'-etoxidifeniletano-3'-o-sal de fosfato de disodio.
- 35 7. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el método comprende además los siguientes pasos:
- (1) Bajo catálisis por transferencia de fase, se somete 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (IX) a etoxilación mediante bromometilo para formar 4-etoxi-3-nitrobenzaldehído (X);

- (2) se somete trimetoxifenil bromuro trifenilfosfonio metiluro y el 4-etoxi-3-nitrobenzaldehído (X) a reacción de Wittig para generar 3,4,5-trimetoxi-3'-nitril-4'-etoxidifeniletano (XI);
- (3) el 3,4,5-trimetoxi-3'-nitril-4'-etoxidifeniletano (XI) se somete a reducción por hidrogenación bajo el catalizador paladio-carbono/borohidruro de sodio para reducir el nitrilo a amino y los enlaces olefínicos a enlaces simples de etano, a fin de obtener 3,4,5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano (XII).
8. El método de la reivindicación 7, donde el 3,4,5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano (XII) y derivados de aminoácidos se someten a reacción para formar el derivado de la amida de los aminoácidos de etoxiaminodifeniletano que tiene la cadena lateral del aminoácido siguiente: cadena lateral del aminoácido natural, o -NH (COCHR' NH) m-H (donde R' es hidrógeno, fenilo y m representa un número entero entre 1 y 3).
9. El método de la reivindicación 8, donde bajo catálisis de diciclohexilcarbo-diimida (DCC) y 1-hidroxibenzotrizol (HOBt) o hexafluorofosfatobenzotrizol-1-il-oxo-tri(dimetilamino)fosfor(agente BOP), el 3,4,5-trimetoxi-3'-amino-4'-etoxidifeniletano (XII) se hace reaccionar con el derivado del aminoácido de N-a-9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc AA), el amino de la posición 3' se convierte en amida del aminoácido-Fmoc, Fmoc se retira para generar los derivados de la amida del aminoácido de etoxidifeniletano, que respectivamente son 3,4,5-trimetoxi-3'-glicilamino-4'-etoxidifeniletano (XIII) y 3,4,5-trimetoxi-3'-serilamino-4'-etoxidifeniletano (XIV).
10. El método de preparación del compuesto conforme a cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde los derivados de los aminoácidos se disuelven en metanol, etanol o isopropanol, y se añade la cantidad equivalente de ácido hidrocórico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, así como éter de petróleo o n-hexano, para diluir los derivados a fin de formar sal de amonio soluble en agua.
11. Un compuesto conforme a la reivindicación 1, donde la preparación farmacéutica del mismo se puede seleccionar del grupo compuesto por las formas siguientes: polvo liofilizado, polvo, inyección, liposoma, emulsión, microcápsula, suspensión o solución, adecuados para la administración en forma de inyección intravenosa, gránulo, tableta, cápsula o jarabe adecuado para la administración oral o supositorio.
12. Un compuesto conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento.
13. Un compuesto conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de: cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de huesos, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer cervical, melanoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, carcinoma adenoide quístico, cistocarcinoma, cáncer de médula, carcinoma bronquial, carcinoma de células óseas, carcinoma epitelial, cáncer de conductos biliares, coriocarcinoma, embriocarcinoma, espermatocitoma, adenomiosarcoma embrionario, espongiocitoma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimocitoma, pinealoma, hemocitoblastoma, neuroma de cuerdas vocales, meningioma, neuroblastoma, neuroblastoma óptico, retinoblastoma, neurofibroma, fibrosarcoma, fibroblastoma, fibroma, fibroadenoma, fibrocondroma, fibrocistoma, fibromixoma, fibroosteoma, fibromixosarcoma, fibropapiloma, mixosarcoma, mixocistoma, mixocondroma, mixocondrosarcoma, mixocondrofibrosarcoma, mixadenoma, mixoblastoma, liposarcoma, lipoma, lipoadenoma, lipoblastoma, lipocondroma, lipofibroma, lipoangioma, mixolioma, condrosarcoma, condroma, condromioma, notocordoma, corioadenoma, corionepitelioma, epitelioma corionico, osteosarcoma, osteoblastoma, osteocondrofibroma, osteocondrosarcoma, osteocondroma, osteocistoma, osteodentinoma, fibroosteoma, fibrosarcoma de huesos, angiosarcoma, hemangioma, angioliopoma, angiocondroma, angioblastoma, angioqueratoma, angioglioma, hemangiosarcoma, angioblastoma, angiomioma, angioliopoma, hematolinfagioma, angioliopleiomioma, angiomioliopoma, angiomioneuroma, angiomioma, angiorreticuloendotelio, linfangiosarcoma, linfogranuloma, linfagioma, linfadenoma, linfomixoma, linfosarcoma, linfangiofibroma, linfocitoma, linfoepitelioma, linfoblastoma, endotelio, endoblastoma, sinovioma, sinoviosarcoma, mesolepidoma, mesocitoma, tumor de Ewing, leiomioma, leiomiosarcoma, leiomioblastoma, leiomioblastoma, rabdomioma, rabdomyosarcoma, rabdomyomixoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritrocitosis y citosis crónica, linfoma, mieloma múltiple, artritis reumática, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, obstrucción de las venas de la retina, psoriasis, rosácea, sarcoma de Kaposi, queratitis de reacción específica, queratoconjuntivitis epidémica, glaucoma neovascular, úlcera bacteriana, úlcera micótica, infección por herpesvirus simple, infección por herpesvirus zoster, infección por protozoos, infección por micobacterias, poliartritis sarcoides, escleritis, rubeosis, síndrome de artritis con síntomas de sequedad de boca y ojos, lupus eritematoso sistémico, síndrome de inmunodeficiencia adquirida y/o sífilis.

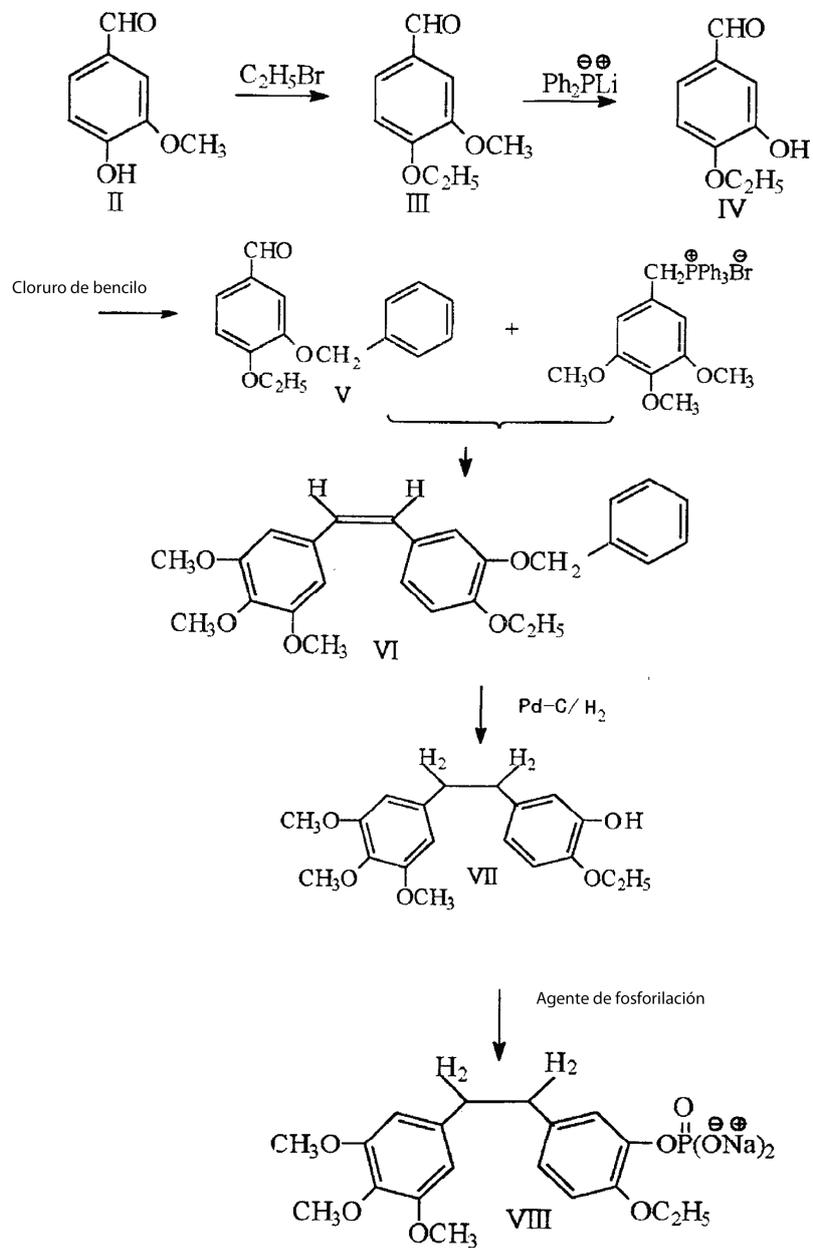


FIG. 1

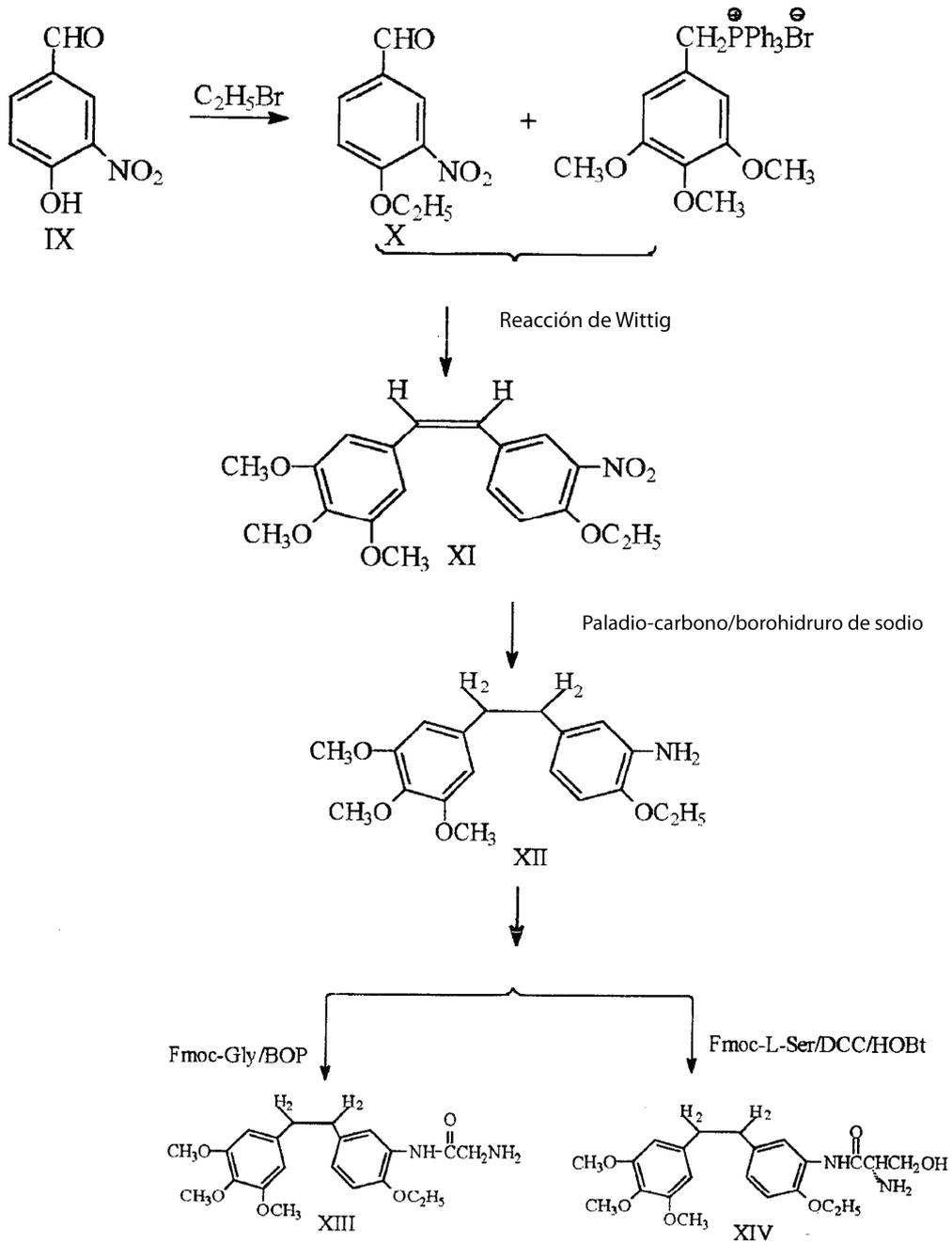


FIG.2