(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 710 153**

(51) Int. CI.:

C07C 271/24 (2006.01)
C07C 233/32 (2006.01)
C07C 235/56 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2011 PCT/KR2011/001087**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11102668**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2011 E 11744910 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2562156**

(54) Título: **Derivados de la colchicina o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, método de preparación de dichos derivados y composición farmacéutica que comprende dichos derivados**

(30) Prioridad:

18.02.2010 KR 20100014811

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2019

(73) Titular/es:

THE ASAN FOUNDATION (100.0%)
388-1 Pungnap-2dong
Songpa-gu, Seoul 138-736, KR

(72) Inventor/es:

HAN, DUCK JONG;
YOO, SUNG-EUN y
SUH, JEEHEE

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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 la colchicina o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, método de preparación de dichos derivados y composición farmacéutica que comprende dichos derivados

La presente invención se refiere a derivados de la colchicina o a las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, un método para preparar los mismos y una composición farmacéutica que comprende los mismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a derivados de la colchicina que pueden usarse como un inmunomodulador de una respuesta inmunitaria aguda o crónica en un trasplante de órganos.

Los rechazos de trasplantes de órganos, enfermedades autoinmunitarias, alergias, etc. se producen cuando el sistema inmunitario responsable de defender el cuerpo activa el sistema de defensa contra otros antígenos diferentes del propio cuerpo para destruir el órgano o tejido trasplantado y, por lo tanto, tienen efectos nocivos en el cuerpo humano. En general, el trasplante de órganos es el tratamiento más efectivo para los pacientes con insuficiencia orgánica terminal. Sin embargo, si los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del donante y el receptor no coinciden, el sistema inmunitario del cuerpo reconoce al órgano trasplantado como gérmenes dañinos y ataca al órgano trasplantado activando los linfocitos T, los linfocitos B, los macrófagos o los linfocitos citolíticos naturales (NK), etc. La regulación de la respuesta inmunitaria no deseada se llama inmunomodulación, y los medicamentos utilizados para la inmunomodulación se denominan inmunomoduladores. Hasta ahora se han desarrollado inmunomoduladores como la ciclosporina A, el tacrolimus (en lo sucesivo, FK506), etc.

La ciclosporina A fue aislada de *Trichoderma polysporum* en 1976 y se ha descrito que tiene relativamente menos efectos secundarios y que reduce la infección bacteriana en comparación con otros inmunomoduladores. Además, se ha descrito que el FK506 aislado de *Streptomyces tsukubaensis* tiene una eficiencia 10 a 100 veces mayor que la de la ciclosporina A. Sin embargo, la ciclosporina A y FK506 tienen efectos secundarios como toxicidad renal grave, toxicidad hepática, etc.

Por otro lado, la colchicina es un fármaco alcaloide utilizado para el tratamiento de la gota y se ha descrito que inhibe la función de la tubulina, una proteína que se sabe que actúa como músculo y esqueleto, al unirse a la tubulina. Se ha descrito que la colchicina tiene actividades anticancerígenas y antiproliferativas y se ha usado ampliamente para el tratamiento de la psoriasis o la artritis reumatoide, el tratamiento de la amiloidosis y la inflamación, etc. Además, la Patente Coreana N.º 324302 y la publicación de patente coreana N.º 2002-30296 divulgan el uso de colchicina como inmunomodulador, así como el documento WO02 100824,

Sin embargo, la colchicina tiene poco efecto en comparación con la dosis y es altamente tóxica en dosis altas, por lo que se necesita con urgencia el desarrollo de un nuevo inmunomodulador mejorado.

En consecuencia, los presentes inventores han preparado nuevos derivados de la colchicina mediante varias rutas sintéticas y han confirmado que los derivados de la colchicina muestran efectos inmunomoduladores superiores y baja toxicidad en comparación con los inmunomoduladores convencionales y las colchicinas, completando así la presente invención. Un derivado de la colchicina de acuerdo con la presente invención a lo largo de la descripción se selecciona del grupo que consiste en los compuestos 1) a 22) como se indica a continuación.

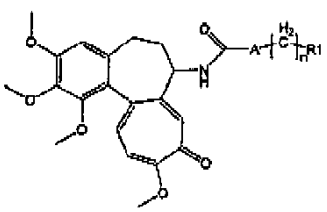
Un objeto de la presente invención es proporcionar derivados de la colchicina o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar los derivados de la colchicina.

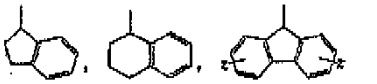
Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la inmunomodulación que comprende los derivados de la colchicina o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como principio activo.

En un aspecto, se divulga un derivado de la colchicina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representado por la siguiente fórmula 1:

[Fórmula 1]

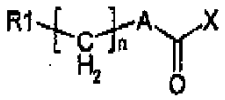


en la que R1 es fenilo,



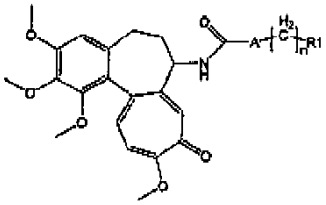
o cicloalquilo C_3-C_6, no sustituido o sustituido con X, donde X es halógeno, OCH_3, NO_2, NH_2 o alquilo C_1-C_3 de cadena lineal o ramificada, y Z y Z' son cada uno independientemente H, halógeno, OCH_3, NO_2, NH_2 o alquilo C_1-C_4 de cadena lineal o ramificada;
n es un número entero de 0 a 3; y
A es CH_2, NH, u O.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un derivado de la colchicina que comprende la etapa de hacer reaccionar un derivado de la desacetil colchicina representado por la siguiente fórmula 2 con una cantidad equivalente o un exceso de

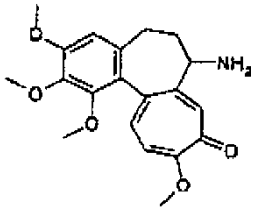


en presencia de una base o un agente de condensación en un disolvente de reacción para formar amida.

[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



en la que R1, n y A tienen los significados que se han definido anteriormente.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la inmunomodulación que comprende el derivado de la colchicina o sus sales farmacéuticamente aceptables como principio activo.

Los derivados de la colchicina o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de la presente invención no tienen citotoxicidad a dosis altas y exhiben efectos inmunomoduladores superiores en comparación con los inmunomoduladores convencionales o colchicinas, y por lo tanto pueden usarse eficazmente como un inmunomodulador para modular una respuesta inmunitaria aguda o crónica en el trasplante de órganos.

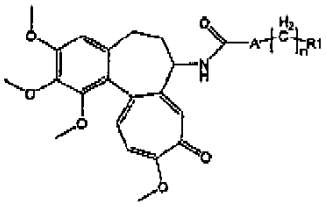
La FIG. 1 un gráfico que muestra la modulación o los efectos inmunomoduladores de la proliferación de linfocitos T utilizando bazos de ratas Lewis y ratas Wistar tratadas con derivados de la colchicina (compuestos 1, 7, 9, 14, 15, 17, 18, 22 y 23) de la presente Invención para examinar los efectos inmunomoduladores de los derivados de la colchicina.

La FIG. 2 muestra los resultados del análisis de tejidos realizado 100 días después del trasplante de células de los islotes mediante inyección intraperitoneal en combinación con ciclosporina A (5 mg/kg) y compuestos derivados de la colchicina 7 (50, 100 µg/kg), 9 (50 µg/kg), y 14 (40 µg/kg), en los cuales los tejidos del hígado se tiñeron con insulina, hematoxilina y eosina (H-E), y los linfocitos CD4 y CD8, y los tejidos pancreáticos se tiñeron con insulina y H-E.

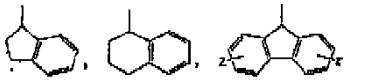
A continuación, se describirá con más detalle la presente invención.

La presente invención proporciona un derivado de la colchicina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la siguiente fórmula 1:

[Fórmula 1]



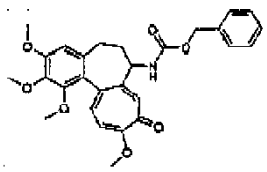
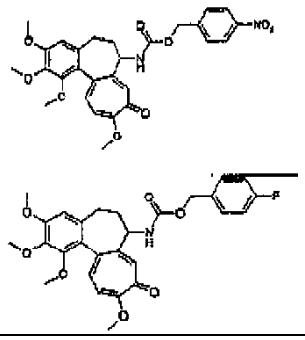
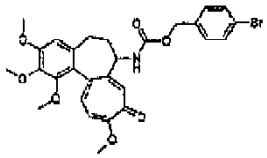
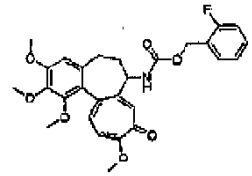
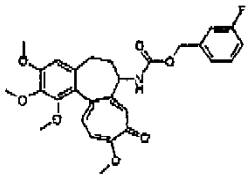
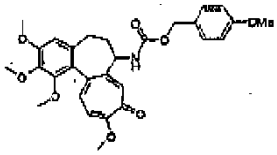
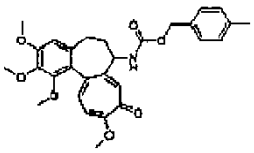
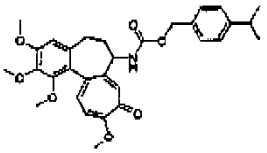
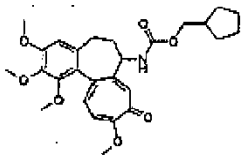
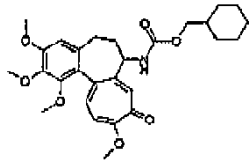
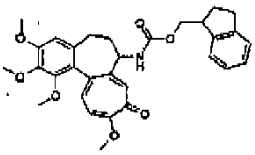
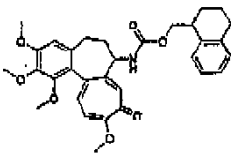
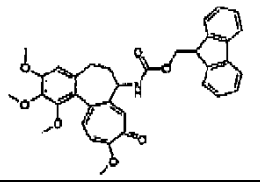
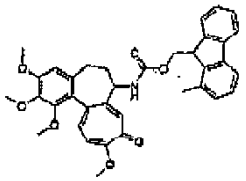
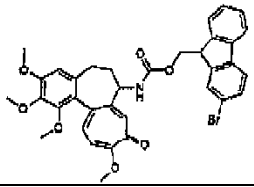
en la que R1 es fenilo,

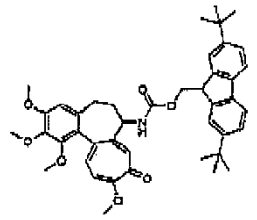
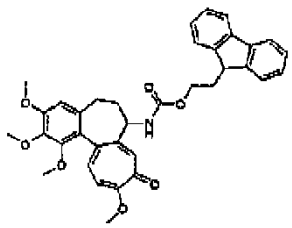
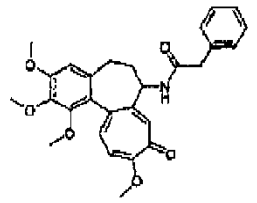
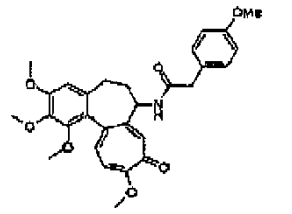
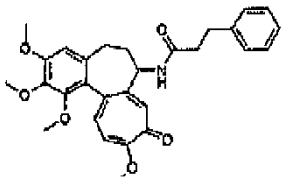
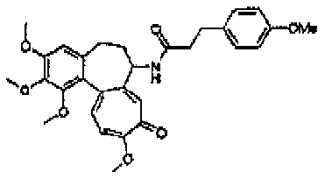


o cicloalquilo C_3-C_6, no sustituido o sustituido con X, donde X es halógeno, OCH_3, NO_2, NH_2 o alquilo C_1-C_3 de cadena lineal o ramificada, y Z y Z' son cada uno independientemente H, halógeno, OCH_3, NO_2, NH_2 o alquilo C_1-C_4 de cadena lineal o ramificada; n es un número entero de 0 a 3; y
A es CH_2, NH, u O seleccionado del grupo que consiste en:

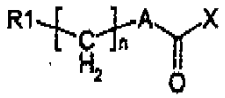
1) éster bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
2) éster 4-nitro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
3) éster 4-bromo bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
4) éster 4-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
5) éster 2-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
6) éster 3-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
7) éster 4-metoxi bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
8) éster 4-metil bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
9) éster 4-isopropil bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
10) éster ciclopentilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
11) éster ciclohexilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
12) éster indan-1-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
13) éster 1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
14) éster *9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
15) éster 1-metil-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
16) éster 2-bromo-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
17) éster 2,7-di-terc-butil-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tatrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
18) éster 2-(*9H*-fluoren-9-il)-etílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;;
19) 2-fenil-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-acetamida;
20) 2-(4-metoxi-fenil)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-acetamida;
21) 3-fenil-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-propionamida;
22) 3-(4-metoxi-fenil)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-propionamida.

Las estructuras de los compuestos anteriores se muestran en la siguiente tabla 1.

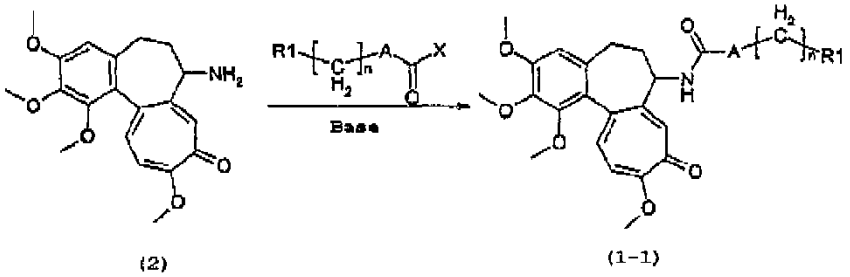
Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura
1		2	
3		4	
5		6	
7		8	
9		10	
11		12	
13		14	
15		16	

Compuesto	Estructura	Compuesto	Estructura
17		18	
19		20	
21		22	

Además, la presente invención proporciona un método para preparar un derivado de la colchicina, comprendiendo el método la etapa de obtener un derivado de la colchicina (fórmula 1-1) haciendo reaccionar un derivado de desacetil colchicina (fórmula 2) con una cantidad equivalente o un exceso de



en presencia de una base o un agente de condensación en un disolvente de reacción para formar amida como se muestra en el siguiente esquema de reacción 1,



(en el que R1 y n son como se definen en la fórmula 1, A es CH_2 u O, y X es un grupo hidroxilo o un grupo cloruro).

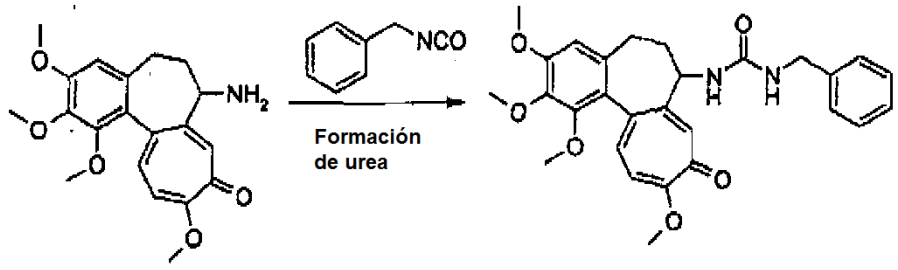
En el método de preparación de acuerdo con la presente invención, una base orgánica tal como piridina, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, DBU, o una base inorgánica tal como NaOH, Na_2CO_3, K_2CO_3, Cs_2CO_3 se puede utilizar preferentemente como base. Como agente de condensación, se puede usar preferiblemente 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI). Como disolvente de reacción, puede usarse preferiblemente un disolvente de éter tal como tetrahidrofurano, dioxano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, N,N'-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido, cloroformo, o mezclas de los mismos. La temperatura de reacción puede ser preferiblemente de 0 °C o el punto de ebullición del disolvente.

Más preferiblemente, cuando A es CH_2 u O y X es un grupo cloruro, se puede utilizar preferentemente como base una cantidad equivalente o un exceso de una base orgánica como piridina, trietilamina, N,N'-diisopropil etilamina, DBU, o una base inorgánica como NaOH, Na_2CO_3, K_2CO_3, Cs_2CO_3. Como disolvente de reacción, se puede usar

preferiblemente un disolvente de éter tal como tetrahidrofurano, dioxano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, N,N'-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido, o mezclas de los mismos. La reacción se puede realizar en el rango de temperatura de 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente. Por otro lado, cuando A es CH_2 y X es un grupo hidroxilo, se puede usar DCC, DIC, EDC, CDI, como agente de condensación. Como disolvente de reacción, se pueden usar diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, DMF o mezclas de los mismos. La reacción se puede realizar desde temperatura ambiente hasta el punto de ebullición del disolvente.

Por otro lado, en la fórmula 1 anterior, un compuesto (fórmula 1-2) en el que R1 es fenilo, n es 1, y A es NH puede prepararse haciendo reaccionar un derivado de desacetil colchicina (fórmula 2) con una cantidad equivalente o un exceso de isocianato de bencilo en un disolvente de reacción para formar urea como se muestra en el siguiente esquema de reacción 2.

[Esquema de reacción 2]

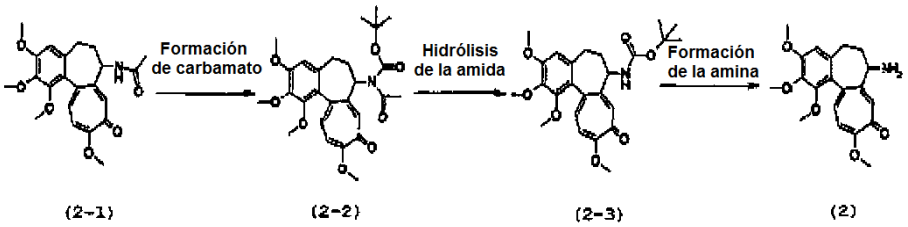


(2) (1-2)

Como disolvente de reacción, se puede usar preferiblemente un disolvente de éter tal como tetrahidrofurano, dioxano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido o mezclas de los mismos. La reacción se puede realizar en el rango de temperaturas desde 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente.

El derivado de desacetil colchicina de fórmula 2 usado como material de partida en los esquemas de reacción 1 y 2 puede prepararse a partir de la colchicina disponible comercialmente mediante la reacción de formación de carbamato, la hidrólisis de la amida y la reacción de formación de la amina como se muestra en el siguiente esquema de reacción 3 (Helv. Chem. Acta 1996, 79, 2346).

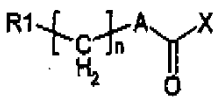
[Esquema de reacción 3]



(2-1) (2-2) (2-3) (2)

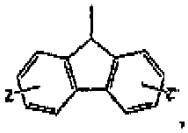
El compuesto de la siguiente fórmula 3 que reacciona con el derivado de desacetil colchicina (fórmula 2) del esquema de reacción 1, se puede preparar por el siguiente método.

[Fórmula 3]



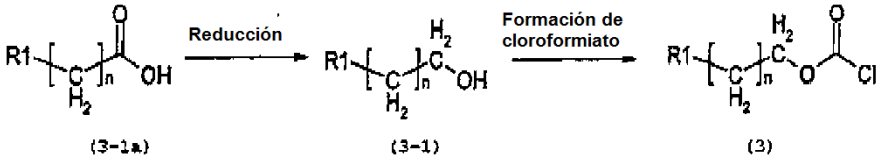
(en la que R1 y n son como se definen en la fórmula 1, A es CH_2 u O, y X es un grupo hidroxilo o un grupo cloruro).

En general, el compuesto de fórmula 3 se puede preparar utilizando un compuesto disponible comercialmente o mediante síntesis de acuerdo con el siguiente esquema de reacción 4, Por otro lado, cuando
R1 es

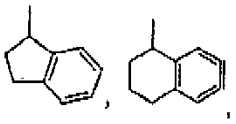


X es un grupo hidroxilo, A es CH_2 y n es 1, el compuesto de fórmula 3 se puede preparar por síntesis de acuerdo con la siguiente reacción 5, Aquí, Z y Z' son cada uno independientemente H.

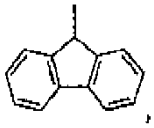
[Esquema de reacción 4]



(en el que R1 es

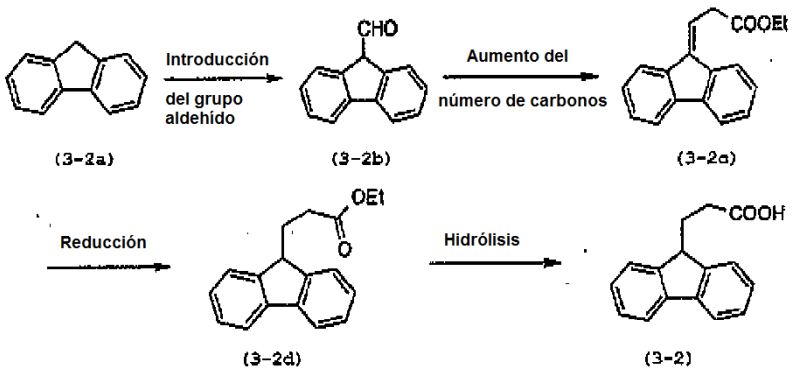


donde n es 0, si R1 es



n es 1).

En el esquema de reacción 4 anterior, el ácido carboxílico (3-1 a) se reduce a un grupo alcohol con un hidruro de litio y aluminio o un complejo de borano tetrahidrofurano utilizando tetrahidrofurano como disolvente de reacción, preparando así un derivado de alcohol. El agente reductor se puede usar en exceso, y la temperatura de reacción puede ser desde 0 °C hasta temperatura ambiente. Después de obtener cloroformiato como compuesto intermedio utilizando una cantidad equivalente o un exceso de fosgeno y trifosgeno, el derivado de alcohol (3-1) obtenido en el esquema de reacción 4 no se purifica más y se hace reaccionar adicionalmente con el compuesto (2) del esquema de reacción 1, Aquí, como disolvente de reacción, se puede usar diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, y la temperatura de reacción puede ser desde 0 °C hasta temperatura ambiente.



El fluoreno (3-2a) utilizado como material de partida en el esquema de reacción 5 se agita a 0 °C durante 30 minutos usando una cantidad equivalente o un exceso de hidruro de sodio como base y luego reacciona con formiato de etilo, preparando así el compuesto (3 -2b) en el que se introduce un grupo aldehído en C-9, Aquí, como disolvente de reacción, se pueden usar diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, DMF. La temperatura de reacción puede ser desde 0 °C hasta temperatura ambiente.

El compuesto éster (3-2c) en el esquema de reacción 5 con un doble enlace exo en C-9 se puede preparar haciendo reaccionar el compuesto aldehído (3-2b) con una cantidad equivalente o un exceso de trifenil (carbetoximetilen)fosforano y un exceso de ácido carboxílico benzoico. Aquí, se puede usar benceno o tolueno como disolvente de reacción, y la reacción se puede realizar desde temperatura ambiente hasta el punto de ebullición del disolvente.

En la reacción de reducción, el compuesto (3-2d) se puede preparar por hidrogenación usando hidrógeno gaseoso en presencia de un catalizador de paladio (Pd/C) o un catalizador de níquel raney o haciendo reaccionar un hidruro

de hidrazina con níquel raney, $SnCl_2 \cdot HCl$, Fe · HCl, etc. En general, la reacción se realiza en un alcohol disolvente como el metanol.

En el esquema de reacción anterior, el derivado de ácido carboxílico (3-2) se puede preparar por hidrólisis del grupo éster del compuesto (3-2d) con una base. Como disolvente, puede usarse un disolvente alcohólico tal como metanol, un disolvente éster tal como tetrahidrofurano, dioxano o mezclas de los mismos. Como base, se puede usar hidróxido de sodio, hidróxido de potasio. Aquí, la cantidad de base utilizada puede ser de 1 a 5 equivalentes, y la temperatura de reacción puede ser de 0 °C o el punto de ebullición del disolvente.

La presente invención comprende los derivados de la colchicina o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y comprende además todos los solvatos, hidratos y estereoisómeros, que pueden prepararse a partir de ellos. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los derivados de la colchicina de acuerdo con la presente invención pueden ser sales de adición de ácido formadas por ácidos libres farmacéuticamente aceptables. Como ácidos libres, se pueden usar ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos. Como ácidos inorgánicos, se pueden usar ácido clorhídrico, ácido brómico, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido fosfórico. Como los ácidos orgánicos, se pueden usar ácido cítrico, ácido acético, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido glicólico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido aspártico. Preferiblemente, se puede usar ácido metanosulfónico, ácido clorhídrico.

Las sales de adición de ácido de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante un método típico de disolución del compuesto de fórmula 1 en un disolvente orgánico miscible con agua tal como acetona, metanol, etanol, acetonitrilo, agregando un exceso de un ácido orgánico o una solución acuosa de un ácido inorgánico, y la precipitación o cristalización de la mezcla resultante. A continuación, el disolvente o un exceso del ácido puede evaporarse de la mezcla y luego secarse para obtener sales de adición de ácido o las sales precipitadas pueden separarse por filtración y recristalizarse.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para inmunomodulación que comprende los derivados de la colchicina o sus sales farmacéuticamente aceptables como principio activo. La inmunomodulación puede modular una respuesta inmunitaria aguda o crónica en el trasplante de órganos.

Los derivados de la colchicina o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de la presente invención tienen efectos inmunomoduladores superiores, efectos secundarios bajos y altas tasas de supervivencia después del trasplante de órganos, en comparación con los inmunomoduladores convencionales y las colchicinas, y por lo tanto se pueden usar de manera eficaz.

Los derivados de la colchicina de la presente invención se pueden usar solos o en combinación con otros inmunomoduladores convencionales. El uso puede depender de los tejidos a partir de los cuales se logran los efectos inmunomoduladores. Por ejemplo, en el caso de tejidos (por ejemplo, corazón), que es vulnerable a la respuesta inmunitaria, se pueden lograr efectos significativos solo con los derivados de la colchicina de la presente invención. Sin embargo, en el caso de tejidos (por ejemplo, células de los islotes) es más ventajoso usar los derivados de la colchicina de la presente invención en combinación con otros inmunomoduladores convencionales (por ejemplo, ciclosporina). Los ejemplos de inmunomoduladores disponibles pueden incluir ciclosporina A, tacrolimus, prednisolona, deflazacort, ácido micofenólico, azatioprina, mizoribina, sirolimus, everolimus, anticuerpo anti-CD25 (Simulect y Zenapax), anticuerpo anti-CD3 (OKT3) y anticuerpo anti-CD20 (rituximab).

El derivado de la colchicina de la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral durante la administración clínica y puede formularse en diversas preparaciones farmacéuticas.

Durante la formulación de las preparaciones, se pueden usar diluyentes o excipientes tales como cargas, diluyentes, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, tensioactivos, etc. Las preparaciones sólidas para administración oral se pueden preparar mezclando al menos un compuesto de la presente invención con al menos un excipiente como almidón, carbonato de calcio, sacarosa o lactosa, gelatina, etc. Asimismo, además de excipientes simples, se pueden usar lubricantes tales como estearato de magnesio o talco. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden incluir suspensiones, soluciones internas, emulsiones, jarabes, etc. Además de diluyentes simples como el agua y la parafina líquida, se pueden incluir varios excipientes como agentes humectantes, edulcorantes, aromas, conservantes, etc. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas o no acuosas esterilizadas, suspensiones, emulsiones, preparaciones de liofilización o supositorios. Se pueden usar propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, ésteres inyectables como oleato de etilo, como soluciones o suspensiones no acuosas. Como base de supositorios pueden usarse Witepsol, macrogol, Tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina, glicerol, gelatina.

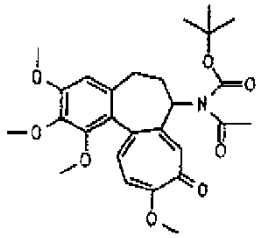
La dosis efectiva del compuesto de acuerdo con la presente invención administrado al cuerpo puede depender de la edad, el peso, el sexo, la vía de administración, las condiciones de salud y la gravedad de un paciente. Para un paciente que pesa 70 kg, la dosis puede ser de 0,1 a 1.000 mg/día, preferiblemente de 1 a 500 mg/día, lo más preferiblemente de 0,7 a 3,5 mg/día. Además, con el consejo de un médico o farmacéutico, el compuesto de acuerdo con la presente invención se puede administrar una o varias veces al día a intervalos regulares.

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos.

En la presente invención, las estructuras moleculares de los compuestos se determinaron mediante espectroscopia infrarroja, espectroscopia de RMN, espectroscopia de masas, cromatografía líquida, cristalografía de rayos X, espectroscopia de rotación óptica, análisis elemental o estudios comparativos entre los valores calculados y los valores observados experimentalmente de compuestos representativos.

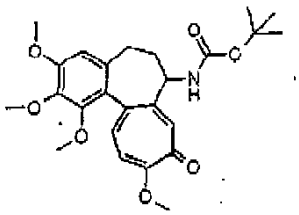
Ejemplo de preparación 1: Preparación de 7-amino-1,2,3,10-tetrametoxi-6,7-dihidro-5H-benzo[a]heptalen-9-ona (fórmula 2) como material de partida

<1-1> Preparación del éster *t*-butílico del ácido acetil-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (2-2)



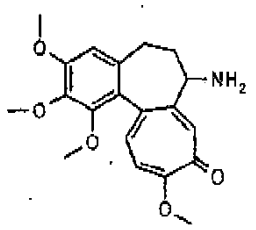
Se disolvieron 100 mg (0,25 mmol) de colchicina en 5 ml de cloruro de metileno y a continuación se añadieron 104 µl (0,75 mmol, 3 eq) de trietilamina, 546 mg (2,5 mmol, 10 eq) de dicarbonato de *t*-butilo y 546 mg (0,25 mmol, 1 eq) de dimetilaminopiridina y se agitaron a 50 °C durante 48 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de cloruro de metileno y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (metanol 5 %/cloruro de metileno) para dar 75 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 75 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,56(s, 9H), 1,92-2,0(m, 1H), 2,28(s, 3H), 2,45-2,54(m, 1H), 2,57-5,71(m, 2H), 3,66(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,93(s, 3H), 3,97(s, 3H), 5,11-5,17(m, 1H), 6,53(s, 1H), 6,74-6,78(d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 7,18-7,22(d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 7,57(s, 1H)
MS (m/e, M+): 499

<1-2> Preparación del éster *t*-butílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (2-3)



Se disolvieron 100 mg (0,2 mmol) del compuesto obtenido en el apartado anterior <1-1> en 4 ml de metanol y a continuación se añadieron 0,15 ml (0,3 mmol, 1,5 eq) de metóxido de sodio 2N y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar 80 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 88 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,24(s, 9H), 1,61-1,69(m, 1H), 2,15-2,34(m, 2H), 2,38-2,44(m, 1H), 3,54(s, 3H), 3,79(s, 3H), 3,82(s, 3H), 3,89(s, 3H), 4,26-4,34(m, 1H), 6,44(s, 1H), 6,71-6,74(d, 1H, *J* = 10,9 Hz), 7,13-7,17(d, 1H, *J* = 10,9 Hz), 7,44(s, 1H)
MS (m/e, M+): 457

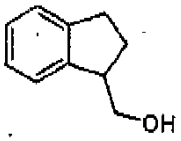
<1-3> Preparación de la 7-amino-1,2,3,10-tetrametoxi-6,7-dihidro-5H-benzo[a]heptalen-9-ona (2)



Se disolvieron 100 mg (0,22 mmol) del compuesto obtenido en el apartado anterior <1-2> en una solución de 10 ml de ácido trifluoroacético y cloruro de metileno (1:10) y luego se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de cloruro de metileno y luego se añadió a una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio para alcalinizar hasta pH 9. La capa orgánica se extrajo y se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (metanol 10 %/cloruro de metileno) para dar 57 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 76 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 1,6-1,64(m, 1H), 2,31-2,47(m, 3H), 3,66(s, 3H), 3,69-3,74(m, 1H), 3,91(s, 3H), 3,99(s, 3H), 3,69-3,74(m, 1H), 3,91(s, 6H), 3,99(s, 3H), 6,54(s, 1H), 6,78-6,82(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,18-7,21(d, 1H, *J* = 10,8 Hz)7,74(s, 1H)
MS (m/e, M+): 357

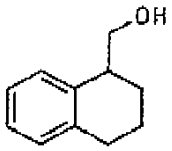
Ejemplo de preparación 2: Preparación del compuesto de fórmula 3 como material de partida

<2-1> Preparación de indan-1-il-metanol



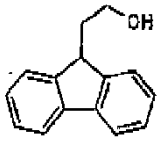
Se disolvieron 150 mg (0,92 mmol) de compuesto ácido indan-1-carboxílico en 9 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 105 mg (2,77 mmol) de hidruro de litio y aluminio a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua lentamente para inactivar la reacción, y cuando se formó un gel añadiendo acetato de etilo, se filtró a través de celite. A continuación, el residuo se disolvió de nuevo en 20 ml de acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar 124 mg de un aceite incoloro (rendimiento: 91 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,89-2,00(m, 1H), 2,21-2,33(m, 1H), 2,83-3,01(m, 2H), 3,34-3,39(m, 1H), 3,76-3,82(m, 2H), 7,15-7,30(m, 4H)
MS (m/e, M+): 148

<2-2> Preparación de (1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-il)-metanol



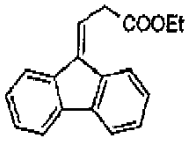
Se disolvieron 200 mg (1,10 mmol) del compuesto ácido 1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-carboxílico en 9 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 129 mg (3,30 mmol) de hidruro de litio y aluminio a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua lentamente para inactivar la reacción, y cuando se formó un gel añadiendo acetato de etilo, se filtró a través de celite. A continuación, el residuo se disolvió de nuevo en 20 ml de acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar 180 mg de aceite incoloro (rendimiento: 97 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,69-1,98(m, 4H), 2,74-2,78(m, 2H), 2,94-3,01(m, 1H), 3,80(d, 2H, *J* = 8,3 Hz), 7,07-7,24(m, 4H)
MS (m/e, M+): 162

<2-3> Preparación de 2-(*9H*-fluoren-9-il)-etanol



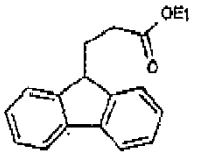
Se disolvieron 200 mg (0,89 mmol) de ácido (9*H*-fluoren-9-il)acético en 9 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 101 mg (2,67 mmol) de hidruro de litio y aluminio a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua lentamente para inactivar la reacción, y cuando se formó un gel añadiendo acetato de etilo, se filtró a través de celite. A continuación, el residuo se disolvió de nuevo en 20 ml de acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:3) para dar 88 mg de un compuesto sólido blanco (rendimiento: 47 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,16(sa, 1H), 2,26-2,33(m, 2H), 3,55-2,63(m, 2H), 4,10-4,14(t, 1H), 7,24-7,39(m, 4H), 7,52-7,54(d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 7,74-7,77(d, 1H, *J* = 7,2 Hz)
MS (m/e, M+): 210

<2-4> Preparación del éster etílico del ácido 3-fluoren-9-iliden-propiónico (3-2c)



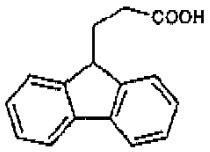
Se disolvieron 100 mg (0,6 mmol) de fluoreno en 10 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 72 mg (1,8 mmol) de hidruro de sodio a 0 °C y se agitó durante 1 hora. A continuación, se añadieron 0,48 ml (6 mmol) de formiato de etilo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los reactantes se disolvieron en 50 ml de acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en 10 ml de benceno y a continuación se añadieron 250 mg (0,72 mmol) de trifenil(carbetoximetilen)-fosforano y 73 mg (0,6 mmol) de ácido benzoico y se agitó a 80 °C durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (acetato de etilo:hexano = 1:40) para dar 80 mg de un compuesto sólido blanco (rendimiento): 50 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,30-1,34(t, 3H, *J* = 7,1 Hz), 3,86-3,88(d, 2H, *J* = 7,1 Hz), 6,93-6,98(t, 1H, *J* = 6,9 Hz), 7,25-7,40(m, 4H), 7,67-7,78(m, 4H)
MS (m/e, M+): 264

<2-5> Preparación del éster etílico del ácido 3-(*9H*-fluoren-9-il)-propiónico (3-2d)



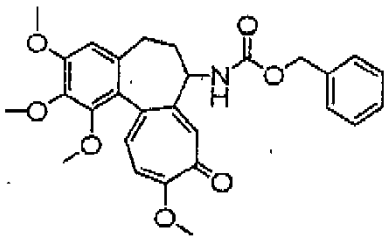
Se disolvieron 160 mg (0,61 mmol) del compuesto obtenido en el apartado anterior <2-4> en metanol, y a continuación se añadieron gota a gota 16 mg de paladio/carbón al 10 %, se purgó con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez que la reacción se extinguió, la solución de reacción se filtró a través de celite y se evaporó a presión reducida para dar 159 mg de un compuesto sólido blanco (rendimiento: 98 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,13-1,18(t, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,92-1,97(m, 2H), 2,39-2,46(m, 2H), 3,97-4,04(m, 2H), 4,05-4,09(m, 1H), 7,25-7,49(m, 4H), 7,50-7,52(d, 2H, *J* = 6,9 Hz), 7,73-7,75(d, 2H, *J* = 7,4 Hz)
MS (m/e, M+): 266

<2-6> Preparación del ácido 3-(*9H*-fluoren-9-il)-propiónico (3-2)



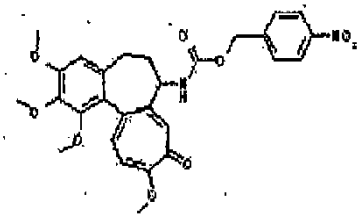
Se disolvieron 157 mg (0,59 mmol) del compuesto obtenido en el apartado anterior <2-5> en 10 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 0,59 ml (1,18 mmol) de una solución de hidróxido de sodio 2N y se agitó a 80 °C durante dos horas. Se añadió ácido clorhídrico 2N a los reactantes que se acidificaron a pH 4 y se disolvieron en 40 ml (20 ml x 2) de acetato de etilo, y después se extrajo la capa orgánica. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para dar 131 mg de un compuesto sólido blanco (rendimiento: 94 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1,84-1,91 (m, 2H), 2,22-2,29(m, 2H), 4,04-4,07(t, 1H), 7,31-7,41 (m, 4H), 7,58-7,60(d, 2H, J = 7,2 Hz), 7,86-7,89(d, 2H, *J* = 7,2 Hz)
MS (m/e, M+): 238

Ejemplo 1: Preparación del éster bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 1)



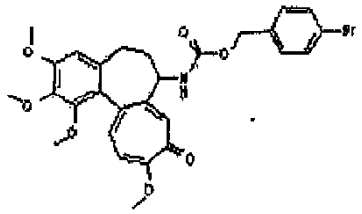
Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 3 ml de tetrahidrofurano y después se añadieron 78 µl (0,56 mmol, 2 eq) de trietilamina y 60 µl (0,42 mmol, 1,5 eq) de cloroformiato de bencilo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo, y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 137 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 61 %).
RMN de ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) δ 1,71-1,79(m, 1H), 2,25-2,53(m, 3H), 3,64(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,98(s, 3H), 4,43-4,47(m, 1H), 4,91(d, 1H, J = 12,3 Hz), 5,07(d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 5,38(d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 6,53(s, 1H), 6,89(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,28-7,36(m, 6H), 7,52(s, 1H)
MS (m/e, M+): 491

Ejemplo 2: Preparación del éster 4-nitro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 2)



Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 3 ml de tetrahidrofurano y después se añadieron 78 µl (0,56 mmol, 2 eq) de trietilamina y 90 µl (0,42 mmol, 1,5 eq) de cloroformiato de 4-nitro bencilo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo, y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 100 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 67 %).
RMN de ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) δ = 1,79-1,80(m, 1H), 2,29-2,56(m, 3H), 3,63(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,93(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,43-4,47(m, 1H), 5,01(d, 1H, *J* = 13,5 Hz), 5,15(d, 1H, *J* = 13,2 Hz), 5,56(d, 1H, J = 7,2 Hz), 6,54(s, 1H), 6,82(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,29(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,43(d, 2H, J = 8,7 Hz), 7,51(s, 1H), 8,18(d, 2H, *J* = 8,7 Hz)
MS (m/e, M+): 536

Ejemplo 3: Preparación del éster 4-bromo-bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 3)

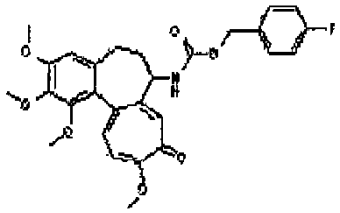


Se disolvieron 157 mg (0,84 mmoles) de alcohol 4-bromobencílico en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmoles) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 54 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 34 %).

RMN de ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) δ 1,84-1,90(m, 1H), 2,33-2,54(m, 3H), 3,68(s, 3H), 3,88(s, 3H), 3,91(s, 3H), 3,95(s, 3H), 4,42-4,50(m, 1H), 4,78(d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 4,98(d, 1H, J = 12 Hz), 6,24(d, 1H, *J* = 6,9 Hz), 6,55(s, 1H), 6,80(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,08(d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,29(d, 1H, *J* = 11,7 Hz), 7,39(d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,63(s, 1H)

MS (m/e, M+): 571

Ejemplo 4: Preparación del éster 4-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 4)

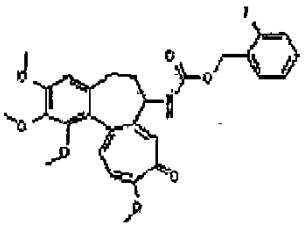


Se disolvieron 105 mg (0,84 mmoles) de alcohol 4-fluorobencílico en 8 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmoles) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1: 4) para dar 110 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 77 %).

RMN de ^{1}H (300MHz, CDCl3) δ 1,72-1,74(m, 1H), 2,27-2,51(m, 3H), 3,64(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,42-4,46(m, 1H), 4,88(d, 1H, J = 12 Hz), 5,03(d, 1H, J = 12 Hz), 5,25(d, 1H, J = 7,2 Hz), 6,53(s, 1H), 6,81 (d, 1H, J = 10,8 Hz), 7,02(t, 2H), 7,28-7,29(m, 3H), 7,48(s, 1H)

MS (m/e, M+): 509

Ejemplo 5: Preparación del éster 2-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-6,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 5)



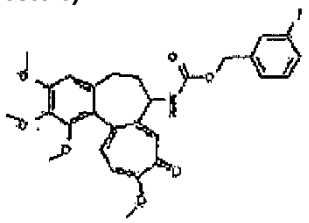
Se disolvieron 106 mg (0,84 mmol) de alcohol 2-fluorobencílico en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se

añadieron 2,2 ml (1,40 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 106 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 75 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,61-1,79(m, 1H), 2,26-2,56(m, 3H), 3,64(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,20-4,50(m, 1H), 4,97(d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 5,17(d, 1H, J = 12,3 Hz), 5,35(d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 6,53(s, 1H), 6,81(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,00-7,14(m, 2H), 7,26-7,35(m, 3H), 7,51(s, 1H)

MS (m/e, M+): 509

Ejemplo 6: Preparación del éster 3-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-6,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 6)

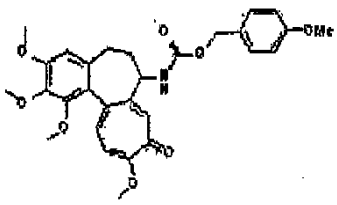


Se disolvieron 106 mg (0,84 mmol) de alcohol 3-fluorobencílico en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 115 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 81 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,74-1,84(m, 1H), 2,26-2,56(m, 3H), 3,62(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,18-4,50(m, 1H), 4,86(d, 1H, *J* = 12,6 Hz), 5,07(d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 5,59(d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 6,54(s, 1H), 6,81(d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 7,95-7,05(m, 2H), 7,24-7,32(m, 3H), 7,54(s, 1H)

MS (m/e, M+): 509

Ejemplo 7: Preparación del éster 4-metoxi bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il) carbámico (Compuesto 7)

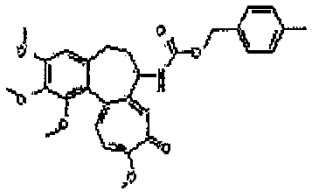


Se disolvieron 116 mg (0,84 mmol) de alcohol 4-metoxibencílico en 8 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1: 4) para dar 68 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 47 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,68-1,78(m, 1H), 2,22-2,55(m, 3H), 3,65(s, 3H), 3,77(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,98(s, 3H), 4,40-4,49(m, 1H), 4,83(d, 1H, J = 11,7 Hz), 5,01(d, 1H, *J* = 11,7 Hz), 5,35(d, 1H, J = 7,2 Hz), 6,53(s, 1H), 6,79-6,87(m, 3H), 7,21-7,29(m, 3H), 7,51(s, 1H)

MS (m/e, M+): 521

Ejemplo 8: Preparación del éster 4-metilbencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 8)

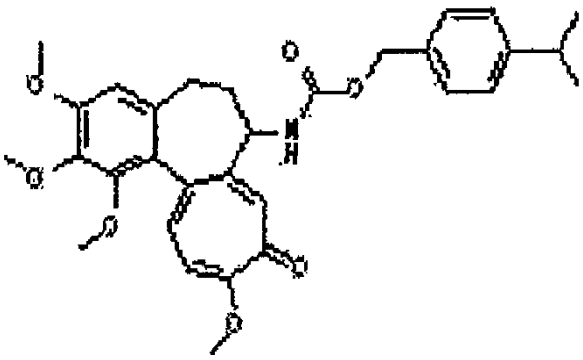


Se disolvieron 102 mg (0,84 mmoles) de alcohol 4-metilbencílico en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmoles) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 93 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 66 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,70-1,78(m, 1H), 2,17-2,55(m, 6H), 3,64(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,40-4,49(m, 1H), 4,86(d, 1H, J = 12 Hz), 5,03(d, 1H, J = 12 Hz), 5,31(d, 1H, J = 7,5 Hz), 6,53(s, 1H), 6,81 (d, 1H, J = 10,8 Hz), 7,07-7,29(m, 5H), 7,51 (s, 1H)

MS (m/e, M+): 505

Ejemplo 9: Preparación del éster 4-isopropilbencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,8,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 9)

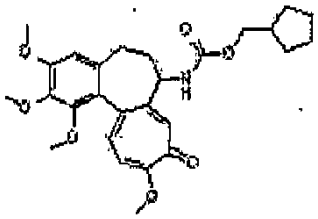


Se disolvieron 126 mg (0,84 mmol) de alcohol 4-isopropilbencílico en 8 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y luego el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 121 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 81 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,23(d, 6H, J = 3,9 Hz), 1,69-1,78(m, 1H), 2,23-2,55(m, 3H), 2,84-2,93(m, 1H), 3,64(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,98(s, 3H), 4,41-4,49(m, 1H), 4,86(d, 1H, J = 12 Hz), 5,04(d, 1H, J = 12 Hz), 5,37(d, 1H, J = 7,2 Hz), 6,53(s, 1H), 6,81(d, 1H, J = 10,8 Hz), 7,12-7,30(m, 5H), 7,52(s, 1H)

MS (m/e, M+): 533

Ejemplo 10: Preparación del éster ciclopentil metílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptaen-7-il)-carbámico (Compuesto 10)

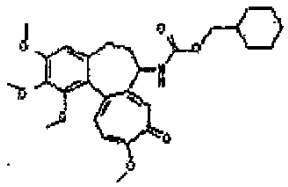


Se disolvieron 84 mg (0,84 mmoles) de ciclopentano metanol en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmoles) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 105 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 78 %).

RMN de ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) δ 1,17-1,25(m, 2H), 1,48-1,78(m, 6H), 2,09-2,17(m, 1H), 2,26-2,56(m, 3H), 3,62(s, 3H), 3,78-3,86(m, 2H), 3,90(s, 3H), 3,92(s, 3H), 3,93(s, 3H), 3,99-4,44(m, 1H), 5,17(d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 6,53(s, 1H), 6,80(d, 1H, *J* = 11,1 Hz), 7,27(d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 7,48(s, 1H)

MS (m/e, M+): 483

Ejemplo 11: Preparación del éster ciclohexilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 11)

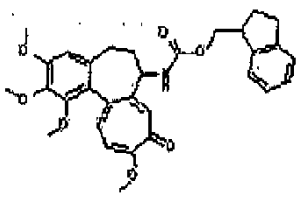


Se disolvieron 96 mg (0,84 mmol) de ciclohexil metanol en 8 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 109 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 78 %).

RMN de ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) δ 0,88-0,95(m, 2H), 1,10-1,27(m, 3H), 1,54-1,78(m, 6H), 2,24-2,56(m, 3H), 3,62(s, 3H), 3,69-3,82(m, 2H)3,90(s, 3H), 3,92(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,38-4,47(m, 1H), 5,19(d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 6,53(s, 1H), 6,80(d, 1H, *J* = 11,1 Hz), 7,27(d, 1H, *J* = 10,5 Hz), 7,48(s, 1H)

MS (m/e, M+): 497

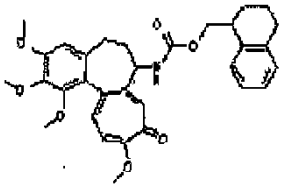
Ejemplo 12: Preparación del éster indan-1-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 12)



Se disolvieron 124 mg (0,84 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <2-1> en 8 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 2,2 ml (4,20 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y

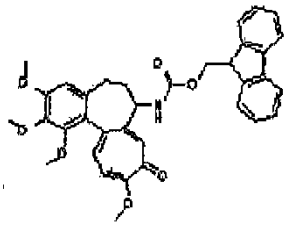
100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,78 mmol, 2 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 121 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 81 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,73-1,83(m, 2H), 2,14-2,56(m, 4H), 2,82-2,90(m, 2H), 3,31-3,35(m, 1H), 3,58(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,93(s, 3H), 3,98-4,02(m, 4H), 4,17-4,22(m, 1H), 4,43-4,47(m, 1H), 5,62(d, 1H, *J* = 6 Hz), 6,54(s, 1H), 6,81 (d, 1H, *J* = 12 Hz), 7,12-7,29(m, 5H), 7,57(s, 1H)
MS (m/e, M+): 531

Ejemplo 13: Preparación del éster 1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 13)



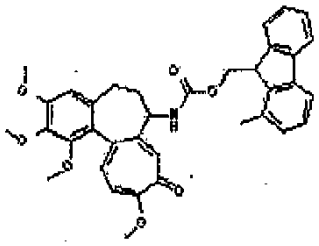
Se disolvieron 136 mg (0,84 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <2-2> en 8 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 2,2 ml (4,20 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,78 mmol, 2 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 140 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 92 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,65-1,79(m, 4H), 2,26-2,57(m, 4H), 2,72-2,74(m, 2H), 2,97-3,05(m, 1H), 3,63(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,93-3,95(4H; s, 3H - m, 1H), 3,99(s, 3H), 4,22-4,27(m, 1H), 4,41-4,47(m, 1H), 5,37-5,39(d, 1H, *J* = 7,4 Hz), 6,54(s, 1H), 6,79-6,84(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,01-7,16(m, 4H), 7,25-7,29(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,52(s, 1H)
MS (m/e, M+): 545

Ejemplo 14: Preparación del éster *9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 14)



Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 10 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 58 µl (0,4 mmol) de trietilamina y 86 mg (0,32 mmol) de cloroformiato de 9-fluorenilmetilo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo, y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (acetona; cloruro de metileno = 1:4) para dar 155 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 96 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,00-2,05(m, 1H), 2,39-2,57(m, 3H), 3,28(s, 3H), 3,78-4,03(m, 11H), 4,41-4,56(m, 2H), 6,54(s, 1H), 6,70-6,76(m, 2H), 7,17-7,39(m, 5H), 7,49-7,56(m, 2H), 7,69-7,71 (d, 2H, *J* = 6,7 Hz), 7,86(s, 1H)
MS (m/e, M+): 579

Ejemplo 15: Preparación del éster 1-metil-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 15)

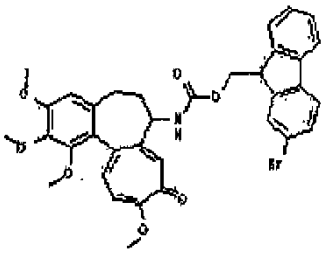


Se disolvieron 176 mg (0,84 mmol) de (1-metil-*9H*-Fluoren-9-il)-metanol en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 2,2 ml (4,20 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (metanol:cloruro de metileno = 1:19) para dar 41 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 33 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,77(m, 1H), 2,23(m, 3H), 2,45(s, 3H), 3,58(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,92(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,08(m, 2H), 4,44(m, 1H), 4,71(dd, 1H), 5,40(m, NH), 6,53(s, 1H), 6,78(m, 1H), 7,05(t, 1H), 7,07(m, 4H), 7,46(s, 1H), 7,62(m, 2H), 7,70(d, 1H)

MS (m/e, M+): 593

Ejemplo 16: Preparación del éster 2-bromo-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-6,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico ácido (Compuesto 16)

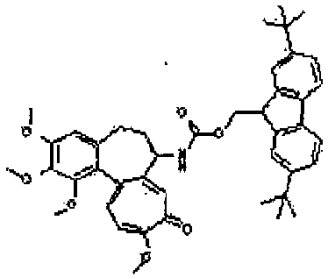


Se disolvieron 231 mg (0,84 mmol) de (2-bromo-*9H*-fluoren-9-il)-metanol en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 2,2 ml (4,20 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida, y después el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol, 3 eq) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (metanol:cloruro de metileno = 1:19) para dar 70 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 39 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, CDCl3) δ 2,05(m, 1H), 2,39(m, 3H), 3,66(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,91(s, 3H), 3,97(m, 4H), 4,21(m, 1H), 4,44(m, 2H), 5,84(m, NH), 6,55(s, 1H), 6,77(d, 1H), 7,25(m, 2H), 7,51(m, 7H)

MS (m/e, M+): 658

Ejemplo 17: Preparación del éster 2,7-di-terc-butil-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 17)

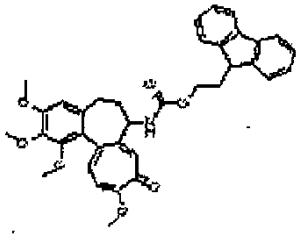


Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 3 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina y 156 mg (0,42 mmol) de cloroformiato de 2,7 di-terc-butil-9-fluorenilmetilo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 174 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 90 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,31(s, 9H), 1,34(s, 9H), 1,76-1,84(m, 1H), 2,22-2,56(m, 3H), 3,59(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,92(s, 3H), 3,98(s, 3H), 4,02-4,07(m, 1H), 4,30-4,34(m, 2H), 4,41-4,49(m, 1H), 5,43-5,45(d, 1H, *J* = 7,4 Hz), 6,53(s, 1H), 6,78-6,82(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,25-7,28(m, 1H), 7,37-7,39(d, 2H, *J* = 8 Hz), 7,50-7,66(m, 5H)

MS (m/e, M+): 691

Ejemplo 18: Preparación del éster 2-(*9H*-fluoren-9-il)-etílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-6,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico (Compuesto 18)

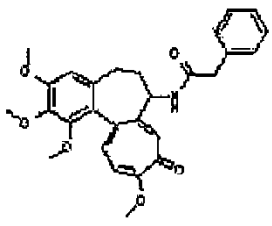


Se disolvieron 176 mg (0,84 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <2-3> en 8 ml de tetrahidrofurano y a continuación se añadieron 2,2 ml (1,40 mmol) de una solución de fosgeno al 20 % a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, y luego el residuo y 100 mg (0,28 mmol) del compuesto preparado en el Ejemplo de preparación <1-3> se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano. A continuación, se añadieron 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 154 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 93 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,64-1,74(m, 1H), 2,18-2,54(m, 5H), 3,59(s, 3H), 3,86-3,96(m, 11H), 4,01-4,06(t, 1H), 4,30-4,38(m, 1H), 5,05-5,08(d, 1H, *J* = 6,7 Hz), 6,53(s, 1H), 6,76-6,80(d, 1H, *J* = 10,9 Hz), 7,21-7,37(m, 5H), 7,44-7,49(m, 3H), 7,72-7,75(d, 2H, *J* = 7,3 Hz)

MS (m/e, M+): 593

Ejemplo 19: Preparación de la 2-fenil-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-acetamida (Compuesto 19)

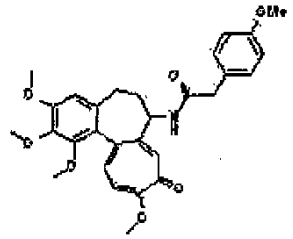


Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina y 65 mg (0,42 mmol) de cloruro de fenilacetilo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 113 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 85 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,61-1,71(m, 1H), 2,08-2,17(m, 1H), 2,33-2,51(m, 2H), 3,56(s, 2H), 3,65(s, 3H), 3,89(s, 3H), 3,93(s, 3H), 3,99(s, 3H), 4,59-4,66(m, 1H), 5,99-5,97(d, 1H, *J* = 6 Hz), 6,51(s, 1H), 6,78-6,81 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7,26-7,39(m, 7H)

MS (m/e, M+): 475

Ejemplo 20; Preparación de la 2-(4-metoxi-fenil)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-acetamida (compuesto 20)

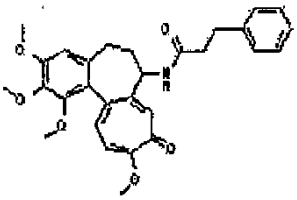


Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 8 ml de tetrahidrofurano, y a continuación se añadieron 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina y 77 mg (0,42 mmol) de cloruro de 4-metoxi acetilo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de acetato de etilo y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 100 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 71 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,67-1,73(m, 1H), 2,08-2,17(m, 1H), 2,32-2,51(m, 2H), 3,57(s, 2H), 3,66(s, 3H), 3,80(s, 3H), 3,88(s, 3H), 3,93(s, 3H), 3,98(s, 3H), 4,56-4,63(m, 1H), 6,13-6,15(d, 1H, *J* = 6 Hz), 6,49(s, 1H), 6,78-6,82(d, 1H, *J* = 12 Hz), 6,87-6,90(d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 7,16-7,19(d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,26-7,30(d, 1H, *J* = 12 Hz)

MS (m/e, M+): 505

Ejemplo 21: Preparación de la 3-fenil-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-propionamida (Compuesto 21)

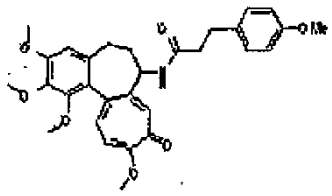


Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 3 ml de cloruro de metileno y a continuación se añadieron 80 mg (0,42 mmol) de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), 18 mg (0,14 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina y 62 mg (0,40 mmol) de ácido hidrocinámico a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de cloruro de metileno y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 81 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 59 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,73-1,81(m, 1H), 2,14-2,22(m, 1H), 2,32-2,54(m, 4H), 2,85-2,90(2, 1H), 3,66(s, 3H), 3,90(s, 3H), 3,95(s, 3H), 3,97(s, 3H), 4,60-4,69(m, 1H), 6,52(s, 1H), 6,63-6,65(d, 1H. *J* = 6,9 Hz), 6,80-6,84(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,11-7,33(m, 6H), 7,41(s, 1H)

MS (m/e, M+): 489

Ejemplo 22: Preparación de la 3-(4-metoxi-fenil)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-propionamida (Compuesto 22)



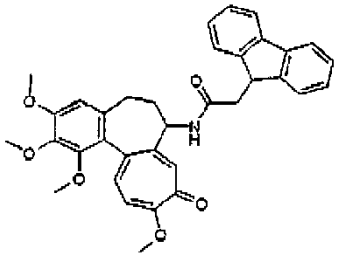
Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 3 ml de cloruro de metileno y a continuación se añadieron 80 mg (0,42 mmol) de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), 18 mg (0,14 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina, y 62 mg (0,40 mmol) de ácido 3-(4-metoxifenil)propiónico a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de cloruro de metileno y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 131 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 90 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,72-1,82(m, 1H), 2,18-2,23(m, 1H), 2,33-2,51(m, 4H), 2,80-2,85(2, 1H), 3,67(s, 3H), 3,78(s, 3H), 3,91(s, 3H), 3,95(s, 3H), 3,98(s, 3H), 4,61-4,69(m, 1H), 6,53(s, 1H), 6,69-6,85(m, 4H), 7,03-7,06(d, 2H, *J* = 9 Hz), 7,27-7,34(m, 1H), 7,43(s, 1H)

MS (m/e, M+): 519

Los ejemplos 23 a 25 están fuera del alcance de la presente invención.

Ejemplo 23: Preparación de la 2-(*9H*-fluoren-9-il)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-banzo[a]heptalen-7-il)-acetamida (Compuesto 23)

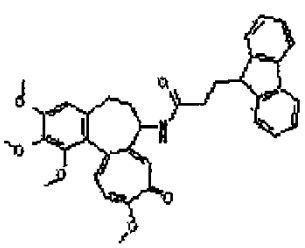


Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 3 ml de cloruro de metileno y a continuación se añadieron 80 mg (0,42 mmol) de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), 18 mg (0,14 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina y 94 mg (0,42 mmol) de ácido 9-fluorenacético a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de cloruro de metileno y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 40 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 59 %).

RMN de ^{1}H (300 MHz, $COCl_3$): δ = 1,61-1,67(m, 1H), 2,07-2,16(m, 1H), 2,33-2,54(m, 2H), 2,66-2,70(m, 2H), 3,71(s, 3H), 3,92(s, 3H), 3,97(s, 3H), 3,98(s, 3H), 4,40-4,45(t, 1H), 4,65-4,73(m, 1H), 5,84-5,87(d, 1H, *J* = 6,9 Hz), 6,54(s, 1H), 6,79-6,83(d, 1H, *J* = 10,6 Hz), 7,23-7,46(m, 8H), 7,74-7,76(m, 2H);

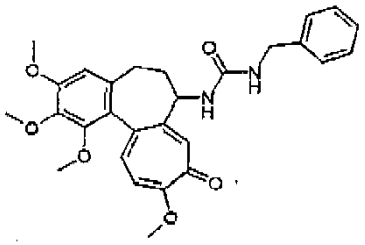
MS (m/e, M+): 563

Ejemplo 24: Preparación de la 3-(*9H*-fluoren-9-il)-N-(1,2,3,10-tetramotoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il) -propionamida (Compuesto 24)



Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> en 3 ml de cloruro de metileno y a continuación se añadieron 80 mg (0,42 mmol) de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), 18 mg (0,14 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 116 µl (0,84 mmol) de trietilamina y 100 mg (0,42 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <2-6> a 0 °C y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió de nuevo en 50 ml de cloruro de metileno y después la capa orgánica se lavó con agua destilada tres veces. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, y el residuo obtenido concentrando el filtrado a presión reducida se purificó por cromatografía en columna de sílice (acetona:cloruro de metileno = 1:4) para dar 110 mg de un compuesto sólido en forma de espuma amarilla (rendimiento: 68 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,58-1,88(m, 3H), 2,00-2,12(m, 1H), 2,27-2,48(m, 4H), 3,65(s, 3H), 3,89(s, 3H), 3,94(s, 3H), 3,95(s, 3H), 4,04-4,06(t, 1H), 4,42-4,50(m, 1H), 6,00-6,02(d, 1H, *J* = 6,7 Hz), 6,50(s, 1H), 6,77-6,80(d, 1H, *J* = 10,8 Hz), 7,18-7,37(m, 6H), 7,42-7,48(m, 2H), 7,70-7,73(d, 2H, *J* = 7,3 Hz)
MS (m/e, M+): 577

Ejemplo 25: Preparación de la 1-bencil-3-(1,2,3,10-tatrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-urea (Compuesto 25)



Se disolvieron 100 mg (0,28 mmol) del compuesto obtenido en el Ejemplo de preparación <1-3> y a continuación se añadieron 38 µl (0,31 mmol) de bencilisocianato en 2 ml de cloruro de metileno y después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de inactivar la reacción, la solución de reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna (metanol 5 %/diclorometano) para dar 125 mg de un sólido blanco (rendimiento: 91 %).
RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,87(m, 1H), 2,52(m, 3H), 3,67(s, 3H), 3,70(s, 3H), 3,92(s, 3H), 3,95(s, 3H), 4,23(dd, *J* = 6,0 Hz, 15,0 Hz, 1H), 4,41 (dd, *J* = 6,0 Hz, 15,0 Hz, 1H), 4,81(m, 1H), 6,11(m, 1H), 6,55(s, 1H), 6,75(d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 6,84(m, 1H), 7,11(m, 1H), 7,19(m, 3H), 7,35(d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 7,96(s, 1H)
MS (m/e, M): 490

Ejemplos experimentales

Los siguientes experimentos se realizaron en el compuesto de fórmula 1 seleccionado del grupo de compuestos 1) a 22) para investigar diversas acciones farmacológicas. La dosis de los derivados de la colchicina depende y varía según la edad, el peso, el efecto terapéutico esperado, la vía de administración, el período de tratamiento, de un animal o ser humano. Sin embargo, se pueden obtener efectos satisfactorios utilizando dosis de 10, 50, 100 a 500 µg/kg.

Ejemplo Experimental 1: prueba de citotoxicidad

La prueba de citotoxicidad se realizó para determinar la toxicidad de los materiales candidatos inmunosupresores mezclando los materiales candidatos inmunosupresores con células de bazo de ratas en medios de cultivo y midiendo el grado de toxicidad en las células. En detalle, se sembraron células de bazo de rata a una densidad celular de 5 x 10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, y se añadió ciclosporina A y los derivados de la colchicina de la presente invención. Las concentraciones de los fármacos fueron 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000 y 100000 ng/ml. Las células se cultivaron en una incubadora de CO_2 durante 72 horas, y luego cada pocillo se trató con 10 µl de CCK-SK (Dojindo, Japón). Posteriormente, las células fueron cultivadas de nuevo en la incubadora de CO_2 durante 4 horas, y luego se midió la absorbancia (valor D.O.) a 450 nm utilizando un espectrofotómetro.

Como resultado del experimento, se determinó que los compuestos derivados de la colchicina de la presente invención (compuestos 1, 7, 9, 14, 15, 17, 18 y 22) no tenían citotoxicidad incluso a concentraciones de 100 ng a 10000 ng/ml.

Ejemplo experimental 2: Medición de las funciones inmunosupresoras mediante la prueba de reacción mixta de linfocitos (MLR)

Se realizó una prueba de reacción de linfocitos mixtos (MLR) para examinar los efectos inmunomoduladores de los derivados de la colchicina de acuerdo con la presente invención. Cuando ambas células respondedoras (células de

bazo de rata Wistar) y células estimuladoras (células de bazo de rata de Lewis, irradiadas) se cultivan solas, a menudo no se produce el crecimiento de células. Sin embargo, cuando ambas células se cultivan conjuntamente, las células proliferan por interacción célula-célula. Aquí, es posible determinar los efectos inmunomoduladores de los materiales candidatos inmunomoduladores mezclando los materiales candidatos inmunomoduladores con las células en proliferación y midiendo el grado de inhibición de la proliferación.

En detalle, las células respondedoras (células de bazo de rata Wistar, 2,5 x 10^5 células por pocillo) y células estimuladoras (células de bazo de rata Lewis, 5 x 10^5 células por pocillo) se cultivaron conjuntamente y se trataron con los derivados de la colchicina de la presente invención. Se usó ciclosporina A como grupo de control. Las concentraciones de los fármacos fueron 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000 y 100000 ng/ml. Las células se cultivaron en una incubadora de CO_2 durante 72 horas. En el día 2 todos los pocillos fueron pulsados con ^{3}H-timidina y se incubaron durante 24 h más a 37 °C en CO_2 5 %. Después de la recolección celular, se midió la incorporación de timidina usando un contador β.

Como resultado de la medición, como se muestra en la FIG. 1, se determinó que los compuestos derivados de la colchicina de la presente invención (compuestos 1, 7, 9, 14, 15, 17, 18 y 22) inhibían el crecimiento de la células a concentraciones de 100 a 1000 ng/ml, lo que indica que los compuestos de la presente invención tenían efectos inmunomoduladores superiores.

Ejemplo experimental 3: modulación de la respuesta inmunitaria de acuerdo con el trasplante alogénico de corazón

Se extrajeron corazones de ratas Lewis (donantes) de 8 semanas de edad que pesaban aproximadamente 250 g y se realizó un trasplante de corazón heterotópico abdominal en la cavidad abdominal de ratas Wistar de 8 semanas de edad (receptor) con un peso aproximado de 300 g por pinzamiento cruzado de la vena cava caudal y la aorta abdominal del receptor tanto proximal como distalmente del sitio anastomótico. Después del trasplante de corazón, se inyectaron por vía intravenosa a los grupos experimentales ciclosporina A (5 mg/kg), colchicina (10 µg y 40 µg/kg) y un compuesto de derivado de la colchicina 14 (10 µg y 40 µg/kg), respectivamente, durante 14 días.

La frecuencia cardíaca de cada rata en un grupo de control no tratado y los grupos experimentales se midió mediante palpación abdominal desde la fecha del trasplante de corazón, y la frecuencia cardíaca se clasificó como ++++ (latidos cardíacos fuertes y rápidos), +++ (latidos cardíacos fuertes o rápidos), ++ (latidos cardíacos débiles y lentos pero distintos), + (latidos cardíacos débiles pero constantes) y ± 0 (latidos cardíacos intermitentes). Los resultados de la medición se muestran en la siguiente tabla 2.

Trasplante alogénico de corazón

Grupo		Población	Número de días durante los cuales se mantuvo la frecuencia cardíaca (día)	Promedio (día)
Grupo de control		8	7, 7, 8, 9, 9, 11, 11, 12	9,2±1,9
CsA (5 mg/kg)		3	166, >182, >200	182,6:1:17,0
Colchicina	10 µg/kg	3	12, 12, >186	>70±100,5
	40 µg/kg	4	13, 14, >32*, >187	>73,3±85,4
Compuesto 14	10 µg/kg	3	9, >139, >173	>107±86,6
	40 µg/kg	2	>173, >174	>173,5±0,7
* Muerte				

Como resultado del experimento, se pudo ver que el latido del corazón se detuvo debido al rechazo de los corazones trasplantados en el grupo de control no tratado después de 8 a 9 días.

Por el contrario, se observó que en el grupo experimental, al que se administró ciclosporina A (5 mg/kg), se detuvo el latido cardíaco de una rata después de 166 días, y el latido cardíaco de dos ratas continuó durante 200 días y 182 días. Además, se observó que en el grupo experimental, al que se administró colchicina (10 µg/kg), se detuvo el latido cardíaco de dos ratas después de 12 días, y el latido cardíaco de una rata continuó durante 186 días, y en el grupo experimental, al que se administró colchicina (40 µg/kg), se detuvo el latido cardíaco de dos ratas después de 13 días y 14 días, y el latido cardíaco de una rata continuó durante 187 días.

Por otro lado, se observó que en el grupo experimental, al que se administró el compuesto de colchicina 14 (10 µg/kg), se detuvo el latido cardíaco de una rata después de 9 días, y el latido cardíaco de dos ratas continuó durante 139 días y 173 días, y en el grupo experimental, al que se administró el compuesto derivado de la colchicina 14 (40 µg/kg), el latido del corazón de todas las ratas continuó durante 173 días y 174 días.

Las observaciones anteriores indican que los derivados de la colchicina de la presente invención exhiben efectos

inmunomoduladores similares incluso en una pequeña cantidad en comparación con la ciclosporina A, y exhiben efectos inmunosupresores superiores, en particular, en comparación con las colchicinas.

Ejemplo experimental 4: modulación de la respuesta inmunitaria de acuerdo con el trasplante alogénico de células de los islotes pancreáticos

La estreptozotocina es un medicamento que destruye las células de los islotes pancreáticos para inducir la diabetes y se utiliza para crear modelos experimentales de animales diabéticos. Los islotes alogénicos se trasplantaron en los hígados de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina mediante inyección en la vena porta. El funcionamiento de los islotes trasplantados se evaluó mediante mediciones diarias de los niveles de glucosa en sangre. Los islotes se consideraron rechazados cuando el nivel de glucosa en la sangre era ≥ 200 mg/dl en dos días consecutivos. Aquí, los inmunomoduladores como la ciclosporina A, que son medicamentos para suprimir la respuesta inmunitaria, se utilizan para evitar que las células de los islotes trasplantados se destruyan.

Se inyectaron por vía intraperitoneal 35 mg/kg de estreptozotocina (50 mg/ml) disueltos en una solución de tampón de citrato 0,1 M (pH 4,5) en ratas Fischer 344 macho de 8 semanas de edad (F344) que pesaban entre 200 y 220 g. A continuación, el nivel de glucosa en sangre se midió después de 1 semana, y el primer día cuando el nivel de glucosa en sangre aumentó más de 300 mg/dl y el aumento se repitió más de dos veces se consideró como la fecha de diagnóstico de la diabetes. Las ratas se utilizaron en el trasplante 3 semanas después de la administración de estreptozotocina.

Los páncreas de ratas Lewis de 8 semanas de edad se extrajeron a las 3 semanas posteriores a la inducción de la diabetes en ratas Fischer y se aislaron las células de los islotes. Las células aisladas de los islotes fueron cultivadas en una incubadora de CO_2 a 37 °C durante un día, y las células de los islotes cultivadas fueron trasplantadas en ratas Fischer diabéticas.

<4-1> Administración única intraperitoneal

La ciclosporina (5 mg/kg), la colchicina (10 µg/kg y 40 µg/kg) y los compuestos derivados de la colchicina (compuestos 1, 7, 9, 14, 15, 17, 18 y 22; 50 µg/kg) fueron administrados a las ratas Fischer, a las que se trasplantaron las células de los islotes, durante 14 días a partir de la fecha del trasplante, y se examinó el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre hasta que se produjo el rechazo desde la fecha del trasplante. Los resultados experimentales se muestran en la siguiente tabla 3.

Trasplante alogénico de células de los islotes pancreáticos - Administración intraperitoneal única

Grupo		Población	Número de días durante los cuales se mantuvo la función de las células de los islotes (día)	Promedio (día)
Grupo de control		9	4, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6	5±0,5
CsA (5 mg/kg)		5	5, 7, 7, 13, 14	9,2±4,02
Colchicina	10 µg/kg	2	5, 5	5
	40 µg/kg	4	2*, 2*, 6, 9*	6
Compuesto 7	50 µg/kg	3	5, 5, 7	5,7±1,16
Compuesto 9	50 µg/kg	3	5, 6, 6	5,7±0,58
Compuesto14	10 µg/kg	2	5, 5	5,5±0,71
	40 µg/kg	2	6, 7	6,5±0,71
* Muerte				

Como resultado del experimento, se pudo ver que el rechazo de las células de los islotes trasplantados ocurrió en el grupo de control no tratado después de 5 a 6 días. Por el contrario, el rechazo de las células de los islotes trasplantados se observó después de un promedio de 9 días en el grupo experimental al que se administró la ciclosporina (5 µg/kg) solo. Además, el rechazo de las células de los islotes trasplantados se observó después de 5 días en el grupo experimental al que se administró solo colchicina (10 µg/kg). Se pudo ver que en el grupo experimental al que se administraron colchicinas (40 µg/kg) solo, dos de las cuatro ratas murieron con una reducción de peso del 15 % el segundo día, una rata murió repentinamente después de 9 días, manteniendo el nivel de glucosa en sangre, y el rechazo de las células de los islotes trasplantadas ocurrió en la rata restante después de 6 días.

Por otro lado, se pudo observar que el rechazo de las células de los islotes trasplantados se produjo después de 5 días a 7 días en el grupo experimental al que se administró el compuesto derivado de la colchicina 7 (50 µg/kg) solo, después de 5 días a 6 días en el grupo experimental al que se administró el compuesto derivado de la colchicina 9

(50 µg/kg) solo, después de 5 días a 6 días en el grupo experimental al que se le administró el compuesto derivado de la colchicina 14 (10 µg/kg) solo, y después de 6 días a 7 días en el grupo experimental al que se administró el compuesto derivado de la colchicina 14 (40 µg/kg) solo.

Como administración única, la ciclosporina A mantuvo los niveles de glucosa en sangre durante más de 4 días, en comparación con el grupo de control no tratado, y la colchicina y los derivados de la colchicina no mostraron diferencias significativas con el grupo de control. Esto indica que las células de los islotes tienen una fuerte respuesta inmunitaria y, por lo tanto, la ciclosporina A, la colchicina o su derivado no presentan efectos significativos.

<4-2> Administración intraperitoneal combinada

Dado que no hubo efectos en la administración única, la ciclosporina A (5 mg/kg) y los compuestos derivados de la colchicina se administraron juntos durante 14 días a partir de la fecha del trasplante de células de los islotes, y se examinó el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, considerando la interacción entre los dos medicamentos, los dos medicamentos se introdujeron en jeringas diferentes y se inyectaron en los lados derecho e izquierdo de la cavidad abdominal, respectivamente, y los resultados de la medición se muestran en la siguiente tabla 4.

Trasplante alogénico de células de los islotes pancreáticos - Administración intraperitoneal combinada

Grupo	Población	Número de días durante los cuales se mantuvo la función de las células de los islotes (día)	Promedio (día)
CsA (5 mg/kg)+ Colchicina (10 µg/kg)	3	5, 6, 13	8±4,36
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 1 (50 µg/kg)	2	27, 27	27
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 7 (50 µg/kg)	5	14, 15, 24, >101, >154	>61,6±63,13
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 7 (100 µg/kg)	3	33, >70, >11 3	> 72±40,04
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 9 (50 µg/kg)	3	27, 32, >108	>55,7±45,4
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 14 (10 µg/kg)	3	27, 29, 30	28,7±1,53
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 14 (40 µg/kg)	9	24, 25, 27, 28, 33, 47, 70, >101, >201	>61,8±58,3
CsA(5 mg/kg)+ Compuesto 15 (50 µg/kg)	2	24, 24	24
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 17 (50 µg/kg)	4	23, 24, 26, 74	36,5±24,9
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 18 (50 µg/kg)	2	27, 29	28±1,41
CsA(5 mg/kg)+ Compuesto 22 (50 µg/kg)	3	5, 6, 51	20,7±26,3
CsA (5 mg/kg)+ Compuesto 23 (50 µg/kg)	2	22, 31	26,5±6,36

Como resultado del experimento, se determinó que el número de días durante los cuales se mantuvo la función de las células de los islotes era un promedio de 8 días en el grupo experimental al que se administró la colchicina (10 µg/kg) en combinación con la ciclosporina A (5 mg/kg), que aumentó en aproximadamente 3 días, en comparación con la administración única. Por el contrario, se pudo observar que los grupos experimentales a los que se administraron los compuestos derivados de la colchicina en combinación con la ciclosporina A (5 mg/kg) mantuvieron la función de las células de los islotes durante más tiempo y, por lo tanto, mostraron efectos inmunomoduladores superiores, en comparación con la administración única, y en comparación con la administración combinada de colchicina (10 µg/kg) y ciclosporina A (5 mg/kg).

En particular, durante la administración combinada de la ciclosporina A y los derivados de la colchicina de la presente invención, la función de las células de los islotes duró un promedio de 20 días o más. Además, en el caso de los compuestos 7, 9 y 14, los efectos inmunomoduladores que duran más de 100 días muestran que la administración combinada es más ventajosa que la administración única en el caso del trasplante de células de los

islotes, además, el hecho de que los efectos sobre la regulación de la glucosa en sangre fueran elevados, incluso con la administración a corto plazo, demuestra que los derivados de la colchicina de la presente invención exhiben efectos inmunomoduladores superiores en comparación con las colchicinas.

<4-3> Administración intraperitoneal combinada continua

Para verificar los efectos inmunomoduladores durante la administración intraperitoneal combinada continua, después de inyectar la ciclosporina A (5 mg/kg) y el compuesto 14 (40 a 500 µg/kg) durante 14 días (2 semanas) a partir de la fecha del trasplante de células de los islotes, se llevó a cabo la administración continuada única o combinada en las condiciones que se muestran en la siguiente tabla 5, y se examinó el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, considerando la toxicidad de la ciclosporina, la cantidad de ciclosporina A se redujo de 5 mg/kg a 2 mg/kg después de 30 días. Los resultados de la medición se muestran en la siguiente tabla 5.

Trasplante alogénico de células de los islotes pancreáticos - Administración intraperitoneal combinada continua

Grupo	Población	Número de días durante los cuales se mantuvo la función de las células de los islotes (día)	Promedio (día)
CsA (5 mg/kg) y el Compuesto 14 (500 µg/kg) se inyectaron durante 2 semanas	3	25, 30, 32	29±3,61
Después de inyectar CsA (5 mg/kg) y el Compuesto 14 (500 µg/kg) durante 2 semanas, solo se inyectó CsA (5 mg/kg)	2	40, 57	48,5±12,0
Después de inyectar CsA (5 mg/kg) y el Compuesto 14 (500 µg/kg) durante 2 semanas, solo se inyectó compuesto 14	3	20, 25, 113	52,7±52,3
Después de inyectar CsA (5 mg/kg) y el Compuesto 14 (40 µg/kg) durante 2 semanas, se inyectaron continuamente CsA (5 mg/kg) y el compuesto 14 (40 µg/kg)	2	56, >70	>63±9,9
Después de inyectar CsA (5 mg/kg) y compuesto 14 (500 µg/kg) durante 2 semanas, se inyectaron continuamente CsA (5 mg/kg) y el compuesto 14	3	40, 81, 82	67,7±24,0

Como se muestra en la tabla 5 anterior, en el grupo experimental al que se administró la ciclosporina A o el compuesto 14 solo después de la administración combinada durante 2 semanas, la función de las células de los islotes se mantuvo entre 1,6 y 1,8 veces en comparación con el grupo experimental al cual se administró ciclosporina A y el compuesto 14 solo durante 2 semanas. Además, los grupos experimentales a los que se administran continuamente los dos fármacos juntos incluso después de la administración combinada durante 2 semanas, la función de las células de los islotes mejoró aproximadamente 2,3 veces en comparación con el grupo experimental al que se administran la ciclosporina A y el compuesto 14 durante 2 semanas solo, y entre 1,28 y 1,3 veces en comparación con el grupo experimental al que se administró la ciclosporina A o el compuesto 14 solo después de la administración combinada durante 2 semanas.

Los resultados anteriores indican que la administración combinada de la ciclosporina A y los derivados de la colchicina de la presente invención después del trasplante de células de los islotes es más eficaz para mantener las funciones de las células de los islotes trasplantados y los derivados de la colchicina de la presente invención no tienen efectos secundarios incluso con la administración a largo plazo.

Ejemplo Experimental 5: Análisis de tejidos de órganos trasplantados

La tinción de la insulina se realizó en tejidos hepáticos y pancreáticos para determinar si las células de los islotes trasplantados en tejidos hepáticos se infunden y segregan insulina o si las células de los islotes se regeneran en el páncreas y segregan insulina, y se realizó una tinción de hematoxilina y eosina (H-E) para determinar cambios en los tejidos. Al mismo tiempo, se realizó la tinción de CD4 y CD8 para determinar la infiltración de linfocitos T.

Los tejidos utilizados en la tinción fueron los extraídos del hígado y el páncreas de las ratas, cuya función de las células de los islotes se mantuvo durante 100 días, entre los grupos experimentales a los que se administraron la ciclosporina A y los compuestos derivados de la colchicina (7, 9 y 14) en las condiciones que se muestran en la tabla 4 después del trasplante de células de los islotes, y se mantuvo en formalina al 10 %.

Primero, para la tinción con insulina, los tejidos se incrustaron en parafina y se obtuvieron cortes de 2 a 3 μm de espesor. Cada corte se mantuvo a 60 °C durante 30 minutos, de manera que el tejido no se separó del portaobjetos durante la tinción, y luego la parafina se eliminó con xileno. Posteriormente, cada portaobjetos se trató secuencialmente con alcoholes al 100 %, 95 % y 90 %, se trató con suero de caballo normal (Vectastain kit, Vector, EE. UU.) y se tiñó con anticuerpo antiinsulínico (anticuerpo primario: Dako, EE. UU.) durante 1 hora. A continuación, el portaobjetos resultante se tiñó con anticuerpo secundario (Vectastain kit, Vector, EE. UU.) durante 30 minutos, se tiñó con DAB durante 2 minutos, se tiñó de nuevo con hematoxilina durante 1 minuto, se lavó para detectar cualquier exceso de mancha y luego se secó. El portaobjetos seco se sumergió en xileno y se montó en Permount, y después se examinó la presencia de tinción con insulina en un microscopio óptico.

La tinción de los linfocitos CD4 y CD8 se realizó de la misma manera que la tinción de insulina.

Por otro lado, para la tinción con hematoxilina y eosina, los tejidos se incrustaron en parafina y se obtuvieron cortes de 2 a 3 μm de espesor. Cada corte se mantuvo a 60 °C durante 30 minutos, de modo que el tejido no se separó del portaobjetos durante la tinción, y luego se eliminó la parafina con xileno. Posteriormente, cada portaobjetos se trató secuencialmente con alcoholes al 100 %, 95 % y 90 %, y luego se realizó una tinción nuclear con hematoxilina Harris durante 5 minutos. Con respecto a los portaobjetos con tinción nuclear, el exceso de tinción se decoloró con una solución de alcohol ácido, se tiñó con mordiente usando una solución de amoníaco, y luego se realizó la tinción citoplásmica con eosina. A continuación, el portaobjetos resultante se trató secuencialmente con alcoholes al 90 %, 95 % y 100 %, se deshidrató, se sustituyó con xileno y se montó en Permount, y luego se examinaron los cambios en los tejidos hepáticos de las células de los islotes trasplantados en un microscopio óptico.

Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 2, Como se muestra en la FIG. 2, se determinó a partir del análisis de tejidos de hígado y páncreas de las ratas, cuya función de las células de los islotes se mantuvo durante 100 días, y a las que se administraron la ciclosporina A y los compuestos derivados de la colchicina juntos después del trasplante de células de los islotes, que las células de los islotes perfundidas en tejidos hepáticos eran viables por la tinción positiva de insulina, mientras que las células de los islotes estaban destruidas en el páncreas por tinción negativa de insulina. De los resultados experimentales de la tinción con hematoxilina y eosina se pudo determinar que cuando la función de las células de los islotes pancreáticos se mantenía durante 100 días, los tejidos del hígado se mantuvieron muy limpios y hubo menos células inmunitarias que se infiltraron en los tejidos. Se pudo confirmar a partir de los resultados experimentales de la tinción de linfocitos CD4 y CD8 que había muy pocas células inmunitarias infiltradas en los tejidos.

Ejemplo de preparación 1: Comprimidos (compresión directa)

Se tamizaron 5,0 mg de principio activo, se mezclaron con 14,1 mg de lactosa, 0,8 mg de CrossPovidone USNF y 0,1 mg de estearato de magnesio, y luego se comprimieron para formar comprimidos.

Ejemplo de preparación 2: Comprimidos (granulación en húmedo)

Se tamizaron 5,0 de principio activo y se mezclaron con 16,0 mg de lactosa y 4,0 mg de almidón. Se disolvieron 0,3 mg de Polisorbato 80 en agua purificada, y se añadió una cantidad apropiada de esta solución a la mezcla y se granuló. Los gránulos se tamizaron y se mezclaron con 2,7 mg de dióxido de silicio coloidal y 2,0 mg de estearato de magnesio y luego se comprimieron para formar comprimidos.

Ejemplo de preparación 3: Polvos y cápsulas

Se tamizaron 5,0 mg de principio activo y se mezclaron con 14,8 mg de lactosa, 10,0 mg de polivinilpirrolidona y 0,2 mg de estearato de magnesio. La mezcla se introdujo en una cápsula de gelatina dura N.° 5 utilizando un aparato apropiado.

Ejemplo de preparación 4: inyecciones

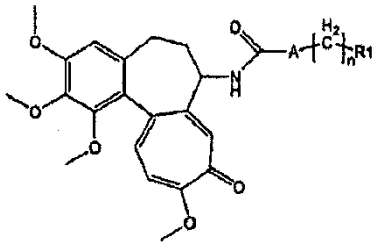
Se mezclaron 100 mg de principio activo, 180 mg de manitol, 26 mg de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ y 2974 mg de agua

destilada para formar inyecciones.

REIVINDICACIONES

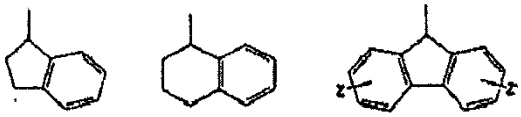
1. Un derivado de la colchicina representado por la siguiente fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula 1]



en la que

- R1 es fenilo,



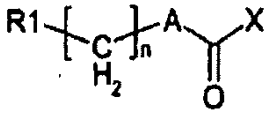
o cicloalquilo C_3-C_6, no sustituido o sustituido con X, donde X es halógeno, OCH_3, NO_2, NH_2 o alquilo C_1-C_3 de cadena lineal o ramificada, y Z y Z' son cada uno independientemente H, halógeno, OCH_3, NO_2, NH_2 o alquilo C_1-C_4 de cadena lineal o ramificada;
- n es un número entero de 0 a 3; y
- A es CH_2, NH, u O

seleccionado del grupo que consiste en:

1) éster bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
2) éster 4-nitro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
3) éster 4-bromo bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
4) éster 4-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
5) éster 2-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
6) éster 3-fluoro bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
7) éster 4-metil bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
8) éster 4-isopropil bencílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
9) éster ciclopentilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
10) éster ciclohexilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
11) éster indan-1-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
12) éster 1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
13) éster *9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido 1,2,3,4-tetrahidro-naftalen-1-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
14) éster 1-metil-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
15) éster 2-bromo-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
16) éster 2,7-di-terc-butil-*9H*-fluoren-9-ilmetílico del ácido (1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;

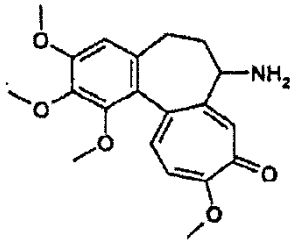
17) éster 2-(*9H*-fluoren-9-il)-etílico del ácido (1,2,3,10-tatrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-carbámico;
18) 3-fenil-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-propionamida;
19) 3-(4-metoxi-fenil)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-propionamida
20) 2-(*9H*-fluoren-9-il)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-acetamida;
21) 3-(*9H*-fluoren-9-il)-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-propionamida; y
22) 1-bencil-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro-benzo[a]heptalen-7-il)-urea.

2. Un método para preparar un derivado de la colchicina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa de hacer reaccionar un derivado de la desacetil colchicina representado por la siguiente fórmula 2 con una cantidad equivalente o un exceso de



en presencia de una base o un agente de condensación en un disolvente de reacción para formar amida.

[Fórmula 2]



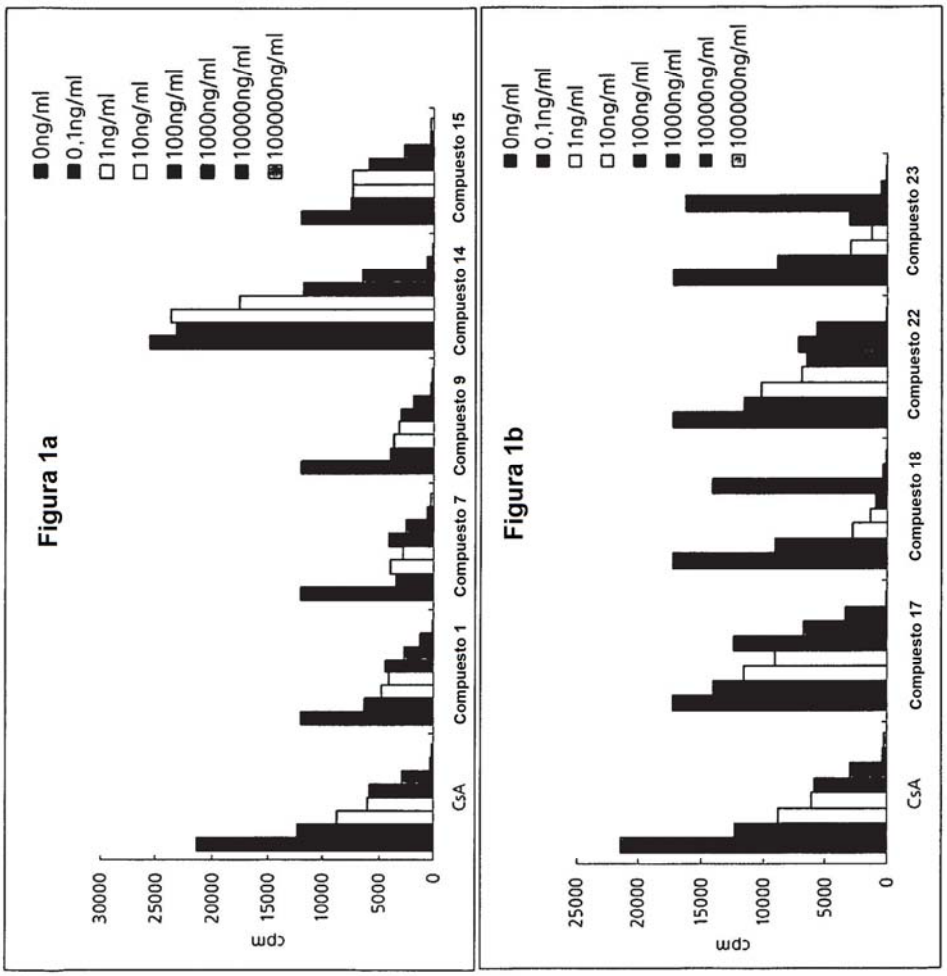
3. La composición farmacéutica que comprende

a) el derivado de la colchicina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1; y
b) un inmunosupresor.

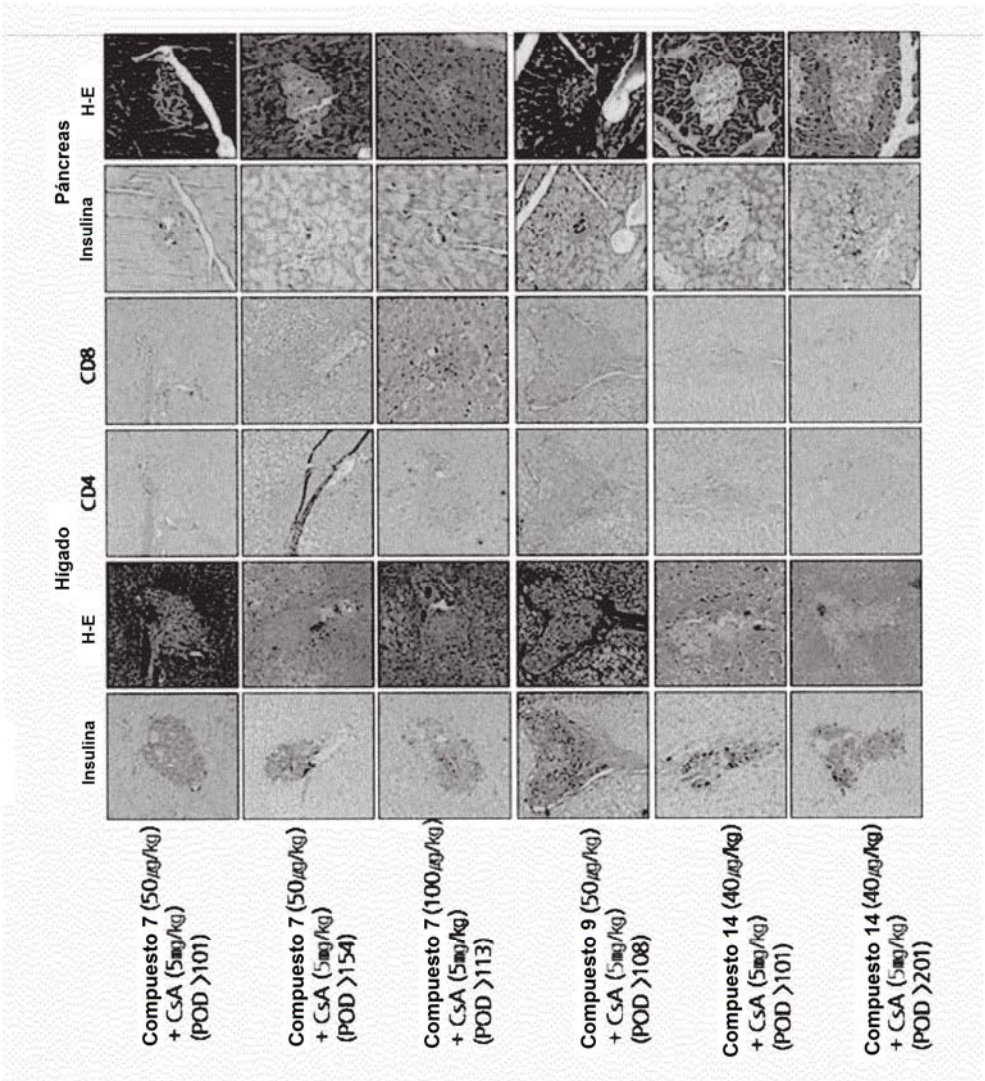
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que el inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en ciclosporina A, tacrolimus, prednisolona, deflazacort, ácido micofenólico, azatioprina, mizoribina, sirolimus, everolimus, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-CD3 (OKT3), anticuerpo anti-CD20, y combinaciones de los mismos.

5. Composición farmacéutica que comprende el derivado de la colchicina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en inmunomodulación.

6. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en la modulación de una respuesta inmunitaria aguda o crónica en el trasplante de órganos.



El Compuesto 23 está fuera del alcance de la presente invención


Hígado
Páncreas
Insulina
H-E
CD4
CD8
Insulina
H-E
Compuesto 7 (50µg/kg) + CsA (5mg/kg) (POD >101)
Compuesto 7 (50µg/kg) + CsA (5mg/kg) (POD >154)
Compuesto 7 (100µg/kg) + CsA (5mg/kg) (POD >113)
Compuesto 9 (50µg/kg) + CsA (5mg/kg) (POD >108)
Compuesto 14 (40µg/kg) + CsA (5mg/kg) (POD >101)
Compuesto 14 (40µg/kg) + CsA (5mg/kg) (POD >201)