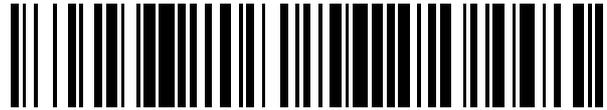


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 205**

51 Int. Cl.:

C07J 19/00 (2006.01)

C07J 71/00 (2006.01)

A61K 31/585 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2011 E 11716407 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2563803**

54 Título: **Lactonas esteroideas anticancerosas insaturadas en la posición 7(8)**

30 Prioridad:

27.04.2010 EP 10382095

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

15.06.2016

73 Titular/es:

**PHARMA MAR S.A. (100.0%)
Avda. de los Reyes, 1 Polígono Industrial La
Mina-Norte
28770 Colmenar Viejo, Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, ROGELIO;
REYES BENÍTEZ, JOSÉ FERNANDO;
FRANCESCH SOLLOSO, ANDRÉS y
CUEVAS MARCHANTE, MARÍA DEL CARMEN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 574 205 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

Lactonas esteroideas anticancerosas insaturadas en la posición 7(8)

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos anticancerosos, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso como agentes anticancerosos.

10 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos con algunas similitudes estructurales con los compuestos de bufadienólido dados a conocer en el estado de la técnica. Para una revisión de bufadienólidos, véase Huimin Gao *et al* en Nat. Prod. Rep., 2011, 28, 953.

15 Los compuestos de bufadienólido descritos en el estado de la técnica son esteroides naturales, aislados originalmente de fuentes naturales terrestres tales como plantas de las familias *Crassulaceae*, *Hyacinthaceae*, *Iridaceae*, *Melanthaceae*, *Ranunculaceae* y *Santalaceae*, y animales de los géneros *Bufo* (sapos), *Photinus* (luciérnagas) y *Rhabdophis* (serpientes) (Steyn *et al.* Nat. Prod. Rep. 1998, 15, 397-413; Krenn *et al.* Phytochemistry, 1998, 48(1), 1-29).

Entre estos compuestos de bufadienólido, se han aislado escilirósido y otros compuestos de escila de la cebolla albarrana roja, *Urginea maritima*, y se divulga que son muy tóxicos, especialmente el escilirósido que afecta a los sistemas nervioso central y cardiovascular, provocando convulsiones y muerte (Verbiscar *et al.* J. Agric. Food Chem. 1986, 34, 973-979; Kopp *et al.* Phytochemistry, 1996, 42(2), 513-522). Majinda *et al.* también aislaron compuestos de bufadienólido de *Urginea sanguinea*, lo que hace que la planta sea peligrosa para su uso como planta medicinal (Planta Med. 1997, 63, 188-190).

30 Se evaluaron la actividad antiviral frente a una serie de rinovirus y la actividad antiherpética de varios compuestos de bufadienólido por Kamano *et al.* (Chem. Pharm. Bull. 1988, 36(1), 326-332) y Takechi *et al.* (Phytochemistry, 1996, 41(1), 125-127), respectivamente, y encontraron que la mayoría de los compuestos mostraban alguna actividad inhibidora.

Además, varios autores han evaluado la actividad citotóxica de varios compuestos de bufadienólido. Específicamente, Jing *et al.* notificaron que la bufalina tiene un potente efecto inhibidor del crecimiento sobre células cancerosas humanas de leucemia (líneas celulares HL-60, ML1, U937 y K562), carcinoma epitelioide (línea celular HeLa), hepatoma (línea celular PLC/PRF/5) y carcinoma epidermoide (línea celular A431), pero es menos potente sobre líneas celulares de leucemia de ratón M1, melanoma B16 y neoplasia linfoide P388 y líneas celulares de hepatoma de rata AH66 y de células cromafines PC12. También encontraron que la bufalina induce apoptosis típica en la línea celular de leucemia humana HL-60 pero no en leucocitos humanos (Jpn. J. Cancer Res. 1994, 85(6), 645-651).

45 Kupchan *et al.* dieron a conocer varios compuestos de bufadienólido aislados de *Bersama abyssinica* que mostraron actividad inhibidora frente al carcinoma humano de la línea celular de nasofaringe (KB) (Bioorg. Chem. 1971, 1, 13-31; J. Org. Chem. 1971, 36(18), 2611-2616).

Kamano *et al.* evaluaron la actividad citotóxica de 80 compuestos de bufadienólido y cardenólido, aislados del fármaco chino Ch'an Su (obtenido de las glándulas de la piel de sapos tales como *Bufo gargarizans*), frente a una línea celular de carcinoma de hígado primario PLC/PRF/5 y la línea celular resistente a colchicina de PLC/PRF/5. De ellos, se mostró que 16 tenían citotoxicidades potentes ($CI_{50} < 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$) frente a la línea celular PLC/PRF/5 (Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 1103-1115; J. Med. Chem. 2002, 45, 5440-5447). Se aislaron compuestos de bufadienólido adicionales por Nogawa *et al.* de la misma fuente, que se ensayaron frente a líneas celulares de carcinoma humano de la nasofaringe (KB), leucemia humana (HL-60), leucemia murina (MH60), adenocarcinoma de páncreas (BXPC3), adenocarcinoma de mama (MCF7), glioblastoma del SNC (SF268), cáncer de pulmón NSC (NCIH460), carcinoma de colon (KM20L2) y cáncer de próstata (DU145) (J. Nat. Prod. 2001, 64, 1148-1152).

60 Ye *et al.* prepararon compuestos de bufadienólido novedosos a partir de bufalina mediante hidroxilación microbiana. Los compuestos se ensayaron frente a líneas celulares de hepatoma humano Bel-7402, cáncer gástrico humano BGC-823, carcinoma de cuello uterino humano HeLa y leucemia humana HL-60, mostrando algunos de ellos citotoxicidades potentes comparables a las de bufalina (J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2004, 91, 87-98; J. Nat. Prod. 2005, 68, 626-628).

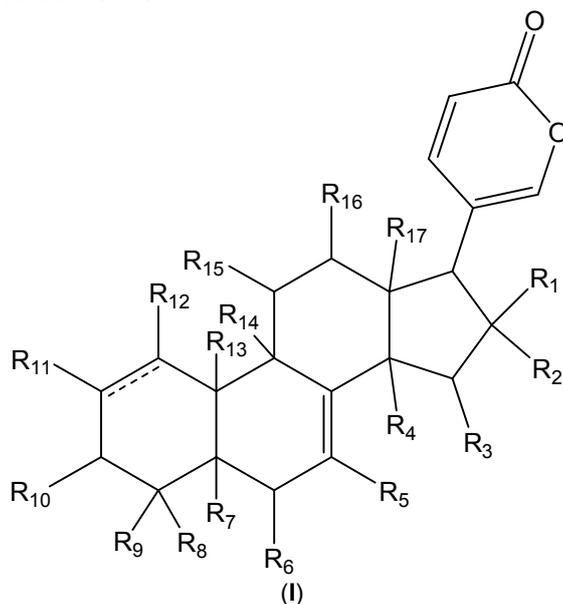
65 El documento WO 00/47215 A divulga glucósidos cardiacos, incluyendo cardenólidos, bufadienólidos y witanólidos, y composiciones farmacéuticas de los mismos para uso en el tratamiento de un tumor seleccionado de mesoteliomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células estromales y células germinales. Entre estos compuestos, se divulga que bufalina muestra actividad citotóxica frente a tumor sarcoma ($CI_{50} = 13$ nM).

Los documentos US 2009/018088 A y WO 2007/130124 A proporcionan métodos para tratar cáncer con glucósidos cardiacos, incluyendo bufadienólidos y cardenólidos, y describen la actividad citotóxica de los compuestos digoxina y ouabaína en líneas celulares de linfoma Jurkat E6-1 y Daudi.

Puesto que el cáncer es una causa principal de muerte en animales y seres humanos, se han realizado y todavía se están acometiendo varios esfuerzos con el fin de obtener una terapia anticancerosa activa y segura para administrarse a pacientes que padecen cáncer. El problema que va a resolverse mediante la presente invención es proporcionar compuestos que sean útiles en el tratamiento del cáncer.

Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención se dirige a compuestos de fórmula general I, o sales o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos



donde

R₁ se selecciona de hidrógeno y halógeno

R₂ se selecciona de halógeno;

cada R₃, R₁₅ y R₁₆ se selecciona independientemente de hidrógeno, OR_a, OCOR_a, OCOOR_a y =O, con la condición de que cuando existe un grupo =O, el hidrógeno del átomo de C al que está unido el =O está ausente;

cada R₄, R₅, R₆, R₇, R₁₁, R₁₂ y R₁₄ se selecciona independientemente de hidrógeno, OR_a, OCOR_a y OCOOR_a;

cada R₈, R₉ y R₁₇ se selecciona independientemente de hidrógeno, OR_a, OCOR_a, OCOOR_a, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido y alquino C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido;

R₁₀ se selecciona de hidrógeno, OR_b, OCOR_a, OCOOR_a y =O, con la condición de que cuando existe un grupo =O, el hidrógeno del átomo de C al que está unido el =O está ausente;

R₁₃ se selecciona de hidrógeno, COR_a, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido y alquino C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido;

cada R_a se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, alquino C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y grupo heterocíclico sustituido o no sustituido;

cada R_b se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, alquino C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y azúcar sustituido o no sustituido; y

la línea ----- representa un enlace adicional, un grupo epoxi o está ausente.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un compuesto de fórmula I, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento, en particular como un medicamento para tratar el cáncer.

En un aspecto adicional, la presente invención también se dirige al uso de un compuesto de fórmula I, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento del cáncer, o en la preparación de un medicamento, preferiblemente para el tratamiento del cáncer. Otros aspectos de la invención son métodos de tratamiento y compuestos para su uso en estos métodos. Por tanto, la presente invención proporciona además un método de tratamiento de cualquier mamífero, especialmente un ser humano, afectado por cáncer que comprende administrar al individuo afectado una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto tal como se definió anteriormente.

Aún en un aspecto adicional, la presente invención también se dirige a un compuesto de fórmula I, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como agente anticanceroso.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general I tal como se definió anteriormente.

En estos compuestos los grupos pueden seleccionarse según la siguiente orientación:

Los grupos alquilo pueden ser ramificados o no ramificados, y tienen preferiblemente desde 1 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono. Una clase más preferida de grupos alquilo tiene desde 1 hasta aproximadamente 6 átomos de carbono. Incluso más preferidos son grupos alquilo que tienen 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono. Metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, sec-butilo e isobutilo son grupos alquilo particularmente preferidos en los compuestos de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término alquilo, a menos que se indique lo contrario, se refiere a grupos tanto cíclicos como no cíclicos, aunque los grupos cíclicos comprenderán al menos tres miembros de anillo de carbono.

Los grupos alqueno y alquino preferidos en los compuestos de la presente invención pueden ser ramificados o no ramificados, tienen uno o más enlaces insaturados y desde 2 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono. Una clase más preferida de grupos alqueno y alquino tiene desde 2 hasta aproximadamente 6 átomos de carbono. Incluso más preferidos son grupos alqueno y alquino que tienen 2, 3 o 4 átomos de carbono. Los términos alqueno y alquino tal como se usan en el presente documento se refieren a grupos tanto cíclicos como no cíclicos, aunque los grupos cíclicos comprenderán al menos tres miembros de anillo de carbono.

Los grupos arilo adecuados en los compuestos de la presente invención incluyen compuestos de anillo único y múltiple, incluyendo compuestos de anillo múltiple que contienen grupos arilo separados y/o fusionados. Los grupos arilo típicos contienen desde 1 hasta 3 anillos separados o fusionados y desde 6 hasta aproximadamente 18 átomos de anillo de carbono. Preferiblemente, los grupos arilo contienen desde 6 hasta aproximadamente 10 átomos de anillo de carbono. Los grupos arilo especialmente preferidos incluyen fenilo sustituido o no sustituido, naftilo sustituido o no sustituido, bifenilo sustituido o no sustituido, fenantrilo sustituido o no sustituido y antrilo sustituido o no sustituido.

Los grupos heterocíclicos adecuados incluyen grupos heteroaromáticos y heteroalíclicos que contienen desde 1 hasta 3 anillos separados y/o fusionados y desde 5 hasta aproximadamente 18 átomos de anillo. Preferiblemente, los grupos heteroaromáticos y heteroalíclicos contienen desde 5 hasta aproximadamente 10 átomos de anillo. Los grupos heteroaromáticos adecuados en los compuestos de la presente invención contienen uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de átomos de N, O o S e incluyen, por ejemplo, cumarino incluyendo 8-cumarino, quinolino incluyendo 8-quinolino, isoquinolino, piridilo, pirazino, pirazolilo, pirimidino, furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, imidazolilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, indolicino, ftalacino, pteridino, purino, oxadiazolilo, tiadiazolilo, furazano, piridacino, triacino, cinolino, bencimidazolilo, benzofurano, benzofurazano, benzotieno, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolino, quinoxalino, naftiridino y furopiridilo. Los grupos heteroalíclicos adecuados en los compuestos de la presente invención contienen uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de átomos de N, O o S e incluyen, por ejemplo, pirrolidino, tetrahydrofurilo, dihydrofurilo, tetrahydrotienilo, tetrahydrotiopirano, piperidilo, morfolino, tiomorfolino, tioxano, piperacino, acetidino, oxetano, tietano, homopiperidilo, oxepano, tiepano, oxacepino, diacepino, tiacepino, 1,2,3,6-tetrahydropiridilo, 2-pirrolino, 3-pirrolino, indolino, 2H-pirano, 4H-pirano, dioxolano, dioxano, 1,3-dioxolano, pirazolino, ditiolano, dihidropirano, dihydrotienilo, pirazolidino, imidazolino, imidazolidino, 3-azabicyclo[3.1.0]hexilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptilo, 3H-indolilo y quinolicino.

El término azúcar incluye monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, oligosacáridos y derivados de sacáridos. Preferiblemente, el sacárido se selecciona de ramnosa, glucosa, digitoxosa, digitalosa, diginosa, sarmentosa, valarosa y fructosa. Derivados de los mismos, incluyendo glucósidos de azúcar, N-glucosilaminas, derivados de O-acilo, derivados de O-metilo, alcoholes de azúcar, ácidos de azúcar, desoxiazúcares y grupos relacionados, también son grupos de azúcar preferidos.

Los grupos halógeno adecuados en los compuestos de la presente invención son F, Cl, Br y I.

Los grupos mencionados anteriormente pueden sustituirse en una o más posiciones disponibles por uno o más grupos adecuados tales como OR', =O, SR', SOR', SO₂R', NO₂, NHR', N(R')₂, =N-R', NHCOR', N(COR')₂, NHSO₂R', NR'C(=NR')NR'R', CN, halógeno, COR', COOR', OCOR', OCONHR', OCON(R')₂, CONHR', CON(R')₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y grupo heterocíclico sustituido o no sustituido, en donde cada uno de los grupos R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, OH, NO₂, NH₂, SH, CN, halógeno, COH, CO-alquilo, COOH, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y grupo heterocíclico sustituido o no sustituido. Cuando tales grupos se sustituyen a su vez, los sustituyentes pueden elegirse de la lista anterior.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable que, tras la administración al paciente puede proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también están dentro del ámbito de la invención puesto que pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos proporcionados en el presente documento se sintetizan a partir del compuesto progenitor, que contiene una fracción básica o ácida, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales, por ejemplo, se preparan haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Los ejemplos de las sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina y sales de aminoácidos básicos.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina o bien como compuestos libres o bien como solvatos (por ejemplo, hidratos) y se pretende que ambas formas estén dentro del ámbito de la presente invención. Se conocen generalmente dentro de la técnica métodos de solvatación.

Cualquier compuesto al que se hace referencia en el presente documento pretende representar tal compuesto específico, así como determinadas variaciones o formas. En particular, los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento pueden tener centros asimétricos y existen por tanto en formas enantioméricas o diastereoisoméricas diferentes. Por tanto, cualquier compuesto determinado al que se hace referencia en el presente documento pretende representar uno cualquiera de un racemato, una o más formas enantioméricas, una o más formas diastereoméricas y mezclas de los mismos. Del mismo modo, también es posible la estereoisomería o la isomería geométrica alrededor del doble enlace, por tanto, en algunos casos la molécula podría existir como (*E*)-isómero o (*Z*)-isómero (isómeros *trans* y *cis*). Si la molécula contiene varios dobles enlaces, cada doble enlace tendrá su propia estereoisomería, que podría ser igual que, o diferente de, la estereoisomería de los otros dobles enlaces de la molécula. Además, los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento pueden existir como atropoisómeros. Todos los estereoisómeros incluyendo enantiómeros, diastereoisómeros, isómeros geométricos y atropoisómeros de los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento, y mezclas de los mismos, se consideran dentro del ámbito de la presente invención.

Además, cualquier compuesto al que se hace referencia en el presente documento puede existir en formas marcadas isotópicamente, es decir, compuestos que se diferencian en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por la sustitución de al menos un átomo de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de al menos un carbono por carbono enriquecido con ¹³C o ¹⁴C, o la sustitución de al menos un átomo de nitrógeno por nitrógeno enriquecido con ¹⁵N están dentro del ámbito de esta invención.

Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas facilitadas en el presente documento no están calificadas con el término "aproximadamente". Se entiende que, se use el término "aproximadamente" de manera explícita o no, cada cantidad facilitada en el presente documento pretende referirse al valor facilitado real, y también pretende referirse a la aproximación para tal valor facilitado que podría inferirse

razonablemente basándose en la experiencia habitual en la técnica, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidos a las condiciones experimentales y/o de medición para tal valor dado.

5 En los compuestos de fórmula general I, cada R_1 se selecciona de hidrógeno y halógeno, siendo Cl el halógeno más preferido. R_2 se selecciona de halógeno, siendo Cl el halógeno más preferido.

10 R_3 , R_5 , R_6 , R_{14} y R_{15} particularmente preferidos se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, OR_a y $OCOR_a$, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R_3 , R_5 , R_6 , R_{14} y R_{15} son hidrógeno.

15 R_4 se selecciona preferiblemente de hidrógeno y OR_a , seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R_4 es OR_a y R_a es hidrógeno.

20 R_7 se selecciona preferiblemente de hidrógeno, OR_a y $OCOR_a$, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R_7 es hidrógeno.

25 R_8 y R_9 particularmente preferidos se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, OR_a y $OCOR_a$, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R_8 y R_9 son cada uno un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo; siendo metilo el más preferido.

30 R_{10} se selecciona preferiblemente de OR_b , $OCOR_a$ y $=O$, con la condición de que cuando R_{10} es $=O$, el hidrógeno del átomo de C al que R_{10} está unido está ausente, y seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido y seleccionándose R_b de hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido y azúcar sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. R_b particularmente preferido es hidrógeno, alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, monosacárido, disacárido y trisacárido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, isobutilo, ramnosa, glucosa, digitoxosa, digitalosa, diginosa, sarmentosa, valarosa y fructosa. Más preferiblemente, R_{10} es $=O$ u OR_b , siendo R_b metilo.

35 En una clase preferida de los compuestos de la invención en los que la línea ----- está ausente, R_{11} y R_{12} particularmente preferidos se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, OR_a y $OCOR_a$, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo.

40 En otra clase preferida de compuestos de la invención en los que está presente o bien un enlace adicional o bien un grupo epoxi en el lugar indicado con la línea -----, R_{11} y R_{12} particularmente preferidos son hidrógeno.

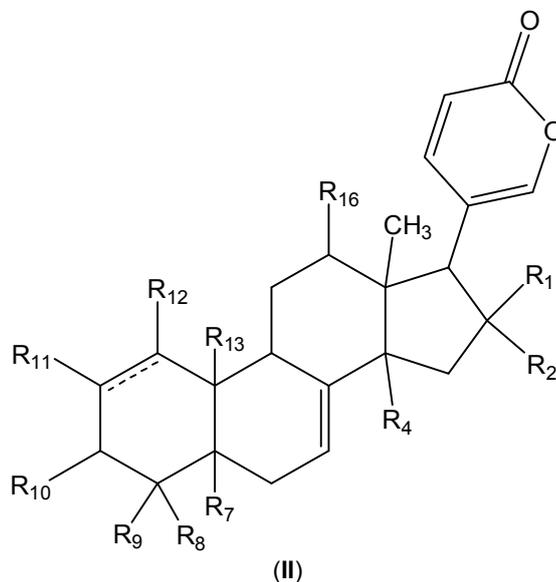
45 R_{13} se selecciona preferiblemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido y COR_a , seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R_{13} es alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido y COR_a , siendo R_a hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido. R_{13} incluso más preferido es un metilo sustituido o no sustituido, etilo sustituido o no sustituido, propilo sustituido o no sustituido y COR_a , siendo R_a hidrógeno. Sustituyentes preferidos de metilo, etilo y propilo son OR' en la que R' es hidrógeno o CO-alquilo, siendo hidrógeno el R' más preferido.

50 R_{16} se selecciona preferiblemente de hidrógeno, OR_a y $OCOR_a$, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R_{16} es hidrógeno u OR_a , siendo R_a hidrógeno.

55 R_{17} particularmente preferido es alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido. Más preferiblemente, es un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Metilo es el R_{17} más preferido.

Se prefiere particularmente la presencia de un enlace adicional o un grupo epoxi en el lugar indicado con la línea ----.

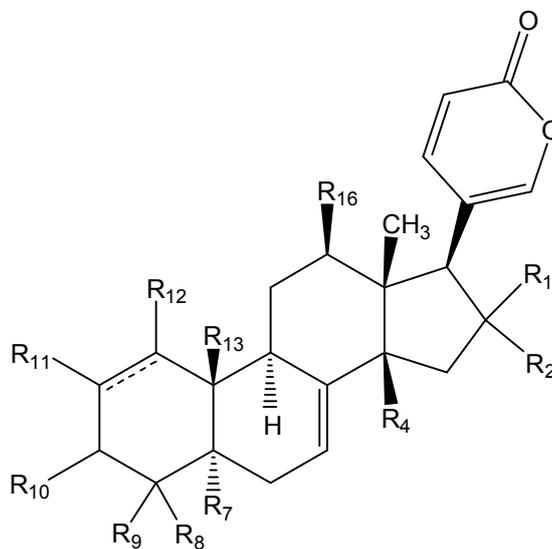
- 5 Más particularmente, la invención proporciona compuestos de fórmula general II o sales o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos



10

en los que R₁, R₂, R₄, R₇, R₈-R₁₃, R₁₆ y la línea ----- tienen el mismo significado dado anteriormente.

La estereoquímica particularmente preferida de dichos compuestos de fórmula general II es la siguiente:



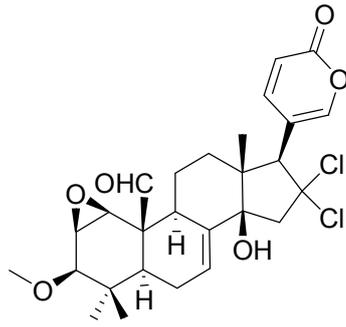
15

En los compuestos de fórmula general II, cada R₁ se selecciona de hidrógeno y halógeno, siendo Cl el halógeno más preferido. R₂ se selecciona de halógeno, siendo Cl el halógeno más preferido.

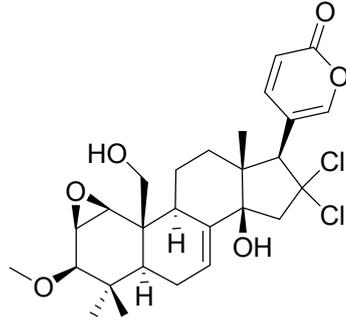
- 20 R₄ se selecciona preferiblemente de hidrógeno y OR_a, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R₄ es OR_a y R_a es hidrógeno.

- 25 R₇ se selecciona preferiblemente de hidrógeno, OR_a y OCOR_a, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R₇ es hidrógeno.

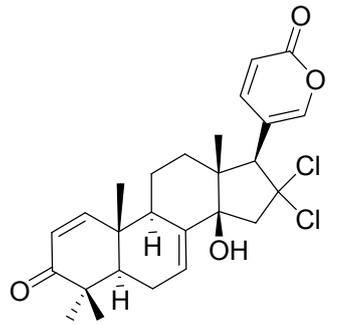
- R₈ y R₉ particularmente preferidos se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, OR_a y OCOR_a, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R₈ y R₉ son cada uno un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo; siendo metilo el más preferido.
- R₁₀ se selecciona preferiblemente de OR_b, y OCOR_a, y =O, con la condición de que cuando R₁₀ es =O, el hidrógeno del átomo de C al que R₁₀ está unido está ausente, y seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido y R_b se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido y azúcar sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo.
- R_b particularmente preferido es hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, monosacárido, disacárido y trisacárido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, isobutilo, ramnosa, glucosa, digitoxosa, digitalosa, diginosa, sarmentosa, valarosa y fructosa. Más preferiblemente, R₁₀ es =O u OR_b, en donde R_b es metilo.
- En una clase preferida de los compuestos de la invención en los que la línea ----- está ausente, R₁₁ y R₁₂ particularmente preferidos se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, OR_a y OCOR_a, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo.
- En otra clase preferida de compuestos de la invención en los que está presente o bien un enlace adicional o bien un grupo epoxi en el lugar indicado con la línea -----, R₁₁ y R₁₂ particularmente preferidos son hidrógeno.
- R₁₃ se selecciona preferiblemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido y COR_a, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R₁₃ es alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido y COR_a, siendo R_a hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido. R₁₃ incluso más preferido es un metilo sustituido o no sustituido, etilo sustituido o no sustituido, propilo sustituido o no sustituido y COR_a, siendo R_a hidrógeno. Sustituyentes preferidos de metilo, etilo y propilo son OR' en la que R' es hidrógeno o CO-alquilo, siendo hidrógeno el R' más preferido.
- R₁₆ se selecciona preferiblemente de hidrógeno, OR_a y OCOR_a, seleccionándose R_a de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido. R_a particularmente preferido es hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido; e incluso más preferido es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo e isobutilo. Más preferiblemente, R₁₆ es hidrógeno u OR_a, siendo R_a hidrógeno.
- Se prefiere particularmente la presencia de un enlace adicional o un grupo epoxi en el lugar indicado con una línea -----.
- En la presente descripción y definiciones, cuando hay varios sustituyentes R_a presentes en los compuestos de la invención, y a menos que se indique de forma explícita, debe entenderse que puede ser cada uno independientemente diferente dentro de la definición dada, es decir R_a no representa necesariamente el mismo grupo simultáneamente en un compuesto dado de la invención.
- En los párrafos anteriores se definen preferencias para los grupos sustituyentes R₁ a R₁₇ y la línea discontinua. También debe entenderse que las diferentes combinaciones de estas preferencias también se prefieren dentro de los compuestos de la invención.
- Los compuestos particularmente preferidos de la invención son los siguientes:



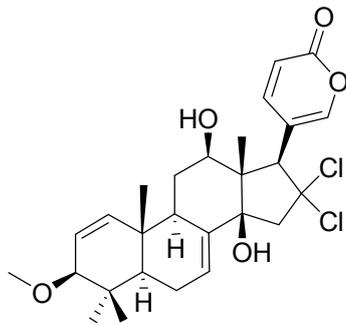
Aegomicina A



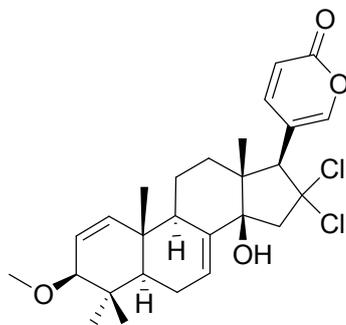
Aegomicina B



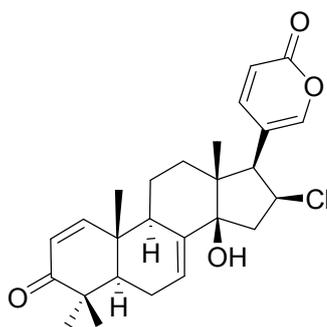
Aegomicina C



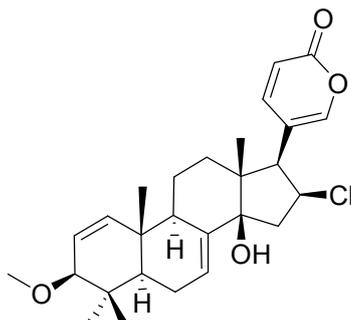
Aegomicina D



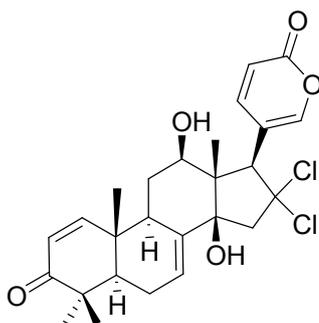
Aegomicina E



Aegomicina F



Aegomicina G



Aegomicina H

5

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La estereoquímica indicada aquí para las aegomicinas A-H es relativa.

10 Se aislaron las aegomicinas A-H de una porifera de la familia Mycalidae, género *Mycale*, subgénero *Aegogropila*, especie *Mycale (Aegogropila) crassissima* (Dendy, 1905). Se depositó una muestra de *Mycale (Aegogropila) crassissima* (Dendy, 1905) en el Instituto de Ciencias Marinas y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el código de referencia MFIA-399. Se recogió esta esponja a mano usando el material de buceo SCUBA en la isla de Mafia (07° 39,558' S / 39° 55,043' E) a profundidades que oscilan entre 5 y 31,4 m.

15 La descripción de la esponja es la siguiente: los especímenes examinados crecían incrustándose finamente en rocas. El color de los especímenes vivos era marrón, aunque también se ha descrito como naranja u ocre. Complemento de la espícula: las megascleras eran subtilostilos rectos, a menudo con tilos apenas perceptibles, y habitualmente doblados ligeramente en la parte central. Tenían aproximadamente 270 µm de longitud media, aproximadamente 4,6 µm de anchura de eje y aproximadamente 4,8 µm de anchura de tilo. Las microscleras incluían anisoquelas de palmato (tres clases de tamaño: anisoquela 1 de aproximadamente 36 µm en promedio, anisoquela 2 de aproximadamente 27 µm en promedio y anisoquela 3 de aproximadamente 11 µm en promedio), sigmas (una clase: sigma robusta de aproximadamente 57 µm en promedio), y rafidios (muy escasos). Disposición del esqueleto: tractos de subtilostilos ascendían hacia el exterior de la placa basal y terminaban en la superficie en ligeros penachos o mechones. El ectosoma tenía una reticulación bien desarrollada de haces de micalostilos y las microscleras estaban esparcidas aleatoriamente tanto en el coanosoma como en el ectosoma. Las anisoquelas no formaban rosetas. *Mycale crassissima* es común en la zona de recogida de la isla de Mafia y también se ha encontrado en Mombasa, Zanzibar, Madagascar, Ceilán y el mar de Aráfrica, en rocas y arrecifes de coral, desde 1 hasta 60 m de profundidad.

30 Además, los compuestos de la invención pueden obtenerse mediante síntesis siguiendo procedimientos habituales en química orgánica sintética y ya conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, los compuestos de esta invención pueden obtenerse adaptando los procedimientos descritos en la bibliografía tal como en Steyn *et al.* Nat.

Prod. Rep. 1998, 15, 397-413; Huimin Gao *et al* en Nat. Prod. Rep., 2011, 28, 953; documento WO 01/79256; documento WO 2006/120472; y CA 2.418.458. Las rutas sintéticas pueden usar combinaciones de etapas tomadas de más de una de estas referencias.

5 Del mismo modo, los compuestos naturales, sintéticos o ya modificados de la invención pueden modificarse adicionalmente mediante una variedad de reacciones químicas para obtener compuestos adicionales de la invención. Por tanto, los grupos hidroxilo pueden acilarse mediante procedimientos de acoplamiento o acilación
10 convencionales, por ejemplo, usando ácido acético o anhídrido acético en piridina o similares. Los grupos formiato pueden obtenerse calentando precursores de hidroxilo en ácido fórmico. Los grupos hidroxilo también pueden oxidarse a oxo (=O), por ejemplo, usando dióxido de manganeso o cromo, o convertirse en amino-alcoxilo inferior, por ejemplo, usando una 2-bromoetilamina protegida. Los grupos carboxilo pueden alquilarse, por ejemplo, metilarse mediante tratamiento con diazometano. Pueden introducirse restos glicosídicos mediante reacciones de acoplamiento de azúcar convencionales.

15 Una característica importante de los compuestos descritos anteriormente de fórmula I y II es su bioactividad y en particular su actividad citotóxica.

Con esta invención se proporcionan composiciones farmacéuticas novedosas de compuestos de fórmula general I y II que tienen actividad citotóxica y su uso como agentes anticancerosos. Por tanto, la presente invención proporciona
20 además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de esta invención, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo con un soporte farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o
25 parenteral.

La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser mediante cualquier método adecuado, tal como infusión intravenosa, preparaciones orales y administración intraperitoneal e intravenosa. Se prefiere que se usen tiempos de infusión de hasta 24 horas, más preferiblemente 1-12 horas, siendo
30 lo más preferido 1-6 horas. Son especialmente deseables tiempos de infusión cortos que permiten que el tratamiento se lleve a cabo sin pasar la noche en un hospital. Sin embargo, la infusión puede ser de 12 a 24 horas o incluso más prolongada si se requiere. La infusión puede llevarse a cabo en intervalos adecuados de digamos 1 a 4 semanas. Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención pueden administrarse mediante encapsulación en liposomas o nanoesferas, en formulaciones de liberación sostenida o mediante otros medios de
35 administración convencionales.

La dosificación correcta de los compuestos variará según la formulación particular, el modo de aplicación y el sitio, el huésped y el tumor que se está tratando particulares. Se tendrán en cuenta otros factores como la edad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, estado del huésped, combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. La administración puede llevarse a cabo de manera
40 continua o periódica dentro de la dosis tolerada máxima.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento” incluyen la erradicación, eliminación, modificación o control de un tumor o células o tejido cancerosos primarios, regionales o metastásicos y la minimización o retraso de la propagación del cáncer.
45

Los compuestos de la invención tienen actividad frente a cánceres incluyendo, pero sin limitarse, cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de mama.

50 Ejemplos

EJEMPLO 1: DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO MARINO Y SITIO DE RECOGIDA

Se recogió *Mycale (Aegogropila) crassissima* (Dendy, 1905) a mano usando el material de buceo SCUBA en la isla de Mafia (07° 39,558' S / 39° 55,043' E) a profundidades que oscilan entre 5 y 31,4 m. El material animal lo identificó el Dr. José Luis Carballo (Universidad Nacional Autónoma de México). Se depositó una muestra del espécimen en el Instituto de Ciencias Marinas y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el código de referencia MFIA-399.
55

EJEMPLO 2: AISLAMIENTO DE AEGOMICINAS A Y B

Se trituró el espécimen congelado del ejemplo 1 (67 g) y se extrajo con H₂O y una mezcla de MeOH:CH₂Cl₂ (50:50) a 23°C. Se evaporó el extracto orgánico a presión reducida para proporcionar un producto crudo de 500 mg. Este material se sometió a cromatografía (CLV, cromatografía líquida a vacío) en Lichroprep RP-18 con un gradiente
65 escalonado desde H₂O hasta MeOH y CH₂Cl₂. Se purificaron adicionalmente dos fracciones obtenidas de esta cromatografía tal como se describe más adelante. La fracción eluida con H₂O:MeOH 1:3 (23 mg) se sometió a HPLC

en fase inversa semipreparativa (Symmetry Prep C18, 7,8 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 60 hasta el 75% de MeCN en 10 min luego del 75 al 100% de MeCN en 10 min, detección UV, flujo 2,3 ml/min) para proporcionar aegomicina A (0,6 mg). La fracción eluida con MeOH (83 mg) se sometió a HPLC en fase inversa semipreparativa (Symmetry Prep C18, 7,8 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 50 hasta el 75% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 2,3 ml/min) para proporcionar aegomicina A (1,8 mg) y aegomicina B (0,8 mg).

Aegomicina A: sólido blanco amorfo. (+)HRMaldims m/z 523,1622 [M+H]⁺ (Calcd. para C₂₇H₃₃³⁵Cl₂O₆ 523,1649); ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (75 MHz) en CDCl₃, véase la tabla 1

10 Aegomicina B: sólido blanco amorfo. (+)HRMaldims m/z 525,1788 [M+H]⁺ (Calcd. para C₂₇H₃₅³⁵Cl₂O₆ 525,1805); ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (75 MHz) en CD₃OD, véase la tabla 2.

Tabla 1. Datos de ¹H y ¹³C RMN de aegomicina A (CDCl₃).

Nº	¹ H, m, J (Hz)	¹³ C, m	HMBC	ROESY
1	3,74, d (3,8)	54,3, d	C5,C9,C10,C19	H2,H11a
2	3,25, d (3,8)	55,7, d	C3,C4	OMe,H1,H3
3	2,88, s	84,4, d	C1,C2,C4, C20,C21,OMe	OMe,H2,H5,H20
4	-	36,7, s	-	-
5	1,51, dd (10,6, 7,8)	41,0, d	C4,C9,C10, C6,C19,C21	H3,H6,H9,H20
6	2,40, m	22,7, t	C7	H5,H7,H19,H20,H21
7	6,19, m	122,8, d	-	H6,14-OH
8	-	137,5, s	-	-
9	2,62, m	41,1, d	-	H5,H11a,H12a,H15a
10	-	49,8, s	-	-
11a	1,90, m	22,7, t	C8	H1,H9,H11b
11b	1,25, m		C9	H11a,H12b,H18,H19
12a	1,89, m	39,3, t	C13,C14,C15,C18	H9,H12b,H15a,H17
12b	1,72, m		C13	H11b,H12a,H17,H18
13	-	51,0, s	-	-
14	-	83,8, s	-	-
14-OH	1,87, m	-	C14	H7,H18
15a	3,47, d (15,8)	62,0, t	C13,C14,C16	H9,H12a,H15b
15b	2,81, d (15,8)		C13,C14,C16,C17	H15a
16	-	92,5, s	-	-
17	3,46, s	71,2, d	C12,C13,C16, C22,C23,C24	H12a,H12b,H23
18	0,74, s	16,5, q	C12,C13,C14,C17	H11b,H12b,H24,14-OH
19	9,87, s	205,6, d	C1,C10	H6,H11b,H21
20	0,94, s	25,0, q	C3,C4,C5,C21	OMe,H3,H5,H6,H21
21	0,66, s	16,2, q	C3,C4,C5,C20	H6,H19,H20
22	-	116,7, s	-	-
23	7,33, d (2,7)	151,0, d	C17,C22,C24	H17
24	8,00, dd (9,9, 2,7)	147,9, d	C26	H18,H25
25	6,28, d (9,9)	113,9, d	C22,C26	H24
26	-	161,4, s	-	-
OMe	3,51, s	58,3, q	C3	H2,H3,H20

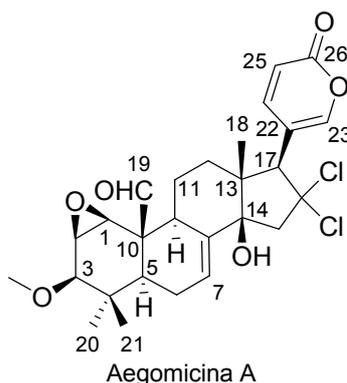
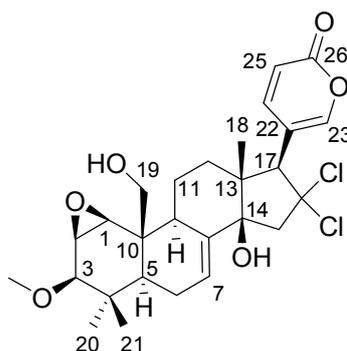


Tabla 2. Datos de ^1H y ^{13}C RMN de aegomicina B (CD_3OD).

Nº	^1H , m, J (Hz)	^{13}C , m	HMBC	ROESY
1	3,74, d (3,7)	56,6, d	C5,C10	H2,H11
2	3,18, d (3,7)	57,5, d	C3,C4	OMe,H1,H3
3	2,85, s	87,0, d	OMe,C1,C2,C4,C5, C20,C21	OMe,H2,H5,H20
4	-	37,6, s	-	-
5	1,05, dd (12,4, 5,0)	43,2, d	C3,C4,C6,C9,C10, C19,C21	H3,H9,H20
6	1,99, m	22,7, t	C7, C8	H7,H20
7	6,05, m	124,6, d	-	H6
8	-	139,6, s	-	-
9	2,42, m	46,1, d	-	H5,H15a
10	-	40,0, s	-	-
11	1,90, m	23,5, t	C12	H1,H18
12	1,79, m	40,7, t	C11	H17,H18
13	-	52,6, s	-	-
14	-	84,7, s	-	-
15a	3,43, d (15,8)	64,1, t	C8,C13,C14,C16 C14,C16,C17	H9,H15b
15b	2,76, d (15,8)			H15a
16	-	94,9, s	-	-
17	3,61, s	72,8, d	C12,C13,C14,C16, C22,C24,C25	H12,H23
18	0,79, s	17,3, q	C12,C13,C14,C17	H11,H12,H24
19a	3,98, d (12,1)	60,7, t	C1,C5,C9,C10	H19b,H21
19b	3,75, d (12,1)			H19a
20	0,89, s	26,4, q	C3,C4,C5,C21	H3,H5,H6
21	0,92, s	17,3, q	C3,C4,C5,C20	H19a
22	-	119,8, s	-	-
23	7,57, d (2,2)	152,9, d	C17,C22,C24,C26	H17
24	8,30, dd (9,8, 2,2)	151,5, d	C23,C26	H18,H25
25	6,28, d (9,8)	113,7, d	C22,C26	H24
26	-	164,1, s	-	-
OMe	3,49, s	58,4, q	C3	H2,H3



Aegomicina B

5

EJEMPLO 3: AISLAMIENTO DE AEGOMICINAS C, D, E, F y G

Se trituró un segundo grupo de muestras del espécimen del ejemplo 1 (160 g) y se extrajo con H_2O y una mezcla de $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50:50) a 23°C . Se evaporó el extracto orgánico a presión reducida para proporcionar un producto bruto de 3,12 g. Este material se sometió a cromatografía (CLV) en Lichroprep RP-18 con un gradiente escalonado desde H_2O hasta MeOH y CH_2Cl_2 . Se purificaron adicionalmente dos fracciones obtenidas de esta cromatografía tal como se describe más adelante. La fracción eluida con $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:3 (122 mg) se sometió a HPLC en fase inversa semipreparativa (Symmetry Prep C18, 7,8 x 150 mm, gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ desde el 45 hasta el 65% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 2,3 ml/min) para proporcionar aegomicina F (2,6 mg) y una mezcla de otros compuestos de aegomicina (5,1 mg). Esta mezcla se purificó adicionalmente mediante HPLC semipreparativa (X Terra Phenyl, 10 x 150 mm, gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ desde el 45 hasta el 60% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 2,3 ml/min) para proporcionar aegomicina C (0,5 mg) y D (2,8 mg). La fracción eluida con MeOH (230 mg) se sometió a CC

15

(cromatografía en columna) en gel de sílice ultrarrápida eluyendo con un gradiente de hexano:EtOAc para proporcionar 11 fracciones (S1 a S11). Se sometieron las fracciones S6 (hexano:EtOAc 70:30) y S7 (hexano:EtOAc 60:40) a HPLC en fase inversa semipreparativa (X Terra Phenyl, 10 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 50 hasta el 55% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 3,0 ml/min) para proporcionar aegomicina E (1,3 mg) a partir de S6 y aegomicina G (0,3 mg) a partir de S7.

5 Aegomicina C: sólido blanco amorfo. (+)HRMALDIMS m/z 477,1581 [M+H]⁺ (Calcd. para C₂₆H₃₁³⁵Cl₂O₄ 477,1594); ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (75 MHz) en CD₃OD, véase la tabla 3.

10 Aegomicina D: sólido blanco amorfo. (+)HRMALDIMS m/z 509,1834 [M+H]⁺ (Calcd. para C₂₇H₃₅³⁵Cl₂O₅ 509,1856); ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (125 MHz) en CD₃OD, véase la tabla 4.

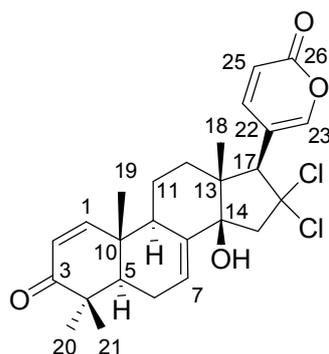
15 Aegomicina E: sólido blanco amorfo. (+)HRMALDIMS m/z 493,1898 [M+H]⁺ (Calcd. para C₂₇H₃₅³⁵Cl₂O₄ 493,1907); ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (75 MHz) en CD₃OD, véase la tabla 5.

Aegomicina F: sólido blanco amorfo. (+)HRMALDIMS m/z 443,1997 [M+H]⁺ (Calcd. para C₂₆H₃₂³⁵ClO₄ 443,1984); ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (75 MHz) en CD₃OD, véase la tabla 6.

20 Aegomicina G: sólido blanco amorfo. (+)HRMALDIMS m/z 459,2306 [M+H]⁺ (Calcd. para C₂₇H₃₆³⁵ClO₄ 459,2297); ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (75 MHz) en CD₃OD, véase la tabla 7.

Tabla 3. Datos de ¹H y ¹³C RMN de aegomicina C (CD₃OD).

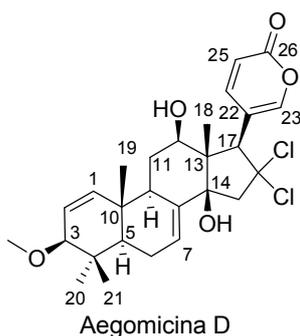
Nº	¹ H, m, J (Hz)	¹³ C, m	HMBC	ROESY
1	7,12, d (10,3)	157,2, d	C3,C5,C10	H2,H11a
2	5,91, d (10,3)	124,4, d	C4,C10	H1
3	-	206,7, s	-	-
4	-	44,9, s	-	-
5	1,85, m	48,9, d	C4,C6,C10,C19	H6,H9,H20
6	2,17, m	24,0, t	-	H5,H7,H9,H20
7	6,15, m	124,4, d	C5,C14	H6
8	-	138,4, s	-	-
9	2,21, m	46,9, d	-	H5,H6,H15a
10	-	38,9, s	-	-
11a	1,87, m	21,9, t	C19	H1,H11b
11b	1,54, dddd (13,7, 13,7, 13,7, 3,4)		-	H11a,H12b,H18,H19
12a	1,96, ddd (13,7, 13,7, 3,5)	40,3, t	-	H12b,H15a,H17
12b	1,79, ddd (13,7, 3,4, 3,4)		C18	H11b,H12a,H17,H18
13	-	52,4, s	-	-
14	-	84,7, s	-	-
15a	3,44, d (16,1)	63,6, t	C8,C13,C14,C16	H9,H12a,H15b
15b	2,78, d (16,1)		C14,C16,C17	H15a
16	-	94,9, s	-	-
17	3,62, s	72,5, d	C12,C13,C14,C16, C22,C23	H12a,H12b,H23
18	0,77, s	17,2, q	C12,C13,C14,C17	H11b,H12b
19	1,07, s	14,9, q	C1,C5,C9,C10	H11b,H21
20	1,15, s	24,0, q	C3,C4,C5,C21	H5,H6
21	1,13, s	22,5, q	C3,C4,C5,C20	H19
22	-	119,7, s	-	-
23	7,58, d (2,2)	152,9, d	C22,C24,C26	H17
24	8,32, dd (10,3, 2,2)	151,4, d	C23,C26	H25
25	6,29, d (10,3)	113,7, d	C22,C26	H24
26	-	164,1, s	-	-



Aegomicina C

Tabla 4. Datos de ^1H y ^{13}C RMN de aegomicina D (CD_3OD).

Nº	^1H , m, J (Hz)	^{13}C , m	HMBC	ROESY
1	5,82, dd (10,7, 2,4)	135,3, d	C3,C5	H2,H11a,H19
2	5,67, dd (10,7, 1,0)	126,5, d	-	H1,OMe
3	3,40, m	87,3, d	OMe,C1,C2, C4,C20,C21	H5,H20
4	-	37,7, s	-	-
5	1,45, dd (11,9, 4,2)	49,2, d	C3,C4,C6,C9, C10,C19,C21	H3,H9,H20
6a	2,14, m	23,4, t	C7,C8	H6b,H7,H20
6b	2,04, m		-	H6a,H19,H21
7	6,12, m	125,9, d	C5,C9,C14	H6a
8	-	137,9, s	-	-
9	2,08, m	46,8, d	C8,C10	H5,H11a,H12,H15a
10	-	38,4, s	-	-
11a	1,83, ddd (12,7, 4,4, 4,2)	30,3, t	C8,C9,C12,C13	H1,H9,H12,H11b
11b	1,53, ddd (12,7, 12,7, 11,9)		C9,C10,C12,C13	H11a,H18,H19
12	3,84, dd (11,9, 4,2)	74,9, d	C17,C18	H9,H11a,H15a,H17
13	-	58,3, s	-	-
14	-	85,0, s	-	-
15a	3,28, d (16,1)	64,0, t	C8,C14,C16	H9,H12,H15b
15b	2,80, d (16,1)		C13,C14,C16,C17	H15a
16	-	95,1, s	-	-
17	4,15, s	68,2, d	C12,C13,C14,C16, C22,C23,C24	H12,H18,H23
18	0,65, s	10,5, q	C12,C13,C14,C17	H11b,H17,H19,H24
19	0,92, s	15,3, q	C1,C5,C9,C10	H1,H6b,H11b,H18,H21
20	0,99, s	26,6, q	C3,C4,C5,C21	H3,H5,H6a,H21
21	0,85, s	17,2, q	C3,C4,C5,C20	H6b,H19,H20
22	-	120,0, s	-	-
23	7,54, d (2,9)	156,0, d	C22,C24,C26	H17
24	8,27, dd (9,8, 2,9)	151,6, d	C23,C26	H18,H25
25	6,28, d (9,8)	113,7, d	C22,C26	H24
26	-	164,1, s	-	-
OMe	3,41, s	58,3, q	C3	H2

Tabla 5. Datos de ^1H y ^{13}C RMN de aegomicina E (CD_3OD).

Nº	^1H , m, J (Hz)	^{13}C , m	HMBC	ROESY
1	5,83, dd (10,5, 2,3)	135,7, d	C2,C5,C9	H2,H11a,H19
2	5,65, dd (10,5, 1,5)	126,2, d	C4	H1,H3
3	3,40, m	87,3, d	C1	H2,H5,H20
4	-	37,7, s	-	-
5	1,42, dd (12,0, 4,5)	48,9, d	C19	H3,H9,H20
6a	2,12, m	23,4, t	-	H6b,H7,H20
6b	2,01, m			H6a,H19,H21
7	6,11, d a (5,6)	125,2, d	C5,C14	H6a
8	-	139,0, s	-	-
9	2,02, m	49,1, d	-	H5,H15a
10	-	38,6, s	-	-
11a	1,71, m	21,9, t	-	H1,H11b
11b	1,51, dddd (13,8, 13,7, 13,7, 3,4)			H11a,H18,H19
12a	1,90, ddd (13,7, 13,7, 3,4)	40,5, t	-	H12b,H15a,H17
12b	1,74, m			H12a,H17
13	-	52,5, s	-	-
14	-	84,8, s	-	-
15a	3,43, d (15,6)	63,9, t	C16	H9,H12a,H15b
15b	2,76, d (15,6)		C14,C16,C17	H15a
16	-	95,0, s	-	-
17	3,59, s	72,6, d	C14,C16,C22, C23,C24	H12a,H12b,H23
18	0,74, s	17,2, q	C12,C13, C14,C17	H11b,H24
19	0,91, s	15,3, q	C1,C5,C9,C10	H1,H6b,H11b,H21
20	0,99, s	26,7, q	C3,C4,C5,C21	H3,H5,H6a,H21
21	0,85, s	17,2, q	C3,C4,C5,C20	H6b,H19,H20
22	-	119,7, s	-	-
23	7,57, d (2,4)	152,8, d	C22	H17
24	8,31, dd (9,8, 2,4)	151,5, d	-	H18,H25
25	6,28, d (9,8)	113,7, d	C22,C26	H24
26	-	164,1, s	-	-
OMe	3,41, s	58,3, q	C3	-

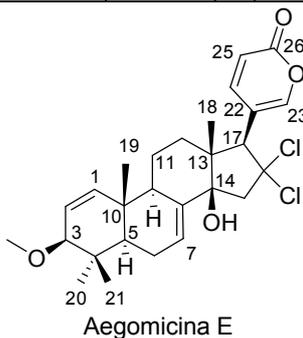
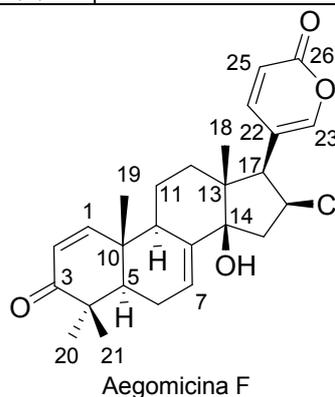


Tabla 6. Datos de ^1H y ^{13}C RMN de Aegomicina F (CD_3OD).

Nº	^1H , m, J (Hz)	^{13}C , m	HMBC	ROESY
1	7,10, d (10,3)	157,5, d	C3,C5,C6, C9,C10,C19	H2,H11a,H19
2	5,88, d (10,3)	126,1, d	C4,C10,C19	H1
3	-	206,8, s	-	-
4	-	45,0, s	-	-
5	1,83, dd (12,1, 4,2)	48,5, d	C4,C6,C9, C19,C20,C21	H6,H9,H20
6	2,18, m	23,9, t	C7,C8	H5,H7,H19,H20,H21
7	6,13, d a (5,0)	123,0, d	C5,C6,C14	H6
8	-	140,0, s	-	-
9	2,14, m	47,3, d	C7,C8,C10	H5,H11a,H12b,H15a
10	-	38,5, s	-	-
11a	1,79, m	21,8, t	C8,C9,C12,C13	H1,H9,H11b
11b	1,48, dddd (12,6, 12,6, 12,6, 3,9)		C9,C12	H11a,H18,H19
12a	1,65, ddd (13,7, 3,9, 3,9)	39,5, t	C9,C11,C13,C14,C18	H12b,H17,H18
12b	1,59, ddd (13,7, 12,6, 3,0)		C11,C13	H9,H12a,H17
13	-	52,0, s	-	-
14	-	84,7, s	-	-
15a	3,00, dd (16,0, 9,5)	52,2, t	C8,C16	H9,H15b,H16
15b	2,01, dd (16,0, 2,9)		C13,C14,C16,C17	H15a
16	4,90, ddd (9,5, 9,5, 2,9)	60,3, d	C14,C22	H15a,H17
17	3,12, d (9,5)	58,9, d	C12,C13,C14,C15, C16,C23,C24	H12a,H12b,H16, H18,H23
18	0,76, s	17,6, q	C12,C13,C14,C17	H11b,H12a,H17, H23,H24
19	1,05, s	14,9, q	C1,C5,C9,C10	H1,H6,H11b,H21
20	1,13, s	25,5, q	C3,C4,C5,C21	H5,H6
21	1,11, s	22,5, q	C3,C4,C5,C20	H6,H19
22	-	121,2, s	-	-
23	7,46, d (2,3)	152,4, d	C17,C22,C24,C26	H17,H18
24	8,36, dd (9,8, 2,3)	153,3, d	C23,C26	H18,H25
25	6,22, d (9,8)	112,8, d	C22,C26	H24
26	-	164,6, s	-	-



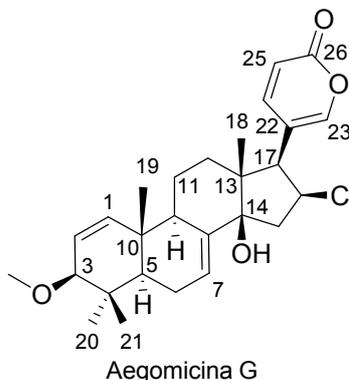
5

Tabla 7. Datos de ^1H y ^{13}C RMN de aegomicina G (CD_3OD).

Nº	^1H , m, J (Hz)	^{13}C , m	HMBC	ROESY
1	5,81, d a (10,4)	136,0, d	C3	H2,H11a,H19
2	5,62, d (10,4)	120,0, d	C4,C10	H1,H3,OMe
3	3,67, br s	87,4, d	OMe,C1,C2, C4,C20,C21	H2,H5,H20
4	-	37,7, s	-	-
5	1,40, dd (12,0, 4,3)	49,4, d	-	H3,H6a,H9,H20

Nº	¹ H, m, J (Hz)	¹³ C, m	HMBC	ROESY
6a	2,07, m	23,7, t	-	H5,H7,H20
6b	1,99, m			H7,H21
7	6,08, d a (5,4)	123,8, d	C14	H6a,H6b
8	-	140,6, s	-	-
9	1,99, m	49,0, d	-	H5,H15a
10	-	38,6, s	-	-
11a	1,62, m	21,8, t	-	H1,H11b
11b	1,45, dddd (12,6, 12,6,12,6, 4,1)			H11a,H18,H19
12a	1,58, m	39,7, t	-	H17
12b	1,54, m			H15a,H17
13	-	52,0, s	-	-
14	-	85,0, s	-	-
15a	2,97, dd (15,7, 9,6)	52,3, t	C17	H9,H12b,H15b,H16
15b	2,00, dd (15,7, 3,0)		-	H15a
16	4,89, ddd (9,6, 9,5, 3,0)	60,3, d	-	H15a,H17
17	3,09, d, (9,5)	59,0, d	C12,C13,C14, C22,C24	H12a,H12b,H16, H23
18	0,73, s	17,6, q	C12,C13,C14, C17	H11b,H24
19	0,90, s	15,4, q	C1,C5,C9,C10	H1,H11b
20	0,97, s	26,7, q	C4,C5,C3,C21	H3,H5,H6a
21	0,83, s	17,2, q	C4,C5,C3,C20	H6b
22	-	121,3, s	-	-
23	7,45, d (2,5)	152,3, d*	C22,C24,C26	H17
24	8,36, dd (9,9, 2,5)	152,3, d*	-	H18,H25
25	6,21, d (9,9)	112,7, d	C22,C26	H24
26	-	164,7, s	-	-
OMe	3,39, s	58,3, q	C3	H2

*Las asignaciones pueden intercambiarse



5 EJEMPLO 4: AISLAMIENTO DE AEGOMICINA D, F y H

Se trituró un tercer grupo de muestras del espécimen del ejemplo 1 (700 g) y se extrajo con H₂O y una mezcla de MeOH:CH₂Cl₂ (50:50) a 23°C. Se evaporó el extracto orgánico a presión reducida para proporcionar un producto bruto de 33 g. Se disolvió el producto crudo en MeOH:H₂O (1:9, 500 ml) y se extrajo con hexano (3 x 500 ml), EtOAc (3 x 500 ml) y nBuOH (2 x 500 ml).

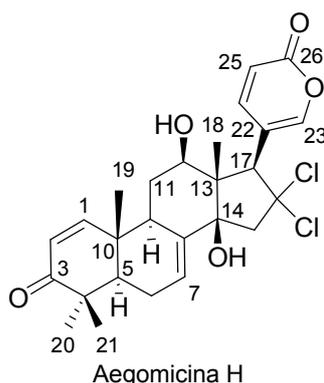
Se sometió a cromatografía (CLV) la fracción de hexano (4 g) en Lichroprep RP-18 con un gradiente escalonado desde H₂O:MeOH (3:1) hasta MeOH y luego hasta CH₂Cl₂. La fracción eluida con H₂O:MeOH 1:3 (430 mg) se sometió a HPLC en fase inversa preparativa (Symmetry Prep C18, 19 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 45 hasta el 65% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 14,6 ml/min) para proporcionar 7 fracciones (H1 a H7). Se sometió la fracción H4 a HPLC en fase inversa semipreparativa (X Terra Phenyl, 10 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 30 hasta el 50% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 3,8 ml/min) para proporcionar aegomicina F (8,3 mg). Se sometió la fracción H5 a HPLC en fase inversa semipreparativa (X Terra Phenyl, 10 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 45 hasta el 60% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 3,8 ml/min) para proporcionar aegomicina D (20,4 mg).

5 Se sometió a cromatografía (CLV) la fracción de EtOAc (1,2 g) en Lichroprep RP-18 con un gradiente escalonado desde H₂O:MeOH (3:1) hasta MeOH y luego hasta CH₂Cl₂. La fracción eluida con H₂O:MeOH 1:3 (162 mg) se sometió a HPLC en fase inversa preparativa (Symmetry Prep C18, 19 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 45 hasta el 65% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 14,6 ml/min) para proporcionar 7 fracciones (H1 a H7). Se sometió la fracción H2 a HPLC en fase inversa semipreparativa (X Terra Phenyl, 10 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 30 hasta el 55% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 3,8 ml/min) para proporcionar aegomicina H (1,4 mg). Se sometió la fracción H4 a HPLC en fase inversa semipreparativa (X Terra Phenyl, 10 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 30 hasta el 50% de MeCN en 20 min, detección UV, flujo 3,8 ml/min) para proporcionar aegomicina F (12,2 mg). Se sometió la fracción H5 a HPLC en fase inversa semipreparativa (X Terra Phenyl, 10 x 150 mm, gradiente H₂O:MeCN desde el 45 hasta el 60% de MeCN en 30 min, detección UV, flujo 3,8 ml/min) para proporcionar aegomicina D (21,7 mg).

15 Aegomicina H: sólido blanco amorfo. (+)ESIMS m/z 493 [M+H]⁺, ¹H (500 MHz) y ¹³C-RMN (75 MHz) en CD₃OD véase la tabla 8.

Tabla 8. Datos de ¹H y ¹³C RMN de aegomicina H (CD₃OD).

Nº	¹ H, m, J (Hz)	¹³ C, m	HMBC	ROESY
1	7,10, d (10,3)	156,7, d	C3,C4,C5, C9,C10,C19	H2,H9, H11a,H19
2	5,91, d (10,3)	126,4, d	C4,C10	H1
3	-	206,5, s	-	-
4	-	45,0, s	-	-
5	1,89, dd (11,7, 4,5)	48,5, d	C4,C6,C7, C9,C10,C19	H9,H20
6	2,19, m	24,0, t	C8	H7,H19, H20,H21
7	6,15, m	125,1, d	C5,C14	H6
8	-	137,3, s	-	-
9	2,27, m	44,6, d		H1,H5,H11a, H12,H15a
10	-	38,6, s	-	-
11a	1,95, ddd (12,6, 4,2, 4,2)	30,2, t	C8,C9,C12,C13	H1,H9,H11b,H12
11b	1,55, ddd (12,6, 12,6, 12,6)			H11a,H18,H19
12	3,89, dd (12,6, 4,2)	74,7, d	C17,C18	H9,H11a, H15a,H17
13	-	58,2, s	-	-
14	-	84,9, s	-	-
15a	3,33, d (15,9)	63,7, t	C8,C14,C16 C13,C14,C16,C17	H9,H12,H15b
15b	2,80, d (15,9)			H15a
16	-	95,0, s	-	-
17	4,15, s	68,2, d	C12,C13,C14,C16, C22,C23,C24	H12,H18,H23
18	0,67, s	10,4, q	C12,C13,C14,C17	H11b,H17, H23,H24
19	1,07, s	14,9, q	C1,C5,C9,C10	H1,H6,H11b
20	1,14, s	25,4, q	C4,C5,C21	H5,H6
21	1,12, s	22,5, q	C4,C5,C20	H6
22	-	119,9, s	-	-
23	7,55, d (2,6)	153,0, d	C17,C22,C24,C26	H17,H18
24	8,27, dd (9,8, 2,6)	151,5, d	C23,C26	H18,H25
25	6,28, d (9,8)	113,7, d	C22,C26	H24
26	-	164,1, s	-	-



EJEMPLO 5: BIOENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL

5 El objetivo de este ensayo es evaluar la actividad citostática (capacidad para retrasar o detener el crecimiento de células tumorales) o citotóxica (capacidad para destruir células tumorales) *in vitro* de las muestras que se someten a prueba.

10 Líneas celulares

Nombre	n.º de ATCC	Especie	Tejido	Características
A549	CCL-185	humana	pulmón	carcinoma de pulmón (NSCLC)
HT29	HTB-38	humana	colon	adenocarcinoma colorrectal
MDA-MB-231	HTB-26	humana	mama	adenocarcinoma de mama

Evaluación de la actividad citotóxica usando el ensayo colorimétrico SBR

15 Se ha adaptado un ensayo colorimétrico, usando reacción de sulfo-rodamina B (SRB) para proporcionar una medición cuantitativa del crecimiento y la viabilidad celulares (siguiendo la técnica descrita por Skehan *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 1107-1112).

20 Esta forma de ensayo emplea microplacas de cultivo celular de 96 pocillos convencionales SBS (Faircloth *et al.* Methods in Cell Science, 1988, 11(4), 201-205; Mosmann *et al.*, Journal of Immunological Methods, 1983, 65(1-2), 55-63). Todas las líneas celulares usadas en este estudio se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y derivan de diferentes tipos de cáncer humano.

25 Se mantuvieron las células en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 U/ml a 37°C, CO₂ al 5% y humedad del 98%. Para los experimentos, se recogieron las células a partir de cultivos subconfluentes usando tripsinización y se resuspendieron en medio recién preparado antes de contar y sembrar en placa.

30 Se sembraron células en placas de microtitulación de 96 pocillos, a 5 x 10³ células por pocillo en alícuotas de 150 µl, y se dejó que se adhirieran a la superficie de la placa durante 18 horas (durante la noche) en medio sin fármaco. Después de eso, se fijó una placa control (no tratada) de cada línea celular (tal como se describe más adelante) y se usó para un valor de referencia de tiempo cero. Luego se trataron las placas de cultivo con compuestos de prueba (alícuotas de 50 µl de disoluciones madre 4X en medio de cultivo completo más DMSO al 4%) usando diez diluciones en serie (concentraciones que oscilan entre 10 y 0,00262 µg/ml) y cultivos por triplicado (concentración final del 1% de DMSO). Tras 72 horas de tratamiento, se midió el efecto antitumoral usando la metodología SRB: brevemente, se lavaron las células dos veces con PBS, se fijaron durante 15 min en disolución de glutaraldehído al 1% a temperatura ambiente, se enjuagaron dos veces en PBS y se tiñeron en disolución de SRB al 0,4% durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se enjuagaron las células varias veces con disolución de ácido acético al 1% y se secaron al aire a temperatura ambiente. Luego se extrajo SRB en disolución base de trizma 10 mM y se midió la absorbancia en un lector de placa espectrofotométrica automatizado a 490 nm. Se estimaron los efectos sobre el crecimiento y la supervivencia celulares aplicando el algoritmo NCI (Boyd MR y Paull KD. Drug Dev. Res. 1995, 34, 91-104).

45 Usando la media ± DE de cultivos por triplicado, se generó automáticamente una curva de dosis y respuesta usando análisis de regresión no lineal. Se calcularon tres parámetros de referencia (algoritmo NCI) mediante interpolación automática: GI₅₀ = concentración de compuesto que produce el 50% de inhibición del crecimiento celular, en comparación con cultivos control; TGI = inhibición total del crecimiento celular (efecto citostático), en comparación

con cultivos control y LC₅₀ = concentración de compuesto que produce el 50% de muerte celular neta (efecto citotóxico).

Las tablas 9 y 10 ilustran datos sobre la actividad biológica de los compuestos de la presente invención.

5

Tabla 9. Datos de actividad del ensayo de citotoxicidad (molar) de aegomicina A, B, C y D.

		Aegomicina A	Aegomicina B	Aegomicina C	Aegomicina D
MDA-MB-231	GI ₅₀	1,91E-8	7,61E-8	6,28E-8	6,48E-8
	TGI	3,63E-8	1,67E-7	1,97E-7	9,81E-8
	LC ₅₀	6,11E-8	3,81E-7	6,91E-7	1,73E-7
HT29	GI ₅₀	1,05E-8	3,04E-8	9,84E-9	3,14E-8
	TGI	3,25E-8	2,28E-7	1,05E-7	1,35E-7
	LC ₅₀	1,15E-7	3,04E-6	>2,09E-5	1,45E-6
A549	GI ₅₀	3,82E-9	5,90E-9	7,54E-9	8,64E-9
	TGI	4,39E-9	7,61E-9	1,72E-8	1,28E-8
	LC ₅₀	5,35E-9	1,14E-8	4,19E-8	1,83E-8

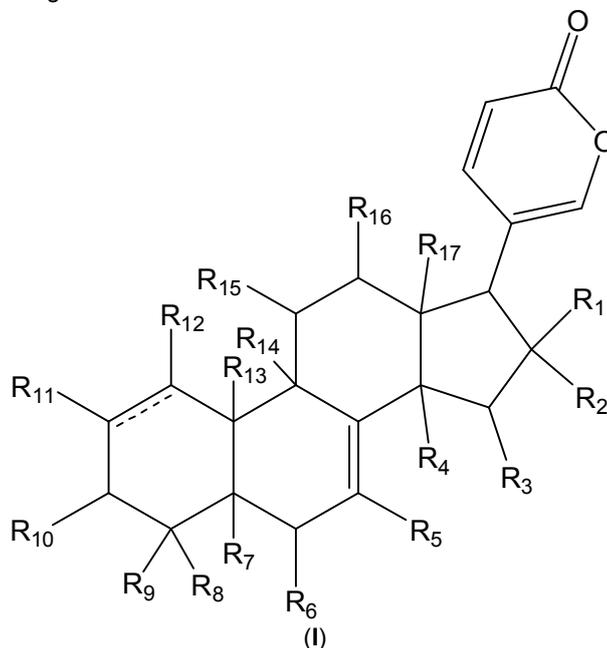
Tabla 10. Datos de actividad del ensayo de citotoxicidad (molar) de aegomicina E, F, G y H

		Aegomicina E	Aegomicina F	Aegomicina G	Aegomicina H
MDA-MB-231	GI ₅₀	1,97E-7	8,80E-8	1,70E-7	8,11E-8
	TGI	3,65E-7	2,71E-7	4,36E-7	2,03E-7
	LC ₅₀	7,50E-7	9,48E-7	1,29E-6	6,08E-7
HT29	GI ₅₀	1,18E-7	6,55E-8	1,46E-7	3,65E-8
	TGI	4,86E-7	4,06E-7	6,75E-7	2,03E-7
	LC ₅₀	5,27E-6	3,16E-6	3,92E-6	4,86E-6
A549	GI ₅₀	4,26E-8	2,48E-8	3,92E-8	8,31E-9
	TGI	5,67E-8	3,84E-8	6,32E-8	1,46E-8
	LC ₅₀	7,50E-8	6,10E-8	1,11E-7	2,84E-8

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general I



5

en donde

R_1 se selecciona de hidrógeno y halógeno;

10

R_2 es halógeno;

cada R_3 , R_{15} y R_{16} se selecciona independientemente de hidrógeno, OR_a , $OCOR_a$, $OCOOR_a$ y $=O$, con la condición de que cuando existe un grupo $=O$, el hidrógeno del átomo de C al que está unido el $=O$ está ausente;

15

cada R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_{11} , R_{12} y R_{14} se selecciona independientemente de hidrógeno, OR_a , $OCOR_a$ y $OCOOR_a$;

cada R_8 , R_9 y R_{17} se selecciona independientemente de hidrógeno, OR_a , $OCOR_a$, $OCOOR_a$, alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, alqueno C_2-C_{12} sustituido o no sustituido y alquino C_2-C_{12} sustituido o no sustituido;

20

R_{10} se selecciona de hidrógeno, OR_b , $OCOR_a$, $OCOOR_a$ y $=O$, con la condición de que cuando existe un grupo $=O$, el hidrógeno del átomo de C al que está unido el $=O$ está ausente;

25

R_{13} se selecciona de hidrógeno, COR_a , alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, alqueno C_2-C_{12} sustituido o no sustituido y alquino C_2-C_{12} sustituido o no sustituido;

cada R_a se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, alqueno C_2-C_{12} sustituido o no sustituido, alquino C_2-C_{12} sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y grupo heterocíclico sustituido o no sustituido;

30

cada R_b se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_{12} sustituido o no sustituido, alqueno C_2-C_{12} sustituido o no sustituido, alquino C_2-C_{12} sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, grupo heterocíclico sustituido o no sustituido y azúcar sustituido o no sustituido;

35

la línea ----- representa un enlace adicional, un grupo epoxi o está ausente;

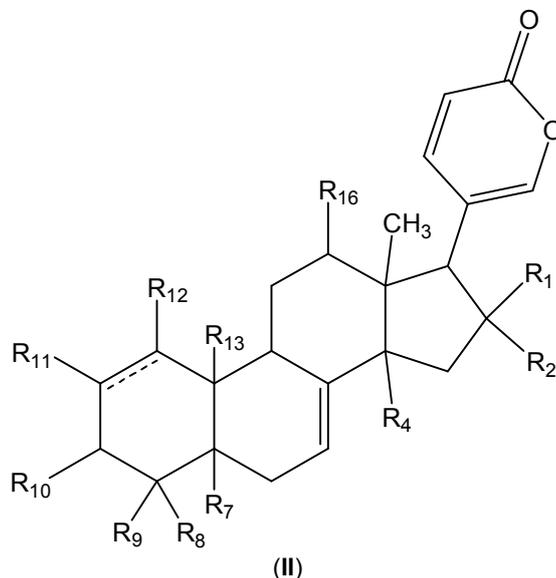
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

40

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde R_3 , R_5 , R_6 , R_{14} y R_{15} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, OR_a y $OCOR_a$, y en donde R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido.

3. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₁₇ es un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
4. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula II

5



en donde R₁, R₂, R₄, R₇, R₈-R₁₃, R₁₆ y la línea ----- son tal como se definieron en la reivindicación 1, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

5. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₁ se selecciona de hidrógeno y Cl; y en donde R₂ es Cl.
6. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₄ se selecciona de hidrógeno y OR_a, y en donde R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
7. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₇ se selecciona de hidrógeno, OR_a y OCOR_a, y en donde R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
8. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, OR_a y OCOR_a, y en donde R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
9. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₁₀ se selecciona de OR_b, OCOR_a y =O, y en donde R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido y R_b se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, monosacárido, disacárido y trisacárido, con la condición de que cuando R₁₀ es =O, el hidrógeno del átomo de C al que R₁₀ está unido está ausente.
10. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₁₃ se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido y COR_a, y en donde R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
11. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde R₁₆ se selecciona de hidrógeno, OR_a y OCOR_a, y en donde R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
12. Un compuesto según cualquier reivindicación anterior, en donde la línea ----- está ausente, R₁₁ y R₁₂ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, OR_a y OCOR_a, y R_a se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
13. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la línea ----- representa un enlace adicional o un grupo epoxi, y R₁₁ y R₁₂ son hidrógeno.
14. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura:

40

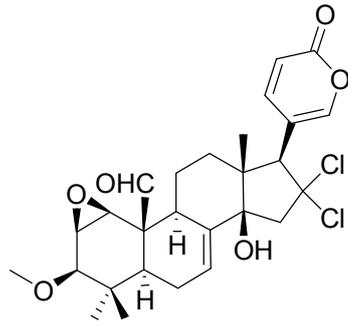
35

30

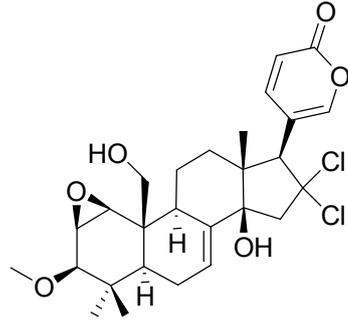
25

20

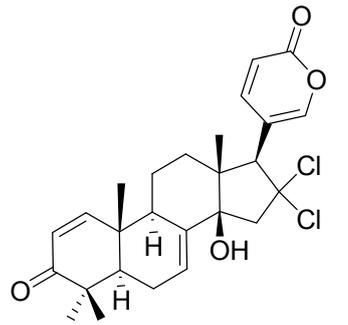
15



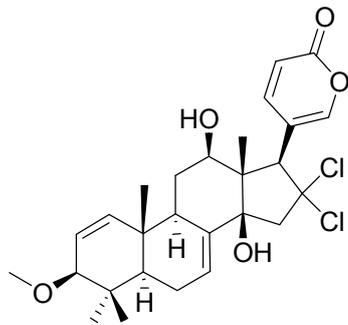
Aegomicina A,



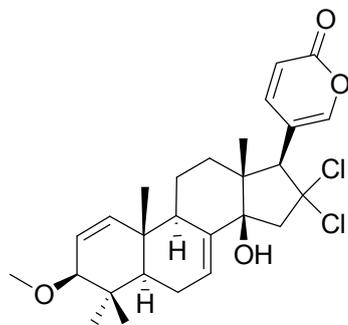
Aegomicina B,



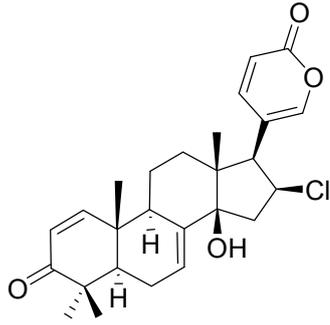
Aegomicina C,



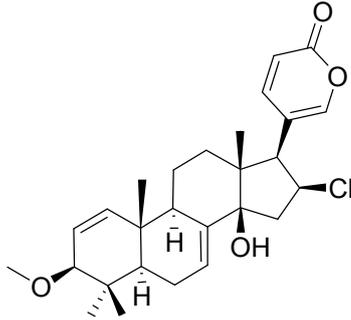
Aegomicina D,



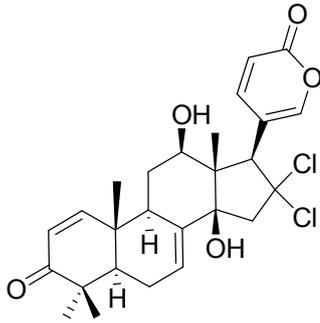
Aegomicina E,



Aegomicina F,



Aegomicina G, o



Aegomicina H;

- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquier reivindicación anterior, o una
 10 sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, y un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable.
16. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.
- 15 17. Un compuesto según la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento del cáncer.