

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 359**

51 Int. Cl.:

C07H 15/252 (2006.01)

C07H 19/044 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2013 PCT/CN2013/000233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14059740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 13847102 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2824108**

54 Título: **Derivados de antraquinona tetracíclica**

30 Prioridad:

06.03.2012 CN 201210055298

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.09.2017

73 Titular/es:

**TIANJIN HEMAY ONCOLOGY PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
No. 3 Workshop Culture Center Phase 2, 2 Jianfu Road, Xiqing Economic-Technological Development Area
Tianjin 300385, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, HESHENG;
HUO, AIHONG y
LI, ZHENZHONG**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 633 359 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 antraquinona tetracíclica

5 Campo

La presente solicitud se refiere al campo de compuestos orgánicos y química medicinal. En particular, la presente solicitud se refiere a derivados de antraquinona tetracíclica, procedimientos de preparación y aplicaciones de los mismos.

10

Antecedentes

Los antibióticos de de antraquinona tetracíclica, en particular doxorubicina y daunorrubicina, son fármacos anticáncer usados ampliamente. La doxorubicina tiene efectos curativos significativos en muchos tumores sólidos que incluyen cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y diversas leucemias. La daunorrubicina es uno de los fármacos más eficaces para el tratamiento de la leucemia. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios tales como mielosupresión severa, toxicidad cardíaca, respuestas adversas en tractos digestivos y similares, sus aplicaciones clínicas están limitadas en cierta medida. Hasta ahora, muchos derivados de antraquinonas tetracíclicas ya se han separado de la naturaleza o se han sintetizado de forma artificial.

20

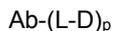
JORG B. ENGEL *ET AL*: "Targeted Therapy of Breast and Gynecological Cancers with Cytotoxic Analogues of Peptide Hormones", MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 4, n.º 5, 1 de octubre de 2007 (2007-10-01), páginas 652-658, es una revisión que describe diversas moléculas híbridas citotóxicas que consisten en un radical citotóxico y un análogo de hormona peptídica como un vehículo.

25

El documento CN 101 555 264 A describe diversos derivados antibióticos de antraquinona tetracíclica.

El documento WO 2009/099741 describe compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco de Fórmula:

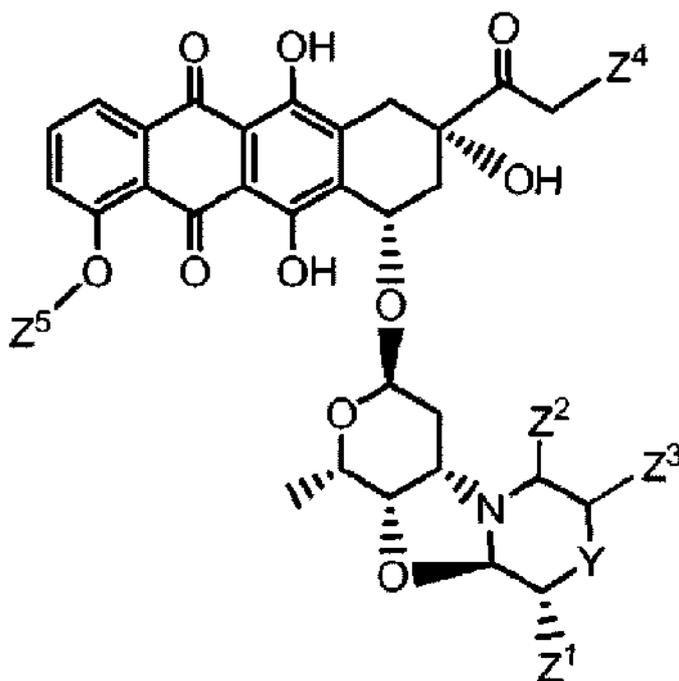
30



en la que uno o más restos de fármaco de metabolito o análogo de nemorrubicina (D) están unidos de forma covalente mediante un conector (L) a un anticuerpo (Ab) que se une a uno o más antígenos asociados a tumor o receptores de superficie celular.

35

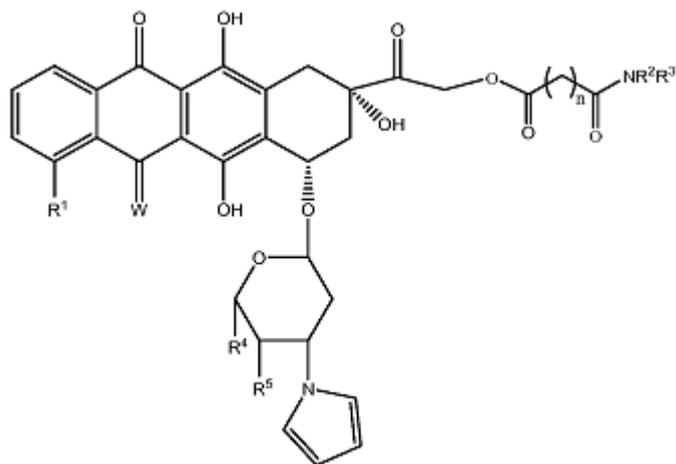
En particular, describe un reactivo de resto de fármaco que tiene una estructura:



en la que Y es N-Z⁶ u O; y uno de z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵ o Z⁶ comprende un grupo funcional reactivo seleccionado entre maleimida, tiol, amino, bromuro de alquilo, yoduro de alquilo, alquil tiol, alquil hidroxilo, alquil amino, hidroxilo, carboxilo, y éster de NHS.

5 **Sumario**

Un aspecto de la presente solicitud se refiere a un compuesto representado por la fórmula (I) y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



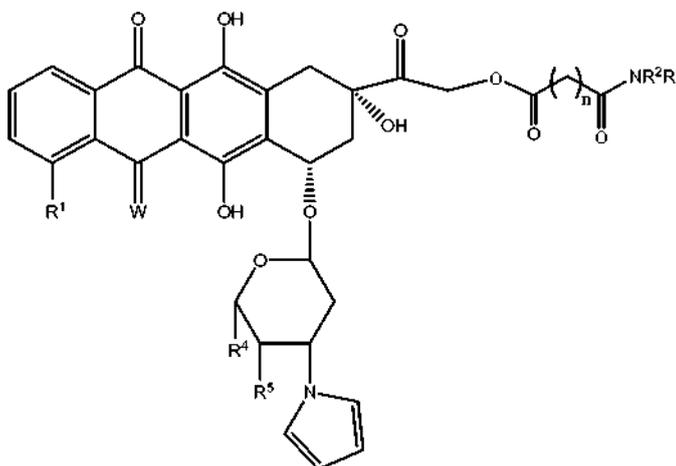
Fórmula (I)

10

en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, W y n son como se definen en la reivindicación 1.

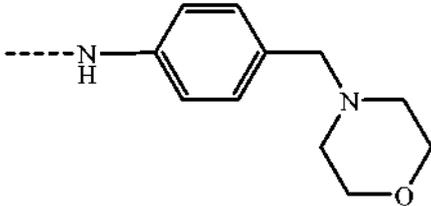
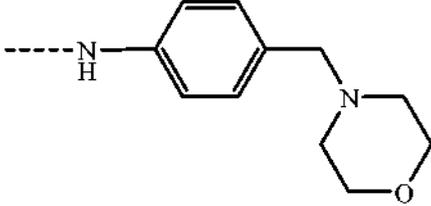
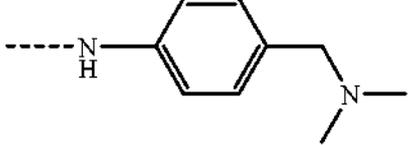
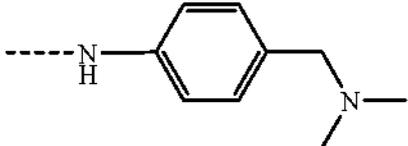
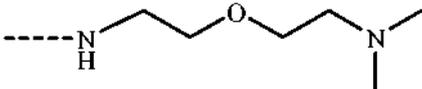
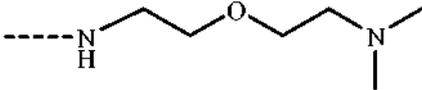
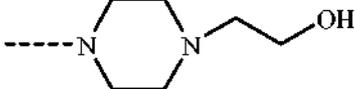
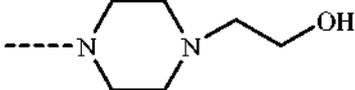
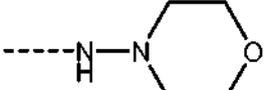
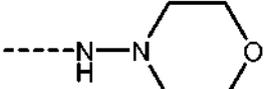
Además otro aspecto de la presente solicitud se refiere a un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

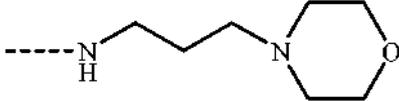
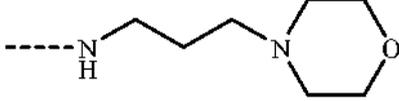
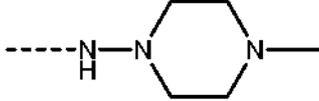
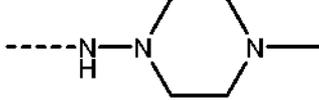
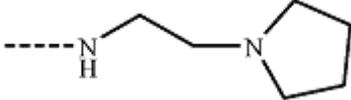
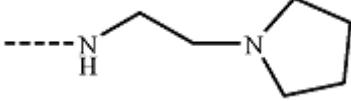
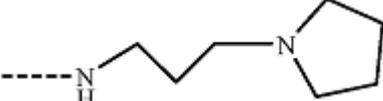
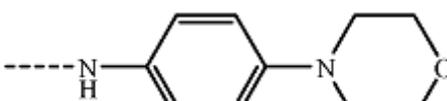
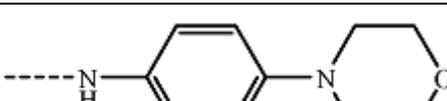
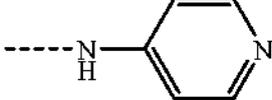
15

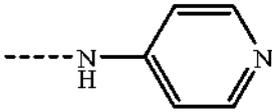
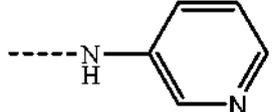
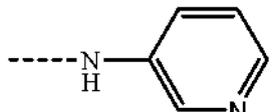
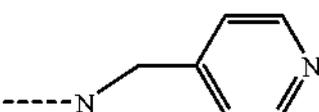
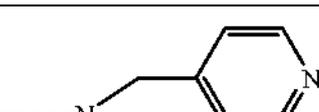
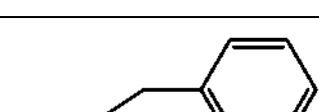
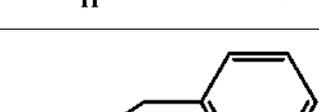
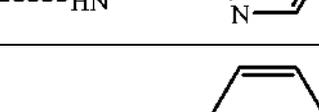
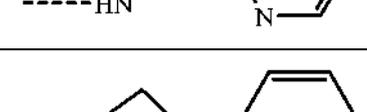
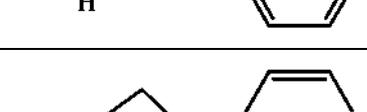


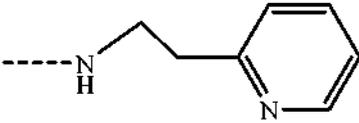
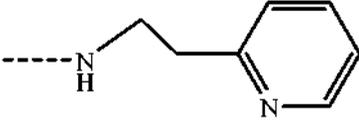
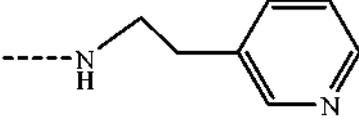
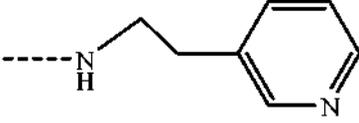
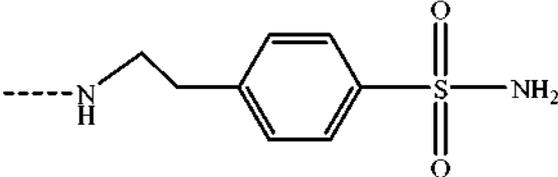
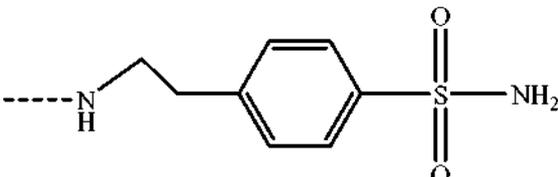
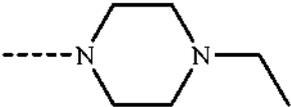
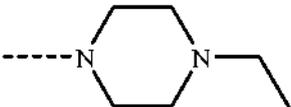
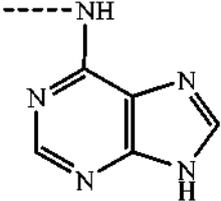
en el que W es O, R¹ es OCH₃, R⁴ es CH₃, R⁵ es OH, n y NR²R³ son como se muestran en la siguiente tabla:

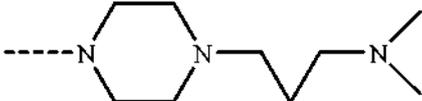
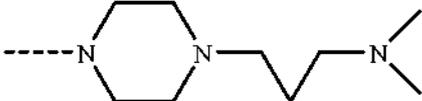
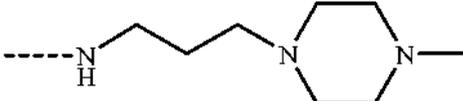
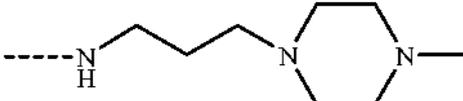
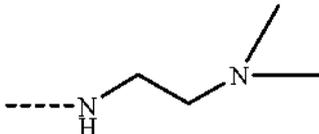
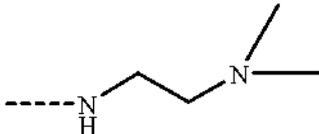
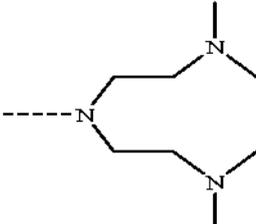
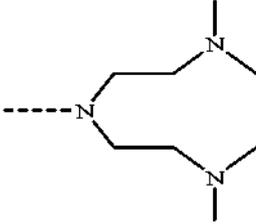
N.º	n	NR ² R ³
1	3	

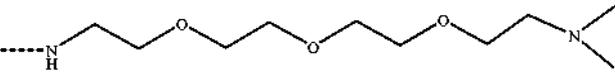
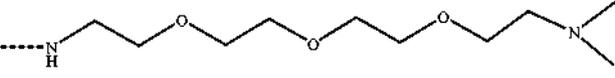
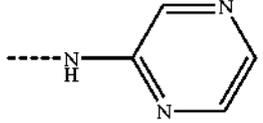
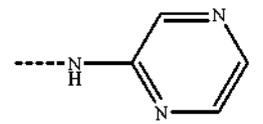
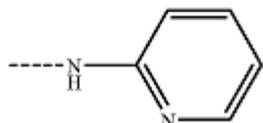
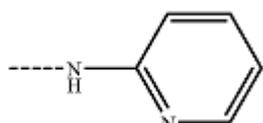
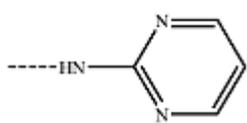
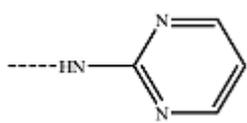
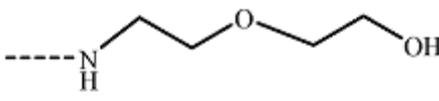
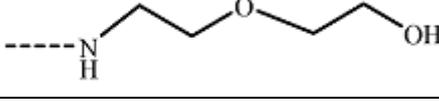
N.º	n	NR ² R ³
2	2	
3	3	
4	2	
5	3	
6	2	
7	3	
8	2	
9	3	
10	2	
11	3	

N.º	n	NR ² R ³
12	2	
13	3	
14	2	
15	3	
16	2	
17	3	
18	2	
19	3	
20	2	
21	3	
22	2	

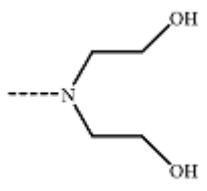
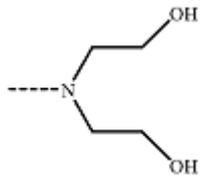
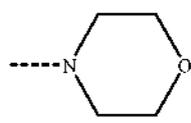
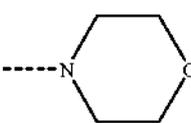
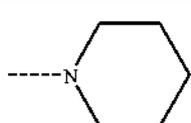
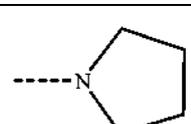
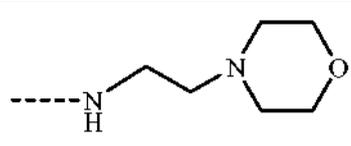
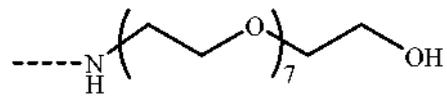
N.º	n	NR ² R ³
23	3	
24	2	
25	3	
26	2	
27	3	
28	2	
29	3	
30	2	
31	3	
32	2	
33	3	

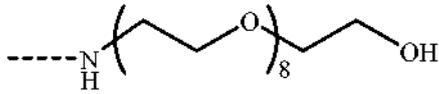
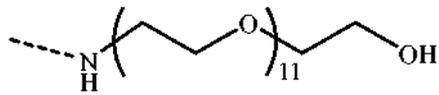
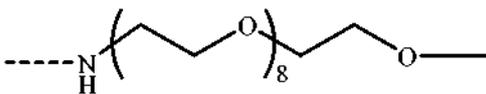
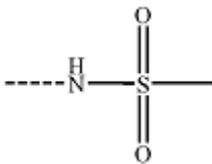
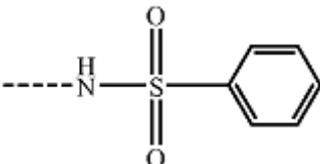
N.º	n	NR ² R ³
34	2	
35	3	
36	2	
37	3	
38	2	
39	3	
40	2	
41	3	
42	2	

N.º	n	NR ² R ³
43	3	
44	2	
45	3	
46	2	
47	3	
48	2	
49	3	
50	2	
51	3	

N.º	n	NR ² R ³
52	2	
53	3	
54	2	
55	3	
56	2	
57	3	
58	2	
59	3	
60	2	
61	3	
62	2	
63	3	

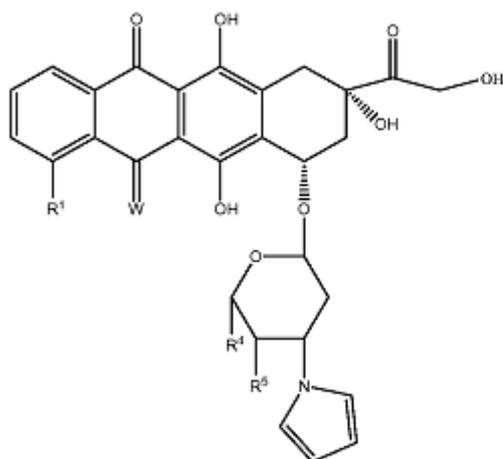
ES 2 633 359 T3

N.º	n	NR ² R ³
64	2	
65	3	
66	2	NH ₂
67	3	NH ₂
68	2	NHCH ₃
69	3	NHCH ₃
70	2	N(CH ₃) ₂
71	3	N(CH ₃) ₂
72	2	
73	3	
74	2	
75	2	
88	2	
90	2	

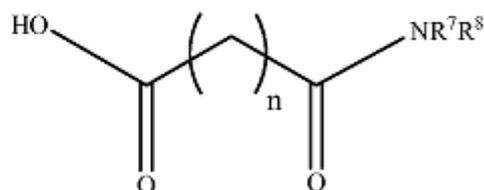
N.º	n	NR ² R ³
91	2	
92	2	
93	2	
94	2	
95	2	

- 77) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((4-(2-hidroxi)etil)piperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 78) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((3-(morfolin-1-il)propil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 79) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(4-metil)piperazin-1-il)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 80) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(4-etilpiperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 81) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(3-(4-metilpiperazin-1-il)propil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 82) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((piridin-4-il)metil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 83) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((piridin-3-il)metil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 84) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-2-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 85) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-3-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 86) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-4-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 87) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(4-(3-(dimetilamino)propil)piperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona acetato;
- 89) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 96) fosfato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona fosfato; y
- 99) clorhidrato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona.

Además otro aspecto de la presente solicitud se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I), que comprende:



Fórmula (II)



Fórmula (III)

hacer reaccionar un compuesto representado por la fórmula (II) con un compuesto representado por la fórmula (III) en presencia de un agente de condensación para obtener el compuesto representado por la fórmula (I),
5 en la que:

los grupos representados por R^1 , W , R^4 , R^5 en el compuesto representado por la fórmula (II) son los mismos que los grupos representados por R^1 , W , R^4 , R^5 en el compuesto representado por la fórmula (I);
10 n en el compuesto representado por la fórmula (III) tiene los mismos significados que n en el compuesto representado por la fórmula (I); los grupos representados por R^7 y R^8 en el compuesto representado por la fórmula (III) son los mismos que los grupos representados por R^2 y R^3 en el compuesto representado por la fórmula (I), con la condición de que los grupos representados por R^7 y R^8 no comprendan NH o NH_2 ; cuando los grupos representados por R^7 y R^8 comprenden NH o NH_2 , el compuesto representado por la fórmula (III) tiene un grupo protector de amino en el extremo N-terminal, y está sometido a una reacción de desprotección para
15 obtener el compuesto representado por la fórmula (I).

Además otro aspecto de la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

Además otro aspecto de la presente solicitud se refiere a una formulación que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En el presente documento se describe un método para tratar y/o prevenir tumor y/o cáncer, que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable, o administrar una
30 cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El compuesto y una sal del mismo de acuerdo con la presente solicitud poseen buenas actividades anticáncer y/o antitumorales, y buena solubilidad y estabilidad en agua, así como buena tolerancia en cuerpos de animales. Por lo
35 tanto, son propensos a su desarrollo como fármacos clínicos.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra efectos de 3'-pirrolidoxorrubicina en el peso corporal de animales experimentales.
40 La Fig. 2 muestra efectos del compuesto en el Ejemplo 96 de acuerdo con la presente solicitud en el peso corporal de animales experimentales.
La Fig. 3 muestra efectos de monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico en el peso corporal de animales experimentales.

45

Descripción detallada

En la siguiente descripción, se incluyen ciertos detalles específicos para proporcionar una comprensión minuciosa de diversas realizaciones desveladas. Alguien con una experiencia habitual en la materia pertinente, sin embargo, 5 reconocerá que las realizaciones se pueden poner en práctica sin uno o más de estos detalles específicos, o con otros métodos, componentes, materiales, etc.

A menos que el contexto lo requiera de otro modo, a través de la memoria descriptiva y reivindicaciones que siguen a continuación, el término "comprender" y variaciones del mismo, tal como "comprende" y "que comprende" se 10 deben interpretar en un sentido inclusivo, abierto, que es como "incluir, pero no limitarse a".

A través de la presente memoria descriptiva la referencia a "una realización", o "una realización", o "en otra realización", o "en algunas realizaciones" se refiere a que una característica, estructura o características de referencia en particular descritas en conexión con la realización está incluida en al menos una realización. Por lo 15 tanto, la aparición de no todas las expresiones "en una realización" o "en la realización" o "en otra realización" o "en algunas realizaciones" en diversos lugares a través de la presente memoria descriptiva no hacen referencia necesariamente a la misma realización. Además, los elementos, estructuras o características en particular se pueden combinar de una manera adecuada en una o más realizaciones.

Se debería indicar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, una reacción que comprende "un catalizador" comprende un catalizador, dos o 20 más catalizadores. También se debería indicar que el uso de "o" se refiere a "y/o" a menos que se indique de otro modo.

Definiciones

Ciertos grupos químicos nombrados en el presente documento van precedidos por una notación abreviada que indica el número total de átomos de carbono que se van a encontrar en el grupo químico indicado. Por ejemplo, 30 alquilo C₇-C₁₂ describe un grupo alquilo, como se define a continuación, que tiene un total de 7 a 12 átomos de carbono, y ciclohidrocarbiloalquilo C₄-C₁₂ describe un grupo ciclohidrocarbiloalquilo, como se define a continuación, que tiene un total de 4 a 12 átomos de carbono. El número total de átomos de carbono en la notación abreviada no incluye los carbonos que pueden existir en los sustituyentes de los grupos descritos.

Por consiguiente, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen los significados indicados:

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste únicamente en carbono e hidrógeno, que no contiene ningún enlace insaturado, que tiene de 40 uno a doce átomos de carbono, preferentemente de uno a ocho o de uno a seis átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, 1-metiletilo (*iso*-propilo), *n*-butilo, *n*-pentilo, 1,1-dimetiletilo (*terc*-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo, y similares.

El grupo alquilo puede tener de uno a doce átomos de carbono (siempre que aparece en la presente solicitud, un 45 intervalo numérico tal como "de uno a doce" se refiere a cada número entero en el intervalo numérico dado; por ejemplo "de uno a doce átomos de carbono" se refiere a que el grupo alquilo debe consistir en un átomo de carbono, dos átomos de carbono, tres átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo doce átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" en el que no se designa ningún intervalo numérico). El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tenga de uno a diez átomos de 50 carbono. El grupo alquilo también puede ser un alquilo inferior que tenga de uno a cinco átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos de la presente solicitud se puede designar como "alquilo C₁₋₄" o designaciones similares. Solamente a modo de ejemplo, "alquilo C₁₋₄" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilo, es decir, la cadena de alquilo se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, o *t*-butilo.

El grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido, es decir, sustituido o sin sustituir. Cuando está sustituido, el grupo o grupos sustituidos se seleccionan individual e independientemente entre el grupo que consiste en ciclohidrocarbilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfinamido, 60 N-sulfinamido, C-carboxilo, O-carboxilo, isocianato, tiociano, isotiocianato, nitro, sililo, trihalometanosulfonilo, -NR'R" o amino incluyendo grupo amino mono- y di-sustituido, y los derivados protegidos de los mismos. Los grupos hidrocarbilo habituales incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo, pentilo, hexilo, etenilo, propenilo, buenilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, y similares. Siempre que se describe que un sustituyente está "opcionalmente sustituido", ese sustituyente puede estar sustituido con uno de los 65 sustituyentes mencionados anteriormente.

"Alquilo C₁₋₄" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de uno a cuatro átomos de carbono. El grupo alquilo C₁₋₄ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

5 "Alquilo C₁₋₆" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de uno a seis átomos de carbono. El alquilo grupo C₁₋₆ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

"Alquilo C₁₋₁₂" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de uno a doce átomos de carbono. El alquilo grupo C₁₋₁₂ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

10 "Alquilo C₂₋₆" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de dos a seis átomos de carbono. El grupo alquilo C₂₋₆ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

15 "Alquilo C₃₋₆" se refiere a un alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de tres a seis átomos de carbono. El grupo alquilo C₃₋₆ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

"Alquilo C₃₋₁₂" se refiere a un alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de tres a doce átomos de carbono. El grupo alquilo C₃₋₁₂ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

20 "Alquilo C₆₋₁₂" se refiere a un alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de seis a doce átomos de carbono. El grupo alquilo C₆₋₁₂ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

"Alquilo C₇₋₁₂" se refiere a un alquilo como se ha definido anteriormente que contiene de siete a doce átomos de carbono. El grupo alquilo C₇₋₁₂ puede estar opcionalmente sustituido como se ha definido para el grupo alquilo.

25 En algunas realizaciones, el grupo alquilo es alquilo C₁₋₁₂.

En algunas realizaciones, el grupo alquilo es alquilo C₁₋₈.

En algunas realizaciones, el grupo alquilo es alquilo C₁₋₆.

30

En algunas realizaciones, el grupo alquilo es alquilo C₁₋₄.

"Alcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a la fórmula -OR, en la que R es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente, por ejemplo metoxi, etoxi, *n*-propoxi, 1-metil etoxi (isopropoxi), *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *t*-butoxi, amoxi, *t*-amoxi, y similares.

35

En algunas realizaciones, el grupo alcoxi es alcoxi C₁₋₁₂.

En algunas realizaciones, el grupo alcoxi es alcoxi C₁₋₈.

40

En algunas realizaciones, el grupo alcoxi es alcoxi C₁₋₆.

En algunas realizaciones, el grupo alcoxi es alcoxi C₁₋₄.

45 "Alquilenos", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de cadena de hidrocarburo divalente línea no ramificado que consiste únicamente en carbono e hidrógeno y que tiene de uno a ocho átomos de carbono, que está unido al otro resto de la molécula y un grupo residual, por ejemplo metileno, etileno, propileno, *n*-butileno. La cadena de alquilenos se puede unir con el otro resto de la molécula y el grupo residual a través de un átomo de carbono en la cadena o cualesquiera dos átomos de carbono en la cadena.

50

En algunas realizaciones, el grupo alquilenos es alquilenos C₁₋₁₂.

En algunas realizaciones, el grupo alquilenos es alquilenos C₁₋₈.

55 En algunas realizaciones, el grupo alquilenos es alquilenos C₁₋₆.

En algunas realizaciones, el grupo alquilenos es alquilenos C₁₋₄.

60 "Alquilenoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a la fórmula -OR, en la que R es un grupo alquilenos como se ha definido anteriormente, por ejemplo metilenoxi, etilenoxi, *n*-propilenoxi, isopropilenoxi, *n*-butilenoxi, isobutilenoxi, *sec*-butilenoxi, *t*-butilenoxi, amilenoxi, *t*-amilenoxi, y similares.

En algunas realizaciones, el grupo alquilenoxi es Oalquilenos (C₁₋₁₂).

65 En algunas realizaciones, el grupo alquilenoxi es Oalquilenos (C₁₋₈).

En algunas realizaciones, el grupo alquilenoxi es Oalquilenoxi (C_{1-6}).

En algunas realizaciones, el grupo alquilenoxi es Oalquilenoxi (C_{1-4}).

5 "Ariilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un carbociclo (completamente de carbonos) o dos anillos fusionados (anillos que comparten dos átomos de carbono adyacentes), que tienen sistema de electrones π completamente los localizados. Los ejemplos de grupo ariilo incluyen, pero no se limitan a, fluorenilo, fenilo y naftilo. El grupo ariilo puede tener, por ejemplo, de cinco a doce átomos de carbono. El grupo ariilo de la presente solicitud puede estar sustituido o sin sustituir. Cuando esta sustituido, el átomo o átomos de hidrógeno están sustituidos con

10 uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en alquilo, ciclohidrocarbilo, ariilo, heteroarilo, heteroalíciclico, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfinamido, N-sulfinamido, C-carboxilo, C-carboxilo protegido, O-carboxilo, isocianato, tiociano, isotiocianato, nitro, sililo, trihalometanosulfonilo, $-NR'R''$ (R' y R'' son grupos alquilo definidos en el presente documento) y amino protegido.

15 En algunas realizaciones, el grupo ariilo es ariilo C_6-C_{18} .

En algunas realizaciones, el grupo ariilo es ariilo C_6-C_{12} .

20 En algunas realizaciones, el grupo ariilo es ariilo C_6-C_{10} .

"Heteroarilo (heterociclilo aromático)" se refiere a un grupo de anillos aromáticos de cinco a dieciocho miembros, que contiene de uno a diecisiete átomos de carbono y de uno a diez heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Para el fin de la presente invención, el heteroarilo puede ser un sistema de

25 anillos monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede comprender sistema de anillos fusionados o unidos por puente. Además, el átomo de nitrógeno, carbono o azufre en el grupo heteroarilo puede estar opcionalmente oxidado, y el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, acridinilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzoindolilo, benzodioxolanilo, benzofuranilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[*b*][1,4]dioxepanilo, 1,4-benzodioxanilo, benzonaftofuranilo, benzodioxolanilo,

30 benzodioxadienilo, benzopiranilo, benzopironilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo, benzotriazolilo, benzo[4,6]imidazo[1,2-*a*]piridilo, carbazolilo, cinnolinilo, dibenzofuranilo, dibenzotienilo, furanilo, furanonilo, isotiazolilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, isoquinolilo, indolizínilo, isoxazolilo, naftilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, oxiranilo, 1-fenil-1H-pirrolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, 2,3-naftiridinilo, pteridinilo, purinilo, pirrolilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo,

35 piridazinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolilo, quinuclidinilo, isoquinolilo, tetrahydroquinolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, triazinilo y tiopenilo. A menos que se indique específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, el término "heteroarilo" pretende incluir los grupos heteroarilo que pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en alquilo, ciclohidrocarbilo, ariilo, heteroarilo, heteroalíciclico, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio,

40 ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfinamido, N-sulfinamido, C-carboxilo, C-carboxilo protegido, O-carboxilo, isocianato, tiociano, isotiocianato, nitro, sililo, trihalometanosulfonilo, $-NR'R''$ (R' y R'' son grupos alquilo definidos en el presente documento) y amino protegido.

45 En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo es heteroarilo C_5-18 .

En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo es heteroarilo C_5-12 .

En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo es heteroarilo C_5-10 .

50 El término "heterociclilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de anillos no aromáticos de tres a doce miembros estable que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de los grupos heterociclilo de este tipo incluyen, pero no se limitan a, dioxolanilo, decahidroisoquinolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo,

55 isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxazolidinilo, piperidilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, tiazolidinilo, tetrahydrofurilo, tritanilo, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, tiamorfolinilo, 1-oxo-tiomorfolinilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. A menos que se indique específicamente de otro modo en la memoria descriptiva, el término "heterociclilo" pretende incluir los grupos heterociclilo como se ha definido anteriormente, que pueden estar opcionalmente sustituidos con

60 uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en ciclohidrocarbilo, ariilo, heteroarilo, heteroalíciclico, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfinamido, N-sulfinamido, C-carboxilo, O-carboxilo, isocianato, tiociano, isotiocianato, nitro, sililo, trihalometanosulfonilo, $-NR'R''$ (R' y R'' son grupos alquilo como se define en la presente solicitud) o amino que incluye grupo amino mono- y di-sustituido, y los derivados protegidos de

65 los mismos.

En algunas realizaciones, el grupo heterociclilo es heterociclilo C₃₋₁₈.

En algunas realizaciones, el grupo heterociclilo es heterociclilo C₃₋₁₂.

5 En algunas realizaciones, el grupo heterociclilo es heterociclilo C₃₋₁₀.

"Sulfonilo" se refiere a grupo -S(=O)₂R, en el que R puede ser alquilo, ciclohidrocarbilo, heterociclilo, arilo, heteroarilo, etc., como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos sulfonilo incluyen, pero no se limitan a, -S(=O)₂CH₃ (mesilo), -S(=O)₂CF₃, -S(=O)₂CH₂CH₃ y 4-metilbencenosulfonilo (tosilo).

10 "Opcional" u "opcionalmente" se refiere a que las circunstancias que se describen a continuación se pueden producir o no, y la memoria descriptiva incluye casos en los que dicho suceso o circunstancia se produce y casos en los que no se produce. Por ejemplo, "arilo opcionalmente sustituido" se refiere a que el grupo arilo puede estar sustituido o no y la memoria descriptiva incluye el grupo arilo sustituido y el grupo arilo que no está sustituido.

15 "Vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen, pero no se limitan a, cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, sustancia de deslizamiento, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, tensoactivo, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizante, agente isosmótico, disolvente, o emulgente, etc., que han sido aprobados por la United States Food and Drug Administration como
20 aceptables para su uso en seres humanos o en animales y no tienen efectos secundarios para formar una composición farmacéutica.

"Sales farmacéuticamente aceptables" incluyen tanto "sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables" como "sales de adición de base farmacéuticamente aceptables".

25 "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que retienen la eficacia biológica y propiedades de las bases libres, que son biológicamente o de otro modo deseables, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, pero no limitados a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; y ácidos orgánicos tales como, pero no limitados a, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido camfánico, ácido canfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinnámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecil sulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido múxico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxil-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleínico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico y similares.

"Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que retienen la eficacia biológica y propiedades de los ácidos libres, que son biológicamente o de otro modo deseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica en el ácido libre. Las sales obtenidas a partir de bases
45 inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, y similares. Las sales inorgánicas preferentes son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio, y magnesio. Las sales obtenidas a partir de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como amoniaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, bencilamina, feniletildiamina, etilendiamina, glucosamina, metilglucosamina, teobromo, trietanolamina, trometamol, purina, piperazina, piperidina, *N*-etil piperidina, resina de poliamina y similares. Las bases orgánicas particularmente preferentes son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitlohexilamina, colina y cafeína.

55 "Composición farmacéutica" se refiere a una formulación formada con un compuesto de la invención y un medio generalmente aceptable en la técnica para la administración del compuesto biológicamente activo a un mamífero por ejemplo seres humanos. Un medio de este tipo incluye todos los vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

60 "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que, cuando se administra a un mamífero, preferentemente a un ser humano, es suficiente para efectuar el tratamiento (como se define a continuación) del tumor y/o cáncer en el mamífero, preferentemente un ser humano. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del
65 compuesto, la afección y su gravedad, y la edad del mamífero a tratar, pero la puede determinar de forma rutinaria

alguien con experiencia habitual en la materia en la técnica teniendo en cuenta sus propios conocimientos y con respecto a la presente divulgación.

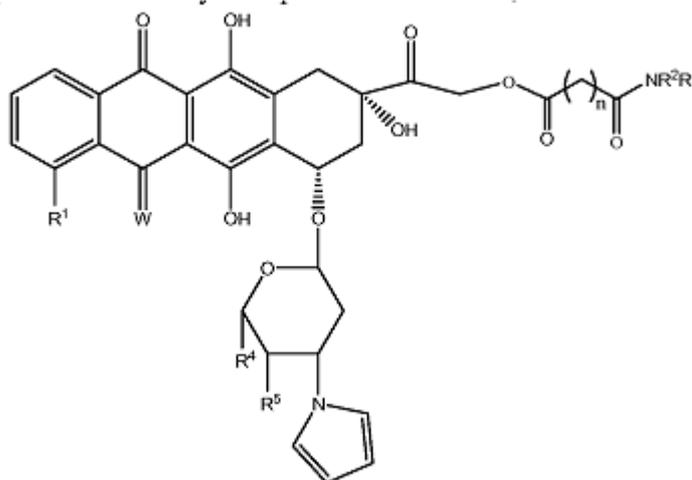
"Tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre el tratamiento de una enfermedad o afección pertinente en un mamífero, preferentemente un ser humano, que tienen la enfermedad o trastorno pertinente, e incluye:

- (i) evitar que la enfermedad o afección se produzca en un mamífero, en particular, cuando tan mamífero está predispuesto a la afección pero aún no se ha diagnosticado que la padece;
- (ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir detener su desarrollo; o
- (iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir causar la regresión de la enfermedad o afección.

Durante el transcurso del tratamiento, la administración *in vivo* se puede realizar por medio de una sola administración, una administración continua o una administración intermitente (de modo que la administración se realiza mediante dosis divididas a intervalos apropiados). El método para determinar el modo de administración y la dosis más eficaz sería bien conocido por alguien con una experiencia habitual en la materia, y varía dependiendo de la formulación a usar en el tratamiento, el objeto del tratamiento, la célula dirigida a tratar y el sujeto a tratar. Se puede realizar una administración individual o una administración múltiple, y el nivel de dosis y el modo nos puede seleccionar un doctor asistente.

Realizaciones Específicas

En un aspecto, la presente solicitud se refiere a un compuesto representado por la fórmula (I) y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



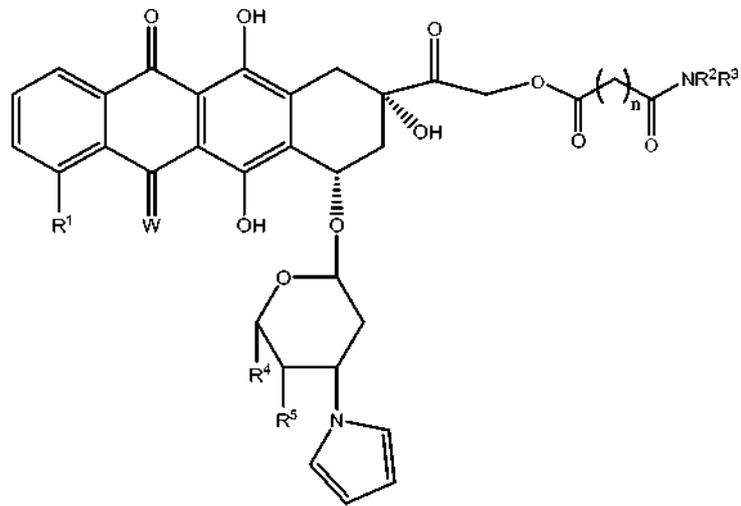
Fórmula (I)

en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, W y n son como se definen en la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, R¹ en el compuesto representado por la fórmula (I) se selecciona entre el grupo que consiste en H y OCH₃.

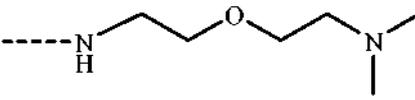
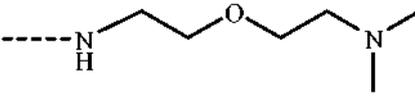
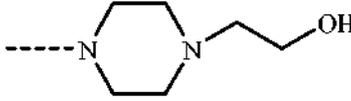
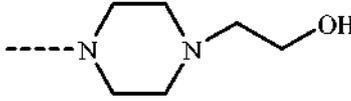
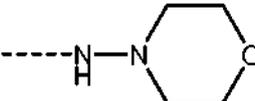
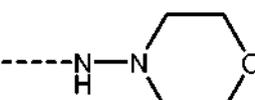
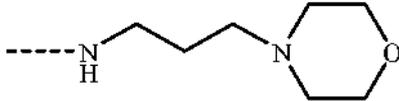
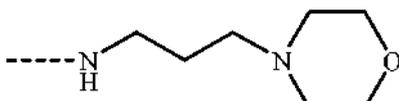
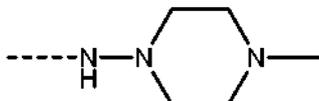
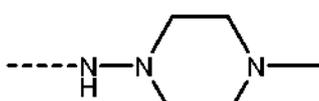
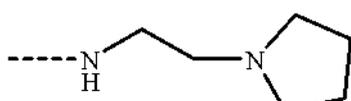
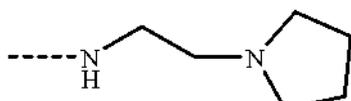
En algunas realizaciones, R⁴ en el compuesto representado por la fórmula (I) es CH₃.

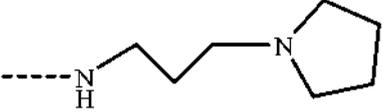
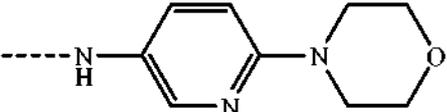
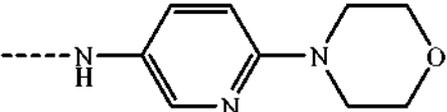
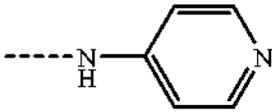
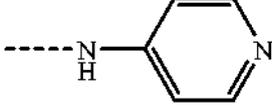
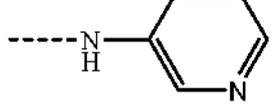
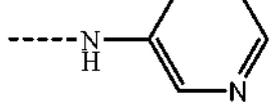
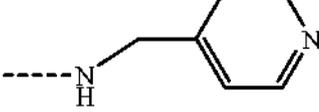
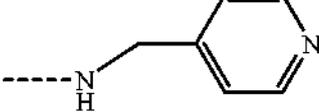
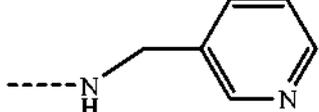
Además en otro aspecto, la presente solicitud se refiere a compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en:



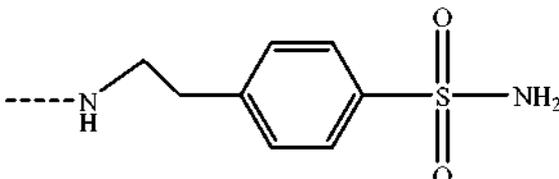
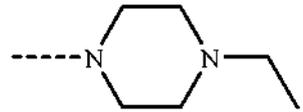
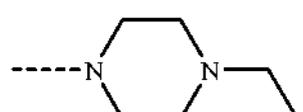
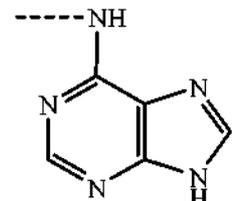
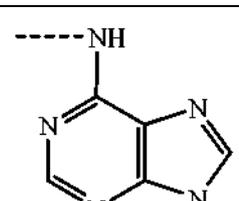
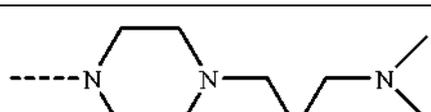
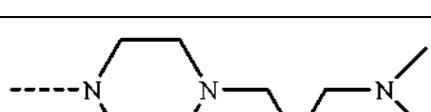
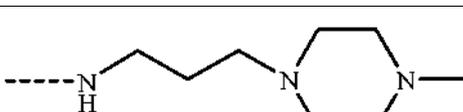
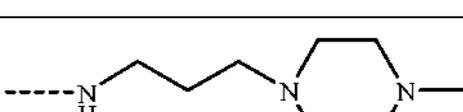
en la que W es O, R¹ es OCH₃, R⁴ es CH₃, R⁵ es OH, n y NR²R³ son como se muestran en la siguiente tabla:

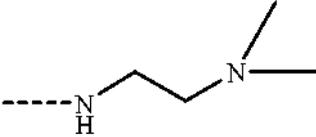
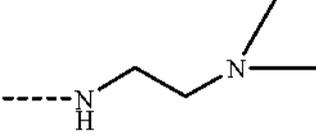
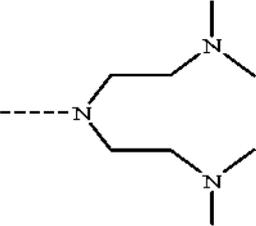
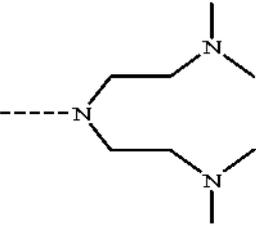
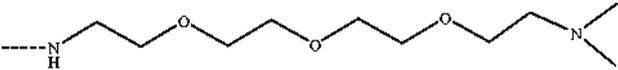
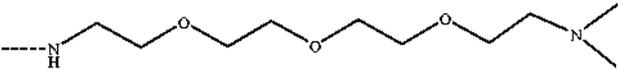
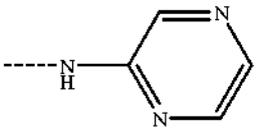
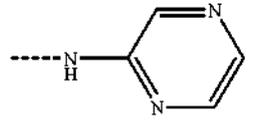
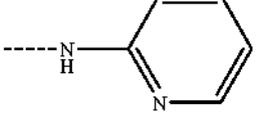
N.º	n	NR ² R ³
1	3	
2	2	
3	3	
4	2	
5	3	

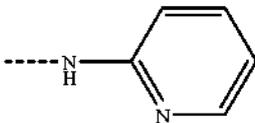
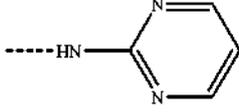
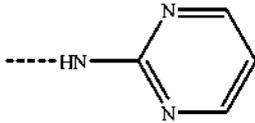
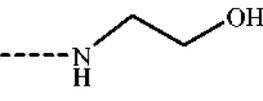
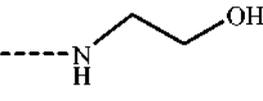
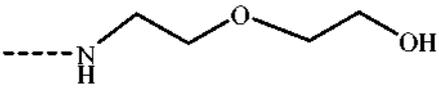
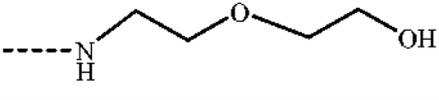
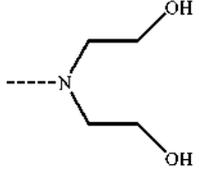
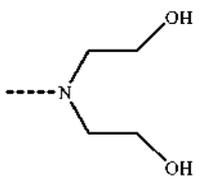
N.º	n	NR ² R ³
6	2	
7	3	
8	2	
9	3	
10	2	
11	3	
12	2	
13	3	
14	2	
15	3	
16	2	
17	3	

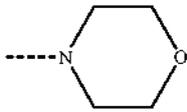
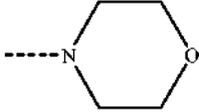
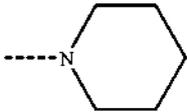
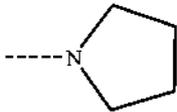
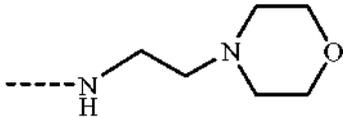
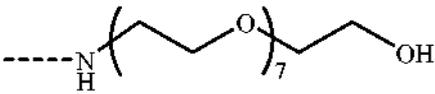
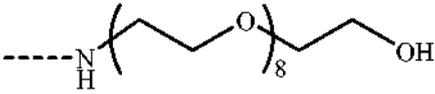
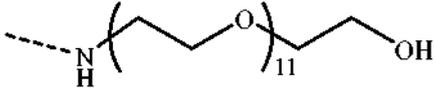
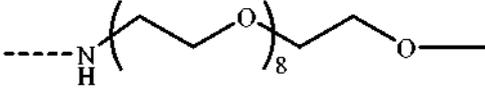
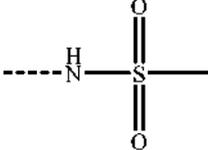
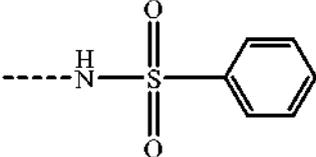
N.º	n	NR ² R ³
18	2	
19	3	
20	2	
21	3	
22	2	
23	3	
24	2	
25	3	
26	2	
27	3	
28	2	

N.º	n	NR ² R ³
29	3	
30	2	
31	3	
32	2	
33	3	
34	2	
35	3	
36	2	
37	3	
38	2	

N.º	n	NR ² R ³
39	3	
40	2	
41	3	
42	2	
43	3	
44	2	
45	3	
46	2	
47	3	

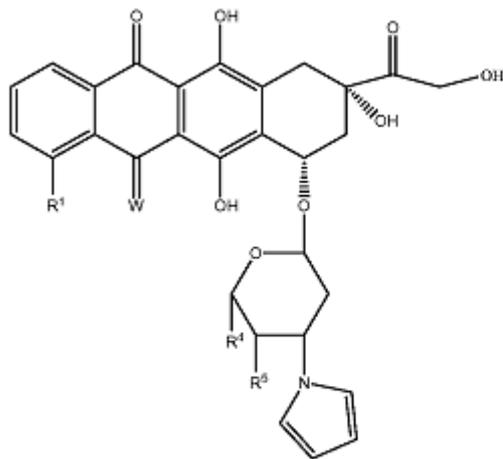
N.º	n	NR ² R ³
48	2	
49	3	
50	2	
51	3	
52	2	
53	3	
54	2	
55	3	
56	2	

N.º	n	NR ² R ³
57	3	
58	2	
59	3	
60	2	
61	3	
62	2	
63	3	
64	2	
65	3	
66	2	NH ₂
67	3	NH ₂
68	2	NHCH ₃
69	3	NHCH ₃
70	2	N(CH ₃) ₂
71	3	N(CH ₃) ₂

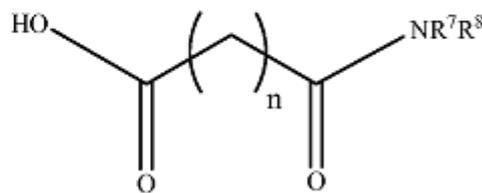
N.º	n	NR ² R ³
72	2	
73	3	
74	2	
75	2	
88	2	
90	2	
91	2	
92	2	
93	2	
94	2	
95	2	

- 77) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((4-(2-hidroxi)etil)piperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 78) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((3-(morfolin-1-il)propil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 5 79) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((4-metil)piperazin-1-il)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 80) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(4-etilpiperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 81) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((3-(4-metilpiperazin-1-il)propil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 10 82) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((piridin-4-il)metil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 83) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((piridin-3-il)metil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 15 84) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-2-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 77) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-3-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 20 77) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-4-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 77) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(3-(dimetilamino)propil)piperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 89) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 25 96) fosfato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona; y
- 99) clorhidrato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona.

30 Además en otro aspecto adicional, la presente solicitud se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I), que comprende:



Fórmula (II)



Fórmula (III)

35 hacer reaccionar un compuesto representado por la fórmula (II) con un compuesto representado por la fórmula (III) en presencia de un agente de condensación para obtener el compuesto representado por la fórmula (I), en la que:

40 los grupos representados por R^1 , W , R^4 , R^5 en el compuesto representado por la fórmula (II) son los mismos que los grupos representados por R^1 , W , R^4 , R^5 en el compuesto representado por la fórmula (I);

n en el compuesto representado por la fórmula (III) tiene los mismos significados que n en el compuesto representado por la fórmula (I); los grupos representados por R^7 y R^8 en el compuesto representado por la fórmula (III) son los mismos que los grupos representados por R^2 y R^3 en el compuesto representado por la fórmula (I), con la condición de que los grupos representados por R^7 y R^8 no comprendan NH o NH_2 ; cuando los

45 grupos representados por R^7 y R^8 comprenden NH o NH_2 , el compuesto representado por la fórmula (III) tiene un

grupo protector de amino en el extremo N-terminal, y está sometido a una reacción de desprotección para obtener el compuesto representado por la fórmula (I).

En algunas realizaciones, el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) comprende 5 adicionalmente la adición de un activador.

Los ejemplos de activadores a modo de ejemplo que se pueden usar en el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, N-hidroxisuccinimida (HOSu), 1-hidroxi-7-azobenzotriazol (HOAt), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N-hidroxiftalimida 10 (NHPI), N-hidroxi-1,8-naftalimida (NHNI), pentafluorofenol (PFPOH), hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de 6-clorobenzotriazol-1,1,3,3-tetrametiluronio (HCTU), hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio (HAPyU), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio (HBPYU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-succinimido-15 1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), sal de amonio cuaternario de tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (3H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-3-oxi)tri-1-pirrolidinil-fosfonio (PyAOP), cloruro de difenilfosfinilo (DPP-Cl), azida de difenil fosforilo (DPPA), cianodietilfosfato (DECP), cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinilo (BOP-Cl) y una mezcla de los 20 mismos.

Los ejemplos de agentes de condensación a modo de ejemplo que se pueden usar en el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, diciclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida 25 (EDCI), hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de 6-clorobenzotriazol-1,1,3,3-tetrametiluronio (HCTU), hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio (HAPyU), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio (HBPYU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), sal de amonio 30 cuaternario de tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (3H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-3-oxi)tri-1-pirrolidinilfosfonio (PyAOP), cloruro de difenilfosfinilo (DPP-Cl), azida de difenil fosforilo (DPPA), cianodietilfosfato (DECP), cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinilo (BOP-Cl) y una mezcla de los mismos. 35

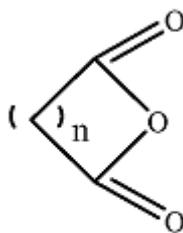
En algunas realizaciones, el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) comprende adicionalmente la adición de un catalizador.

Los ejemplos de catalizadores a modo de ejemplo que se pueden usar en el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, 4-dimetilaminopiridina, 4-pirrolidinilpiridina y una mezcla de los mismos. 40

Los ejemplos de grupos protectores de nitrógeno a modo de ejemplo que se pueden usar en el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo), Boc (*t*-butiloxicarbonilo), CBZ (carbобензоxi), Tr (tritilo) o Alloc (aliloxicarbonilo), Teoc (trimetilsililetoxicarbonilo), metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, Pht (ftaloilo), Tos (tosilo), Ns (*o/p*-nitrobenzenosulfonilo), Tfa (trifluoroacetilo), pivaloilo, benzilo, Trt (tritilo), Dmb (2,4-dimetoxibencilo), PMB (*p*-metoxibencilo), y Bn (bencilo). 45

Los ejemplos de reactivos de desprotección a modo de ejemplo que se pueden usar en el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, gas hidrógeno, NH₃, aminoetanol, dimetilamina, dietilamina, piperidina, piperazina, DBU, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico y una mezcla de los mismos. 50

En algunas realizaciones, el compuesto representado por la fórmula (III) en el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) se obtiene mediante una reacción de un compuesto representado por la fórmula (IV) con HNR⁷R⁸, 55



Fórmula (IV)

en la que:

- 5 n en el compuesto representado por la fórmula (IV) tiene los mismos significados que n en el compuesto representado por la fórmula (I); los grupos representados por R^2 y R^3 en HNR^2R^3 son los mismos que los grupos representados por R^2 y R^3 en el compuesto representado por la fórmula (I).

- 10 En algunas realizaciones, el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (III) comprende adicionalmente la adición de un compuesto alcalino.

Los ejemplos de compuestos alcalinos a modo de ejemplo que se pueden usar en el procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (III) de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, trietilamina, piridina, diisopropilamina, trimetilamina, N-metilpirrolidina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, N-etilpirrolidina, N-etilpiperidina, N-etilmorfolina y una mezcla de los mismos.

En otro aspecto más, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente solicitud se refiere a una formulación que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 En algunas realizaciones, la formulación que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable es una formulación para inyección.

Los ejemplos que se pueden usar a modo de ejemplo en la formulación de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, una inyección de polvo convencional, una inyección de polvo liofilizado, una hidroinyección, una emulsión, una solución y una suspensión.

En el presente documento también se describe un método para tratar y/o prevenir tumor y/o cáncer, que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable, o administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de tumores y/o cánceres a modo de ejemplo que se pueden tratar y/o prevenir con el método de acuerdo con la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, melanoma, cáncer de próstata, glioma cerebral, diversas leucemias, linfoma, y cáncer de médula ósea múltiple.

El compuesto y una sal del mismo de acuerdo con la presente solicitud poseen buena actividad anticáncer y/o antitumoral, y buena solubilidad y estabilidad en agua, así como buena tolerancia en cuerpos de animales. Por lo tanto, son propensos a su desarrollo como fármacos clínicos.

Ejemplos

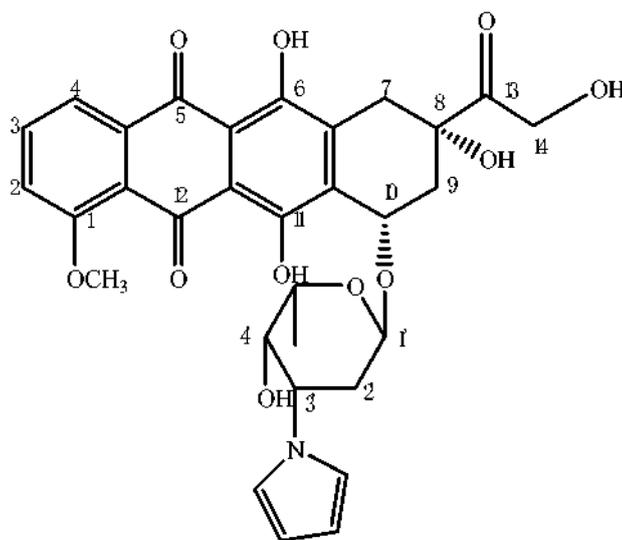
Aunque cualquier experto en la materia es capaz de preparar los compuestos de la presente solicitud de acuerdo con las técnicas generales desveladas anteriormente en el presente documento, en cualquier parte en la presente

memoria descriptiva por conveniencia se proporcionan detalles más específicos sobre técnicas de síntesis para el compuesto de la presente solicitud. Además, todos los reactivos y condiciones de reacción usados en síntesis son conocidos por los expertos en la materia y están disponibles a partir de fuentes comerciales habituales.

5 Abreviaturas

Su: succinimida; Bt: benzotrazol-1-ilo; At: 7-azobenzotrazol-1-ilo; Fmoc: fluorenilmetoxicarbonilo; Boc: *t*-butoxicarbonilo; CBZ: carbobenzoxi; Tr: trimetilfenilo; Alloc: aliloxicarbonilo; DBU: 1,8-diazaciclo[5.4.0]hendeceno-7; DIEA: diisopropiletilamina; DMAP: 4-dimetilaminopiridina; EDC·HCl: clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-
 10 etilcarbodiimida; HOAt: N-hidroxi-7-azobenzotriazol; DCC: dicitclohexilcarbodiimida; DIC: N,N-diisopropilcarbodiimida. NCI-H446: línea de células de cáncer de pulmón de células pequeñas humano; BxPC-3: línea de células de cáncer de pancreático humano; SK-OV-3: línea de células de cáncer de ovarios humanos; MDA-MB-453: línea de células de cáncer de mama humano; 22Rv1: línea de células de cáncer de próstata humano; A375: línea de células de melanoma cutáneo humano; A431: línea de células de carcinoma epidérmico humano; MCF-7: línea de células de
 15 cáncer de mama humano; NCI-446: línea de células de cáncer de pulmón de células pequeñas humano; NCI-H460: línea de células de cáncer de pulmón de células grandes humano; B16: línea de células de melanoma de ratón; 786-O: línea de células de adenocarcinoma de células transparentes de riñón humano; DU-145: línea de células de cáncer de próstata; Hep3B: línea de células de cáncer de hígado; SK-BR-3: línea de células de cáncer de mama humano; MTT: nitroazul de tetrazolio; 5A de McCoy: Medio 5A de McCoy; FBS: suero bovino fetal; PBS:
 20 tampón de fosfato, pH 7,4; EDTA: ácido etilendiamin tetraacético; DMSO: dimetilsulfóxido; RPMI-1640: Medio de RPMI-1640; SRB: sulforrodamina; TCA: ácido tricloroacético; ddH₂O: agua bidestilada; Tris: trihidroximetilaminometano; L15: Medio L-15 de Leibovitz; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolilidoxorrubicina-14-oxo-succínico.

25 Las numeraciones de los sustituyentes en la presente solicitud se indican como sigue a continuación.



PREPARACIÓN 1:

30

3'-PIRROLILDOXORRUBICIN 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-8-HIDROXIACETIL-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

A un matraz de tres bocas (1 l) se añadieron clorhidrato de doxorubicina (3,076 g), agua destilada (300 ml) y 1,2-
 35 dicloroetano (300 ml), 2,5-dimetoxitetrahidrofurano (30 ml) y ácido acético glacial (6 ml). La mezcla se calentó y se calentó a reflujo durante 45 min bajo la protección de gas argón hasta que la reacción se completó. La reacción se enfrió a la temperatura ambiente. La solución de reacción se vertió en agua enfriada con hielo (200 ml), y a continuación se dejó en reposo para su separación. La fase orgánica se lavó con solución salina saturada (200 ml) una vez, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó en rotavapor hasta sequedad. A la fase
 40 acuosa se añadió una solución acuosa de bicarbonato sódico al 5 % (100 ml) a la vez que se agitaba en un baño de hielo, y a continuación se extrajo con cloroformo (50 ml x 3). Las fases de cloroformo se combinaron y se lavaron con solución salina saturada (100 ml) una vez, se filtraron y se evaporaron en rotavapor para retirar el disolvente. El producto bruto resultante se combinó con el producto bruto tenido anteriormente. La mezcla resultante se purificó mediante cromatografía en columna, eluyendo con cloroformo: metanol = 35:1, para dar el producto (2,91 g).

45 MS: 592 (M-1)

PREPARACIÓN 2:

4-(4-NITROBENCIL)MORFOLINA

5 A un matraz de reacción se añadió bromuro de *p*-nitrobencilo (72,084 g). Se añadió diclorometano (470 ml, secado a través de tamiz molecular) para disolver el bromuro de *p*-nitrobencilo. Se añadió carbonato potásico anhidro (91,909 g). La mezcla se enfrió en un baño de hielo bajo la protección de gas argón. Después de 20 min, al matraz de reacción se añadió morfolina gota a gota (durante aproximadamente 30 min). Después de completar la adición, el baño de hielo se retiró. La mezcla resultante se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Después de
10 completar la reacción, se añadió agua (150 ml). El pH de la mezcla se ajustó a 4-5 con una solución acuosa de ácido cítrico al 5 % con agitación. Después de reposo para separar, la fase orgánica se lavó con agua (260 ml x 1), se secó sobre MgSO₄ anhidro durante media hora, y a continuación se filtró. El filtrado se concentró, y se secó a presión reducida mediante bomba de aceite, para dar el compuesto diana (71,9 g, rendimiento de un 97,16 %).

15 PREPARACIÓN 3:

4-(MORFOLINILMETIL)ANILINA

A un matraz de reacción se añadieron 4-(4-nitrobencil)morfolina (37,4 g) y etanol absoluto (520 ml). La mezcla se
20 agitó de forma mecánica, y a continuación se añadió ácido acético (34 ml). La mezcla resultante se calentó en un baño de aceite. La solución se volvió transparente a 40 °C. A ácido clorhídrico (HCl) 1 N (84 ml) se añadieron polvos de hierro (48,002 g), y se agitó durante 10 min, filtrado mediante succión. La torta de filtro se lavó con etanol absoluto, y a continuación se añadió en el matraz de reacción. La mezcla se calentó en un baño de aceite a reflujo, y se mantuvo a reflujo hasta que la reacción se completó (aproximadamente 3 h). Después de completar la reacción,
25 la solución de reacción se filtró mediante succión. El filtrado se concentró, y a continuación se disolvió en acetato de etilo (400 ml) y agua (400 ml). La mezcla se mezcló y a continuación se dejó en reposo para su separación. La fase orgánica se desechó. La fase acuosa se lavó con diclorometano (100 ml x 3). El pH se ajustó con sólidos de NaOH a 9. De la solución precipitaron grandes cantidades de sólidos de color marrón. Los sólidos se filtraron mediante succión. La torta de filtro se lavó con agua destilada (20 ml x 2) y a continuación se desechó. El pH del filtrado se
30 ajustó con hidróxido sódico (NaOH) a 13. La solución resultante se extrajo con diclorometano (100 ml x 2). La fase orgánica se concentró directamente para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 4:

35 ÁCIDO 5-(4-(MORFOLINILMETIL)FENILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

A un matraz de reacción se añadió 4-(morfolinilmetil)anilina (960 mg). Se añadió diclorometano (7,6 ml, secado a través de tamiz molecular) para disolver 4-(morfolinilmetil)anilina. La solución se agitó bajo la protección de gas argón. Al matraz de reacción se añadieron anhídrido glutárico (741 mg), DIEA (1,1 ml) y DMAP (62 mg). La mezcla
40 se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Después de completar la reacción, se añadieron diclorometano (50 ml) y agua destilada (30 ml). El pH de la mezcla resultante se ajustó con sólidos de NaOH a 13. La solución resultante se mezcló de nuevo de forma homogénea, y se dejó en reposo para su separación. El pH de la fase acuosa se ajustó a 3 con HCl. La solución se congeló para su secado. Los sólidos resultantes se lavaron con etanol absoluto (50 ml) y se filtraron. El filtrado resultante se concentró y se volvió a disolver en diclorometano. La
45 solución resultante se concentró de nuevo para retirar el etanol absoluto residual. El producto resultante se secó directamente a presión reducida para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 5:

50 N,N-DIMETIL(4-NITROFENIL)METILAMINA

A un matraz de reacción se añadieron bromuro de nitrobencilo (6,291 g) y diclorometano (50 ml). Se añadieron carbonato potásico anhidro (12,423 g) y clorhidrato de dimetilamina (4,891 g) sucesivamente al matraz de reacción. La mezcla se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Después de completar la reacción, la solución de
55 reacción se filtró mediante succión. La torta de filtro se lavó con diclorometano (10 ml). El filtrado se lavó tres veces con agua destilada (50 ml x 1, 30 ml x 2). La fase orgánica se concentró directamente y se secó a presión reducida mediante bomba de aceite para dar un aceite (4,553 g).

PREPARACIÓN 6:

60 4-((DIMETILAMINO)METIL)ANILINA

A un matraz de reacción se añadió N,N-dimetil(4-nitrofenil)metilamina (4,553 g). Se añadió etanol anhidro para disolver N,N-dimetil(4-nitrofenil)metilamina. Después de añadir ácido acético (5,2 ml), la mezcla se agitó de forma
65 mecánica. A HCl 1 N (40 ml) se añadieron polvos de hierro (11,339 g). Los polvos de hierro se sumergieron durante

10 min y se filtraron mediante succión. La torta de filtro se lavó con etanol absoluto y a continuación se añadió en el matraz de reacción. La mezcla se calentó en un baño de aceite a reflujo, y se mantuvo a reflujo hasta que la reacción se completó (aproximadamente 35 min). Después de completar la reacción, la solución de reacción se filtró mediante succión. La torta de filtro se lavó con etanol absoluto. El filtrado se concentró y a continuación se añadió en 5 agua destilada (100 ml). El pH de la mezcla se ajustó con NaOH a 14. Precipitó una gran cantidad de sólidos. Los sólidos se filtraron mediante succión. El filtrado se extrajo con diclorometano (100 ml x 1), y la fase acuosa se desechó. A la fase orgánica se añadió agua destilada (60 ml). El pH se ajustó a 2 con HCl 2 N. El producto resultante se mezcló y se dejó en reposo para su separación. La fase orgánica se desechó. El pH de la fase acuosa se ajustó a 7 con NaOH. La mezcla se extrajo con diclorometano (40 ml x 2) y la fase acuosa se desechó. La fase 10 orgánica se lavó con agua destilada (40 ml x 1) una vez y la fase acuosa se desechó. La fase orgánica se concentró directamente para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 7:

15 2-(2-HIDROXIETOXI)ETILCARBAMATO DE T-BUTILO

A un matraz de una sola boca se añadió 2-(2-aminoetoxi)etanol (10,500 g). Se añadió tetrahidrofurano (25 ml) para disolver el 2-(2-aminoetoxi)etanol. Se disolvió carbonato sódico anhidro (5,300 g) en agua destilada (30 ml). La solución se añadió en el matraz de una sola boca y se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió bicarbonato de di-*t*- 20 butilo (28,340 g) en tetrahidrofurano (70 ml). La solución resultante se añadió gota a gota lentamente en el sistema de reacción (durante aproximadamente 1 h). Después de la adición, la mezcla se agitó durante 1,5 h. Después de completar la reacción, la solución de reacción se filtró mediante succión. La torta de filtro se lavó con tetrahidrofurano dos veces y a continuación se desechó. El filtrado se concentró, a continuación se disolvió en acetato de etilo (150 ml) y agua destilada (100 ml). La solución se mezcló y a continuación se dejó en reposo para su separación. La 25 fase acuosa se lavó de nuevo con acetato de etilo (100 ml x 2) dos veces. Todas las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 8:

30 4-METILBENCENOSULFONATO DE 2-(2-T-BUTOXICARBONILAMINO)ETOXI)ETILO

A un matraz de una sola boca (250 ml) se añadieron 2-(2-hidroxi)etilcarbamato de *t*-butilo (20,5 g) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (28,575 g). Se añadió tetrahidrofurano (50 ml) para disolver la mezcla. La solución resultante se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió hidróxido sódico (8,000 g) en agua destilada (32 g). La solución se añadió 35 gota a gota en el matraz de reacción. La mezcla se agitó durante una noche. Después de completar la reacción, la solución de reacción se concentró (para retirar el tetrahidrofurano). Al producto resultante se añadieron acetato de etilo (150 ml) y agua destilada (100 ml). La solución se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado una vez, se secó sobre MgSO₄ durante 30 min, se filtró y se concentró para dar un aceite. Después de reposar durante una noche, precipitaron unos sólidos. Los sólidos se 40 filtraron mediante succión. La torta de filtro se eluyó con acetato de etilo dos veces para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 9:

45 2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETILCARBAMATO DE T-BUTILO

A un matraz de reacción se añadió clorhidrato de dimetilamina (30,922 g). Se añadió agua destilada (50 ml) se añadió para disolver el clorhidrato de dimetilamina. La mezcla se enfrió en un baño de hielo. Al matraz de reacción se añadió una solución acuosa de hidróxido sódico al 20 % (76,885 g). Después de agitar durante 20 min, se disolvió 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-*t*-butoxicarbonilamino)etoxi)etilo (13,621 g) en etanol absoluto (50 ml) y 50 tetrahidrofurano (30 ml). Al matraz de reacción se añadió la solución resultante. La mezcla reacciona durante una noche. El matraz de reacción se desplazó hasta un baño de aceite a 40 °C. La mezcla se agitó durante 2,5 h. Después de completar la reacción, el disolvente orgánico se retiró mediante concentración. El producto en bruto se extrajo con acetato de etilo (150 ml x 1) una vez. El pH de la fase acuosa se ajustó con NaOH a 9. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1) una vez. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ 55 durante 30 min, a continuación se filtraron y se concentraron para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 10:

60 2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETILAMINA

En un matraz de reacción se disolvió 2-(2-(dimetilamino)etoxi)etilcarbamato de *t*-butilo se disolvió en diclorometano (70 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo bajo la protección de gas argón. Al matraz de reacción se añadió ácido trifluoroacético gota a gota (17 ml). La mezcla reaccionó durante una noche. Después de completar la reacción, la solución de reacción se extrajo con agua destilada (100 ml) una vez. La fase orgánica se desechó. El pH 65 de la fase acuosa se ajustó a 13 con NaOH. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (150 ml x 3) tres veces. La

fase orgánica resultante se concentró directamente para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 11:

5 DI(2-HIDROXIETIL)CARBAMATO DE T-BUTILO

A un matraz de reacción se añadió dihidroxiethylamina (31,5 g). Se añadieron tetrahydrofurano (50 ml) y agua destilada (50 ml) para disolver la dihidroxiethylamina. Se disolvió bicarbonato de di-*t*-butilo (85,0 g) en tetrahydrofurano (80 ml). La solución resultante se añadió gota a gota en el matraz de reacción en un baño de hielo (durante aproximadamente 2 h). Después de completar la adición, la mezcla se agitó hasta que la reacción se completó (durante aproximadamente 1,5 h). La solución de reacción se concentró, a continuación se disolvió en diclorometano (200 ml) y agua destilada (150 ml), se mezcló y se dejó en reposo para su separación. La fase acuosa se extrajo con diclorometano (100 ml x 4) cuatro veces. Todas las fases orgánicas se combinaron y se concentraron para su uso directamente en la siguiente reacción.

15

PREPARACIÓN 12:

DI(2-P-TOLUENOSULFONATOETIL)CARBAMATO DE T-BUTILO

20 A un matraz de reacción se añadieron di(2-hidroxiethyl)carbamato de *t*-butilo (61,5 g) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (137,2 g). Se añadió tetrahydrofurano (200 ml) para disolver el di(2-hidroxiethyl)carbamato de *t*-butilo y cloruro de *p*-toluenosulfonilo. La solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió una solución acuosa de hidróxido sódico al 20 % (216 g) gota a gota en el matraz de reacción (durante aproximadamente 70 min). La mezcla resultante se agitó durante una noche en un baño de hielo. Después de completar la reacción, el pH de la solución de reacción se ajustó a 13 con una solución acuosa de NaOH al 20 %. La solución se agitó durante 2 h en un baño de aceite a 40 °C. La solución de reacción se concentró. Se añadió diclorometano (250 ml) para disolver la solución de reacción concentrada. La solución resultante se lavó con agua destilada (100 ml) una vez. La fase orgánica se concentró directamente para dar el compuesto diana en bruto.

30 PREPARACIÓN 13:

DI(2-(DIMETILAMINO)ETIL)CARBAMATO DE T-BUTILO

A un matraz de reacción se añadió clorhidrato de dimetilamina (116,1 g). Se añadió agua destilada (60 ml) para disolver el clorhidrato de dimetilamina. La solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió una solución acuosa de hidróxido sódico al 20 % (284,8 g) en el matraz de reacción (durante aproximadamente 70 min). Después de completar la adición, la mezcla se agitó durante 20 min. El di(2-*p*-toluenosulfonatoetil)carbamato de *t*-butilo (73,2 g) se disolvió en tetrahydrofurano (200 ml). La mezcla resultante se añadió al matraz de reacción y se agitó en un baño de aceite a 40 °C hasta que la reacción se completó. La solución de reacción se concentró y se lavó con acetato de etilo (250 ml) una vez. La fase orgánica se extrajo de nuevo con agua destilada (150 ml x 2) dos veces. Todas las fases acuosas se combinaron. El pH de la fase acuosa se ajustó a 14 con NaOH. La solución resultante se extrajo con diclorometano (200 ml x 1, 150 ml x 6) siete veces. Las siete fracciones de diclorometano se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ anhidro durante 30 min, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna (el disolvente de desarrollo fue CHCl₃:CH₃OH = 15:1) para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 14:

DI(2-(DIMETILAMINO)ETIL)AMINA

50

A un matraz de reacción se añadieron di(2-(dimetilamino)ethyl)carbamato de *t*-butilo (3,000 g) y tetrahydrofurano (20 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo. Al matraz de reacción se añadió gota a gota ácido clorhídrico concentrado (9,6 ml) (durante aproximadamente 15 min). La mezcla se agitó en un baño de hielo hasta que la reacción se completó. Después de concentrar la solución de reacción para retirar el tetrahydrofurano, la solución resultante se lavó con diclorometano (50 ml) una vez. La fase orgánica se desechó. El pH de la fase acuosa se ajustó a 10 con K₂CO₃. La solución acuosa se extrajo con diclorometano (50 ml x 4) cuatro veces. Las cuatro fracciones de diclorometano se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ anhidro durante 30 min, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto diana.

60 PREPARACIÓN 15:

2-(2-(2-(2-T-BUTOXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETANOL

A un matraz de reacción que se protegió previamente con gas argón se añadieron tetraetilenglicol (191,2 ml) y DIEA (300 ml). Se añadió diclorometano (80 ml, secado a través de tamices moleculares) al matraz de reacción. La

mezcla se disolvió con agitación a la temperatura ambiente, y a continuación se enfrió en un baño de hielo. El trifenilclorometano (205,9 g) se disolvió en diclorometano (400 ml, secado a través de tamices moleculares) (durante aproximadamente 4 h). La mezcla resultante se añadió al matraz de reacción y reaccionó durante una noche. Después de completar la reacción, la solución de reacción se lavó sucesivamente con una solución acuosa de ácido cítrico al 5 % (500 ml x 4) cuatro veces y con una solución acuosa de NaCl (250 ml x 1) una vez, se secó sobre MgSO₄ anhidro durante 30 min, se filtró y se concentró para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 16:

10 4-METILBENCENOSULFONATO DE 2-(2-(2-(2-T-BUTOXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILO

A un matraz de reacción se añadieron 2-(2-(2-(2-t-butoxi)etoxi)etoxi)etanol (347,5 g) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (227,7 g). Se añadió tetrahidrofurano (200 ml) para disolver el 2-(2-(2-(2-t-butoxi)etoxi)etoxi)etanol y cloruro de *p*-toluenosulfonilo. Al matraz de reacción se añadió una solución acuosa de hidróxido sódico al 20 % (318,8 g) en un baño de hielo (durante aproximadamente 2 h). La mezcla reaccionó durante una noche. Después de completar la reacción, la solución de reacción se concentró para retirar el tetrahidrofurano. Al producto en bruto resultante se añadieron acetato de etilo (300 ml) y agua destilada (50 ml). La solución se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl (200 ml) una vez, se secó sobre MgSO₄ anhidro durante 30 min, se filtró y se concentró para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 17:

2-(2-(2-(2-T-BUTOXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETIL)ISOINDOL-1,3-DIONA

A un matraz de reacción se añadieron 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-(2-t-butoxi)etoxi)etoxi)etilo (373,7 g) y ftalimida de potasio (175,7 g). Se añadió DMF (350 ml, secado sobre tamices moleculares) para disolver la mezcla. La solución resultante se calentó y se mantuvo a 65 °C en un baño de aceite hasta que la reacción se completó (durante aproximadamente 8 h). Después de concentrar la solución de reacción, se añadieron acetato de etilo (250 ml) y agua destilada (200 ml). La solución resultante se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl (150 ml) una vez, se secó sobre MgSO₄ anhidro durante 30 min, se filtró y se concentró para dar un producto en bruto. El producto en bruto se recristalizó a partir de etanol anhidro para dar el compuesto diana.

35 PREPARACIÓN 18:

2-(2-(2-(2-T-BUTOXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINA

A un matraz de reacción se añadió 2-(2-(2-(2-t-butoxi)etoxi)etoxi)etil)isoindol-1,3-diona (193,515 g). Se añadieron tetrahidrofurano (350 ml) se añadió para disolver el 2-(2-(2-(2-t-butoxi)etoxi)etoxi)etil)isoindol-1,3-diona. Después de añadir una solución acuosa de metilamina al 25 % (127,410 g), la solución resultante se hizo transparente mediante agitación mecánica a la temperatura ambiente. La mezcla reaccionó durante una noche. Después de la reacción se agitó durante 30 min en un baño de aceite a 40 °C, la solución de reacción se concentró para dar sólidos de color blanco. Estos sólidos se disolvieron en acetato de etilo (300 ml) y agua destilada (250 ml). El producto resultante se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl (200 ml) una vez, se secó sobre MgSO₄ anhidro durante 30 min, se filtró y se concentró para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 19:

50 CLORHIDRATO DE 2-(2-(2-(2-AMINOETOXI)ETOXI)ETOXI)ETANOL

A un matraz de reacción se añadió ácido clorhídrico concentrado (100,5 ml). El matraz se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió 2-(2-(2-(2-t-butoxi)etoxi)etoxi)etilamina (123,7 g) en tetrahidrofurano (170 ml) (durante aproximadamente 2 h). La mezcla resultante se añadió gota a gota al matraz de reacción y reaccionó durante una noche. Después de completar la reacción, la solución de reacción se concentró para retirar el tetrahidrofurano. El producto en bruto resultante se disolvió en cloroformo (150 ml) y agua destilada (100 ml). La solución resultante se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase acuosa se concentró directamente para dar el compuesto diana.

60 PREPARACIÓN 20:

2-(2-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILCARBAMATO DE T-BUTILO

A un matraz de reacción se añadió clorhidrato de 2-(2-(2-(2-amino)etoxi)etoxi)etanol (41,6 g). Se añadió agua destilada (80 ml) para disolver el clorhidrato de 2-(2-(2-(2-amino)etoxi)etoxi)etanol. La solución se enfrió en un

baño de hielo. Se disolvió carbonato sódico anhidro (38,414 g) en agua destilada (200 ml) (durante aproximadamente 1 h). La mezcla se añadió gota a gota al matraz de reacción. Se disolvió bicarbonato de di-*t*-butilo (51,370 g) en tetrahidrofurano (120 ml). La mezcla se añadió gota a gota (durante aproximadamente 160 min) al matraz de reacción. La mezcla resultante reaccionó durante una noche. Después de completar la reacción, la solución de reacción se concentró y después se extrajo con acetato de etilo (150 ml) una vez, se extrajo con diclorometano (150 ml) una vez. Se combinaron dos fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro durante 30 min, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto diana.

PREPARACIÓN 21:

10

2-(2-(2-(2-(P-METILFENOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETIL CARBAMATO DE T-BUTILO

A un matraz de reacción se añadió 2-(2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etoxi)etilcarbamato de *t*-butilo (14,650 g). Se añadió tetrahidrofurano (75 ml) para disolver el 2-(2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etoxi)etilcarbamato de *t*-butilo. Al matraz de reacción se añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo (11,439 g). La mezcla se enfrió en un baño de hielo. Al matraz de reacción se añadió gota a gota una solución acuosa de hidróxido sódico al 20 % (18,684 g) (durante aproximadamente 15 min). El baño de hielo se retiró cuando la adición se completó. La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente hasta que la reacción se completó (durante aproximadamente 5 h). Al matraz de reacción se añadió de nuevo una solución acuosa de hidróxido sódico al 20 % (8,715 g). La mezcla se agitó durante 2 h en un baño de aceite a 40 °C. La solución resultante se usó directamente en la siguiente reacción.

PREPARACIÓN 22:

25

2-(2-(2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILCARBAMATO DE T-BUTILO

A un matraz de reacción se añadió clorhidrato de dimetilamina (40,766 g). Se añadió agua destilada (60 ml) para disolver el clorhidrato de dimetilamina. La solución se enfrió en un baño de hielo. Al matraz de reacción se añadió una solución acuosa de hidróxido sódico al 20 % (101,464 g). Al matraz de reacción se añadió la solución obtenida en la Preparación 22. La mezcla se agitó en un baño de aceite a 40 °C hasta que la reacción se completó. Después de concentrar la solución de reacción para retirar el tetrahidrofurano, se añadió diclorometano (200 ml). La mezcla se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase acuosa se desechó. La fase orgánica se añadió en agua destilada (100 ml). El pH de la mezcla se ajustó a 3 con HCl 2 N. La solución se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase acuosa se concentró directamente para dar el compuesto diana.

35

PREPARACIÓN 23:

CLORHIDRATO DE 2-(2-(2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINA

A un matraz de reacción se añadió 2-(2-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilcarbamato de *t*-butilo (8,629 g). Se añadió tetrahidrofurano para disolver el 2-(2-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilcarbamato de *t*-butilo. La solución resultante se enfrió en un baño de hielo. Al matraz de reacción se añadió ácido clorhídrico concentrado (20 ml) (durante 20 min). Después de completar la reacción, la solución de reacción se concentró para retirar el tetrahidrofurano, y se añadieron agua destilada (50 ml) y diclorometano (50 ml). La mezcla resultante se mezcló de forma homogénea y se dejó en reposo para su separación. La fase acuosa se concentró directamente para dar el compuesto diana.

Los compuestos diana en la Preparación 24 a 104 se prepararon de acuerdo con el procedimiento de preparación en la Preparación 4.

50

PREPARACIÓN 24:

ÁCIDO 4-(4-(METILSULFONIL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

55 PREPARACIÓN 25:

ÁCIDO 4-(4-(FENILSULFONIL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 26:

60

ÁCIDO 4-(4-(MORFOLINILMETIL)FENILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 27:

65 ÁCIDO 4-(4-((DIMETILAMINO)METIL)FENILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 28:

ÁCIDO 5-(4-((DIMETILAMINO)METIL)FENILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

5 PREPARACIÓN 29:

ÁCIDO 4-(2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 30:

10

ÁCIDO 5-(2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 31:

15 ÁCIDO 4-(4-(HIDROXIETIL)PIPERAZIN-1-IL)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 32:

ÁCIDO 5-(4-(HIDROXIETIL)PIPERAZIN-1-IL)-5-OXOPENTANOICO

20

PREPARACIÓN 33:

ÁCIDO 4-((MORFOLIN-1-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

25 PREPARACIÓN 34:

ÁCIDO 5-((MORFOLIN-1-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 35:

30

ÁCIDO 4-(3-(MORFOLIN-1-IL)PROPILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 36:

35 ÁCIDO 5-(3-(MORFOLIN-1-IL)PROPILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 37:

ÁCIDO 4-((4-METILPIPERAZIN-1-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

40

PREPARACIÓN 38:

ÁCIDO 5-((4-METILPIPERAZIN-1-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

45 PREPARACIÓN 39:

ÁCIDO 4-(2-(TETRAHIDROPIRROL-1-IL)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 40:

50

ÁCIDO 5-(2-(TETRAHIDROPIRROL-1-IL)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 41:

ÁCIDO 4-(3-(TETRAHIDROPIRROL-1-IL)PROPILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

55

PREPARACIÓN 42:

ÁCIDO 5-(3-(TETRAHIDROPIRROL-1-IL)PROPILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

60 PREPARACIÓN 43:

ÁCIDO 4-((6-(MORFOLIN-1-IL)PIRIDIN-3-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 44:

65

ÁCIDO 5-((6-(MORFOLIN-1-IL)PIRIDIN-3-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 45:

5 ÁCIDO 4-((PIRIDIN-4-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 46:

ÁCIDO 5-((PIRIDIN-4-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

10

PREPARACIÓN 47:

ÁCIDO 4-((PIRIDIN-3-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

15 PREPARACIÓN 48:

ÁCIDO 4-((PIRIDIN-3-IL)AMINO)-4-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 49:

20

ÁCIDO 4-((PIRIDIN-4-IL)METILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 50:

25 ÁCIDO 5-((PIRIDIN-4-IL)METILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 51:

ÁCIDO 4-((PIRIDIN-3-IL)METILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

30

PREPARACIÓN 52:

ÁCIDO 5-((PIRIDIN-3-IL)METILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

35 PREPARACIÓN 53: ÁCIDO 4-((PIRIDIN-2-IL)METILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 54:

ÁCIDO 5-((PIRIDIN-2-IL)METILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

40

PREPARACIÓN 55:

ÁCIDO 4-(2-(PIRIDIN-4-IL)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

45 PREPARACIÓN 56:

ÁCIDO 5-(2-(PIRIDIN-4-IL)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 57:

50 ÁCIDO 4-(2-(PIRIDIN-2-IL)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 58:

ÁCIDO 5-(2-(PIRIDIN-2-IL)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

55

PREPARACIÓN 59:

ÁCIDO 4-(2-(PIRIDIN-3-IL)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

60 PREPARACIÓN 60:

ÁCIDO 5-(2-(PIRIDIN-3-IL)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 61:

65

ÁCIDO 4-(2-(4-(AMINOSULFONIL)FENIL)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 62:

5 ÁCIDO 5-(2-(4-(AMINOSULFONIL)FENIL)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 63:

ÁCIDO 4-(4-ETILPIPERAZIN-1-IL)-4-OXOBUTANOICO

10

PREPARACIÓN 64:

ÁCIDO 5-(4-ETILPIPERAZIN-1-IL)-5-OXOPENTANOICO

15 PREPARACIÓN 65:

ÁCIDO 4-(PURINAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 66:

20

ÁCIDO 5-(PURINAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 67:

25 ÁCIDO 4-(4-(3-(DIMETILAMINO)PROPIL)PIPERAZIN-1-IL)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 68:

ÁCIDO 5-(4-(3-(DIMETILAMINO)PROPIL)PIPERAZIN-1-IL)-5-OXOPENTANOICO

30

PREPARACIÓN 69:

ÁCIDO 4-(3-(4-METILPIPERAZIN-1-IL)PROPILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

35 PREPARACIÓN 70:

ÁCIDO 5-(3-(4-METILPIPERAZIN-1-IL)PROPILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 71:

40

ÁCIDO 4-(2-(DIMETILAMINO)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 72:

45 ÁCIDO 5-(2-(DIMETILAMINO)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 73:

ÁCIDO 4-(DI(2-(DIMETILAMINO)ETIL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

50

PREPARACIÓN 74:

ÁCIDO 5-(DI(2-(DIMETILAMINO)ETIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 75:

55

ÁCIDO 4-(2-(2-(2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 76:

60 ÁCIDO 5-(2-(2-(2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 77:

ÁCIDO 4-((PIRAZIN-2-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

65

PREPARACIÓN 78:

ÁCIDO 5-((PIRAZIN-2-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

5 PREPARACIÓN 79:

ÁCIDO 4-((PIRIDIN-2-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 80:

10

ÁCIDO 5-((PIRIDIN-2-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 81:

15 ÁCIDO 4-((PIRIMIDIN-2-IL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 82:

ÁCIDO 5-((PIRIMIDIN-2-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

20

PREPARACIÓN 83:

ÁCIDO 4-(2-HIDROXIETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

25 PREPARACIÓN 84:

ÁCIDO 5-(2-HIDROXIETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 85:

30

ÁCIDO 4-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 86:

35 ÁCIDO 5-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETILAMINO)-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 87:

ÁCIDO 4-(DI(2-(HIDROXI)ETIL)AMINO)-4-OXOBUTANOICO

40

PREPARACIÓN 88:

ÁCIDO 5-(DI(2-(HIDROXI)ETIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

45 PREPARACIÓN 89: ÁCIDO 4-AMINO-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 90: ÁCIDO 5-AMINO-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 91:

50 ÁCIDO 4-METILAMINO-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 92:

ÁCIDO 5-METILAMINO-5-OXOPENTANOICO

55

PREPARACIÓN 93:

ÁCIDO 4-DIMETILAMINO-4-OXOBUTANOICO

60 PREPARACIÓN 94:

ÁCIDO 5-DIMETILAMINO-5-OXOPENTANOICO

PREPARACIÓN 95:

65

ÁCIDO 4-(MORFOLIN-1-IL)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 96: ÁCIDO 5-(MORFOLIN-1-IL)-5-OXOPENTANOICO

5 PREPARACIÓN 97:

ÁCIDO 4-(PIPERIDIN-1-IL)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 98:

10

ÁCIDO 4-(TETRAHIDROPIRROL-1-IL)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 99:

15 ÁCIDO 4-(2-(MORFOLIN-1-IL)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 100:

ÁCIDO 4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)

20

ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 101:

25 ÁCIDO 4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 102:

30 ÁCIDO 4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 103:

35 ÁCIDO 4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(METOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

PREPARACIÓN 104:

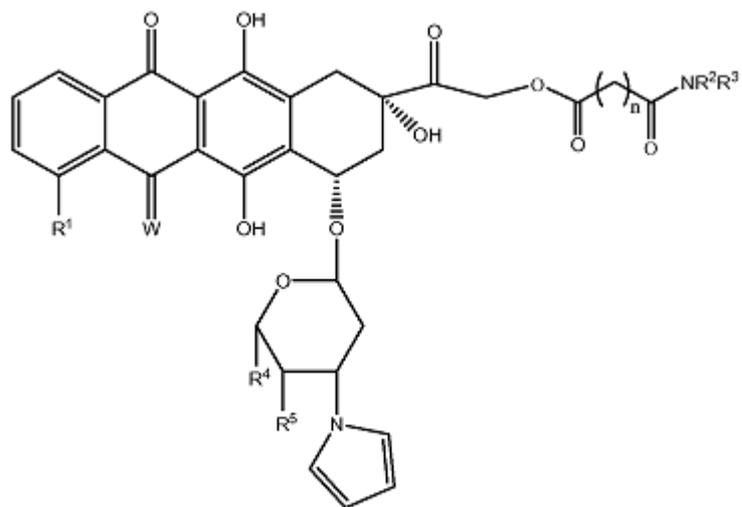
40 ÁCIDO 4-(2-(2-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXOBUTANOICO

EJEMPLO 1:

10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-
 45 TRIHIDROXI 13-OXO-14-(4-(2-(2-(2-(2-HIDROXIETOXI)ETOXI)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI
 5,12-NAFTALENODIONA

A un matraz de reacción se añadió el compuesto (99 mg) obtenido en la Preparación 1. Se añadió diclorometano (5 ml, secado a través de tamices moleculares) para disolver el compuesto. A la solución resultante se añadieron el
 50 compuesto (82 mg) obtenido en la Preparación 104 y DMAP (8 mg). La mezcla se agitó bajo la protección de gas argón. Se añadió EDC·HCl (50 mg). La mezcla reaccionó durante una noche a la temperatura ambiente. Después de completar la reacción, la solución de reacción se concentró y a continuación se purificó directamente mediante cromatografía en capa fina (el disolvente de desarrollo fue cloroformo (CHCl₃): metanol (CH₃OH) = 95: 5,5 ml, añadiendo una gota de ácido acético glacial), para dar el compuesto diana.
 55 MS: 867,1 (M-1).

Los compuestos enumerados en la Tabla 1 se prepararon de acuerdo con el procedimiento de preparación en el Ejemplo 1, en el que la línea discontinua en los sustituyentes representaba el enlace de unión.

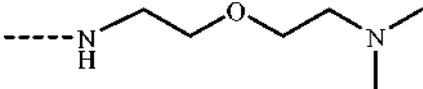
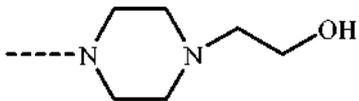
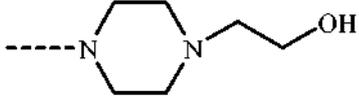
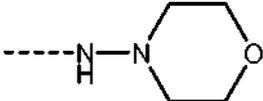
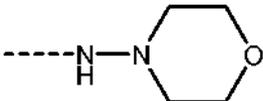
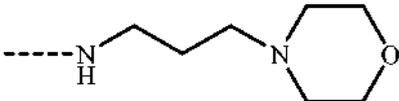
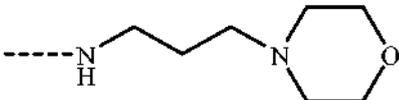
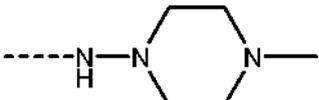
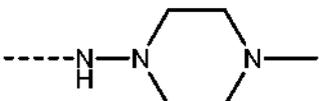
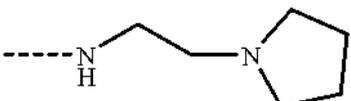
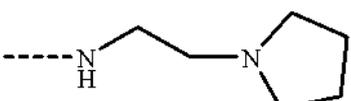
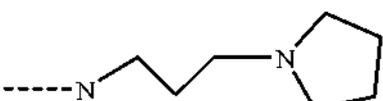


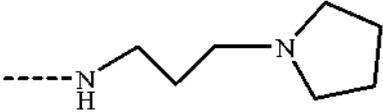
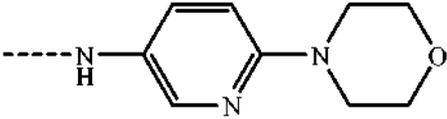
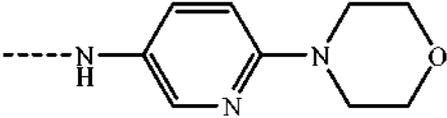
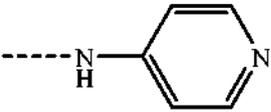
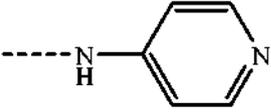
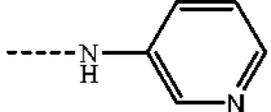
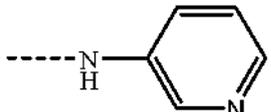
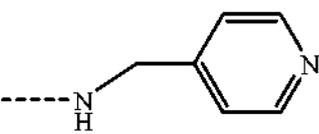
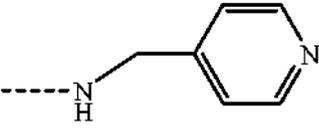
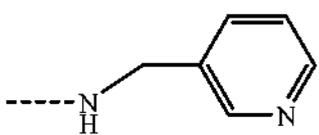
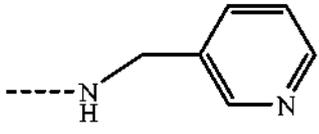
Fórmula (I)

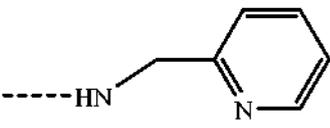
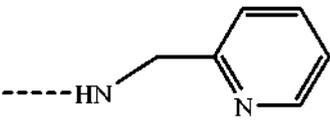
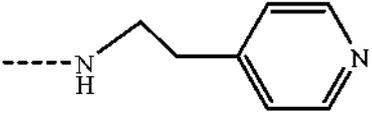
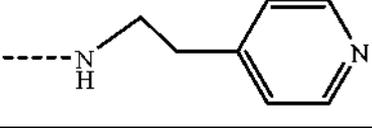
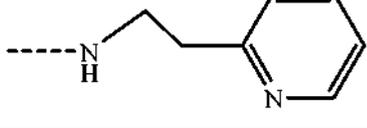
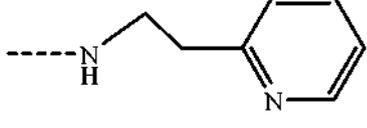
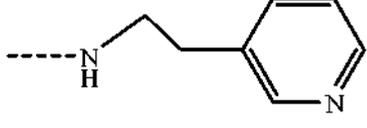
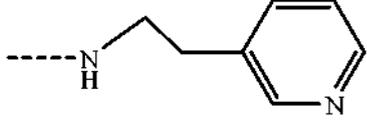
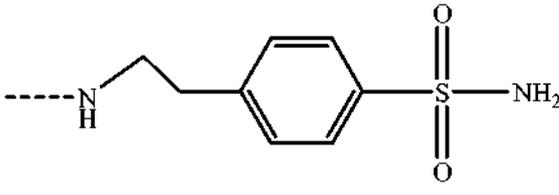
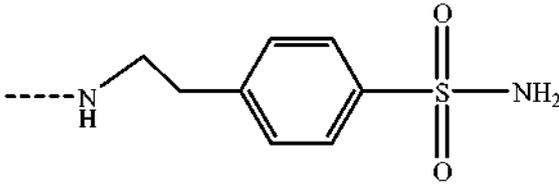
Tabla 1

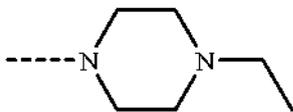
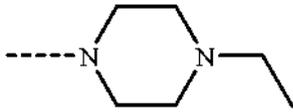
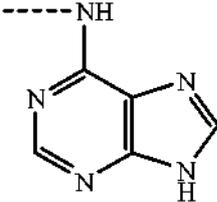
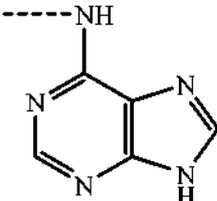
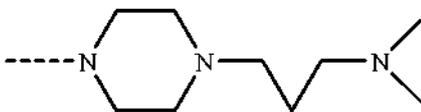
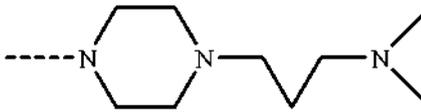
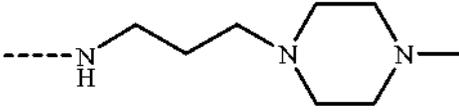
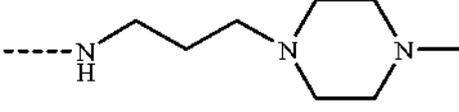
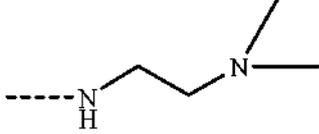
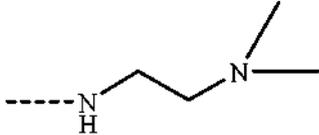
Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
2	2		MS: 868,1 (M+1)
3	3		MS: 882,3 (M+1)
4	2		MS ⁺ 825,9
5	3		MS: 840,3 (M+1)
6	2		MS ⁻ 806,2 (M-1) MS ⁺ 808,3 (M+1)

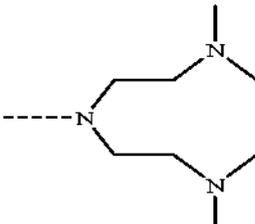
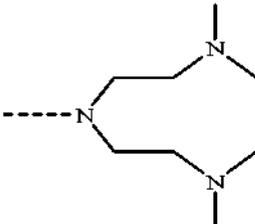
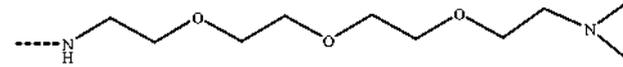
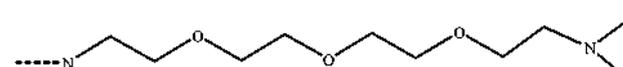
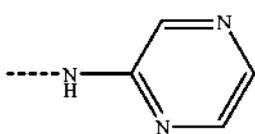
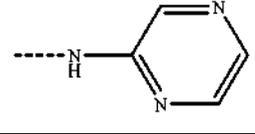
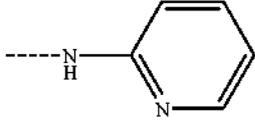
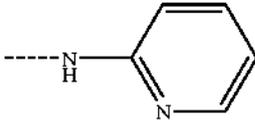
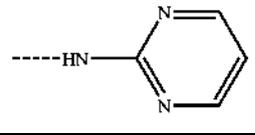
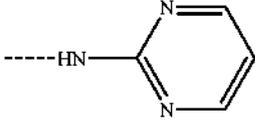
ES 2 633 359 T3

Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
7	3		MS ⁺ 822,3 (M+1)
8	2		MS ⁺ 806,1 (M+1)
9	3		MS ⁺ 820,1 (M+1)
10	2		MS ⁻ : 775,8 (M-1)
11	3		MS ⁺ : 791,2 (M+1)
12	2		MS ⁺ : 820,4 (M+1) MS ⁻ : 818,6 (M-1)
13	3		MS ⁺ : 834,8 (M+1)
14	2		MS ⁻ : 788,9 (M-1)
15	3		MS ⁺ : 805,8 (M+1)
16	2		MS ⁺ 790,3 (M+1)
17	3		MS ⁺ 804,4 (M+1)
18	2		MS ⁺ : 804,1 (M+1)

Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
19	3		MS ⁺ : 817,2 (M+1)
20	2		MS ⁻ : 853,3 (M-1) MS ⁺ : 855,4 (M+1)
21	3		MS ⁺ : 869,3 (M+1)
22	2		MS ⁺ : 770,0 (M+1) MS ⁻ : 767,7 (M-1)
23	3		MS ⁺ : 784,7 (M+1)
24	2		MS ⁺ : 770,1 (M+1)
25	3		MS ⁺ : 784,6 (M+1)
26	2		MS ⁺ : 784,0 (M+1)
27	3		MS ⁺ : 798,2 (M+1)
28	2		MS ⁺ : 783,9 (M+1) MS ⁻ : 781,8 (M-1)
29	3		MS ⁺ : 798,9 (M+1)

Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
30	2		MS ⁺ : 784,1 (M+1)
31	3		MS ⁺ : 798,1 (M+1)
32	2		MS ⁺ : 798,0 (M+1)
33	3		MS ⁺ : 812,1 (M+1)
34	2		MS ⁺ : 798,0 (M+1)
35	3		MS ⁺ : 812,3 (M+1)
36	2		MS ⁺ : 798,0 (M+1)
37	3		MS ⁺ : 812,1 (M+1)
38	2		MS ⁻ : 873,7 (M-1)
39	3		MS ⁻ : 888,1 (M-1)

Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
40	2		MS ⁺ : 790,1 (M+1)
41	3		MS ⁺ : 804,3 (M+1)
42	2		MS ⁺ : 811,0 (M+1) MS ⁻ : 809,2 (M-1)
43	3		MS ⁺ : 825,4 (M+1)
44	2		MS ⁺ : 847,1 (M+1) MS ⁻ : 845,0 (M-1)
45	3		MS ⁺ : 860,3 (M+1)
46	2		MS ⁺ : 833,1 (M+1)
47	3		MS ⁺ : 847,2 (M+1)
48	2		MS ⁺ : 764,1 (M+1)
49	3		MS ⁺ : 778,1 (M+1)

Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
50	2		MS ⁺ : 835,2 (M+1)
51	3		MS ⁺ : 849,2 (M+1)
52	2		MS ⁺ 896,1 (M+1)
53	3		MS ⁺ 909,8 (M+1)
54	2		MS ⁺ 771,2 (M+1)
55	3		MS ⁺ 784,1 (M+1)
56	2		MS ⁺ 770,1 (M+1)
57	3		MS ⁺ 784,1 (M+1)
58	2		MS ⁺ 770,1 (M+1)
59	3		MS ⁺ 784,1 (M+1)

ES 2 633 359 T3

Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
60	2		MS ⁻ : 735,2 (M-1) MS ⁺ : 759,3 (M+Na ⁺)
61	3		MS ⁻ : 750,7 (M-1)
62	2		MS ⁺ : 803,3 (M+Na ⁺)
63	3		MS ⁻ : 793,6 (M-1)
64	2		MS ⁺ : 803,2 (M+Na ⁺) MS ⁻ : 779,2 (M-1)
65	3		MS ⁺ : 795,2 (M+1)
66	2	NH ₂	MS ⁺ : 693,1 (M+1)
67	3	NH ₂	MS ⁺ : 707,2 (M+1)
68	2	NHCH ₃	MS ⁻ : 705,6 (M-1)
69	3	NHCH ₃	MS ⁺ : 721,1 (M+1)
70	2	N(CH ₃) ₂	MS ⁺ : 721,1 (M+1)
71	3	N(CH ₃) ₂	MS ⁺ : 735,6 (M+1)
72	2		MS ⁺ : 763,2 (M+1)
73	3		MS ⁺ : 777,1 (M+1)
74	2		MS ⁺ : 761,3 (M+1)

Ejemplos	n	NR ² R ³	Espectros de Masas (MS)
75	2		MS ⁺ : 746,9 (M+1)
88	2		MS ⁺ : 806,2 (M+1)
90	2		
91	2		
92	2		
93	2		
94	2		MS ⁺ : 771 (M+1)
95	2		MS ⁺ : 833 (M+1)
97	3		
98	2		

Los datos de los espectros de RMN ¹H del compuesto en el Ejemplo 28 fueron:

- 5 δ = 1,145 ppm (d, 3H), δ = 1,664 ppm (m, 1H), δ = 2,110 ppm (m, 1H),
 δ = 2,336 ppm (d, 1H), δ = 2,415 ppm (m, 1H), δ = 2,505 ppm (m, 2H),
 δ = 2,675 ppm (t, 2H), δ = 2,917 ppm (d, 1H), δ = 3,008 ppm (d, 1H),
 δ = 3,546 ppm (s, 1H), δ = 3,943 ppm (s, 4H), δ = 4,303 ppm (m, 5H),
 δ = 4,982 ppm (s, 1H), δ = 5,189 ppm (d, 1H), δ = 5,253 ppm (d, 1H),

$\delta = 5,349$ ppm (s, 1H), $\delta = 5,920$ ppm (s, 2H), $\delta = 6,780$ ppm (s, 2H),
 $\delta = 7,346$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,609$ ppm (d, 1H), $\delta = 7,640$ ppm (d, 1H),
 $\delta = 7,856$ ppm (m, 2H), $\delta = 8,471$ ppm (m, 3H), $\delta = 13,219$ ppm (s, 1H),
 $\delta = 13,982$ ppm (s, 1H).

5

Los datos de los espectros de RMN ^1H del compuesto en el Ejemplo 88 fueron:

$\delta = 1,149$ ppm (d, 3H), $\delta = 2,646$ ppm (d, 2H), $\delta = 2,409$ ppm (t, 2H),
 $\delta = 1,375$ - $2,445$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,795$ - $2,936$ ppm (dd, 2H),
 10 $\delta = 2,702$ ppm (s, 4H), $\delta = 4,294$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,869$ ppm (s, 3H),
 $\delta = 2,632$ ppm (d, 2H), $\delta = 3,666$ ppm (t, 4H),
 $\delta = 5,162$ - $5,236$ ppm (dd, 2H), $\delta = 4,282$ ppm (m, 1H),
 $\delta = 4,897$ ppm (s, 1H), $\delta = 3,533$ ppm (s, 1H), $\delta = 5,314$ ppm (s, 1H),
 $\delta = 5,899$ ppm (t, 2H), $\delta = 7,729$ ppm (d, 1H), $\delta = 6,755$ ppm (t, 2H),
 15 $\delta = 7,492$ ppm (d, 1H), $\delta = 7,772$ ppm (t, 1H), $\delta = 8,070$ ppm (t, 1H),
 $\delta = 13,097$ ppm (s, 1H), $\delta = 13,871$ ppm (s, 1H)

EJEMPLO 76:

20 ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-(2-(2-(DIMETILAMINO)ETOXI)ETILAMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

25 El compuesto diana (10 mg) obtenido en el Ejemplo 6 se disolvió en cloroformo (10 ml) con agitación. A un matraz de reacción se añadió ácido acético glacial (1 mg) disuelto en cloroformo (10 ml). La mezcla se agitó de forma continua durante 10 min, y se evaporó en rotavapor para retirar el disolvente, proporcionando de ese modo el compuesto diana.

30 La solubilidad del compuesto en agua era superior a 9 mg/ml.

Los compuestos diana en los Ejemplos 77-87 y 89 se prepararon de acuerdo con el procedimiento de preparación en el Ejemplo 76.

EJEMPLO 77:

35

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((4-(2-HIDROXI)ETIL)PIPERAZIN-1-IL)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

40 La solubilidad del compuesto en agua era superior a 10,6 mg/ml.

EJEMPLO 78:

45 ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((3-(MORFOLIN-1-IL)PROPIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 22 mg/ml.

50 EJEMPLO 79:

55 ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXIALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((4-(METIL)PIPERAZIN-1-IL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

55

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 5 mg/ml.

EJEMPLO 80:

60 ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXIALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-(4-ETILPIPERAZIN-1-IL)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 11 mg/ml.

65

EJEMPLO 81:

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((3-(4-METIL)PIPERAZIN-1-IL)PROPIL)AMINO)-4-OXO-5 BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 7 mg/ml.

EJEMPLO 82:

10

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((PIRIDIN-4-IL)METIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

15 La solubilidad del compuesto en agua era superior a 6 mg/ml.

EJEMPLO 83:

20

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((PIRIDIN-3-II)METIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 1 mg/ml.

25 EJEMPLO 84:

30

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-(2-(PIRIDIN-2-IL)ETIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 12 mg/ml.

EJEMPLO 85:

35

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-(2-(PIRIDIN-3-IL)ETIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 11 mg/ml.

40

EJEMPLO 86:

45

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-(2-(PIRIDIN-4-IL)ETIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 3 mg/ml.

EJEMPLO 87:

50

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-(4-(3-(DIMETILAMINO)PROPIL)PIPERAZIN-1-IL)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI 5,12-NAFTALENODIONA

55 La solubilidad del compuesto en agua era superior a 16 mg/ml.

EJEMPLO 89:

60

ACETATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((2-(MORFOLIN-1-IL)ETIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

EJEMPLO 96:

65

FOSFATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-

TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((2-(MORFOLIN-1-IL)ETIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

La solubilidad del compuesto en agua era superior a 26 mg/ml.

5

El compuesto en el Ejemplo 96 se detectó por HPLC después de su sellado y almacenamiento durante 9 meses en condiciones de refrigeración. No se observó degradación evidente del producto, lo que indica una buena estabilidad del compuesto.

10 EJEMPLO 99:

CLORHIDRATO DE 10-((3'-(PIRROL-1-IL)-2',3',6'-TRIDESOXI-ALFAL-L-LIXO-HEXILPIRANIL)OXI)-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6,8,11-TRIHIDROXI-13-OXO-14-(4-((2-(MORFOLIN-1-IL)ETIL)AMINO)-4-OXO-BUTIRATO)-1-METOXI-5,12-NAFTALENODIONA

15

EJEMPLOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

EJEMPLO 1: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células SK-OV-3 (Ensayo de MTT)

20 I. Materiales del Ensayo

Cepas celulares: SK-OV-3 (cepas de células de cáncer de ovario humano); MTT; compuestos antitumorales; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

25

Medio de cultivo: 5A de McCoy al 90 % + FBS al 10 %; Pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo

30

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;
4. La pancreatina se retiró por succión. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 5 min a 37 °C;
5. Se añadieron 4,5 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 4000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 69 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
6. La solución de cultivo se retiró por succión;
7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;
8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;
9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;
10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

35

40

45

IV. Resultados y Tratamientos

50

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = (PC-n)/(PC-NC) x 100 % en la que:

55

- PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
 n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
 NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 2: Actividad de Inhibición del Crecimiento a 667 nM de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células SK-OV-3

60

Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)
Ejemplo 1	57,3	Ejemplo 3	62,5	Ejemplo 8	60

Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)
Ejemplo 10	71,5	Ejemplo 12	48,8	Ejemplo 14	53,6
Ejemplo 18	47,4	Ejemplo 20	62,6	Ejemplo 22	60,3
Ejemplo 24	61,4	Ejemplo 26	67,6	Ejemplo 28	66,2
Ejemplo 30	59,9	Ejemplo 32	59,7	Ejemplo 34	59,4
Ejemplo 35	57,8	Ejemplo 38	67,6	Ejemplo 40	47,9
Ejemplo 44	52,3	Ejemplo 60	58,9	Ejemplo 62	63,6
Ejemplo 64	65,9	Ejemplo 66	66,5	Ejemplo 76	46,4
Ejemplo 77	60,4	Ejemplo 81	56,4	Ejemplo 94	71,4
Ejemplo 95	66,3				

EJEMPLO 2: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células BxPc-3 (Ensayo de MTT)

I. Materiales del Ensayo:

5

Cepas celulares: BxPC-3 (cepas de células de cáncer pancreático humano); MTT; compuestos antitumorales; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

10

Medio de cultivo: RPMI-1640 al 90 % + FBS al 10 %; Pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo:

15

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;
4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 8 min a 37 °C;
5. Se añadieron 4,5 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 5000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 70 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
6. La solución de cultivo se retiró por succión;
7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;
8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;
9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;
10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

20

25

30

IV. Resultados y Tratamientos

35

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = (PC-n)/(PC-NC) x 100 % en la que:

40

- PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 3: Actividad de Inhibición del Crecimiento a 2000 nM de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células BxPc-3

Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)
Ejemplo 1	82,5	Ejemplo 3	81,2	Ejemplo 8	82,6
Ejemplo 10	85	Ejemplo 12	74,9	Ejemplo 14	81,8
Ejemplo 18	70,7	Ejemplo 20	84,1	Ejemplo 22	82
Ejemplo 24	84,7	Ejemplo 26	82,7	Ejemplo 28	84,7
Ejemplo 30	85,2	Ejemplo 32	83,4	Ejemplo 34	84
Ejemplo 35	81,3	Ejemplo 38	82,4	Ejemplo 40	76,5
Ejemplo 44	78,5	Ejemplo 60	83,4	Ejemplo 62	82,5
Ejemplo 64	83,7	Ejemplo 66	83,1	Ejemplo 76	77,1
Ejemplo 77	83,3	Ejemplo 81	80,7	Ejemplo 94	84,9
Ejemplo 95	80,6				

EJEMPLO 3: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células NCI-H446 (Ensayo de MTT)

5

I. Materiales del Ensayo

Cepas celulares: NCI-H446 (cepas de células de cáncer de pulmón de células pequeñas humano); MTT; compuestos antitumorales; DMSO.

10

II. Reactivos y Materiales Consumibles

Medio de cultivo: RPMI-1640 al 90 % + FBS al 10 %; Pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

15

III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;
4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 3 min a 37 °C;
5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 4000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 70 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
6. La solución de cultivo se retiró por succión;
7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;
8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;
9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;
10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

35

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

40 La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;

NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 4: Actividad de Inhibición del Crecimiento a 222 nM de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células NCI-H446

Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)
Ejemplo 1	43,2	Ejemplo 3	60,8	Ejemplo 8	59,5
Ejemplo 10	61,1	Ejemplo 12	54,6	Ejemplo 20	68
Ejemplo 22	62,1	Ejemplo 24	61,8	Ejemplo 26	66,9
Ejemplo 28	65,8	Ejemplo 30	61	Ejemplo 32	59,3
Ejemplo 34	60,7	Ejemplo 35	57,2	Ejemplo 38	62,6
Ejemplo 40	49	Ejemplo 44	46,3	Ejemplo 60	52,5
Ejemplo 62	64,6	Ejemplo 64	51,6	Ejemplo 66	56,2
Ejemplo 76	46	Ejemplo 77	59,1	Ejemplo 81	56,8
Ejemplo 94	48,4				

5

EJEMPLO 4: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células MDA-MB-453 (Ensayo de SRB)

I. Materiales del Ensayo

10 Cepas celulares: MDA-MB-453 (cepas de células de cáncer de mama humano); SRB: la solución de trabajo al 0,4 % (p/v) se formuló con ácido acético glacial al 1 %, se reservó a 4 °C; compuestos antitumorales; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

15 Medio de cultivo: L15 al 90 % + FBS al 10 %; pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo

- 20 1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
 2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
 3. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;
 4. La pancreatina se retiró por succión. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 3 min a 37 °C;
- 25 5. Se añadieron 4 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular individual uniforme. La suspensión se implantó en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 7000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 69,5 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
- 30 6. La solución de cultivo se retiró por succión. A cada pocillo se añadieron 100 µl de células fijadas con TCA que se diluyeron a un 10 %. La placa se mantuvo en un refrigerador durante 1 h a 4 °C.
 7. El líquido estacionario de TCA se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ddH₂O cinco veces;
 8. Después de limpiar el líquido estacionario, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
- 35 9. En cada pocillo se añadieron 60 µl de solución de tinción de SRB. El pocillo se tiñó durante 15 min a la temperatura ambiente;
 10. La solución de tinción de SRB se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ácido acético glacial al 1 % cinco veces;
- 40 11. Después de limpiar la solución de tinción de SRB, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
 12. En cada pocillo se añadieron 100 µl de Tris 10 mM. La placa se sometió a vibración para disolver SRB;
 13. Los valores de la DO se determinaron a 570 nM.

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

5 La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;

n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;

NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

10

Tabla 5: Actividad de Inhibición del Crecimiento a 2000 nM de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células MDA-MB-453

Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)
Ejemplo 1	77,7	Ejemplo 3	73,9	Ejemplo 8	75,3
Ejemplo 10	78,5	Ejemplo 12	73,7	Ejemplo 14	74,4
Ejemplo 20	82,4	Ejemplo 22	71,1	Ejemplo 24	79,8
Ejemplo 26	79,9	Ejemplo 28	81,9	Ejemplo 30	79,9
Ejemplo 32	78,3	Ejemplo 34	80,5	Ejemplo 35	77,1
Ejemplo 38	75,8	Ejemplo 40	73	Ejemplo 44	68,5
Ejemplo 60	76,3	Ejemplo 62	83,7	Ejemplo 64	73,5
Ejemplo 66	73,9	Ejemplo 76	62,7	Ejemplo 77	79,7
Ejemplo 81	72	Ejemplo 94	75,8	Ejemplo 95	68,2

EJEMPLO 5: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células 22Rv1 (Ensayo de SRB)

15

I. Materiales del Ensayo

Cepas celulares: 22Rv1 (cepas de células de cáncer de próstata humana); SRB: la solución de trabajo al 0,4 % (p/v) se formuló con ácido acético glacial al 1 %, se reservó a 4 °C; compuestos antitumorales; DMSO.

20

II. Reactivos y Materiales Consumibles

Medio de cultivo: RPMI-1640 al 90 % + FBS al 10 %; Pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

25

III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;

2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;

30

3. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;

4. La pancreatina se retiró por succión. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 3 min a 37 °C;

35

5. Se añadieron 4 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular individual uniforme. La suspensión se implantó en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 7000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 73 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;

40

6. La solución de cultivo se retiró por succión. A cada pocillo se añadieron 100 µl de células fijadas con TCA que se diluyeron a un 10 %. La placa se mantuvo en un refrigerador durante 1 h a 4 °C.

7. El líquido estacionario de TCA se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ddH₂O cinco veces;

8. Después de limpiar el líquido estacionario, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;

9. En cada pocillo se añadieron 60 µl de solución de tinción de SRB. El pocillo se tiñó durante 15 min a la temperatura ambiente;

10. La solución de tinción de SRB se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ácido acético glacial al 1 % cinco veces;
 11. Después de limpiar la solución de tinción de SRB, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
 12. En cada pocillo se añadieron 100 µl de Tris 10 mM. La placa se sometió a vibración para disolver SRB;
 5 13. Los valores de la DO se determinaron a 570 nM.

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

10

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;

n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;

15

NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 6: Actividad de Inhibición del Crecimiento a 222 nM de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células 22Rv1

Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)	Compuestos	Proporción de Inhibición (%)
Ejemplo 1	52,2	Ejemplo 3	61,9	Ejemplo 8	56,8
Ejemplo 10	62,7	Ejemplo 12	53,3	Ejemplo 14	52,1
Ejemplo 20	60,9	Ejemplo 22	56,3	Ejemplo 24	63,6
Ejemplo 26	60,8	Ejemplo 28	63,1	Ejemplo 30	62,3
Ejemplo 32	61,7	Ejemplo 34	63,3	Ejemplo 35	58,5
Ejemplo 38	56,3	Ejemplo 40	50,5	Ejemplo 44	48,5
Ejemplo 60	52,9	Ejemplo 62	57	Ejemplo 64	54,8
Ejemplo 66	59	Ejemplo 76	49,2	Ejemplo 77	57,9
Ejemplo 81	56,5	Ejemplo 94	60,7	Ejemplo 95	51,3

20 EJEMPLO 6: A375 Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células (Ensayo de MTT)

I. Materiales del Ensayo

Cepas celulares: A375 (cepas de células de melanoma cutáneo humano); MTT: nitroazul de tetrazolio; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

25

II. Reactivos y Materiales Consumibles

Medio de cultivo: DMEM al 90 % + FBS al 10 % (suero bovino fetal); la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

30

III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
 2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
 3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células durante 1 min;
 4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 5 min a 37 °C;
 5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 3000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera

35

40

de CO₂ al 5 % a 37 °C;

6. La solución de cultivo se retiró por succión;

7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;

5 8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;

9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;

10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

IV. Resultados y Tratamientos

10

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = (PC-n)/(PC-NC) x 100 %
en la que:

15

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;

n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;

NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

20

Tabla 7: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células A375

Compuestos	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuestos	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuestos	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	207	Ejemplo 6	67	Ejemplo 89	48
Ejemplo 81	67	Ejemplo 97	28	Ejemplo 99	35

EJEMPLO 7: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células A431 (Ensayo de MTT)

I. Materiales del Ensayo

25

Cepas celulares: A431 (cepas de células de carcinoma epidérmico humano); MTT: nitroazul de tetrazolio; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirroliidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

30

Medio de cultivo: DMEM al 45 % + F12 al 45 % + FBS al 10 % (suero bovino fetal); la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo

35

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;

2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;

40

3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células durante 1 min;

4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 5 min a 37 °C;

45

5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 2500 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;

50

6. La solución de cultivo se retiró por succión;

7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;

8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;

9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;

55

10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

5 La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;

n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;

10 NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 8: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células A431

Compuestos	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	68	Ejemplo 81	42	Ejemplo 89	46
Ejemplo 97	45				

EJEMPLO 8: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células MCF-7 (Ensayo de SRB)

15

I. Materiales del Ensayo

Cepas celulares: MCF-7 (cepas de células de cáncer de mama humano); SRB: la solución de trabajo al 0,4 % (p/v) se formuló con ácido acético glacial al 1 %, se reservó a 4 °C; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succinico; DMSO.

20

II. Reactivos y Materiales Consumibles

Medio de cultivo: EMEM al 90 % + FBS al 10 %; la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

25

III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;
4. La pancreatina se retiró por succión. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 3 min a 37 °C;
5. Se añadieron 4 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular individual uniforme. La suspensión se implantó en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 10000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 73 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
6. La solución de cultivo se retiró por succión. A cada pocillo se añadieron 100 µl de células fijadas con TCA que se diluyeron a un 10 %. La placa se mantuvo en un refrigerador durante 1 h a 4 °C.
7. El líquido estacionario de TCA se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ddH₂O cinco veces;
8. Después de limpiar el líquido estacionario, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
9. En cada pocillo se añadieron 60 µl de solución de tinción de SRB. El pocillo se tiñó durante 15 min a la temperatura ambiente;
10. La solución de tinción de SRB se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ácido acético glacial al 1 % cinco veces;
11. Después de limpiar la solución de tinción de SRB, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
12. En cada pocillo se añadieron 100 µl de Tris 10 mM. La placa se sometió a vibración para disolver SRB;
13. Los valores de la DO se determinaron a 570 nM.

30

35

40

45

50

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

55

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
 n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
 NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

5 Tabla 9: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células MCF-7

Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	785	Ejemplo 81	225	Ejemplo 89	333

EJEMPLO 9: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células NCI-446 (Ensayo de MTT)

I. Materiales del Ensayo

10

Cepas celulares: NCI-446 (cepas de células de cáncer de pulmón de células pequeñas humano); MTT: nitroazul de tetrazolio; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

15 II. Reactivos y Materiales Consumibles

Medio de cultivo: RPMI 1640 al 90 % + FBS al 10 % (suero bovino fetal); la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

20 III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células durante 1 min;
4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 3 min a 37 °C;
5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 4000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
6. La solución de cultivo se retiró por succión;
7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;
8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;
9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;
10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

40

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

45 La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = (PC-n)/(PC-NC) x 100 % en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
 n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
 NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

50

Tabla 10: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células NCI-446

Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	234	Ejemplo 89	140

EJEMPLO 10: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células NCI-H460 (Ensayo de MTT)

I. Materiales del Ensayo

5 Cepas celulares: NCI-H460 (cepas de células de cáncer de pulmón de células grandes humano); MTT: nitroazul de tetrazolio; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

10 Medio de cultivo: 90 % RPMI1640 + FBS al 10 % (suero bovino fetal); la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo

- 15
1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
 2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
 3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células durante 1 min;
 - 20 4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 3 min a 37 °C;
 5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 2000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
 - 25 6. La solución de cultivo se retiró por succión;
 7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;
 - 30 8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;
 9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;
 10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

35 IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

- 40
- PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
 - n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
 - NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

45 Tabla 11: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células NCI-460

Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	21	Ejemplo 89	2,5

EJEMPLO 11: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células B16 (Ensayo de MTT)

I. Materiales del Ensayo

50 Cepas celulares: B16 (cepas de células de melanoma de ratón); MTT: nitroazul de tetrazolio; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

55 Medio de cultivo: RPMI 640 al 90 % + FBS al 10 % (suero bovino fetal); la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
- 5 3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células durante 1 min;
4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 1 min a 37 °C;
- 10 5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 2500 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
- 15 6. La solución de cultivo se retiró por succión;
7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;
8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;
9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;
- 20 10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

- 25 La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

- 30 PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
 n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
 NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 12: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células B16

Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	32	Ejemplo 62	3	Ejemplo 89	3

35 EJEMPLO 12: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células 786-O (Ensayo de MTT)

I. Materiales del Ensayo

- 40 Cepas celulares: 786-O (cepas de células de adenocarcinoma de células transparentes humano); MTT: nitroazul de tetrazolio; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

- 45 Medio de cultivo: RPMI 1640 al 90 % + FBS al 10 % (suero bovino fetal); la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo

- 50 1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células durante 1 min;
4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 1 min a 37 °C;
- 55 5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 2000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de

solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;

6. La solución de cultivo se retiró por succión;

5 7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;

8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;

9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;

10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

10 IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = (PC-n)/(PC-NC) x 100 %

15 en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;

n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;

NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

20

Tabla 13: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células 786-O

Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	180	Ejemplo 62	110	Ejemplo 90	90

EJEMPLO 13: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células DU-145 (Ensayo de MTT)

25 I. Materiales del Ensayo

Cepas celulares: DU-145 (cepas de células de cáncer de próstata); MTT: nitroazul de tetrazolio; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

30 II. Reactivos y Materiales Consumibles

Medio de cultivo: EMEM al 90 % + FBS al 10 % (suero bovino fetal); la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

35 III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;

2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;

40 3. El PBS se retiró por succión. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células durante 1 min;

4. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 1 min a 37 °C;

5. Se añadieron 3 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular uniforme. La suspensión se implantó

45 en un disco de cultivo celular de 96 pocillos a 4000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera

de CO₂ al 5 % a 37 °C;

6. La solución de cultivo se retiró por succión;

50 7. En cada pocillo se añadieron 100 µl de solución de cultivo sin suero que contenía 0,5 mg/ml de MTT. La placa se incubó durante 3 h;

8. La solución de cultivo se retiró por succión con cuidado;

9. En cada pocillo se añadieron 100 µl de DMSO y se sometió a vibración para disolver;

10. Los valores de la DO se determinaron a 490 nM.

55

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$
en la que:

- 5 PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 14: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células DU-145

Compuestos	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuestos	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuestos	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	99	Ejemplo 62	34	Ejemplo 89	56
Compuesto 90	30	Ejemplo 92	61		

10 EJEMPLO 14: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células Hep3B (Ensayo de SRB)

I. Materiales del Ensayo

- 15 Cepas celulares: Hep3B (cepas de células de cáncer de hígado); SRB: la solución de trabajo al 0,4 % (p/v) se formuló con ácido acético glacial al 1 %, se reservó a 4 °C; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

II. Reactivos y Materiales Consumibles

- 20 Medio de cultivo: RPMI-1640 al 90 % + FBS al 10 %; Pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

III. Procedimiento del Ensayo

- 25 1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. 1,5 ml de Se añadió pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;
4. La pancreatina se retiró por succión. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 3 min a 37 °C;
30 5. Se añadieron 4 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular individual uniforme. La suspensión se implantó en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 5000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en
35 atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
6. La solución de cultivo se retiró por succión. A cada pocillo se añadieron 100 µl de células fijadas con TCA que se diluyeron a un 10 %. La placa se mantuvo en un refrigerador durante 1 h a 4 °C.
7. El líquido estacionario de TCA se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ddH₂O cinco veces;
8. Después de limpiar el líquido estacionario, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
40 9. En cada pocillo se añadieron 60 µl de solución de tinción de SRB. El pocillo se tiñó durante 15 min a la temperatura ambiente;
10. La solución de tinción de SRB se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ácido acético glacial al 1 % cinco veces;
11. Después de limpiar la solución de tinción de SRB, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
45 12. En cada pocillo se añadieron 100 µl de Tris 10 mM. La placa se sometió a vibración para disolver SRB;
13. Los valores de la DO se determinaron a 570 nM.

IV. Resultados y Tratamientos

50 1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

La proporción de inhibición del compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$
en la que:

- 55 PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;
n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;
NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 15: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células Hep3B

Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	444	Ejemplo 90	29	Ejemplo 92	28

EJEMPLO 15: Ensayo de Inhibición del Crecimiento de Células SK-Br-3 (Ensayo de SRB)

5 I. Materiales del Ensayo

Cepas celulares: SK-Br-3 (cepas de células de cáncer de mama humano); SRB: la solución de trabajo al 0,4 % (p/v) se formuló con ácido acético glacial al 1 %, se reservó a 4 °C; compuestos antitumorales; compuesto A: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico; DMSO.

10

II. Reactivos y Materiales Consumibles

Medio de cultivo: DMEM al 85 % + 15 % FBS; la pancreatina (la solución al 0,25 % (p/v) se formuló con PBS, en la formulación se añadió 0,53 mM de EDTA); PBS; placa de cultivo de 96 pocillos.

15

III. Procedimiento del Ensayo

1. Se recogió una placa (10 cm) de células en fase de crecimiento logarítmico que se cultivaron normalmente;
2. La solución de cultivo se retiró por succión. La placa se lavó con 5 ml de PBS una o dos veces;
3. Se añadieron 1,5 ml de pancreatina al 0,25 % para infiltrar las células;
4. La pancreatina se retiró por succión. La placa de cultivo se puso en una incubadora. La digestión se realizó durante aproximadamente 2 min a 37 °C;
5. Se añadieron 4 ml de solución de cultivo completa a la placa de cultivo para parar la digestión. Las células se frotaron con cuidado con micropipeta (1 ml) para dar una suspensión celular individual uniforme. La suspensión se implantó en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 10000 células/100 µl por pocillo. La placa de cultivo se incubó durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. En el día 2, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de cultivo que comprendía un compuesto. La placa se incubó adicionalmente durante 72 h en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C;
6. La solución de cultivo se retiró por succión. A cada pocillo se añadieron 100 µl de células fijadas con TCA que se diluyeron a un 10 %. La placa se mantuvo en un refrigerador durante 1 h a 4 °C.
7. El líquido estacionario de TCA se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ddH₂O cinco veces;
8. Después de limpiar el líquido estacionario, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
9. En cada pocillo se añadieron 60 µl de solución de tinción de SRB. El pocillo se tiñó durante 15 min a la temperatura ambiente;
10. La solución de tinción de SRB se retiró por succión. Cada pocillo se lavó con 150 µl de ácido acético glacial al 1 % cinco veces;
11. Después de limpiar la solución de tinción de SRB, la placa se secó en el aire a la temperatura ambiente;
12. En cada pocillo se añadieron 100 µl de Tris 10 mM. La placa se sometió a vibración para disolver SRB;
13. Los valores de la DO se determinaron a 570 nM.

40

IV. Resultados y Tratamientos

1. Cálculo de la Proporción de Inhibición Relativa

45 La proporción de inhibición de un compuesto en el crecimiento celular = $(PC-n)/(PC-NC) \times 100 \%$ en la que:

PC: Valores de la DO de células después de crecimiento normal en pocillos de control sin un compuesto;

n: Valores de la DO de células después de crecimiento en pocillos de ensayo con un compuesto;

50

NC: Valores de la DO de fondo de pocillos en blanco sin un compuesto y células.

Tabla 16: Actividad de Inhibición del Crecimiento de Algunos Compuestos en los Ejemplos en Células SK-Br-3

Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)	Compuesto	Actividad de Inhibición (CI ₅₀ /nM)
Compuesto A	93	Ejemplo 98	15

Ensayo sobre la MTD (Dosis Máxima Tolerada) *in vivo* de Ratones

Ensayo sobre la Dosis Máxima Tolerada del Compuesto

- 5 Animales del ensayo: ratones de la cepa ICR con un peso de 18-22 g, adquiridos en Beijing Vital River Laboratories Limited, License SCXK (jing) 2007-0001.

Régimen de Administración: a cada animal experimental se le administró la dosificación correspondiente de la sustancia sometida a ensayo una vez por inyección en la vena caudal cada tres días. Cada dosificación se diseñó inicialmente como 5 veces de administración. El tiempo específico de la administración dependía de las condiciones de los animales. Las condiciones de comportamiento de los animales dentro de 2 horas después de la administración se deberían observar con cuidado. El comportamiento del animal se observó cada 4 horas en el día de la administración. Las condiciones de supervivencia y el peso de los animales se registraron cada día y se observaron por si se producía alguna anomalía en la superficie del cuerpo del mismo. Los animales experimentales se sacrificaron en el día 14 después de la administración y se diseccionaron para su observación.

1. Sustancia sometida a Ensayo 1: 3'-pirrolidoxorrubicina

1) Grupos de Administración

- 20 grupo I: grupo de (20 mg/kg);
grupo II: grupo de (25 mg/kg);
grupo III: grupo de (30 mg/kg);
grupo IV: grupo de control de disolvente.

25 Había cuatro grupos en total. Cada grupo consistía en cinco ratones macho y cinco ratones hembra.

2) Resultados del Ensayo

- 30 (1) Los efectos en los pesos de los animales experimentales se muestran en la Fig. 1.
(2) Los efectos en la proporción de supervivencia de los animales experimentales se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17

Dosificación (mg/kg)	Tiempos de Administración	Dosificación Total (mg/kg)	Número de Animales por Grupo ♂/♀	Número de Animales Muertos ♂/♀	Tasa de Mortalidad (%)
20	4	80	5/5	5/5	100
25	4	100	5/5	5/5	100
30	3	90	5/5	5/5	100
Control	4	0	5/5	0/0	0

Nota: ♂: ratón macho; ♀: ratón hembra

35 3) Resultados del Ensayo y Discusiones

Los animales experimentales en el grupo de control de disolvente presentaban un aumento del peso normal sin muerte. La muerte se producía de forma sucesiva en los animales experimentales después de administración con 20 mg/kg o 25 mg/kg cuatro veces. La muerte se producía en sucesión en los animales experimentales después de administración con 30 mg/kg tres veces. La tasa de mortalidad es de un 100 %. La MTD del compuesto de ensayo 1 es inferior a 20 mg/kg (0,0338 mmol/kg) de acuerdo con el régimen de administración de q4d x 5.

2. Compuesto sometido a Ensayo 2: el compuesto del Ejemplo 96

45 1) Grupos de Administración

- 50 grupo I: grupo de (40 mg/kg);
grupo II: grupo de (45 mg/kg);
grupo III: grupo de (50 mg/kg);
grupo IV: grupo de (55 mg/kg);
grupo V: grupo de (60 mg/kg).

Había cinco grupos en total. Cada grupo consistía en seis ratones macho y seis ratones hembra.

2) Resultados del Ensayo

- (1) Los efectos en los pesos de los animales experimentales se muestran en la Fig. 2.
 (2) Los efectos en la proporción de supervivencia de los animales experimentales se muestran en la Tabla 18.

5

Tabla 18

Dosificación (mg/kg)	Tiempos de Administración	Dosificación Total (mg/kg)	Número de Animales por Grupo ♂/♀	Número de Animales Muertos ♂/♀	Tasa de Mortalidad (%)
40	5	200	6/6	0/1	8,33
45	5	225	6/6	0/0 (1/2a)	0
50	5	250	6/6	0/0 (1/1a)	0
55	5	275	6/6	5/4 (5/3a)	25
60	5	300	6/6	3/4	53,85

Nota: ♂: ratón macho; ♀: ratón hembra

a representa que el animal experimental murió inmediatamente después de la inyección del fármaco en lugar de que la muerte la produjera la citotoxicidad. En el cálculo de la tasa de mortalidad no se hacía el recuento del animal que moría inmediatamente después de la administración (tasa de mortalidad = el número de animales experimentales que no morían inmediatamente después de la inyección/(el número de animales en el grupo - el número de animales experimentales que morían inmediatamente) x 100 %).

3) Resultados del Ensayo y Discusiones

- 10 En el grupo de dosificación de 40 mg/kg había un animal muerto. La tasa de mortalidad es de un 8,33 %. El animal muerto se diseccionó para la observación de diversos órganos. Los órganos no presentaban ninguna anomalía evidente. Sin embargo, había varias marcas de mordedura en la superficie de la piel del animal muerto. Este animal no presentaba una pérdida de peso significativa. Por lo tanto, se supone que la muerte está causada por factores de citotoxicidad en lugar de por el fármaco. Dos animales experimentales murieron inmediatamente después de la
 15 quinta administración en el grupo de dosificación de 50 mg/kg. Los dos animales muertos no presentaban una pérdida de peso significativa. Se supone que la muerte está causada por factores de citotoxicidad en lugar de por el fármaco. La MTD del compuesto sometido a ensayo 2 es 50-55 mg/kg (0,0525-0,0578 mmol/kg) de acuerdo con el régimen de administración de q4d x 5.

20 3. Sustancia sometida a Ensayo 3: monoéster del ácido 3'-pirrolidoxorrubicina-14-oxo-succínico

1) Grupos de Administración

- 25 grupo I: grupo de (30 mg/kg);
 grupo II: grupo de (40 mg/kg);
 grupo III: grupo de (50 mg/kg);
 grupo IV: grupo de (60 mg/kg).

Había cuatro grupos en total. Cada grupo consistía en cinco ratones macho y cinco ratones hembra.

30

2) Resultados del Ensayo

- (1) Los efectos en los pesos de los animales experimentales se muestran en la Fig. 3.
 (2) Los efectos en la proporción de supervivencia de los animales experimentales se muestran en la Tabla 19.

35

Tabla 19

Dosificación (mg/kg)	Tiempos de Administración	Dosificación Total (mg/kg)	Número de Animales por Grupo ♂/♀	Número de Animales Muertos ♂/♀	Tasa de Mortalidad (%)
30	5	150	5/5	0/1	10
40	5	200	5/5	3/2	50
50	5	250	5/5	5/5	100
60	5	300	5/5	5/5	100

Nota: ♂: ratón macho; ♀: ratón hembra

3) Resultados del Ensayo y Discusiones

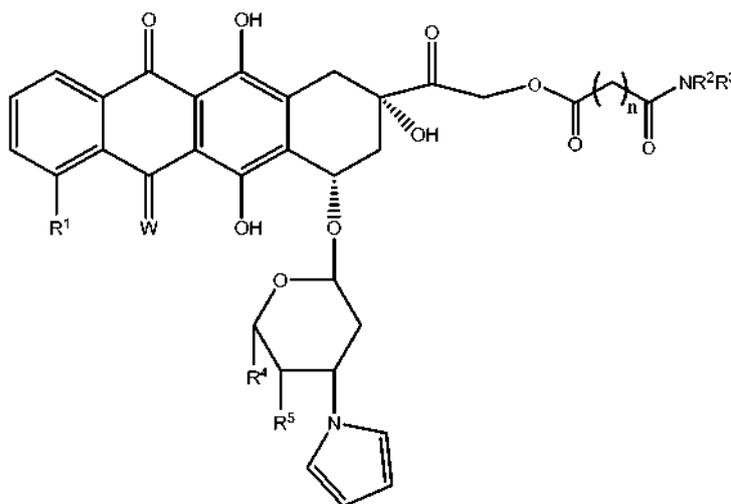
- 5 Las tasas de letalidad de los ratones de la cepa ICR son un 10 %, un 50 %, un 100 %, un 100 % respectivamente, de acuerdo con los regímenes de administración de 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg de los compuestos. Un animal experimental murió sin una pérdida de peso significativa en los animales del grupo de 30 mg/kg, lo que indica que este animal muerto en el grupo de 30 mg/kg no excluye la causa de la diferencia individual del animal. La MTD del compuesto sometido a ensayo 3 es aproximadamente 30 mg/kg (0,0433 mmol/kg) de acuerdo con el régimen de administración de q4d x 5.

La descripción general mencionada anteriormente con respecto a la invención desvelada en el presente documento y la descripción de las realizaciones específicas de la misma no se puede interpretar como la limitación a las soluciones técnicas de la invención. Alguien con una experiencia habitual en la materia puede añadir, suprimir o combinar las características técnicas desveladas en la descripción general y/o realizaciones específicas mencionadas anteriormente (incluyendo los Ejemplos) para formar otras soluciones técnicas dentro de la invención de acuerdo con la divulgación en el presente documento sin apartarse de los elementos constitutivos de la invención.

(piperidin-1-il)butilo, 4-(morfolin-1-il)butilo, 4-(tetrahidropirrol-1-il)butilo, 2-(2-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(diethylamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(dipropilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(piperidin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(morfolin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(tetrahidropirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(dimetilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(diethylamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(dipropilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(piperidin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(morfolin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(tetrahidropirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 6-purinilo, mesilo, bencenosulfonilo, pirazin-2-ilo, pirimidin-2-ilo, 2-hidroxietilo, 2-(2-hidroxietoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etilo, y 2-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)etilo; o NR²R³ se selecciona entre el grupo que consiste en piperidin-1-ilo, morfolin-1-ilo, tetrahidropirrol-1-ilo, (4-(2-hidroxietil))piperazin-1-ilo, (4-metil)piperazin-1-ilo, (4-etil)piperazin-1-ilo, (4-propil)piperazin-1-ilo, 4-(3-hidroxipropil)piperazin-1-ilo, adenin-1-ilo, (4-(3-(dimetilamino)propil)piperazin)-1-ilo, (4-(2-(dimetilamino)etil)piperazin)-1-ilo, (4-(3-(diethylamino)propil)piperazin)-1-ilo, (4-(2-(diethylamino)etil)piperazin)-1-ilo, (4-(2-(piperidin-1-il)etil)piperazin)-1-ilo, (4-(3-(piperidin-1-il)propil)piperazin)-1-ilo, (4-(2-(morfolin-1-il)etil)piperazin)-1-ilo, (4-(3-(morfolin-1-il)propil)piperazin)-1-ilo, (4-(2-(tetrahidropirrol-1-il)etil)piperazin)-1-ilo, y (4-(3-(tetrahidropirrol-1-il)propil)piperazin)-1-ilo; W es O; R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en H, F y alquilo C₁₋₄; R⁵ es OR⁶, en el que R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en H y tetrahidropiran-2-ilo; y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2 y 3.

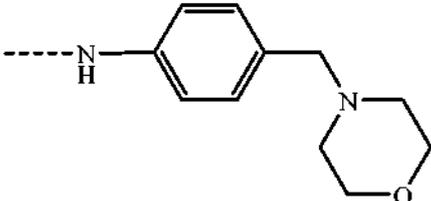
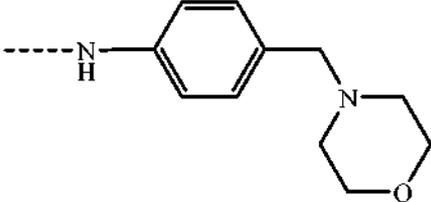
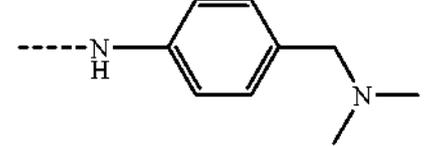
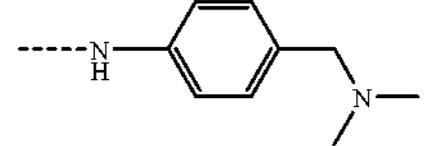
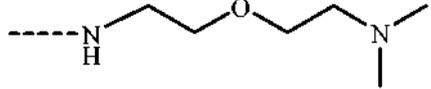
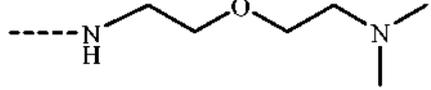
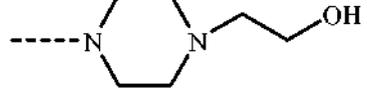
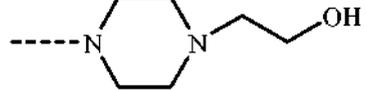
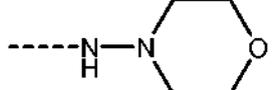
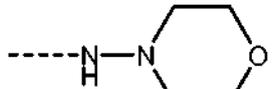
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ es OCH₃; y/o en el que R⁴ es CH₃.

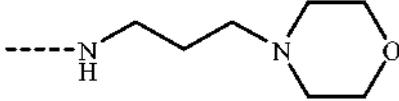
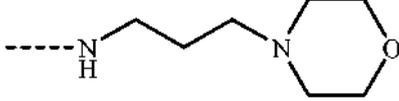
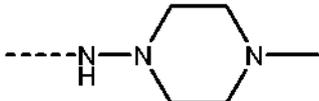
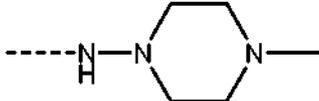
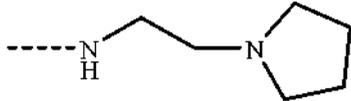
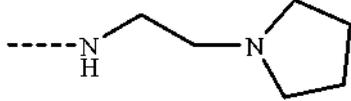
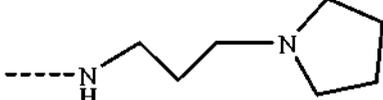
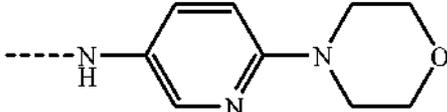
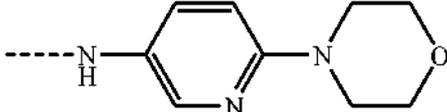
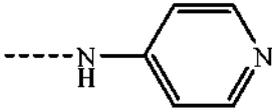
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 seleccionado entre el grupo que consiste en:

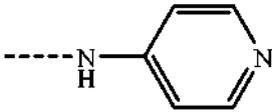
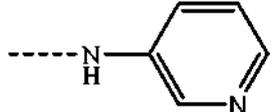
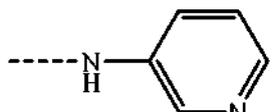
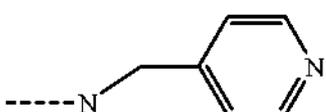
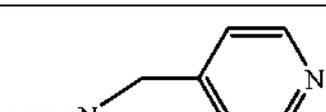
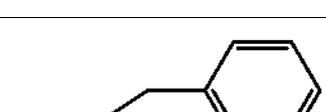
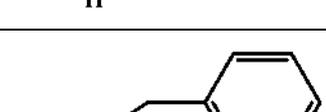
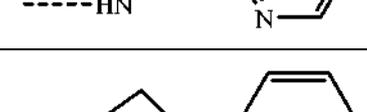


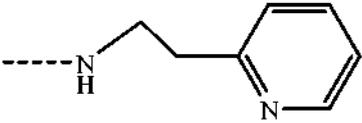
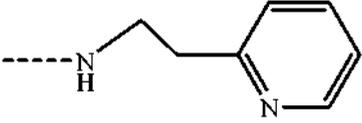
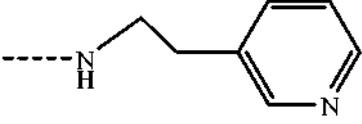
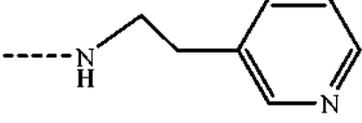
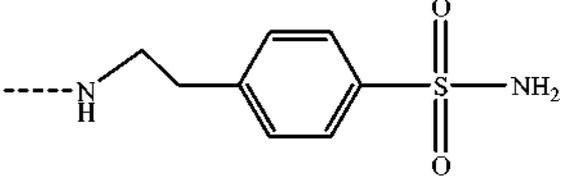
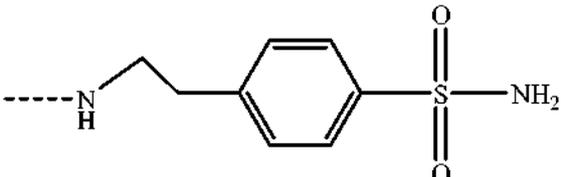
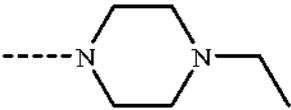
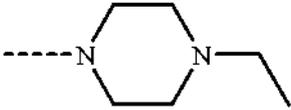
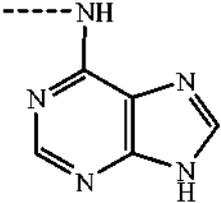
en el que W es O, R¹ es OCH₃, R⁴ es CH₃, R⁵ es OH, n y NR²R³ se muestran en la siguiente tabla:

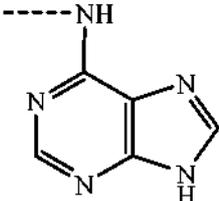
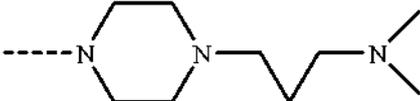
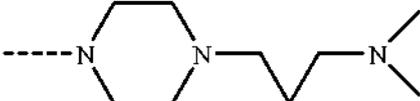
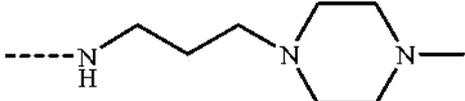
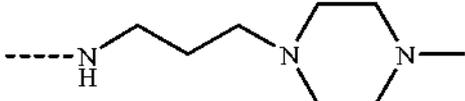
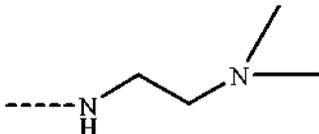
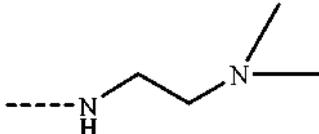
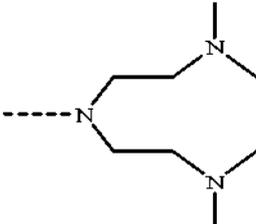
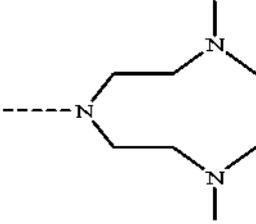
N.º	n	NR ² R ³
1	3	

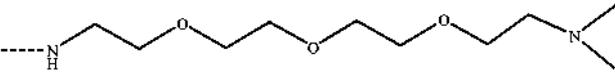
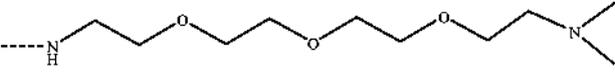
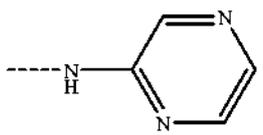
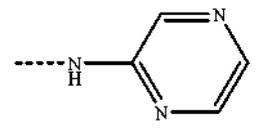
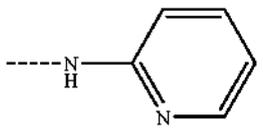
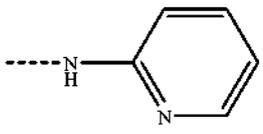
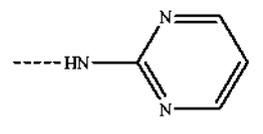
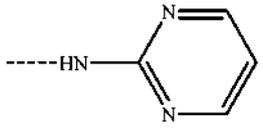
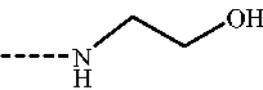
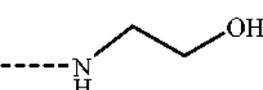
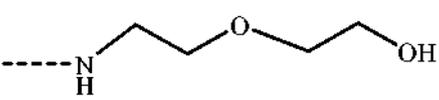
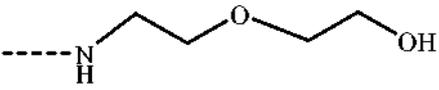
N.º	n	NR ² R ³
2	2	
3	3	
4	2	
5	3	
6	2	
7	3	
8	2	
9	3	
10	2	
11	3	

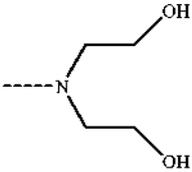
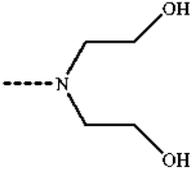
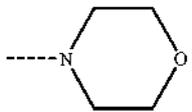
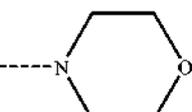
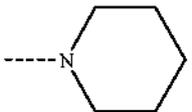
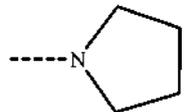
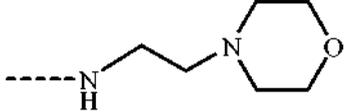
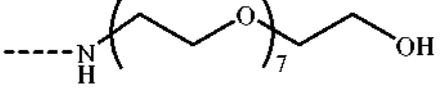
N.º	n	NR ² R ³
12	2	
13	3	
14	2	
15	3	
16	2	
17	3	
18	2	
19	3	
20	2	
21	3	
22	2	

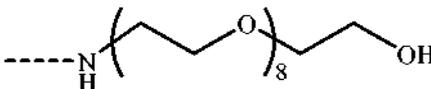
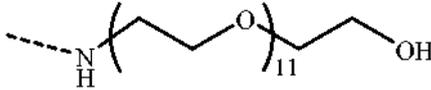
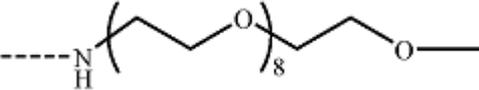
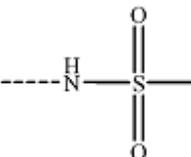
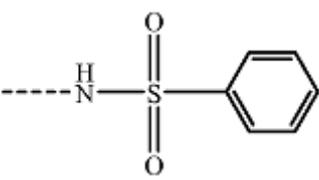
N.º	n	NR ² R ³
23	3	
24	2	
25	3	
26	2	
27	3	
28	2	
29	3	
30	2	
31	3	
32	2	
33	3	

N.º	n	NR ² R ³
34	2	
35	3	
36	2	
37	3	
38	2	
39	3	
40	2	
41	3	
42	2	

N.º	n	NR ² R ³
43	3	
44	2	
45	3	
46	2	
47	3	
48	2	
49	3	
50	2	
51	3	

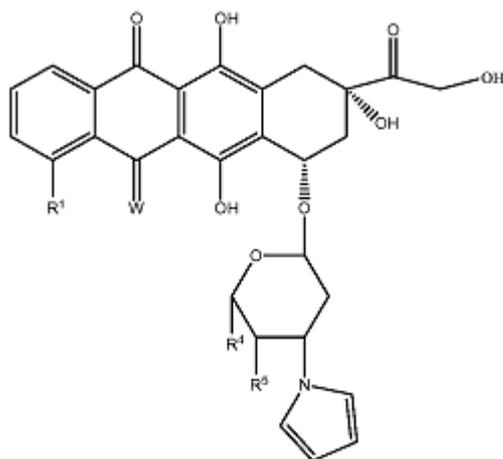
N.º	n	NR ² R ³
52	2	
53	3	
54	2	
55	3	
56	2	
57	3	
58	2	
59	3	
60	2	
61	3	
62	2	
63	3	

N.º	n	NR ² R ³
64	2	
65	3	
66	2	NH ₂
67	3	NH ₂
68	2	NHCH ₃
69	3	NHCH ₃
70	2	N(CH ₃) ₂
71	3	N(CH ₃) ₂
72	2	
73	3	
74	2	
75	2	
88	2	
90	2	

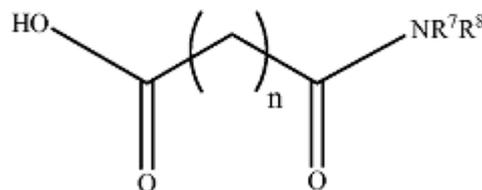
N.º	n	NR ² R ³
91	2	
92	2	
93	2	
94	2	
95	2	

- 77) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((4-(2-hidroxi)etil)piperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 78) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((3-(morfolin-1-il)propil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 79) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((4-metil)piperazin-1-il)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 80) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(4-etilpiperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 81) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((3-(4-metilpiperazin-1-il)propil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 82) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((piridin-4-il)metil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 83) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((piridin-3-il)metil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 84) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-2-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 85) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-3-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 86) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(2-(piridin-4-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 87) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-(4-(3-(dimetilamino)propil)piperazin-1-il)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona acetato;
- 89) acetato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona;
- 96) fosfato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona fosfato;
- y
- 99) clorhidrato de 10-((3'-(pirrol-1-il)-2',3',6'-tridesoxi-alfal-L-lixo-hexilpiranil)oxi)-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-13-oxo-14-(4-((2-(morfolin-1-il)etil)amino)-4-oxo-butirato)-1-metoxi-5,12-naftalenodiona.

4. Un procedimiento para preparar un compuesto representado por la fórmula (I) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende



Fórmula (II)



Fórmula (III)

hacer reaccionar un compuesto representado por la fórmula (II) con un compuesto representado por la fórmula (III) en presencia de un agente de condensación para obtener un compuesto representado por la fórmula (I),
5 en las que:

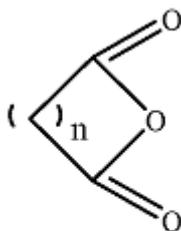
- los grupos representados por R^1 , W , R^4 , R^5 en el compuesto representado por la fórmula (II) son los mismos que los grupos representados por R^1 , W , R^4 , R^5 en el compuesto representado por la fórmula (I);
10 n en el compuesto representado por la fórmula (III) tiene los mismos significados que n en el compuesto representado por la fórmula (I);
los grupos representados por R^7 y R^8 en el compuesto representado por la fórmula (III) son los mismos que los grupos representados por R^2 y R^3 en el compuesto representado por la fórmula (I), cuando los grupos representados por R^7 y R^8 comprenden NH o NH_2 , el compuesto representado por la fórmula (III) tiene un grupo protector de amino en el extremo N-terminal, y está sometido a una reacción de desprotección para obtener el
15 compuesto representado por la fórmula (I).

5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente la adición de un activador;
y/o que adicionalmente comprende la adición de un catalizador;
y/o en el que el grupo de protección de amino se selecciona entre el grupo que consiste en Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo), Boc (*t*-butiloxicarbonilo), CBZ (carbobenzoxi), Tr (trilito), Alloc (aliloxicarbonilo), Teoc (trimetilsililetoxicarbonilo), metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, Pht (ftaloilo), Tos (tosilo), Ns (*o/p*-nitrobenzenosulfonilo), Tfa (trifluoroacetilo), pivaloilo, benzoilo, Dmb (2,4-dimetoxibencilo), PMB (*p*-metoxibencilo), y Bn (bencilo);
y/o en el que el agente de condensación se selecciona entre el grupo que consiste en dicitlohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI), hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de 6-clorobenzotriazol-1,1,3,3-tetrametiluronio (HCTU), hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio (HAPyU), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio (HBPpyU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), sal de amonio cuaternario de tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (3H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-3-oxi)tri-1-pirrolidinilfosfonio (PyAOP), cloruro de difenilfosfinilo (DPP-C1), azida de difenil fosforilo (DPPA), cianodietilfosfato (DECP), cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinilo (BOP-Cl) y una mezcla de los mismos; y/o en el que un reactivo de desprotección usado en la reacción de
35 desprotección se selecciona entre el grupo que consiste en gas hidrógeno, NH_3 , aminoetanol, dimetilamina, dietilamina, piperidina, piperazina, 1,8-diazaciclo[5.4.0]hendeceno-7 (DBU), ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico y una mezcla de los mismos.

40 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el activador se selecciona entre el grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida (HOSu), 1-hidroxi-7-azobenzotriazol (HOAt), 1-hidroxi-7-azobenzotriazol (HOBT), N-hidroxi-ftalimida (NHPI), N-hidroxi-1,8-naftalimida (NHNI), pentafluorofenol (PFPOH), hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de 6-clorobenzotriazol-1,1,3,3-tetrametiluronio (HCTU), hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio (HAPyU), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-di(tetrahidropirrolil)carbenio
45

(HBPYU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), sal de amonio cuaternario de tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (3H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-3-oxi)tri-1-pirrolidinilfosfonio (PyAOP), cloruro de difenilfosfinilo (DPP-Cl), azida de difenil fosforilo (DPPA), cianodietilfosfato (DECP), cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinilo (BOP-Cl) y una mezcla de los mismos;
y/o el catalizador se selecciona entre 4-dimetilaminopiridina, 4-pirrolidinilpiridina y mezcla de los mismos.

10 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el compuesto representado por la fórmula (III) se obtiene mediante una reacción de un compuesto representado por la fórmula (IV) con HNR^7R^8 ,



Fórmula (IV)

15 en la que:

n en el compuesto representado por la fórmula (IV) tiene los mismos significados que n en el compuesto representado por la fórmula (I); y
20 los grupos representados por R^2 y R^3 en HNR^7R^8 son los mismos que los grupos representados por R^2 y R^3 en el compuesto representado por la fórmula (I).

8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente la adición de un compuesto alcalino.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el compuesto alcalino se selecciona entre el grupo que consiste
25 en trietilamina, piridina, diisopropiletilamina, trimetilamina, N-metilpirrolidina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, N-etilpirrolidina, N-etilpiperidina, N-etilmorfolina y una mezcla de los mismos.

10. Una composición farmacéutica o una formulación, que comprende un compuesto representado por la fórmula (I) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo
30 farmacéuticamente aceptable.

11. La composición farmacéutica o formulación de la reivindicación 10, que es una formulación para inyección.

12. La composición farmacéutica o formulación de la reivindicación 11, en la que la formulación para inyección es
35 una inyección de polvo convencional, una inyección de polvo liofilizado, una hidro-inyección, una emulsión, una solución o una suspensión.

13. Un compuesto representado por la fórmula (I) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o una composición o formulación de una cualquiera de las reivindicaciones
40 10 a 12; para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

14. Un compuesto representado por la fórmula (I) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o una composición o formulación de una cualquiera de las reivindicaciones
45 10 a 12; para su uso en un método para tratar y/o prevenir tumor y/o cáncer.

15. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el tumor y/o cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, melanoma, cáncer de próstata, glioma cerebral, leucemia, linfoma, y cáncer de médula ósea múltiple.
50

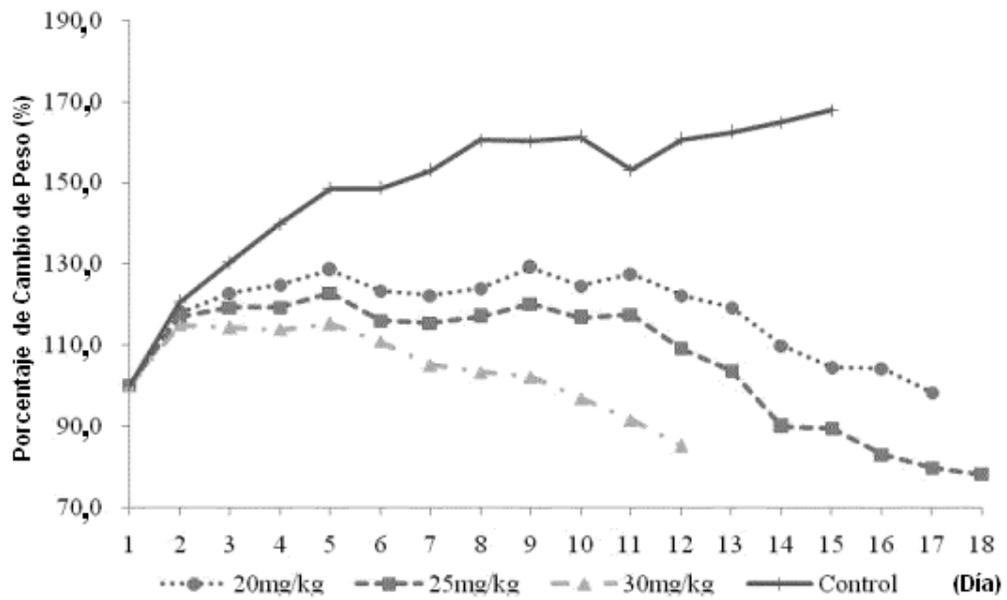


Figura 1

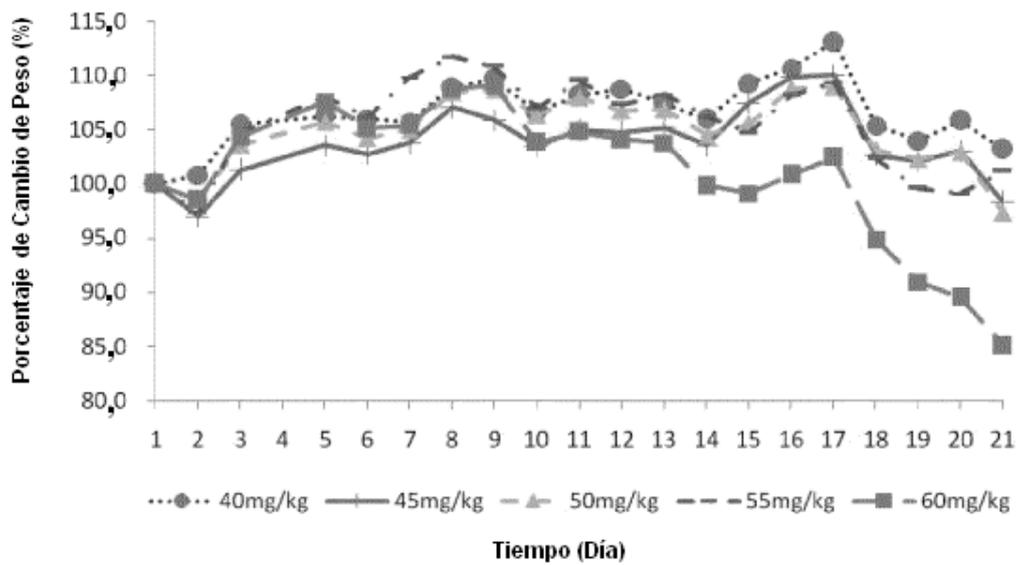


Figura 2

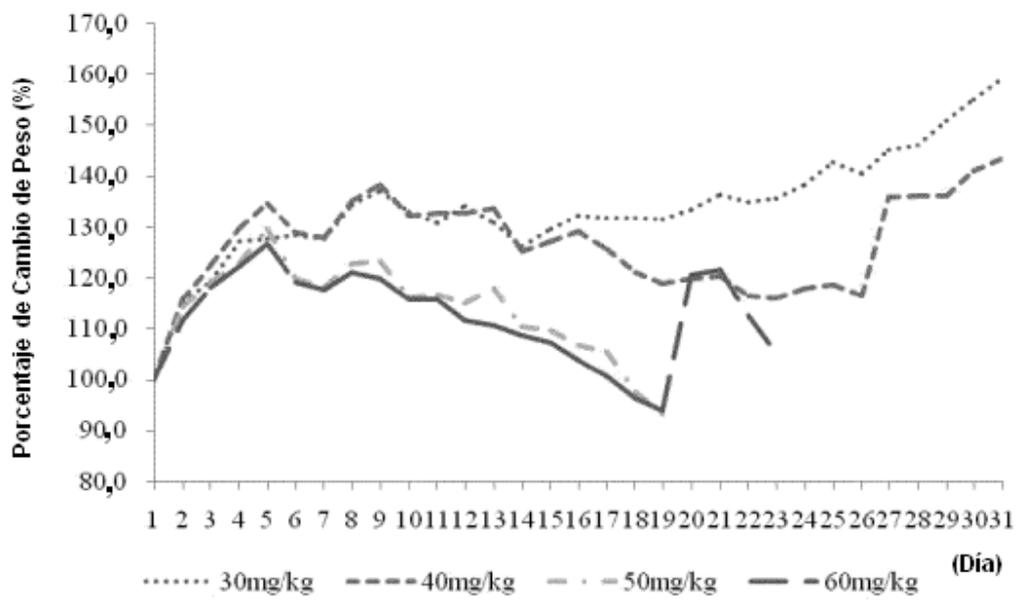


Figura 3

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- CN 101555264 A [0004]
- WO 2009099741 A [0005]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **JORG B. ENGEL et al.** Targeted Therapy of Breast and Gynecological Cancers with Cytotoxic Analogues of Peptide Hormones. *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, 01 de octubre de 2007, vol. 4 (5), 652-658 [0003]