

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 796**

51 Int. Cl.:

C07D 413/14 (2006.01)

C07D 209/04 (2006.01)

C07D 498/04 (2006.01)

C07D 498/06 (2006.01)

A61K 31/5365 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2014** **PCT/US2014/031338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14160586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2014** **E 14772747 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 2978760**

54 Título: **Derivado de N-acilo O-aminofenol CBI cíclico**

30 Prioridad:

28.03.2013 US 201361806212 P

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

16.07.2019

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, US**

72 Inventor/es:

BOGER, DALE, L.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 719 796 T3

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

DESCRIPCIÓN

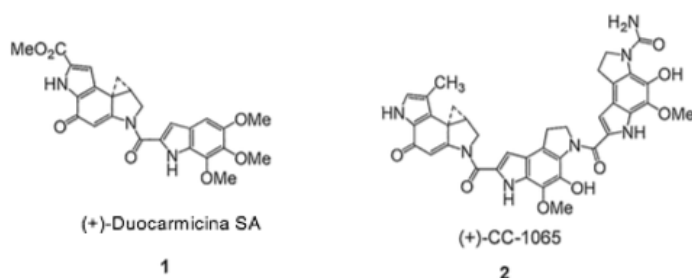
Derivado de *N*-acilo *O*-aminofenol CBI cíclico

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

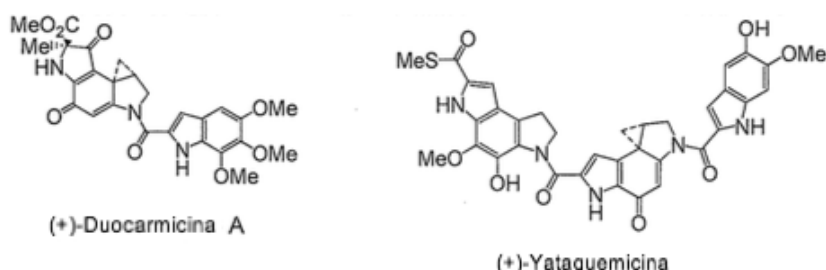
[0001] La invención se refiere a agentes anticancerosos de profármacos y a su uso. Más particularmente, la invención se refiere a profármacos cíclicos de *N*-acilo *O*-aminofenol de CBI-TMI y CBI-indol₂.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] Duocarmicina SA (Compuesto **1**) [Ichimura et al., J. Antibiot. 1990, 43: 1037-1038] y CC-1065 (Compuesto **2**) [Martin et al., J. Antibiot. 1981, 34: 1119-1125], a continuación, son los dos miembros más extensamente



reconocidos de una clase de agentes antitumorales naturales excepcionalmente potentes que también incluyen la duocarmicina A [Takahashi et al., J. Antibiot. 1988, 41: 1915-1917], yataquemicina [Igarashi et al., J. Antibiot. 2003, 56: 107-113] (abajo).

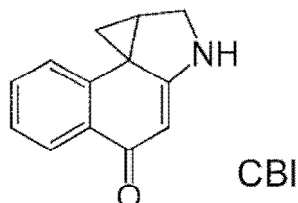


Esta clase única de productos naturales deriva sus propiedades antitumorales de su capacidad para alquilar ADN de una manera selectiva de secuencia. [Para duocarmicina SA, ver: (a) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116: 1635-1656; para yataquemicina, ver: (b) Parrish et al., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125: 10971-10976; (c) Trzupek et al., Nat. Chem. Biol. 2006, 2: 79-82; (d) Tichenor y col., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129: 10858-10869; para CC-1065, ver: (e) Hurley et al., Biochemistry 1988, 27: 3886-3892; (f) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. 1994, 2:115-135; (g) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113: 3980-3983; (h) Boger et al., Proc. Nat. Acad Sci. EE.UU. 1991, 88: 1431-1435; (i) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1990, 112: 4623-4632; (j) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113: 3980-3983; para la duocarmicina A, ver: (k) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1990, 112: 8961-8971; (l) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113: 6645-6649; (m) Boger y col., Med. Chem. Lett. 1992, 2: 759-765, (n) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1993, 115: 9872-9873; (o) Boger et al., Chem.-Biol. Interactions 1990, 73: 29-52. Reviews: (a) Boger et al., Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1996, 35: 1438-1474; (b) Boger et al., Acc. Chem. Res. 1995, 28: 20-29; (c) Boger et al., Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 1995, 92: 3642-3649; (d) Boger et al., Acc. Chem. Res. 1999, 32: 1043-1052; (e) Tichenor et al., Natural Prod. Rep. 2008, 25: 220-226; (f) MacMillan y otros, J. Med. Chem. 2009, 52: 5771-5780; (g) Searcey et al., Curr. Pharm. Des. 2002, 8: 1375-1389; y (h) Tse et al., Chem. Biol. 2004, 11: 1607-1617.]

[0003] En estudios en profundidad de los productos naturales, sus enantiómeros sintéticos no naturales, [(a) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1988, 110: 1321-1323; (b) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1988, 110: 4796-4807; (c) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114: 10056-10058; (d) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1993, 115: 925-9036. (e) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1996, 118: 2301-2302; (f) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119: 311-325; (g) Boger et al., Chem. Rev. 1997, 97: 787-828; (h) Tichenor y col., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126: 8396-8398; (i) Tichenor y col., J. Am. Chem. Soc. 2006, 128: 15683-15696; (j) MacMillan et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131: 1187-1194.] y los análogos clave han definido muchas de las características fundamentales que controlan su selectividad, eficiencia y catálisis de la alquilación del ADN, lo que resulta en una comprensión detallada de las relaciones entre estructura, reactividad y actividad biológica. [Ver las citas anteriores y (a) Boger et al., J. Am. Chem.

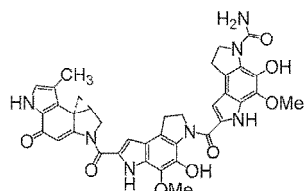
Soc. 1997, 119: 4977-4986; (b) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119: 4987-4998; (c) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. 1997, 5: 263-276.]

[0004] El CBI (1,2,9,9a-tetrahidrociclopopa[c]benz-[e]indol-4-ona), a continuación, es uno de los



análogos sintéticos más estudiados de la familia de la duocarmicina desde que el inventor y sus colaboradores lo introdujeron por primera vez en 1989. [(a) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111: 6461-6463; (b) Boger et al., J. Org. Chem. 1990, 55: 5823-5832; (c) Boger et al., Tetrahedron Lett. 1990, 31: 793-796; (d) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. Lett. 1991, 1:55-58; (e) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114: 5487-5496; (f) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116: 5523-5524; (g) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. 1995, 3: 761-775; (h) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116: 7996-8006; (i) Parrish et al., Bioorg. Medicine. Chem. 2003, 11: 3815-3838; (j) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1990, 112: 5230-5240.]

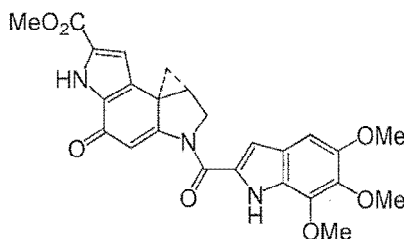
[0005] La subunidad de alquilación CBI no solo es sintéticamente más accesible y posee propiedades de alquilación de ADN idénticas a las de los productos naturales, [(a) Boger et al., J. Org. Chem. 1992, 57: 2873-2876; (b) Boger et al., J. Org. Chem. 1995, 60: 1271-1275; (c) Boger et al., Synlett 1997, 515-517; (d) Kastrinsky et al., J. Org. Chem. 2004, 69: 2284-2289; (e) Lajiness et al., J. Org. Chem. 2010, 76: 583-587; (f) Drost et al., J. Org. Chem. 1991, 56: 2240-2244; (g) Aristoff et al., J. Org. Chem. 1992, 57: 6234-6239; (h) Mohamadi y col., J. Med. Chem. 1994, 37: 232-239; y (i) Ling et al., Heterocicl. Comun. 1997, 3: 405-408], pero también es cuatro veces más estable y cuatro veces más potente que la subunidad de alquilación natural de CC-1065 (Compuesto 2) a continuación, aproximándose a la estabilidad



(+)-CC-1065

2

y la potencia de la subunidad de alquilación de duocarmicina SA (Compuesto 1), a continuación. Debido a que los análogos basados en CBI

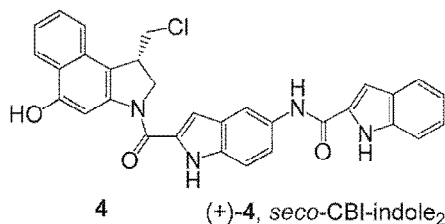


(+)-Duocarmicina SA

1

también se han establecido para mostrar una actividad antitumoral *in vivo* eficaz en modelos animales, se ha convertido en un excelente sustituto sintético en el que se examinan las características de la estructura y la función de los productos naturales, incluidos los nuevos diseños pro-medicamentos. [(a) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. 1995, 3:1429-1453; y (b) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. Lett. 1991, 1:115-120.]

[0006] En el curso de las primeras síntesis totales [(a) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1988, 110: 1321-1323; (b) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1988, 110: 4796-4807; (c) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114: 10056-10058; (d) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1993, 115: 9025-9036; (e) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1996, 118: 2301-2302; (f) Boger y col., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119: 311-325; (g) Boger et al., Chem. Rev. 1997, 97: 787-828; (h) Tichenor, MS; Kastrinsky y col., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126: 8396-8398; (i) Tichenor y col., J. Am. Chem. Soc. 2006, 128: 15683-15696; (j) MacMillan et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131: 1187-1194] (señalado anteriormente) de los productos naturales y análogos relacionados que incluyen CBI-indol₂ (Compuesto **5**) a continuación [(a) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. 1995, 3:1429-1453; y (b) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. Lett. 1991, 1:115-120], precursores de fenol sintético tales como el Compuesto **4**, a continuación, que aún no se han sometido a la



eran equipotentes e indistinguibles de sus homólogos que contienen ciclopropano ciclado en ensayos de inhibición del crecimiento celular, estudios de alquilación de ADN y modelos antitumorales *in vivo*.

[0007] Debido a este comportamiento indistinguible, la protección del fenol proporciona un sitio especialmente eficaz en el que preparar profármacos inactivos que pueden escindirse *in vivo* liberando el fármaco activo. [Para Carzelesin, ver: (a) Li et al., Cancer Res. 1992, 52: 4904-4913; (b) van Tellingen y otros, Cancer Res. 1998, 58: 2410-2416; Para KW-2189, ver: (c) Kobayashi et al., Cancer Res. 1994, 54: 2404-2410; (d) Nagamura et al., Chem. Pharm. Toro. 1995, 43: 1530-1535; Para otros profármacos de carbamato CBI: (e) Boger et al., Synthesis 1999, 1505-1509; (f) Wang et al., Bioorg. Medicine. Chem. 2006, 14: 7854-7861; (g) Li et al., Tetrahedron Lett. 2009, 50: 2932-2935; y (h) Wolfe et al., J. Med. Chem. 2012, 55: 5878-5886.] Los profármacos que utilizan esta estrategia de protección y liberación se han desarrollado cuando la liberación de fenol *in vivo* está acoplada a características que podrían permitir la administración o escisión selectiva de células tumorales, pero sorprendentemente pocas clases de profármacos han sido estudiadas hasta la fecha. [Para profármacos glicosídicos: (a) Tietze et al., Bioorg. Medicine. Chem. 2001, 9: 1929-1939; (b) Tietze et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45: 6574-6577; y (c) Tietze et al., Bioorg. Medicine. Chem. 2008, 16: 6312-6318. Para profármacos activados de forma reductora: (a) Hay et al., J. Med. Chem. 2003, 46: 5533-5545; (b) Hay et al., Bioorg. Medicine. Chem. Lett. 1999, 9: 2237-2242; (c) Tercel et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50: 2606-2609; (d) Townes et al., Med. Chem. Res. 2002, 11: 248-253; y (e) Boger et al., J. Org. Chem. 1999, 64: 8350-8362. Para otros profármacos, ver: (a) Zhao et al., J. Med. Chem. 2012, 55: 766-782; y (b) Pors et al., K; Chem. Comun. 2011, 47:12062-12064.]

[0008] En gran parte, se han examinado dos estrategias pro-drogas principales para las duocarmicinas. La estrategia más ampliamente examinada utiliza una acilación del fenol que puede ser escindida hidrolíticamente o enzimáticamente. Muchos grupos han examinado dichos profármacos de éster y carbamato [para Carzelesina, ver: (a) Li et al., Cancer Res. 1992, 52: 4904-4913; (b) van Tellingen y otros, Cancer Res. 1998, 58: 2410-2416; Para KW-2189, ver: (c) Kobayashi et al., Cancer Res. 1994, 54: 2404-2410; (d) Nagamura et al., Chem. Pharm. Toro. 1995, 43: 1530-1535; Para otros profármacos de carbamato CBI: (e) Boger et al., Synthesis 1999, 1505-1509; (f) Wang et al., Bioorg. Medicine. Chem. 2006, 14: 7854-7861; (g) Li et al., Tetrahedron Lett. 2009, 50: 2932-2935; y (h) Wolfe et al., J. Med. Chem. 2012, 55: 5878-5886] y dos de tales derivados, KW-2189 [Kobayashi et al., Cancer Res. 1994, 54: 2404-2410] y carzelesina [Li et al., Cancer Res. 1992, 52: 4904-4913], entró en ensayos clínicos. Con la excepción de un ejemplo reciente notable [Wang et al., Bioorg. Medicine. Chem. 2006, 14: 7854-7861], estos se han diseñado tradicionalmente para permitir una rápida liberación de fármaco libre en la administración *in vivo* y típicamente incorporan una funcionalidad para mejorar las propiedades físicas del fármaco (p. ej., solubilidad).

[0009] El segundo enfoque, aunque menos explorado, implica el desarrollo de una funcionalidad que puede activarse de forma reductiva. [Wolkenberg y col., Chem. Rev. 2002, 102: 2477-2495.] Entre los ejemplos anteriores se incluyen los precursores nitro de Denny a las variantes de arilamina de los fármacos fenol [Hay et al., J. Med. Chem. 2003, 46: 5533-5545], el uso de Lee de un éster que está sujeto a escisión con una reducción de quinona atada [Townes et al., Med. Chem. Res. 2002, 11: 248-253], y un informe de los precursores de la quinona similares a la mitomicina que se someten a una o-espirociclización análoga tras la activación reductiva por el inventor y colaboradores [Boger et al., J. Org. Chem. 1999, 64: 8350-8362].

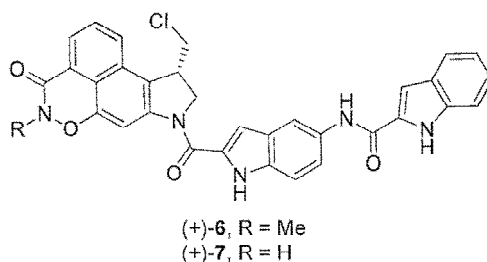
[0010] Más recientemente, el inventor y sus colaboradores introdujeron un conjunto de profármacos de *N*-acilo *O*-aminofenol que fueron diseñados para aprovechar potencialmente el entorno del tumor hipóxico y su mayor concentración de nucleófilos reductores, como el glutatión, que puede romper un enlace N-O activado (abajo) [Jin et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129: 15391-15397 y la patente de EE.UU. n° 8,377,981; y (b) Lajiness et al., J. Med.

Chem. 2010, 53: 7731-7738]. Igualmente, las concentraciones intracelulares de tales tioles reductores son hasta 100 veces más altas que las concentraciones plasmáticas, lo que sugiere que, a diferencia de los carbamatos más tradicionales, tales profármacos activados por reducción pueden estar sujetos a una liberación intracelular preferencial. Los precedentes para el comportamiento de tales profármacos se pueden encontrar en el producto natural FR900482 y sus congéneres relacionados [(a) Paz et al., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119: 5999-6005; y (b) Williams et al., Chem. Biol. 1997, 4: 127-137; y Tepe et al., Tetrahedron 2002, 58: 3553-3559] que contienen hemicetales de hidroxilamina y se activan de forma irreversible por la escisión reductiva de un enlace N-O.

[0011] En los estudios iniciales realizados por el inventor y los colaboradores, se observó un rango notable de estabilidad y propensión a favor de los medicamentos para la escisión del enlace N-O incluso con variaciones sutiles en el entorno electrónico y estérico alrededor del enlace N-O débil. Significativamente, la evaluación *in vivo* de varios profármacos de este tipo demostró que aquellos que exhiben una estabilidad/reactividad de N-O equilibrada se aproximan a la potencia y superan sustancialmente la eficacia del fármaco libre en sí, lo que sugiere que dichos profármacos pueden ofrecer ventajas relacionadas con su liberación controlada o dirigida.

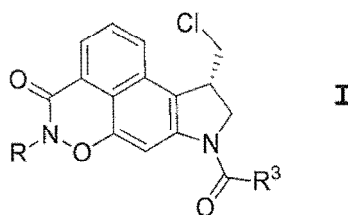
BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] En base a la capacidad demostrada discutida anteriormente para sintonizar estructuralmente la liberación de fármaco libre usando activación reductiva, se ha examinado una variante cíclica única del motivo *N*-acilo *O*-aminofenol que se ha encontrado particularmente útil. En este documento, la síntesis y la evaluación biológica de dos pro-fármacos CBI de oxazinona cíclica específica de N-O (Compuestos +6 y +7), a continuación, se pueden dividir de forma reductiva para proporcionar el

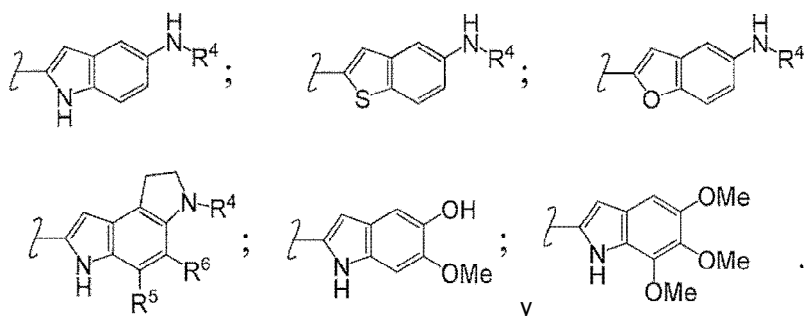


compuesto activo sin la liberación acompañante de cualquier material extraño se usan como ejemplos ilustrativos del género de los compuestos contemplados.

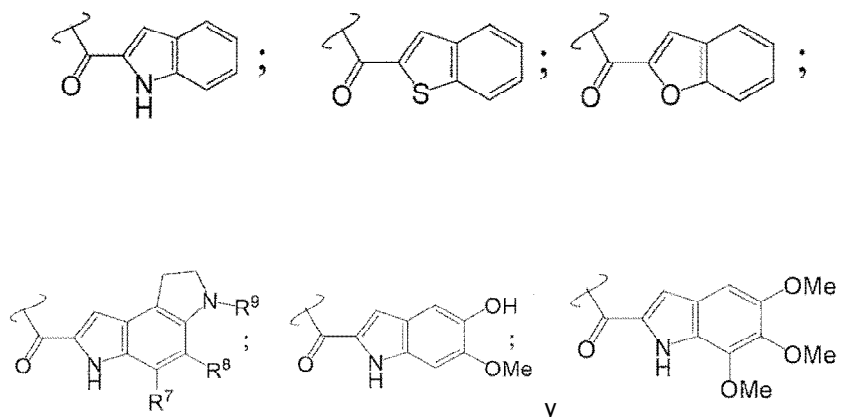
[0013] Más generalmente, un compuesto contemplado puede representarse por la Fórmula I, a continuación



donde R es hidrido (H), o hidrocarbilo C₁-C₆ y R³ se selecciona del grupo que consiste en radicales representados de la siguiente manera:



en donde R⁴ se selecciona de un grupo que consiste en radicales representados como sigue:



R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ en las fórmulas estructurales anteriores se seleccionan cada uno independientemente del grupo de radicales que consiste en -H, -OH, -O(hidrocarbilo C₁-C₆), -(hidrocarbilo C₁-C₆) y halógeno. R⁹ de una fórmula anterior se selecciona del grupo de radicales que consiste en -H, -C(O)O(alquilo C₁-C₆), -C(O)(hidrocarbilo C₁-C₆), -C(O)NH₂, -C(O)NHNH₂, y -C(O)NHNH-C(O)O(hidrocarbilo C₁-C₆).

[0014] Los compuestos contemplados de Fórmula I son para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa tal como un cáncer o leucemia en un mamífero. De acuerdo con ese uso, una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, tal como uno de los dos compuestos mostrados inmediatamente arriba, se administra a un mamífero que lo necesite. En otro aspecto más, se contempla el uso de un compuesto de Fórmula I en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad proliferativa tal como cáncer o leucemia.

[0015] Se observa que en las fórmulas estructurales utilizadas en este documento, una línea ondulada indica un enlace químico de estereoquímica indefinida a un átomo representado. También se señala que para mejorar la legibilidad y minimizar la aparente duplicación, cualquier combinación de elementos estructurales descritos en términos generales puede estar presente en una realización específica, a menos que se indique lo contrario.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] En los dibujos que forman parte de esta descripción,

La FIG. 1 es una fotografía de una autorradiografía de gel de poliacrilamida de secuenciación de ADN en la que se ilustra la alquilación del ADN mediante el Compuesto (+)-7 en el ADN de w794. No se observa alquilación del ADN por el Compuesto (+)-7 en ausencia de activación (carril 7), mientras que la adición de tior (L-glutatión) libera el fármaco libre y da como resultado la alquilación del ADN (carriles 8 y 9) en los sitios observados con (+)-CBI-indol₂ (carril 6). Incubación del agente de ADN a 23°C durante 2 horas (h), eliminación del agente no unido por precipitación con EtOH y termólisis de 30 minutos (100°C) seguida de PAGE desnaturizante al 8% y autorradiografía. Carril 1, ADN de control; carriles 2-5, reacciones de secuenciación Sanger G, C, A y T; carril 6, compuesto (+)-4 (1 X 10⁻⁵ M); carril 7, compuesto (+)-7 (1 X 10⁻⁵ M); carriles 8-9, Compuesto (+)-7 (1 X 10⁻⁵ M) incubados a 37°C con L-glutatión 1 M durante 12 horas y 24 horas. Este comportamiento de alquilación del ADN del Compuesto (+)-7 demostró ser análogo al del Compuesto (+)-3c (Fig. 2) que también falla en la alquilación efectiva del ADN en el ensayo sin células, pero lo hace de manera efectiva tras la activación por adición de L-glutatión.

La FIG. 2 es una autorradiografía de gel de poliacrilamida de secuenciación de ADN en la que la alquilación del ADN por el Compuesto 3c en el ADN w794. No se observa alquilación del ADN por el Compuesto (+)-3c en ausencia de activación (carril 7), mientras que la adición de tior (L-glutatión) libera el fármaco libre y da como resultado la alquilación del ADN (carriles 8 y 9) en los sitios observados con (+)-CBI - indol₂ (carril 6). Incubación del agente de ADN a 23°C durante 2 horas (h), eliminación del agente no unido por precipitación con EtOH y 30 minutos de termólisis (100°C) seguida de PAGE desnaturizante al 8% y autorradiografía. Carril 1, ADN de control; carriles 2-5, reacciones de secuenciación Sanger G, C, A y T; carril 6, compuesto (+)-4 (1 X 10⁻⁵ M); carril 7, Compuesto (+)-3c (1 X 10⁻³ M); carriles 8-9, Compuesto (+)-3c (1 X 10⁻⁵ M) incubado a 37°C con L-glutatión 1 M durante 12 horas y 48 horas.

La FIG. 3 es una autorradiografía de gel de poliacrilamida de secuenciación de ADN de la hendidura de la hebra inducida térmicamente del ADN w794; Incubación del agente de ADN a 23°C durante 48 horas, eliminación del agente no unido por precipitación con EtOH y 30 minutos de termólisis (100°C) seguida de PAGE desnaturizante al 8% y autorradiografía. Carril 1, ADN de control; carriles 2-5, reacciones de secuenciación

Sanger G, C, A y T; carriles 6-8, Compuesto (+)-**4** (1×10^{-4} a 1×10^{-6} M); carriles 9-11, Compuesto (+)-**6** (1×10^{-2} a 1×10^{-4} M).

La FIG. 4 es una autorradiografía de gel de poliacrilamida de secuenciación de ADN de la hendidura de la hebra inducida térmicamente del ADN de w794; Incubación del agente de ADN a 23°C durante t horas, eliminación del agente no unido por precipitación con EtOH y termólisis de 30 minutos (100°C) seguida de PAGE desnaturalizante al 8% y autorradiografía. Carril 1, ADN de control; carriles 2-5, reacciones de secuenciación Sanger G, C, A y T; carriles 6-11, Compuesto (+)-**4** (1×10^{-4} M, t = 2, 4, 6, 8, 24, 48 horas); carriles 12-15, Compuesto (+)-**6** (1×10^{-2} M, t = 2, 4, 6, 8 horas).

La FIG. 5 es una autorradiografía de gel de poliacrilamida de secuenciación de ADN de la hendidura de la hebra inducida térmicamente del ADN de w794; Incubación del agente de ADN a 23°C durante 48 horas, eliminación del agente no unido por precipitación con EtOH y termólisis de 30 minutos (100°C) seguida de PAGE desnaturalizante al 8% y autorradiografía. Carril 1, ADN de control; carriles 2-5, reacciones de secuenciación Sanger G, C, A y T; carril 6, compuesto (+)-**4** (1×10^{-4} M); carriles 7-9, compuesto (+)-**19** (1×10^{-3} a 1×10^{-5} M).

DEFINICIONES

[0017] En el contexto de la presente invención y las reivindicaciones asociadas, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

Los artículos "un" y "una" se usan en este documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

[0018] La palabra "hidrocarbilo" se usa en el presente documento como un término a corto plazo para un grupo no aromático que incluye grupos alifáticos de cadena lineal y ramificada así como también grupos o radicales alicíclicos que contienen solo carbono e hidrógeno. De este modo, se contemplan los grupos alquilo, alqueno y alquino, mientras que los hidrocarburos aromáticos tales como los grupos fenilo y naftilo, que hablando estrictamente también son grupos hidrocarbilo, se denominan aquí grupos arilo o radicales, como se describe más adelante en este documento.

[0019] Cuando se pretende un grupo sustituyente de hidrocarbilo alifático específico, se recita ese grupo; es decir, alquilo C_1 - C_6 , metilo o *terc*-butilo. Los grupos hidrocarbilo ejemplares contienen una cadena de 1 a 4 átomos de carbono, y preferiblemente 1 o 2 átomos de carbono.

[0020] Un grupo hidrocarbilo particularmente preferido es un grupo alquilo. Como consecuencia, puede sustituirse un sustituyente generalizado, pero más preferido, reemplazando el descriptor "hidrocarbilo" por "alquilo" en cualquiera de los grupos sustituyentes enumerados en el presente documento.

[0021] Los ejemplos de radicales alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo. Los ejemplos de radicales alqueno adecuados incluyen etenilo (vinilo), 2-propenilo, 3-propenilo, 1,4-butadienilo, 1-butenilo, 2-butenilo y 3-butenilo. Los ejemplos de radicales alquino incluyen etinilo, 2-propinilo, 1-propinilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo y 1-metilo-2-propinilo.

[0022] Como entenderá un experto en la materia, un sustituyente que no puede existir, tal como un grupo alqueno C_1 , no está destinado a incluirse en la palabra "hidrocarbilo", aunque están previstos sustituyentes con dos o más átomos de carbono.

[0023] Se sigue la nomenclatura de los sufijos químicos habituales cuando se usa la palabra "hidrocarbilo", excepto que no siempre se sigue la práctica habitual de eliminar el terminal "ilo" y agregar un sufijo apropiado debido a la posible similitud de un nombre resultante con uno o más sustituyentes. Por lo tanto, un hidrocarbilo éter se denomina un grupo "hidrocarbilo" en lugar de un grupo "hidrocarburo", ya que posiblemente sea más apropiado cuando se siguen las reglas habituales de la nomenclatura química. Los grupos hidrocarbilo ilustrativos incluyen los grupos metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, aliloxi, *n*-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y *terc*-butoxi.

[0024] El término "estructura de anillo" se usa en el presente documento para significar un sustituyente cíclico que puede contener un solo anillo tal como un grupo imidazolilo o fenilo, o dos anillos fusionados que están presentes en un grupo naftilo, purinilo, indolilo o decalinilo o dos anillos unidos como están presentes en un grupo bifenilo.

[0025] El término "ciclohidrocarbilo" o "carbocíclico", solo o en combinación, significa un radical (o anillo) de hidrocarbilo cíclico que contiene de 5 a aproximadamente 12 átomos de carbono, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Los ejemplos de tales radicales ciclohidrocarbilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, cicloheptenilo, 1-y 2-decalinilo.

[0026] El término "arilo", solo o en combinación, significa un sistema de anillo aromático. Dicho sistema de anillo incluye un sistema de anillo de fenilo, naftilo y bifenilo.

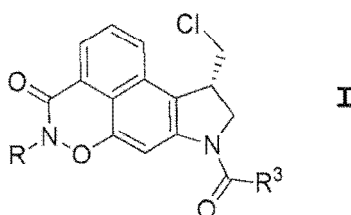
[0027] El heterociclilo (heterociclo) es un anillo simple de 5 o 6 miembros o un sistema de anillo 5,5- 5,6-6,6 fusionado o enlazado que contiene de 1 a 4 heteroátomos (no carbonos) en el anillo que independientemente son átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en un anillo saturado o parcialmente insaturado. Ejemplos de tales grupos heterociclilo son pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, oxatiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, pirazolilo, 1,2,4-oxadiazinilo y azepinilo y un grupo bipiperidinilo.

[0028] Un grupo "heteroarilo" es un anillo heterocíclico aromático que contiene preferiblemente uno, o dos, o tres o cuatro átomos en el anillo que no sea carbono. Esos heteroátomos pueden ser independientemente nitrógeno, azufre u oxígeno. Un grupo heteroarilo puede contener un solo anillo de 5 o 6 miembros o un sistema de anillo fusionado que tenga dos anillos de 6 miembros o un anillo de 5 y 6 miembros, o anillos enlazados de 5,5, 5,6 o 6,6 miembros como en un grupo biperidinilo. Los grupos heteroarilo adicionales ejemplares incluyen sustituyentes de anillo de 6 miembros, tales como piridilo, pirazilo, pirimidinilo y piridazinilo; sustituyentes de anillo de 5 miembros como 1,3,5-, 1,2,4- o 1,2,3-triazinilo, imidazilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, grupos de 1,2,3- 1,2,4-, 1,2,5- o 1,3,4-oxadiazolilo e isotiazolilo; Los sustituyentes de anillo fusionado de 6/5 miembros tales como los grupos benzotiofuranilo, isobenzotiofuranilo, benzisoxazolilo, benzoxazolilo, purinilo y antranililo; y anillos fusionados de 6/6 miembros, tales como los grupos 1,2-, 1,4-, 2,3- y 2,1-benzopironilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinazolinilo y 1,4-benzoxazinilo.

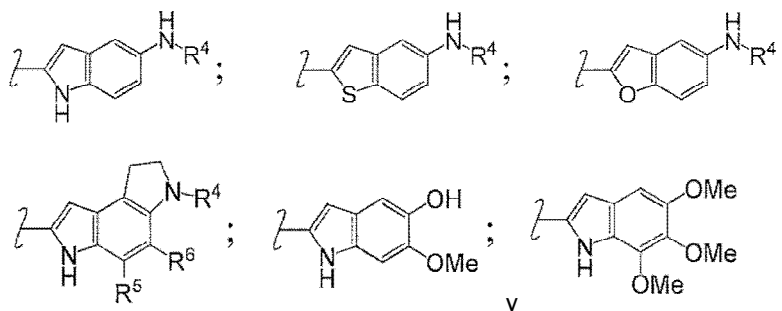
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0029] Se describe un nuevo género de profármacos de fenol activados de forma reductora de *N*-acilo O-amino cíclicos relacionados con la clase de compuestos de duocarmicina y su uso. Estos compuestos no requieren liberación enzimática y son ilustrativos de otros fármacos fenólicos que pueden beneficiarse de una activación diseñada de este tipo.

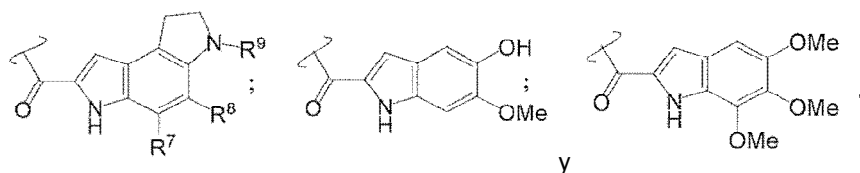
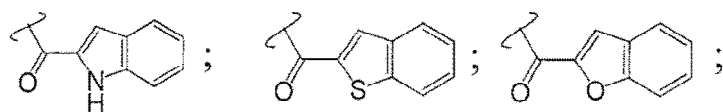
[0030] Un compuesto contemplado puede representarse mediante la Fórmula I, a continuación, donde R es hidrido (H) o hidrocarbilo C₁-C₆



y R³ se seleccionan del grupo que consiste en radicales representados de la siguiente manera:

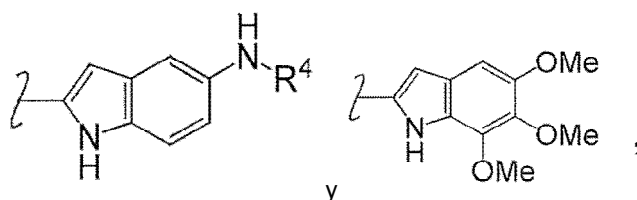


en donde R⁴ se selecciona de un grupo que consiste en radicales representados como sigue:

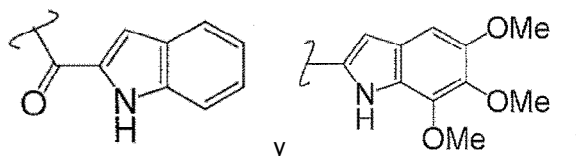


R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ en las fórmulas estructurales anteriores se seleccionan cada uno independientemente del grupo de radicales que consiste en -H, -OH, -O(hidrocarbilo C₁-C₆), -(hidrocarbilo C₁-C₆) y halógeno. R⁹ de una fórmula anterior se selecciona del grupo de radicales que consiste en -H, -C(O)O(alquilo C₁-C₆), -C(O)(hidrocarbilo C₁-C₆), -C(O)NH₂, -C(O)NHNH₂, y -C(O)NHNH-C(O)O(hidrocarbilo C₁-C₆).

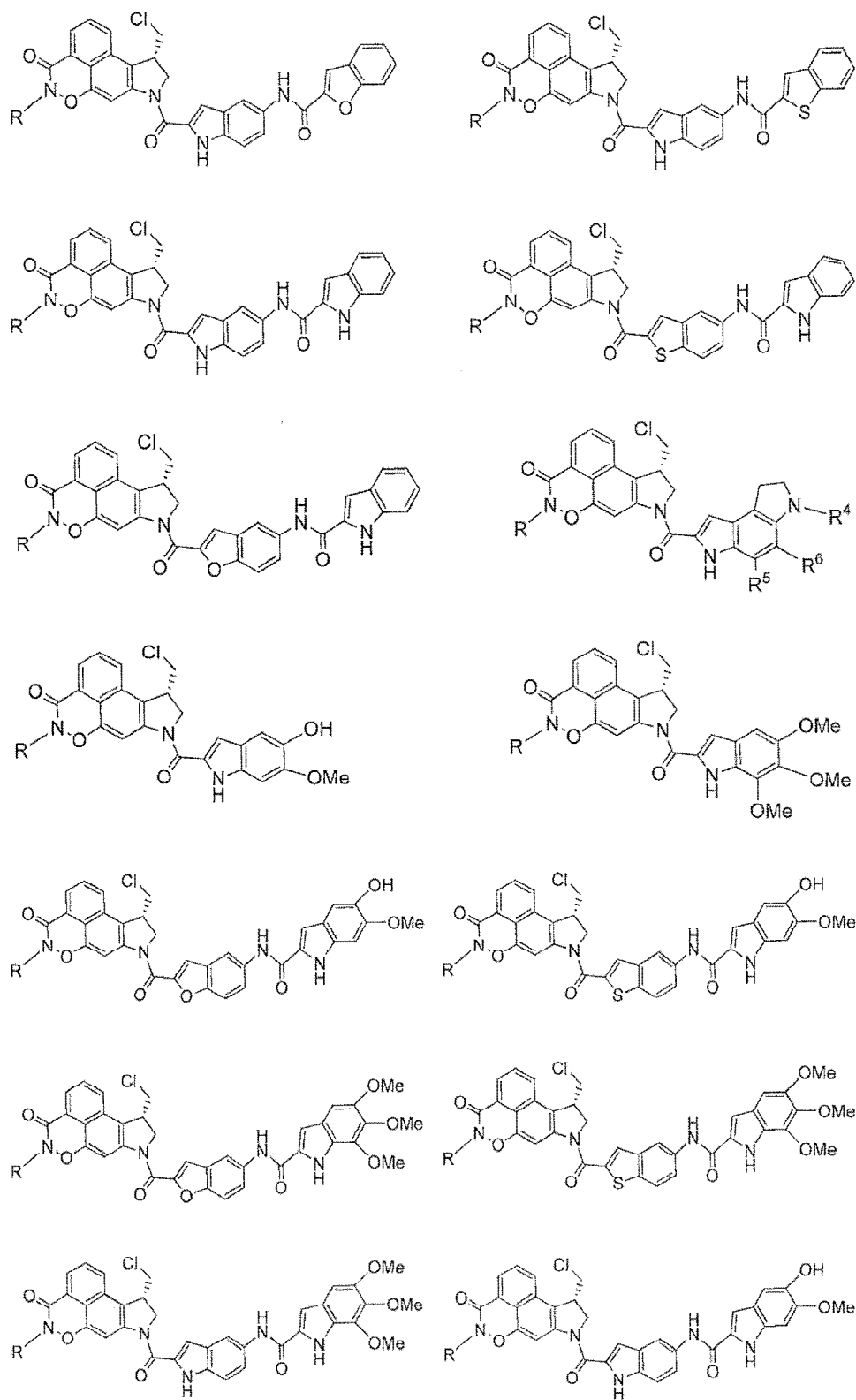
[0031] Los grupos R preferidos son hidrido (H) y metilo (hidrocarbilo C₁). Los grupos R³ preferidos son



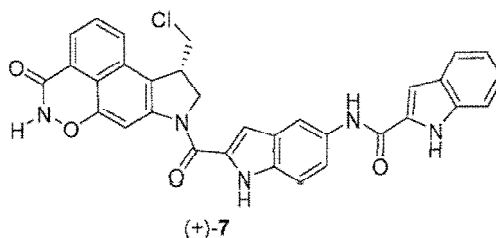
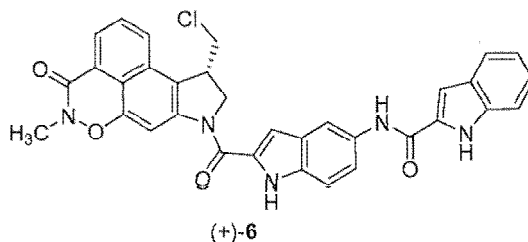
mientras que los sustituyentes R⁴ preferidos son



[0032] Los compuestos preferidos ilustrativos de Fórmula I incluyen aquellos cuyas fórmulas estructurales se muestran a continuación, en donde R es preferiblemente hidrido o metilo y los otros grupos R son como se han definido anteriormente.



[0033] Los compuestos **(+6)** y **(+7)**, a continuación, son particularmente preferidos.



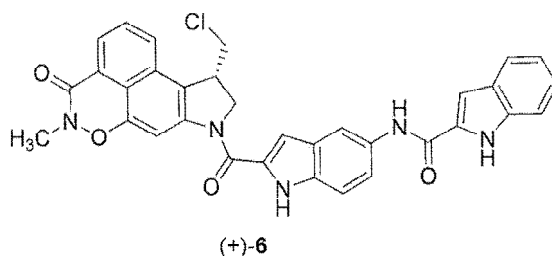
Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

[0034] También se contempla una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa tal como un cáncer o leucemia en un mamífero. Dicha composición contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz (una cantidad inhibidora de la enfermedad proliferativa) de una molécula de Fórmula I discutida previamente disuelta o dispersada en un diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0035] Un compuesto contemplado de Fórmula I se puede usar en una composición farmacéutica para tratar y preferiblemente matar células cancerosas o células de otra enfermedad proliferativa tal como leucemia *in vitro* o *in vivo* en un sujeto mamífero. Por lo tanto, una composición anterior se pone en contacto con las células a tratar. Las células así tratadas se mantienen en contacto con un compuesto de Fórmula I hasta que el cuerpo las elimina cuando están *in vivo*, o por varias veces como se desee en un estudio *in vitro*. El tratamiento generalmente se repite varias veces.

[0036] Un mamífero al que se le administra una composición que contiene un compuesto de Fórmula I puede ser un primate como un ser humano, un simio como un chimpancé o un gorila, un mono como un mono cynomolgus o un macaco, un animal de laboratorio, como una rata, un ratón o un conejo, un animal de compañía como un perro, un gato, un caballo o un animal de alimentación como una vaca o novillo, una oveja, un cordero, un cerdo, una cabra, una llama o similares que necesiten tratamiento para una condición cancerosa.

[0037] Una composición contemplada se administra a un mamífero que necesita la medicación a un nivel de dosificación eficaz proliferativo. Típicamente, ese nivel es una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 100 a aproximadamente 3.000 mg/kg de peso corporal al plasma o suero del receptor, utilizando el peso molecular del compuesto pro-fármaco de tipo duocarmicina activado por escisión **(+)-6** como la base para el cálculo en vista de



los diferentes pesos moleculares de los otros compuestos profármacos contemplados en este documento. La cantidad puede variar dependiendo del receptor y la carga celular proliferativa. La determinación de las dosis óptimas para una situación particular está dentro de los conocimientos de la técnica.

[0038] En un estudio *in vitro* utilizando células de leucemia murina, se encontraron valores de CI_{50} de aproximadamente 1 nM y aproximadamente 0,3 nM para los Compuestos (+)6 y (+)7, respectivamente. En un estudio *in vivo* que comparó los Compuestos (+)4 y (+)6, se observó una ventana terapéutica única y amplia para el Compuesto (+)6 en comparación con el Compuesto (+)4, en esa dosificación del Compuesto (+)4 de 60 a 500 mg/kg, proporcionó muerte prematura a los ratones de prueba, mientras que la administración del Compuesto (+)6 a 2.500 mg/kg proporcionó 6/10 sobrevivientes en el período de un año, y 4/10 en cada una de las dos dosis más bajas siguientes (1.000 mg/kg y 500 mg/kg en ese momento. Datos a continuación.

[0039] Una composición que contiene un compuesto de Fórmula I se administra repetidamente, en un programa adaptado para la carga y la necesidad de cáncer del receptor, como es bien conocido en la técnica. Las administraciones típicas se administran im, iv o ip varias veces dentro de un período de tiempo de un mes, generalmente seguidas de un período de descanso y luego administraciones adicionales y períodos de descanso hasta que el receptor esté libre de la enfermedad, o más tiempo con fines profilácticos.

[0040] Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la invención, se usa un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable inerte. El diluyente suele estar en forma líquida.

[0041] Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, *p. ej.*, soluciones adecuadas para administración intraparenteral (ip), intramuscular (im) o intravenosa (iv). Las soluciones estériles en agua de las soluciones activas o estériles del componente activo en disolventes que comprenden agua, etanol o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para administración parenteral.

[0042] Las soluciones estériles se pueden preparar disolviendo el componente activo en el sistema disolvente deseado, y luego pasando la solución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarlo o, alternativamente, disolviendo el compuesto estéril en un disolvente previamente esterilizado en condiciones estériles.

[0043] Preferiblemente, la composición farmacéutica está en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas de la urea activa. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, el paquete que contiene cantidades discretas de la preparación, *p. ej.*, en viales o ampollas.

Resultados

Solvólisis del compuesto 20

[0044] El compuesto 20 se disolvió en CH_3OH (1,5 ml). La solución de CH_3OH se mezcló con un tampón acuoso (pH 2, 1,5 ml). El tampón contenía 4:1:20 (v:v:v) ácido cítrico 1,0 M, Na_2HPO_4 0,2 M y H_2O , respectivamente. Después de mezclarse, las soluciones de solvolisis se taparon y se mantuvieron a 25°C en la oscuridad.

[0045] El espectro UV de las soluciones se midió 3-4 veces en los primeros dos días y una vez al día durante 2-4 semanas. La monitorización UV se continuó hasta que no se detectaron cambios adicionales. La absorción de longitud de onda larga a 380 nm y la absorción de longitud de onda corta a 255 nm fueron monitoreadas. La constante de velocidad de solvolisis y la vida media se calcularon a partir de los datos registrados en la longitud de onda corta (255 nm) del tratamiento de mínimos cuadrados de las pendientes de las parcelas de tiempo versus $\ln [(A_{Final}-A_{Inicial})/(A_{Final}-A)]$.

Tampón de pH 2: 1,0 C ácido cítrico: 0,2 M Na_2HPO_4 : H_2O (4:1:20)

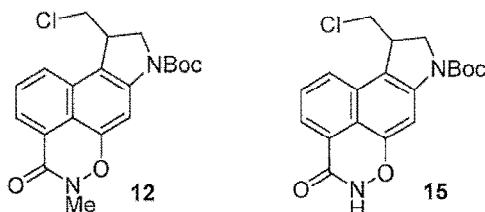
$t_{1/2} = 27,8$ h, $k = 8,3 \times 10^{-6} s^{-1}$

Tampón de pH3: 0,1 M ácido cítrico: 0,2 M Na_2HPO_4 : H_2O (4:1:20)

$t_{1/2} = 293$ h, $k = 6,6 \times 10^{-7} s^{-1}$

Estabilidad y reactividad de los pro-fármacos N-O

[0046] Debido a que se sabe poco acerca de la reactividad química de tales oxazinonas, la estabilidad de cada pro-fármaco protegido por Boc (Compuestos 12 y 15), abajo,



y su propensión a liberar el fármaco libre se examinó bajo ácido representativo, básico y, según las observaciones realizadas a lo largo de su síntesis, ambos Compuestos **12** y **15** son notablemente estables, y el Compuesto **15** demostró ser más reactivo y menos estable que el Compuesto **12** en todas las condiciones examinadas. En medios ácidos (4 N HCl/EtOAc, 23°C), los compuestos **12** y **15** exhibieron vidas medias ($t_{1/2}$) de 24 horas y 2 horas, respectivamente (después de la desprotección inicial de Boc).

[0047] El Compuesto **6** profármaco completo fue incluso más estable, exhibiendo vidas medias de >72 horas y 30 horas en 4 N HCl/EtOAc y TFA/CH₂Cl₂ 1:1 a 23°C, respectivamente. Se encontró que el Compuesto **12** era estable tras la exposición a condiciones básicas, no siendo reactivo hacia el NaHCO₃ en una variedad de disolventes (THF, MeOH, DMF/H₂O, 23°C) durante más de 5 días. Comparativamente, el Compuesto **15** de oxazinona no sustituido fue estable a NaHCO₃ en THF/H₂O a 23°C, pero se consumió lentamente en MeOH en las mismas condiciones ($t_{1/2}$ = 70 horas).

[0048] Se encontró que ambas oxazinonas son notablemente estables hacia los nucleófilos modelo, exhibiendo el Compuesto **15** una escisión más rápida en relación con el Compuesto **12** más estable, reaccionando los tioles mucho más efectivamente que las aminas (Tabla 1, a continuación). La mayor estabilidad del Compuesto **12** en comparación con el Compuesto **15** hacia la escisión nucleófila del enlace N-O se puede atribuir al aumento del impedimento estérico del nitrógeno terciario en comparación con el secundario, de acuerdo con observaciones anteriores. [Lajiness et al., J. Med. Chem. 2010, 53: 7731-7738] Finalmente, incluso el más estable de los dos profármacos (Compuesto **6**) se escindió rápidamente en condiciones reductoras (H₂, Pd/C, MeOH, 23°C, 1 hora o Mo(CO)₆, MeCN/H₂O, reflujo, 3 horas).

Tabla 1

Entrada	Solvente	Nucleófilo ^a	Base ^a	2 h ^b	24 h ^b	48 h ^b	72 h ^b
1	THF ^c	BnSH	NaHCO ₃	28%	33%	39%	46%
2	MeOH	BnSH	NaHCO ₃	33%	58%	75%	83%
3	THF ^c	BnNH ₂	NaHCO ₃	2%	3%	4%	3%
4	MeOH	BnNH ₂	NaHCO ₃	estable	9%	15%	16#

^areactivos en exceso utilizados; ^bporcentaje de material de partida consumido como se ha determinado por la absorción LCMS a 254 nM en varios momentos en horas (h); ^cestable bajo condiciones no básicas

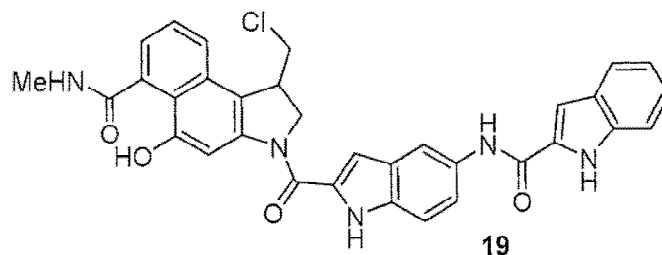
[0049] La estabilidad del compuesto **6** de profármaco se examinó en tampón fosfato de pH 7,0 ($t_{1/2}$ > 4 semanas), plasma humano ($t_{1/2}$ > 1 semana, <5% de fármaco libre) y plasma de ratón ($t_{1/2}$ > 48 horas), demostrando que su enlace N-O es notablemente estable en tales condiciones. En contraste, se encontró que el Compuesto **7** más proactivo reactivo era lentamente reactivo en tampón fosfato de pH 7,0 ($t_{1/2}$ = 1 semana) y se escindía lentamente en plasma humano ($t_{1/2}$ = 4 días) o plasma de ratón ($t_{1/2}$ > 48 horas, <5% de droga libre).

Propiedades biológicas

Propiedades de alquilación del ADN

[0050] De acuerdo con las expectativas y en ausencia de una fuente de activación reductiva, se encontró que el Compuesto pro-fármaco **(+)-6** es incapaz de alquilar el ADN en sistemas libres de células [(a) Boger et al., Tetrahedron 1991, 47: 2661-2682; y (b) Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 2001, 123: 5878-5891] a concentraciones hasta 1.000 veces más altas que aquellas en las que el compuesto de fármaco libre **(+)-4** es efectivo (Figs. 3 y 4). De manera similar, el compuesto pro-fármaco **(+)-7** no logró alquilar ADN en un ensayo libre de células sin una activación deliberada, mientras que la adición de L-glutatión promovió una liberación efectiva del fármaco libre dependiente del tiempo y una reacción lenta de alquilación del ADN que se procedió con una selectividad idéntica a la del fármaco libre principal (Fig. 1).

[0051] El compuesto de fármaco libre 19, a continuación, liberado en



se descubrió que la escisión reductiva del Compuesto **(+)-6** alquilaba el ADN de una manera análoga al Compuesto **(+)-4**, lo que indica que la carboxamida C₅ no altera significativamente las propiedades y capacidades de alquilación del ADN del Compuesto 4 del fármaco original (Fig. 5).

[0052] Estos estudios indican que la actividad citotóxica *in vitro* y la actividad antitumoral *in vivo* de los profármacos N-O probablemente no se derivan de los compuestos 3, 6 o 7 profármacos en sí mismos, pero son el resultado de su división reductiva para liberar los fenoles libres que, a su vez, son agentes alquilantes de ADN efectivos y compuestos citotóxicos potentes. Además, los estudios indican que los tioles solos son capaces de proporcionar esta activación reductora a través de la escisión nucleófila del enlace N-O, aunque no impiden que otros mecanismos reductores sean operativos también.

Actividad citotóxica *in vitro*

[0053] Ambos enantiómeros de los Compuestos **6** y **7** como sus Compuestos **12** y **15** precursores se analizaron para determinar la inhibición del crecimiento celular en un ensayo citotóxico con células de leucemia murina L1210 junto con el Compuesto **19** del fármaco libre y los compuestos de control relacionados (Tabla 2, a continuación). Se encontró que el Compuesto profármaco **(+)-6** exhibía un CI₅₀ de 0,99 nM, mientras que se encontró que el Compuesto pro-fármaco **(+)-7** más reactivo

Tabla 2

Compuesto	CI ₅₀ L1210	
	natural (nM)	no natural (nM)
1 , duocarmicina SA	0,010	0,100
2 , CC-1065	0,020	0,020
4 , seco-CBI-Indol ₂	0,030	0,900
6	0,99	740
7	0,30	65
(+)-19	0,073	
(+)-N-Boc-CBI	80	900
12	850	>1.000
15	650	>1.000

tenía en comparación un CI₅₀ de 0,30 nM. Los derivados de seco-CBI-indol₂ que carecen de un sustituyente C₅ necesario para soportar una espirociclación (p. ej., H u OMe) exhiben valores de CI₅₀ al menos 100 veces más altos que el compuesto **(+)-6** y 350 veces más altos que el compuesto **(+)-7** (CI₅₀>100 nM, L1210). [a] Jin y col., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129: 15391-15397; y (b) Lajiness et al., J. Med. Chem. 2010, 53: 7731-7738.]

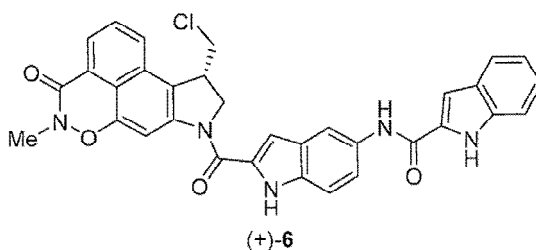
[0054] La diferencia de 3 veces en la potencia entre el Compuesto **(+)-6** y el Compuesto **(+)-7** refleja sus reactividades relativas hacia la escisión del N-O con el profármaco más reactivo que proporciona una liberación más fácil del fármaco libre bajo las condiciones en el ensayo. Se encontró que ambos enantiómeros no naturales profármacos, Compuestos **(-)-6** y **(-)-7**, son >200 veces menos potentes que los enantiómeros naturales. Se descubrió que el Compuesto **19**, fármaco libre original, probado como una mezcla racémica, es 2,5 veces menos potente que **(+)-CBI-indol₂ seco**, lo que indica que su enantiómero natural se aproxima mucho a la actividad de **(+)-CBI-indol₂**. Combinados, estos estudios indican que los profármacos Compuesto **6** y Compuesto **7** se dividen de manera efectiva, pero no rápida o completamente para proporcionar el fármaco libre en las condiciones del ensayo porque sus valores de CI₅₀ están entre 8 y 25 veces más altos que el Compuesto **19** de fármaco libre en sí.

[0055] A pesar de esta menor potencia *in vitro* en relación con el fármaco libre, es notable que ambos profármacos todavía muestren una potencia celular sub-nanomolar, siendo más potentes que la mayoría de los agentes antitumorales usados clínicamente. Además, su estabilidad química inherente sugiere que, como el Compuesto 3c, poseen un equilibrio adecuado entre la estabilidad química y la propensión a la escisión reductiva para mostrar una actividad antitumoral *in vivo* más eficaz que el fármaco libre en sí.

Actividad *in vivo* antitumoral

[0056] Aunque los resultados de los ensayos celulares funcionales muestran que el Compuesto (+)-6 es menos potente que su fármaco original, el Compuesto 19 y menos potente que el Compuesto (+)-7, la liberación lenta del fármaco libre podría resultar ventajosa *In vivo* debido a la notable potencia y la toxicidad inherente del compuesto original. [Wolfe y col., J. Med. Chem. 2012, 55: 5878-5886.] Por lo tanto, la evaluación preliminar de la actividad antitumoral *in vivo* de los profármacos N-O cíclicos se evaluó con el Compuesto (+)-6 y se realizó junto con *seco*-CBI-indol₂ (Compuesto 4) en un modelo antitumoral que consiste en células de leucemia murina L1210 implantadas ip en ratones B6D2F1 tradicionalmente utilizados para comparar inicialmente nuevos derivados de duocarmicina (Tabla 3, a continuación).

Tabla 3



Compuesto	Dosis µg/kg ^a	MSP días ^b	T/C ^c	Ratones supervivientes ^d
ninguno	0	17,6	100	0/10
4	60	>50	>284	1/10
4	100	6,4	36	0/10
4	250	3,7	21	0/10
4	500	3,0	17	0/10
6	60	28	159	0/10
6	200	>68	>386	1/10
6	500	>201	>1142	4/10
6	1.000	>199	>1130	4/10
6	2.500	>264	>1500	6/10

^aDosis (µg/kg en peso de animal) administrada i.p. durante los días 1, 5, y 9.
^bMSP = Periodo medio de supervivencia (días). ^cT/C = Tratado/control (MSP) x 100. ^dNúmero de animales vivos después de 366 días (terminados).

[0057] Un intervalo de dosis de 60 a 2.500 mg/kg para el compuesto profármaco (+)-6 (escalado a su Cl_{50} determinada) y de 60 a 500 mg/kg para *seco*-CBI-indol₂ (compuesto 4), y programa de dosificación (administrado ip tres veces en los días 1, 5 y 9) tradicionalmente utilizado para esta clase de compuestos. Una observación empírica adicional sutil, pero importante, realizada en los estudios fue que la administración profármaco fue tolerada en los sitios de inyección de los animales mucho mejor que el fármaco libre.

[0058] *seco*-CBI-indol₂ [Compuesto (+)-4] se administró en un rango (60 a 500 mg/kg) más allá de su dosis óptima (60 o 100 mg/kg) [(a) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. 1995, 3:1429-1453; y (b) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. Lett. 1991, 1:115-120; y a) Jin et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129: 15391-15397; y (b) Lajiness et al., J. Med. Chem. 2010, 53: 7731-7738] para resaltar su pequeña ventana terapéutica en comparación con la eficacia potencial del compuesto pro-fármaco (+)-6. Como se observó anteriormente, la administración del Compuesto (+)-4 a 60 mg/kg resultó en solo 1/10 sobreviviente a largo plazo (T/C>284) al finalizar el estudio (366 días). En todas las dosis más altas (100-500 mg/kg), el compuesto (+)-4 demostró ser tóxico, lo que lleva a la muerte prematura de los animales debido a la toxicidad del fármaco.

[0059] Notablemente, la administración del Compuesto (+)-6 produjo 6/10 sobrevivientes a largo plazo a 2.500 mg/kg (T/C>1500) y 4/10 sobrevivientes a largo plazo en las siguientes dos dosis más bajas de 1.000 mg/kg

(T/C>1130) y 500 mg/kg (T/C>1142). Debido a que la respuesta a la administración del Compuesto **(+)-6** fue tan notable, la duración del estudio se extendió a 366 días (1 año) donde los animales vivos representan sobrevivientes a largo plazo sin evidencia de toxicidad retardada.

[0060] Incluso a una dosis del Compuesto **(+)-6** (200 mg/kg) solo 3 veces más alto que la dosis óptima del Compuesto **(+)-4** (60 mg/kg), el profármaco superó al libre. droga (T/C 386 vs 284). Estos datos indican que el Compuesto **(+)-6** no sufre la toxicidad característica del Compuesto **(+)-4** incluso a dosis 40 veces más altas, que posee una ventana terapéutica mucho mayor (200 a >2.500 mg/kg) en comparación al estrecho intervalo de dosis de 30 a 100 mg/kg del Compuesto **(+)-4** [(a) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. 1995, 3:1429-1453; y (b) Boger et al., Bioorg. Medicine. Chem. Lett. 1991, 1:115-120; y a) Jin et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129: 15391-15397; y (b) Lajiness et al., J. Med. Chem. 2010, 53: 7731-7738], y que es mucho más y extraordinariamente eficaz *in vivo*.

[0061] Es posible que el Compuesto pro-fármaco **(+)-6** pueda beneficiarse de un nivel de dosificación aún mayor o un programa de dosis alternativo más allá de esta exploración inicial, y que tales dosis más altas puedan ser incluso más eficaces. Aunque estos estudios no establecen directamente que el fármaco libre se libera *in vivo* ni definen el sitio o el mecanismo de liberación libre del fármaco, los estudios sugieren que el comportamiento *in vivo* del *N*-acilo O-aminofenol profármaco beneficia de su liberación lenta controlada del fármaco libre o su escisión reductora intracelular dirigida.

Conclusiones

[0062] Se sintetizaron dos nuevos profármacos relacionados con duocarmicina *N*-acilo O-amino fenol, compuestos ilustrativos **(+)-6** y **(+)-7**, y se analizaron para determinar su actividad antitumoral como profármacos *in vitro* e *in vitro*. Los profármacos se diseñaron para estar sujetos a activación reductiva, quizás pudiendo ser capaces de escisión selectiva con la liberación del fármaco libre dentro de un entorno de células tumorales hipóxicas debido al aumento de la presencia en dichas células de nucleófilos reductores que pueden romper el débil enlace de N-O.

[0063] De los dos profármacos candidatos, el Compuesto de *N*-metilo oxazinona **(+)-6** resultó más estable que el Compuesto **(+)-7**, pero ambos demostraron ser notablemente estables en condiciones ácidas y básicas, así como en la reacción con nucleófilos modelo. No se encontró que ninguno de los dos profármacos fuera efectivo en la alquilación de ADN en ensayos sin células, pero al igual que en el Compuesto no profármaco **3c**, se encontró que estaban activados para la alquilación del ADN por los tioles (L-glutión). Esta reactividad hacia la escisión del enlace protector de N-O se reflejó en su actividad citotóxica *in vitro* con el Compuesto pro-fármaco más estable **(+)-6** mostrando una Cl_{50} menos potente (0,99 nM) que el Compuesto pro-fármaco más reactivo **(+)-7** (Cl_{50} = 0,30 nM). El Compuesto pro-fármaco **(+)-6**, que también se encontró estable en pH 7,0 tampón fosfato, plasma de ratón y plasma humano, se examinó *in vivo* en un modelo de ratón de leucemia realizado durante un período prolongado (366 días) y se encontró que exhibía una eficacia extraordinaria (T/C>1500, L1210; 6/10 sobrevivientes de un año) superando sustancialmente la eficacia del fármaco libre. El Compuesto profármaco **(+)-6** mostró una ventana de eficacia terapéutica que es mucho más grande que el fármaco libre, lo que permite una dosis ≥ 40 veces mayor que la del fármaco libre y, sin embargo, muestra una potencia *in vivo* que está dentro de 3 veces la de la droga libre. Claramente, el comportamiento *in vivo* del Compuesto **(+)-6** se beneficia de una liberación controlada del fármaco libre activo o de su escisión reductora intracelular. Estos y otros aspectos relacionados del comportamiento *in vivo* del Compuesto **6** están bajo investigación.

Seccion experimental

General

[0064] Los reactivos y disolventes se compraron en grado reactivo y se usaron sin purificación adicional. El plasma humano reunido, con citrato de sodio como anticoagulante, se compró a Innovative Research y se almacenó a -20°C. El THF se destiló recientemente de cetilo benzofenona de sodio. Todas las reacciones se realizaron en una vajilla de vidrio secada en horno bajo una atmósfera de Ar. La evaporación y la concentración al vacío se realizaron a 20°C. La TLC se realizó utilizando placas de vidrio de SiO₂ 60 F254 prerrevestidas de EMD con visualización mediante luz UV (254 o 366 nm). La HPLC de fase quiral se realizó utilizando una HPLC Shimadzu en una columna semipreparativa de Diacel ChiralCel OD (0,46 cm 3 25 cm) con un caudal de 7 ml/min y con detección de UV a λ = 254 nm. Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro automático Autopol III analítico de Rudolf Research (λ = 589 nm, 25°C).

[0065] Las RMN (¹H o ¹³C) se registraron en espectrofotómetros Bruker DRX-500 y DRX-600 NMP a 298K. Los picos de solventes residuales se utilizaron como referencia interna. Las constantes de acoplamiento (J) (H, H) se dan en Hz. Los patrones de acoplamiento se designan como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuádruplet (q), multiplete (m) o singlete ancho (br). Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 380 FT-IR y se midieron nítidos. Los datos del espectro de masas de alta resolución se adquirieron en un LC/MSD-TOF de alta resolución de Agilent Technologies, y las masas detectadas se dan como *m/z* y *m* representa el ion molecular. La pureza de cada compuesto analizado (>95%) se determinó en un instrumento Agilent 1100

10

15

20

25

30

35

40

45



55

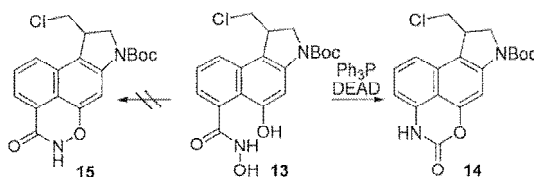
60

65

desplazamiento del fenol intramolecular. En contraste y de manera interesante, los intentos de preparar tales oxazinonas a través de una reacción tipo Mitsunobu del Compuesto **13** de ácido hidroxámico usando trifenilfosfina (Ph_3P) y azidocarboxilato de dietilo (DEAD) produjeron solo el Compuesto **14** del producto carbamato producido a través de un isocianato derivado de la reorganización de Lossen (Esquema 2), abajo.

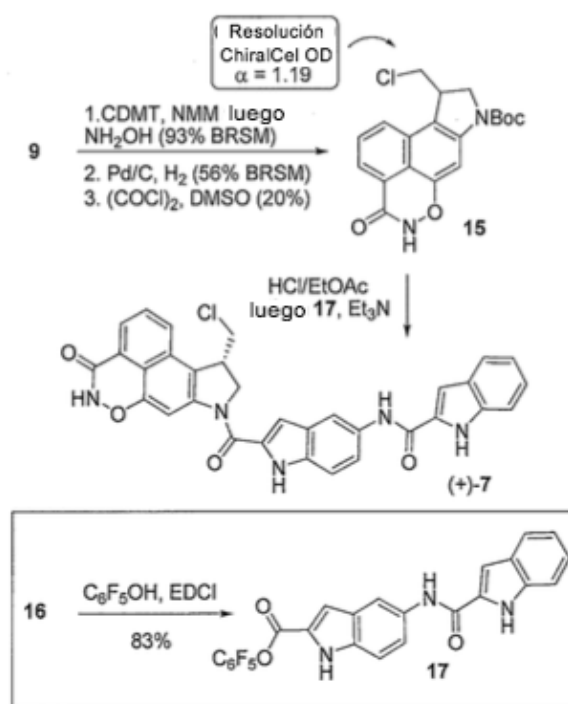
[0070] El Compuesto **12** de *N*-metilo oxazinona racémico se resolvió en sus dos enantiómeros mediante HPLC de fase quiral (ChiraCel OD) con 5% de *i*PrOH/hexanos como eluyente, y cada enantiómero se acopló con el Compuesto **16** utilizando EDCI después de una desprotección catalizada con ácido del grupo Boc que proporciona Compuestos (+)- y ent (-)-**6**.

Esquema 2



[0071] El Compuesto **7** de oxazinona que lleva un NH libre se preparó de manera análoga con cambios menores en la secuencia sintética general (Esquema 3), a continuación. Un éster de triazina activado del Compuesto **9** fue

Esquema 3



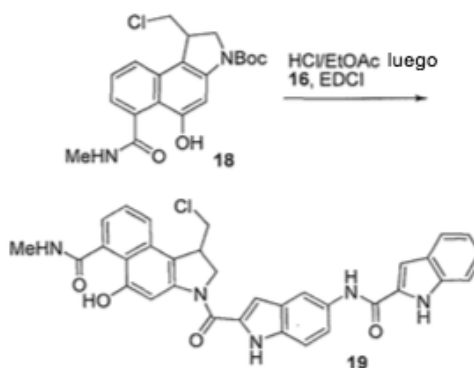
generado por reacción con 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT) y *N*-metilmorfolina (NMM) y atrapada in situ con hidroxilamina para dar el correspondiente ácido hidroxámico. La hidrogenólisis del éter bencílico para proporcionar el Compuesto **13** y el cierre de oxazinona tras la exposición del Compuesto **13** a las condiciones de oxidación de Swern proporcionó el Compuesto **15**, pero la escisión competitiva de N-O durante la hidrogenación fue más fácil que con el ácido hidroxámico secundario y la reacción fue más sensible al tiempo de reacción. El Compuesto **15** se resolvió mediante HPLC de fase quiral (ChiraCel OD) con un eluyente *i*PrOH al 15%/hexanos.

[0072] La desprotección de Boc de cada enantiómero del Compuesto **15** seguido del acoplamiento con el Compuesto **16** usando EDCI no proporcionó el Compuesto **7**, presumiblemente debido a la reacción competitiva de

la oxazinona ácida. Por lo tanto, el Compuesto de ácido carboxílico 16 se activó primero como su Compuesto de éster pentafluorofenílico 17 y se usó en la reacción de acoplamiento para producir el Compuesto (+)-7 y ent (-)-7.

[0073] Además de los compuestos 6 y 7 profármacos clave, se preparó el Compuesto 18 *N*-metilo amida extendiendo el tiempo de hidrogenación del Compuesto 10, dando como resultado la eliminación del éter bencilico y la escisión del ácido hidroxámico. La desprotección de Boc catalizada por ácido del Compuesto 18 y el acoplamiento de la amina libre liberada con el Compuesto 16 usando EDCI produjo el Compuesto 19 del fármaco libre parental como un racemato (Esquema 4) a continuación.

Esquema 4



1,2-dihidro-5-(benciloxi)-1-(clorometilo)-6-(ácido carboxílico)-benzo[e]indol-3-carboxilato de *tert*-butilo (compuesto 9)

[0074] El compuesto 8 (206 mg, 0,409 mmol) se disolvió en THF anhidro recién destilado (4,1 ml) y se enfrió a -78°C. Se añadió gota a gota fenilo litio (0,23 ml, solución 2,0 M en THF). Después de 45 minutos, se burbujeó CO₂ (g) en la mezcla de reacción durante 10 minutos, después de lo cual se dejó calentar lentamente a 0°C. La mezcla de reacción se inactivó con la adición de 2N HCl acuoso. La suspensión resultante se extrajo con Et₂O (3X). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con H₂O (23), NaCl acuoso saturado, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. La cromatografía flash (SiO₂, 20-100% de elución en gradiente de EtOAc/hexanos) proporcionó el Compuesto 9 (180 mg, 94%) como un sólido de color canela. ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 7,72 (br, 2H), 7,52 (d, *J* = 7 Hz, 1H), 7,38-7,32 (m, 3H), 7,25 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,11-4,01 (m, 3H), 3,94 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 3,75 (dd, *J* = 7,5, 11 Hz, 1H), 1,51 (s, 9H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ 154,9, 151,4, 136,7, 136,1, 130,2, 129,1, 128,4, 128,2, 128,1, 127,5, 127,2, 126,7, 125,7, 121,4, 117,1, 114,7, 97,2, 79,8, 69,9, 52,4, 47,6, 27,9. IR (película) ν_{max} 2980, 2903, 1693, 1415, 1141 cm⁻¹, ESI-TOF HRMS *m/z* 468,1569 (M+H⁺, C₂₆H₂₆ClNO₅ requiere 468,1572).

10-(Clorometilo)-5-metilo-4-oxo-9,10-dihidro-4H-pirrol[3',2':5,6]nafto[1,8-*de*][1,2]oxazina-8(5*H*)-carboxilato de *tert*-butilo (Compuesto 12)

[0075] El compuesto 9 de ácido carboxílico (199 mg, 0,420 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (8,5 ml) a 0°C se trató con (COCl)₂ (42 μl, 0,510 mmol). Se añadió una gota de DMF y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Después de 1 hora, se añadió mediante una cánula una solución premezclada de MeNH₂·HCl (177 mg, 2,13 mmol), Et₃N (0,29 ml, 2,13 mmol), 3 gotas de H₂O y THF (21,3 ml). Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y luego se diluyó con 2N HCl acuoso. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3X). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con H₂O y NaCl acuoso saturado, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. El sólido bruto (209 mg, 99%) se llevó a cabo sin purificación adicional. ESI-TOF HRMS *m/z* 497,1854 (M+H⁺, C₂₇H₂₉ClN₂O₅ requiere 497,1838).

[0076] El compuesto 10 de ácido *N*-metilhidroxámico (209 mg, 0,420 mmol) se disolvió en CH₃OH anhidro (8,4 mL) bajo Ar. Se añadió 10% de Pd/C (44 mg, 0,0042 mmol) y la atmósfera se intercambió con H₂. La mezcla de reacción se dejó agitar a 25°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con Et₂O, se filtró a través de Celite® y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO₂, elución con EtOAc) proporcionando el Compuesto 11 (78 mg, 45%) en forma de una espuma de color naranja. ESI-TOF HRMS *m/z* 407,1367 (M+H⁺, C₂₀H₂₃ClN₂O₅ requiere 407,1368).

[0077] Una solución agitada de (COCl)₂ (24 μl, 0,280 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (4 ml) a -78°C se trató con Me₂SO (44 μl, 0,570 mmol) en 3 ml de CH₂Cl₂ anhidro gota a gota. Después de 10 minutos, se añadió gota a gota el Compuesto 11 (78 mg, 0,190 mmol) en 12 ml de CH₂Cl₂ anhidro. Después de la adición, la mezcla de reacción se

dejó calentar lentamente a -10°C durante 2 horas. La reacción se detuvo con la adición de NH₄Cl acuoso saturado y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO₂, 50% de elución EtOAc/hexanos) proporcionando el Compuesto **12** (12,7 mg, 17%) como un sólido amarillo brillante. ¹H RMN (acetona-*d*₆, 600 MHz) δ 7,99 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,82 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,77 (br, 1H), 6,63 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,21 (m, 2H), 4,14 (m, 1H), 4,00 (dd, *J* = 11,1, 3,6 Hz, 1H), 3,79 (dd, *J* = 8,4, 11,4 Hz, 1H), 3,56 (s, 3H), 1,58 (s, 9H). ¹³C RMN (acetona-*d*₆, 150 MHz) δ 161,8, 153,7, 153,3, 144,8, 131,2, 130,0, 127,9, 123,9, 121,6, 118,5, 118,1, 99,2, 82,7, 54,7, 48,7, 45,5, 36,2, 29,5. IR (película) ν_{max} 2978, 1702, 1404, 1141 cm⁻¹, ESI-TOF HRMS *m/z* 389,1268 (M+H⁺, C₂₀H₂₁ClN₂O₄ requiere 389,1263).

[0078] Los enantiómeros se resolvieron en una columna semipreparativa de Diacel ChiralCel® OD (0,46 cm X 25 cm) con 5% de elución *i*-PrOH/hexanos. α = 1,14

(1S)-**12**: [α]_D²³ -35 (c 1,22, THF), enantiómero natural.

(1R)-**12**: [α]_D²³ +40 (c 0,42, THF), enantiómero no natural.

***N*-(2-(10-(Clorometilo)-5-metilo-4-oxo-5,8,9,10-tetrahidro-4H-pirrol-3',2':5,6]nafto[1,8-de][1,2]oxazina-8-carbonilo)-1H-indol-5-ilo)-1H-indol-2-carboxamida** (Compuesto **6**)

[0079] El Compuesto **12** de *N*-metiloxazinano (6,8 mg, 0,017 mmol) se disolvió en 4 N HCl en EtOAc (0,5 ml) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El disolvente se eliminó en una corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió en DMF anhidra (0,34 ml). Se añadieron EDCI (10,0 mg, 0,052 mmol) y el Compuesto **16** (6,1 mg, 0,019 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitar a 25°C durante 20 horas. La mezcla de reacción se inactivó con la adición de H₂O y se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó con HCl acuoso 2 N (3X), NaHCO₃ acuoso saturado (5X) y NaCl acuoso saturado. El extracto orgánico se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO₂, 40% de THF/tolueno) proporcionando el Compuesto **6** (5,7 mg, 56%) como un sólido amarillo. ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 11,84 (s, 1H), 11,73 (s, 1H), 10,18 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,09 (br, 1H), 7,90 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,74 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,68 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 7,50-7,47 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,21 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,07 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,91 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H), 4,65 (dd, *J* = 11,4, 2,4 Hz, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,09-4,04 (m, 1H), 4,03-4,01 (m, 1H), 3,58 (s, 3H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 150 MHz) 160,3, 159,5, 159,4, 150,1, 142,9, 136,6, 133,4, 131,77, 131,70, 130,6, 128,5, 128,4, 127,04, 127,02, 126,9, 123,4, 121,5, 121,5, 120,5, 119,7, 119,5, 118,2, 117,0, 112,8, 112,27, 112,24, 106,2, 103,3, 98,9, 54,9, 47,5, 40,7, 34,9. ESI-TOF HRMS *m/z* 590,1592 (M+H⁺, C₃₃H₂₄ClN₅O₄ requiere 590,1589).

(1S)-**6**: [α]_D²³ +54 (c 0,38, THF), enantiómero natural.

(1R)-**6**: [α]_D²³ -57 (c 0,24, THF), enantiómero no natural.

10-(Clorometilo)-4-oxo-9,10-dihidro-4H-pirrol-3',2':5,6]nafto[1,8-de][1,2]oxazina-8 (5H)-carboxilato (Compuesto **15**)

[0080] El Compuesto **9** de ácido carboxílico (191 mg, 0,41 mmol) en THF anhidro (2,0 ml) a 25°C se trató con CDMT (78,0 mg, 0,45 mmol) y NMM (134 ml, 1,22 mmol). Después de 2 horas, se añadió NH₂OH-HCl (31 mg, 0,45 mmol) en 2,0 ml de DMF y la mezcla de reacción se agitó durante 6 horas. Después de 6 horas, la mezcla de reacción se inactivó con la adición de H₂O y se extrajo con EtOAc (3X). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con HCl acuoso 2 N, NaCl acuoso saturado, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO₂, 50% de elución EtOAc/hexanos) proporcionando el ácido hidroxámico (130 mg, 93% de BRSM) en forma de una espuma de color marrón claro. ESI-TOF HRMS *m/z* 483,1677 (M+H⁺, C₂₆H₂₇ClN₂O₅ requiere 483,1681).

[0081] El ácido hidroxámico (130 mg) se disolvió en CH₃OH anhidro (3,36 ml) bajo Ar. Se añadió 10% de Pd/C (28,6 mg, 0,026 mmol) y la atmósfera se intercambió con H₂. La mezcla de reacción se dejó agitar a 25°C durante 50 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con Et₂O, se filtró a través de Celite® y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO₂, elución con EtOAc) proporcionando el Compuesto **13** (46 mg, 56% de BRSM) en forma de una espuma de color naranja. ESI-TOF HRMS *m/z* 393,1208 (M+H⁺, C₁₉H₂₁ClN₂O₅ requiere 393,1212).

[0082] Una solución agitada de (COCl)₂ (14,7 ml, 0,175 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (3 ml) a -78°C se trató con Me₂SO (27,3 μl, 0,351 mmol) en 2 ml de CH₂Cl₂ anhidro gota a gota. Después de 10 minutos, se añadió gota a gota el Compuesto **13** (46 mg, 0,117 mmol) en 6 ml de CH₂Cl₂ anhidro. Después de la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar lentamente a -10°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactivó con la adición de NH₄Cl acuoso saturado y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO₂, 50% de elución EtOAc/hexanos) produciendo el Compuesto **15** (9 mg, 27%) en forma de un sólido color canela. ¹H RMN (acetona-*d*₆, 600 MHz) δ 8,04 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,79 (br, 1H), 7,66 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,22-4,16 (m, 3H), 4,01 (dd, *J* = 11,1, 3,6 Hz, 1H), 3,79 (dd, *J* = 8,1, 11,4 Hz, 1H), 1,57 (s, 9H). ¹³C RMN (THF-*d*₈, 150 MHz) δ 161,9, 153,5, 152,8, 144,2, 130,5, 129,0, 126,5, 122,4, 118,9, 118,3, 116,1, 98,0, 81,6, 53,9, 47,3, 42,3, 28,6. IR (película) ν_{max} 2920, 1660, 1409, 1139, 758 cm⁻¹, ESI-TOF HRMS *m/z* 375,1120 (M+H⁺, C₁₉H₁₉ClN₂O₄ requiere 375,1106).

[0083] Los enantiómeros se resolvieron en una columna semipreparativa de Diacel ChiralCel® OD (0,46 cm X 25 cm) con elución al 15% de *i*-PrOH/hexanos. $\alpha = 1,19$.

(1S)-**15**: $[\alpha]^{23}_D -17$ (c 0,39, THF), enantiómero natural.

(1R)-**15**: $[\alpha]^{23}_D +19$ (c 0,30, THF), enantiómero no natural.

5

Perfluorofenilo 5-(1H-Indol-2-carboxamido)-1H-indol-2-carboxilato (Compuesto 17)

[0084] El Compuesto **16** (20 mg, 0,062 mmol), C_6F_5OH (17,2 mg, 0,093 mmol) y EDCI (35,5 mg, 0,186 mmol) se combinaron, se suspendieron en DMF (0,62 mL), y la mezcla se agitó a 25°C. C durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con H_2O . Las capas orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida. El Compuesto **17** (25 mg, 83%) se aisló como un sólido de color canela. 1H RMN (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 12,44 (s, 1H), 11,72 (s, 1H), 10,24 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,74 (dd, $J = 10,8, 1,8$ Hz, 1H), 7,68 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,62 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,53 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,22 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,08 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 159,5, 156,9, 141,6, 139,9, 138,3, 136,6, 135,6, 132,5, 131,6, 127,0, 126,4, 124,2, 123,5, 123,2, 121,6, 121,5, 119,7, 112,89, 112,88, 112,2, 111,9, 103,4. IR (película) ν_{max} 3360, 3256, 1721, 1646, 1515, 994 cm^{-1} , ESI-TOF HRMS m/z 486,0890 ($M+H^+$, $C_{24}H_{12}F_5N_3O_3$ requiere 486,0872).

10

15

N-(2-(10-(Clorometilo)-4-oxo-5,8,9,10-tetrahidro-4H-pirrolo[3',2':5,6]nafto[1,8-de][1,2]oxazina-8-carbonilo)-1H-indol-5-ilo)-1H-indol-2-carboxamida (Compuesto 7)

20

[0085] El Compuesto **15** (3,2 mg, 0,008 mmol) se disolvió en 4 N HCl en EtOAc (0,3 ml) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El disolvente se eliminó en una corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió en DMF anhidra (0,2 ml). Se añadieron Et_3N (5,9 ml, 0,042 mmol) y Compuesto **17** (4,9 mg, 0,010 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitar a 25°C durante 20 horas. La mezcla de reacción se inactivó con la adición de H_2O y se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO_2 , 40% de THF/tolueno) proporcionando el Compuesto **7** (1,07 mg, 22%) como un sólido amarillo. 1H RMN (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 11,83 (s, 1H), 11,73 (s, 1H), 10,18 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,16 (br, 1H), 8,02 (br, 1H), 7,71 (br, 1H), 7,68 (d, $J = 18$ Hz, 1H), 7,59 (dd, $J = 9,3, 2,4$ Hz, 1H), 7,49-7,46 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,21 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 7,07 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,89 (t, $J = 9$ Hz, 1H), 4,64 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 4,35 (br, 1H), 4,08-3,99 (m, 2H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 150 MHz) 161,9, 160,3, 159,4, 143,2, 136,6, 133,4, 131,8, 131,7, 130,8, 128,6, 128,4, 127,9, 127,0, 124,8, 123,5, 121,6, 119,8, 119,5, 118,8, 112,8, 112,3, 112,2, 106,9, 106,1, 103,3, 98,7, 66,9, 66,5, 54,9, 47,3, 40,7 δ . ESI-TOF HRMS m/z 576,1423 ($M+H^+$, $C_{32}H_{22}ClN_5O_4$ requiere 576,1433).

25

30

35

(1S)-**7**: $[\alpha]^{23}_D +18$ (c 0,06, acetona), enantiómero natural.

(1R)-**7**: $[\alpha]^{23}_D -16$ (c 0,07, acetona), enantiómero no natural.

1,2-dihidro-1-(clorometilo)-5-hidroxi-6-(metilcarbamoilo) benzo[e]indol-3-carboxilato de *tert*-butilo (compuesto 18)

[0086] 1H RMN (acetona- d_6 , 600 MHz) δ 10,66 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,96 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,74 (br, 1H), 7,56 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,46 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,21 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 4,14-4,09 (m, 2H), 3,95 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 3,68 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H), 3,01 (s, 3H), 1,58 (s, 9H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 171,5, 154,7, 151,5, 141,7, 135,5, 130,6, 126,1, 123,1, 122,2, 117,0, 113,3, 99,6, 80,2, 52,3, 47,6, 40,2, 28,0, 26,1. IR (película) ν_{max} 2924, 1697, 1615, 1539, 1403, 1327, 1137, 760 cm^{-1} , ESI-TOF HRMS m/z 391,1422 ($M+H^+$, $C_{20}H_{23}ClN_2O_4$ requiere 391,1419).

40

45

3-(5-(1H-Indol-2-carboxamido)-1H-indol-2-carbonilo)-1-(clorometilo)-5-hidroxi-N-metilo-1,2-dihidrobenczo[e]indol-6-carboxamida (Compuesto 19)

[0087] El Compuesto **18** (15 mg, 0,038 mmol) se disolvió en 4 N HCl en EtOAc (1 ml) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El disolvente se eliminó en una corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió en DMF anhidra (0,76 ml). Se añadieron EDCI (21,9 mg, 0,115 mmol) y Compuesto **16** (14,6 mg, 0,045 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitar a 25°C durante 22 horas. La mezcla de reacción se inactivó con la adición de H_2O y se diluyó con EtOAc. La fase orgánica se lavó con HCl acuoso 2 N (3X), $NaHCO_3$ acuoso saturado (5X) y NaCl acuoso saturado. El extracto orgánico se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por PTLC (SiO_2 , 40% THF/tolueno) proporcionando el Compuesto **19** (7,1 mg, 31%) en forma de un sólido amarillo oscuro. 1H RMN (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 11,74 (d, $J = 16,2$ Hz, 2H), 10,48 (s, 1H), 10,18 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,07-8,06 (m, 1H), 7,95 (br, 1H), 7,90 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,68 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7,50-7,47 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 7,24-7,18 (m, 3H), 7,07 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,84 (t, $J = 10,2$ Hz, 1H), 4,59 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 4,28 (m, 1H), 4,01 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 3,88 (dd, $J = 7,2, 10,8$ Hz, 1H), 2,77 (s, 3H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 171,2, 159,7, 159,1, 154,0, 142,2, 136,3, 135,3, 132,9, 131,5, 131,2, 130,8, 130,0, 126,74, 126,72, 125,9, 123,3, 123,1, 122,7, 121,2, 119,4, 118,9, 117,7, 114,9, 112,5, 112,0, 111,8, 105,4, 103,0, 101,4, 54,5, 47,3, 40,8, 25,9. IR (película) ν_{max} 3293, 2953, 1613, 1516, 1402, 1241, 1138 cm^{-1} , ESI-TOF HRMS m/z 592,1744 ($M+H^+$, $C_{33}H_{26}ClN_5O_4$ requiere 592,1746).

50

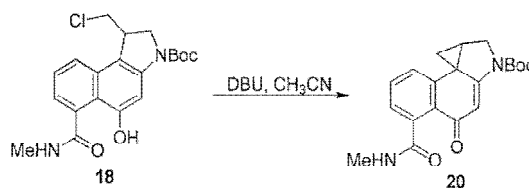
55

60

3-(5-(1H-indol-2-carboxamido)-1H-indol-2-carbonilo)-1-(clorometilo)-5-hidroxi-N-metilo-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-6-carboxamida (Compuesto 20)

65

[0088]



[0089] El Compuesto **18** (11,3 mg, 28 mmol) en 0,6 ml de acetonitrilo se trató con 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]undec-7-eno (DBU, 12,9 ml, 0,086 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 90 minutos. Después de 90 minutos, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por PTLC (SiO₂, EtOAc) para proporcionar el Compuesto **20** (1,5 mg, 15% de rendimiento) como una espuma amarilla. ¹H RMN (acetona-*d*₆, 600 MHz) δ 7,48 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,18 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,08 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,78 (br, 1H), 6,65 (br, 1H) 4,05-3,99 (m, 2H), 3,03 (m, 1H), 2,86 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H), 1,64 (dd, *J* = 7,2, 4,2 Hz, 1H), 1,52 (s, 9H), 1,49 (t, *J* = 4,2 Hz, 1H). ¹³C RMN (acetona-*d*₆, 150 MHz) δ 185,5, 172,6, 153,1, 142,7, 140,7, 132,6, 131,3, 127,5, 123,8, 109,5, 101,2, 83,8, 54,5, 35,0, 33,3, 29,0, 27,5, 25,4. ESI-TOF HRMS *m/z* 355,1656 (M+H⁺, C₂₀H₂₂N₂O₄ requiere 355,1652).

Estudios de alquilación de ADN

[0090] Ver Boger et al., Tetrahedron 1991, 47: 2661-2682 para detalles completos del ensayo de alquilación de ADN. Las reacciones de alquilación del ADN se realizaron a 25°C con ADN w794 marcado en el extremo 5'-³²P, que contiene un único sitio de alquilación principal para los productos naturales. La activación reductora de glutatión de los Compuestos **(+)-7** y **(+)-3c** se realizó durante el tiempo especificado con L-glutatión 1 M a 37°C.

Ensayo de inhibición del crecimiento celular

[0091] Los compuestos se ensayaron para determinar su inhibición del crecimiento celular de células de leucemia linfocítica de ratón L1210 (ATCC CCL-219). Una población de células (>1 X 10⁶ células/ml según lo determinado con un hemocitómetro) se diluyó con una cantidad apropiada de Medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM, Gibco) que contenía suero fetal bovino al 10% (FBS, Gibco) hasta una concentración final de 30.000 células/ml. A cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Corning® Costar®), se agregaron 100 µl de la solución de medio celular con una pipeta multicanal. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y aire humidificado al 95% durante 24 horas. Los compuestos de prueba se agregaron a la placa de la siguiente manera: las sustancias de prueba se diluyeron en DMSO a una concentración de 1 mM y se realizaron diluciones en serie de 10 veces en una placa separada de 96 pocillos. Se añadió medio de cultivo fresco (100 µl) a cada pocillo de células para constituir 200 µl de medio por pocillo seguido de 2 µl de cada agente de prueba. Los compuestos se ensayaron por duplicado (≥2 veces) a seis concentraciones entre 0-100 nM o 0-1.000 nM. Después de la adición, los cultivos se incubaron durante 72 horas adicionales.

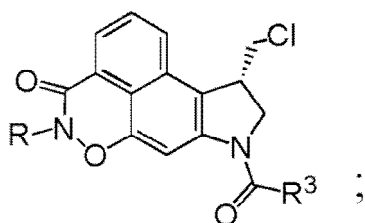
[0092] Se usó un ensayo de fosfatasa para establecer los valores de CI₅₀ de la siguiente manera: se eliminaron los medios de cada célula y 100 µl de solución de fosfatasa (100 mg de sustrato de fosfatasa en 30 ml de NaOAc 0,1 M, pH 5,5, Triton® X al 0,1%). Se añadió 100 µl tampón a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Después del tiempo de incubación dado, se agregaron 50 µl de NaOH 0,1 N a cada pocillo y se determinó la absorción a 405 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos. Como la absorción es directamente proporcional al número de células vivas, se calcularon los valores de CI₅₀ y los valores informados representan el promedio de ≥4 determinaciones (SD + 10%).

Actividad *in vivo* antitumoral

[0093] Los ratones B6D2F1 se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con células singénicas L1210 (1 X 10⁶) en el día 0. Diez ratones fueron asignados al azar al vehículo de control o grupos de tratamiento para los Compuestos **(+)-4** y **(+)-6** en dosis de 60, 100, 250 y 500 mg/kg/inj para los Compuestos **(+)-4** o 60, 200, 500, 1.000 y 2.500 mg/kg/inj para los Compuestos **(+)-6**. Los compuestos **(+)-4** y **(+)-6** se formularon en DMSO al 100%. Ambos compuestos se inyectaron i.p. los días 1, 5 y 9. Después de la inyección de células tumorales, los animales se controlaron diariamente y se pesaron dos veces por semana. El porcentaje de supervivencia (T/C) para los grupos tratados y de control se determinó dividiendo los días de supervivencia total para cada grupo de tratamiento por los días de supervivencia total para el grupo control y multiplicando X 100. Todos los estudios en animales se llevaron a cabo en las instalaciones de animales de The University of Kansas Medical Center con estricto cumplimiento de las directrices del Comité de Bienestar Animal de IACUC de KUMC (aprobación IACUC n° 2009-1837).

REIVINDICACIONES

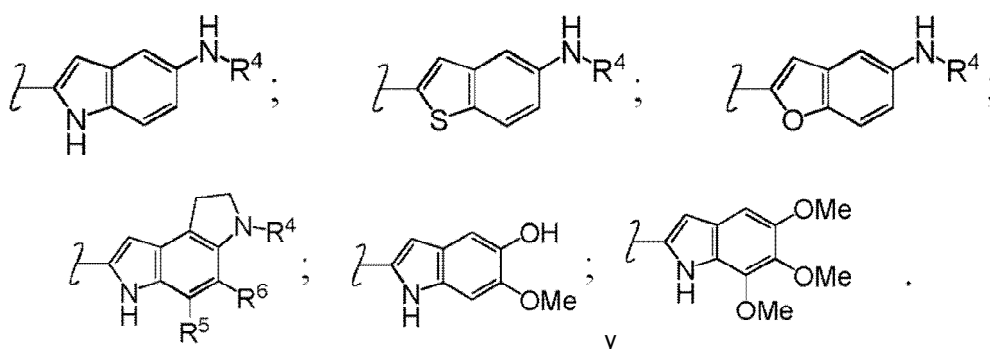
1. Un derivado cíclico de *N*-acilo *O*-aminofenol CBI representado por la Fórmula I:



Formula I

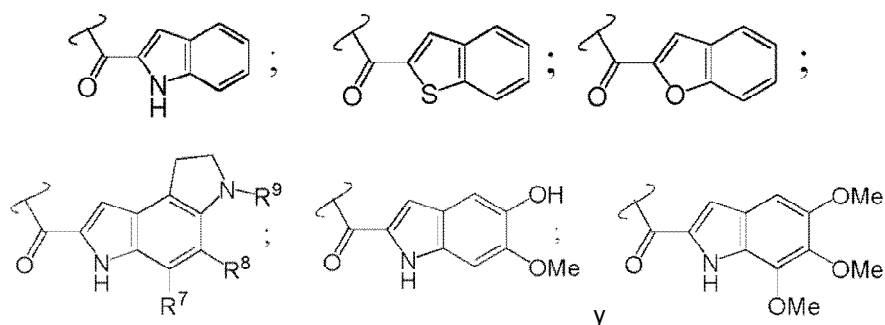
en donde:

R es hidrido o un hidrocarbilo C₁-C₆; y
R³ se selecciona de un grupo que consiste en radicales representados de la siguiente manera:



en donde:

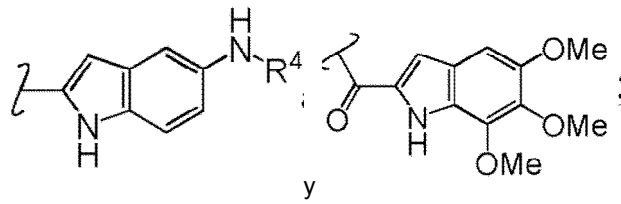
R⁴ se selecciona de un grupo que consiste en radicales representados de la siguiente manera:



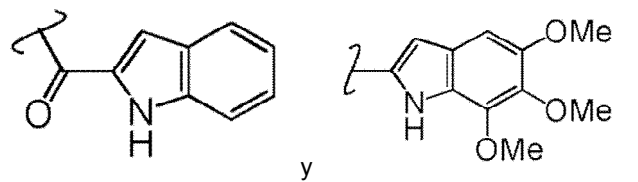
R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente del grupo de radicales que consiste en -H, -OH, -O(hidrocarbilo C₁-C₆), hidrocarbilo C₁-C₆ y halógeno; y
R⁹ se selecciona del grupo de radicales que consiste en -H, -C(O)O(hidrocarbilo C₁-C₆), -C(O)(hidrocarbilo C₁-C₆), -C(O)NH₂, -C(O)NHNH₂, y -C(O)NHNHC(O)O(hidrocarbilo C₁-C₆).

2. El derivado cíclico de *N*-acilo *O*-aminofenol CBI de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R es hidrido o metilo.

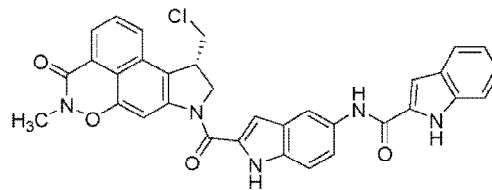
3. El derivado cíclico de *N*-acilo *O*-aminofenol CBI de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R³ es uno u otro de los siguientes radicales:



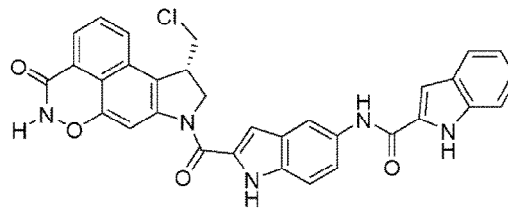
y
R⁴ uno u otro de los siguientes radicales



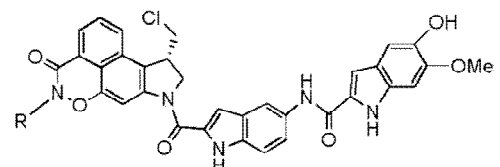
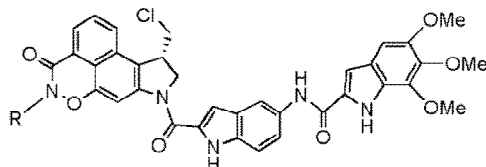
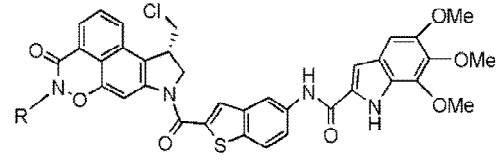
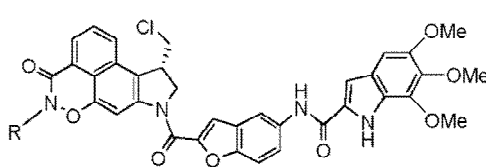
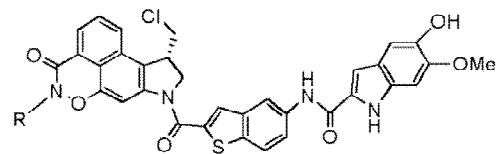
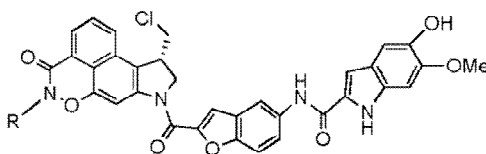
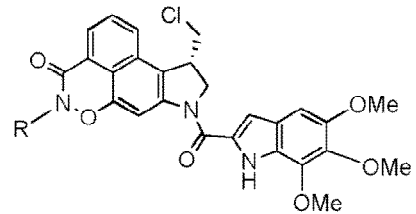
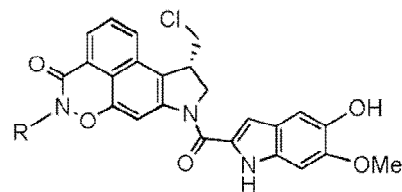
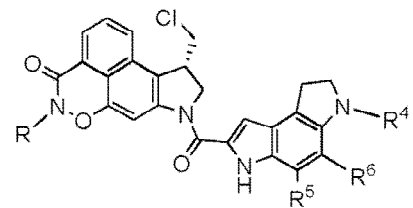
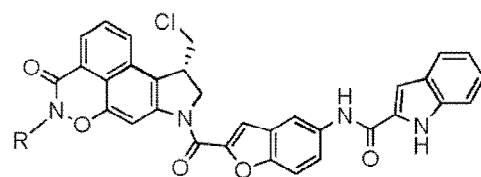
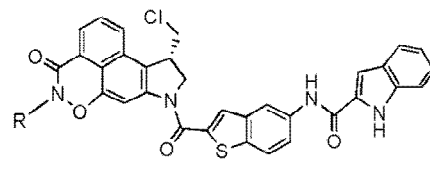
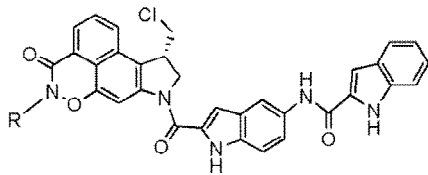
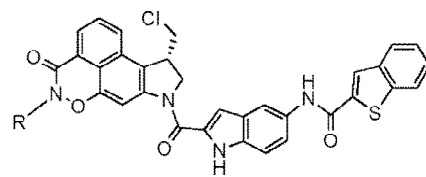
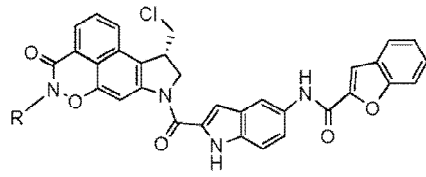
4. El derivado cíclico de *N*-acilo O-aminofenol CBI de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por la fórmula



5. El derivado cíclico de *N*-acilo O-aminofenol CBI de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por la fórmula



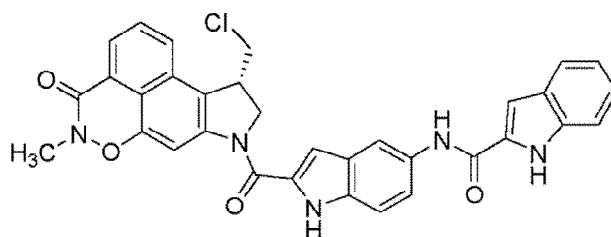
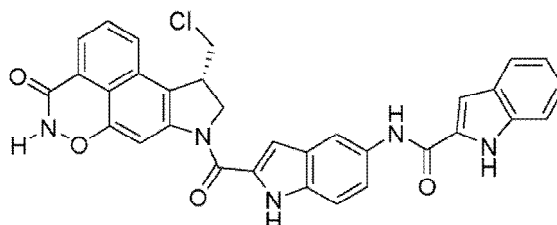
6. El derivado cíclico de *N*-acilo O-aminofenol CBI de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por una fórmula seleccionada del grupo que consiste en uno o más de



en donde R, R⁴, R⁵ y R⁶ son como se definieron anteriormente.

7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad inhibidora de la enfermedad proliferativa de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 disuelta o dispersada en un diluyente farmacéuticamente aceptable.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho compuesto es uno u otro o ambos de

 y 

9. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un mamífero.

10. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad proliferativa es leucemia.

11. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es uno u otro o ambos

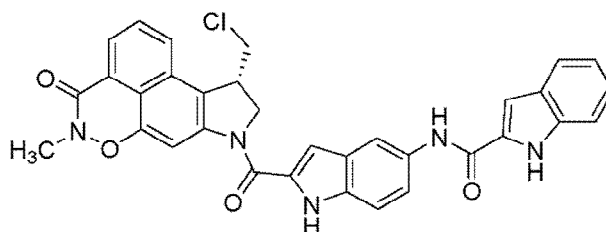
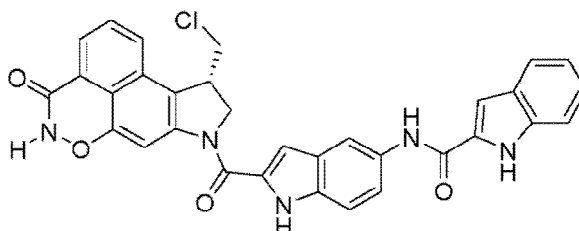
 y 

Fig. 1

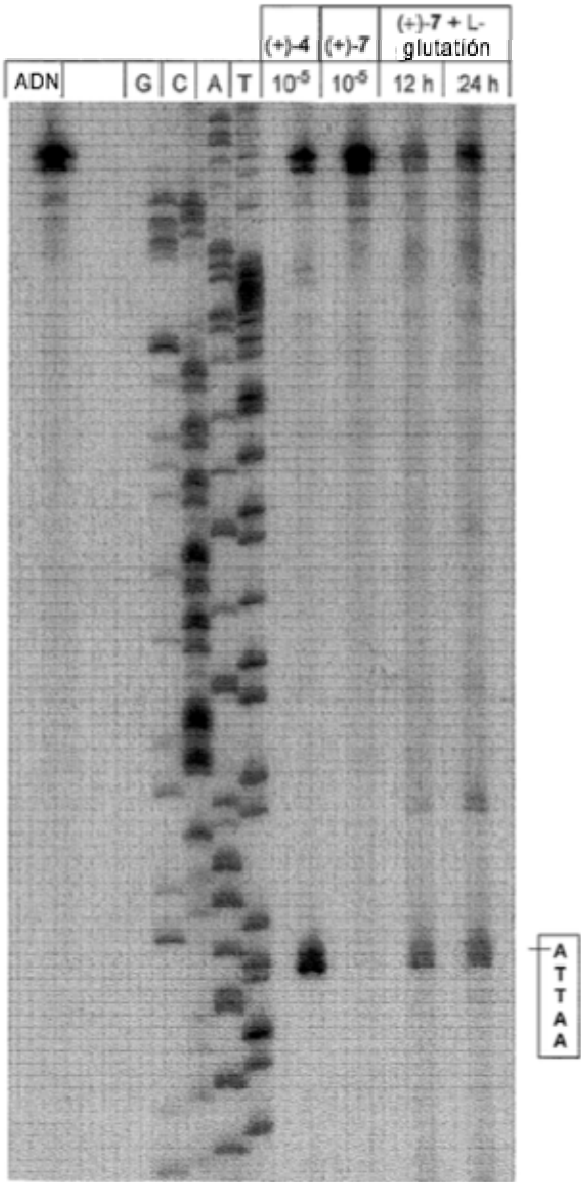


Fig. 2

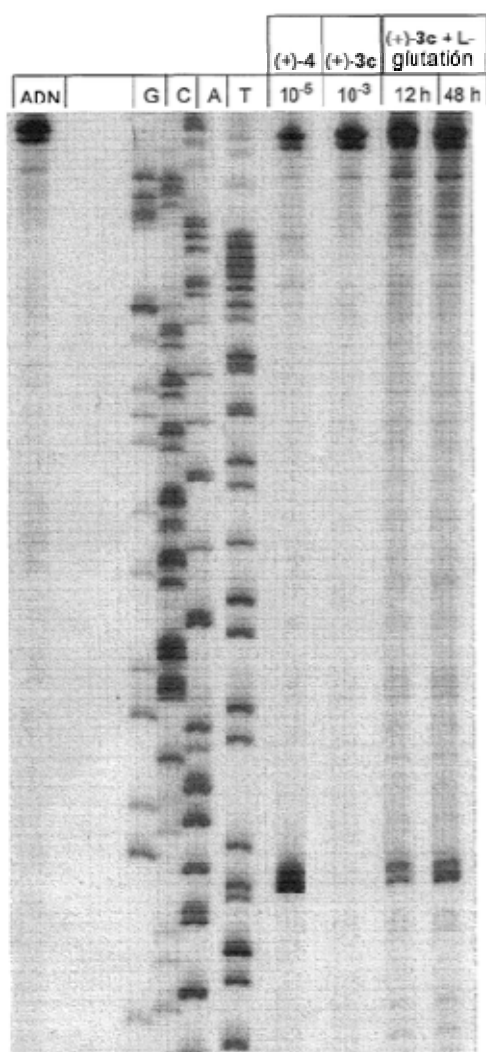


Fig. 3

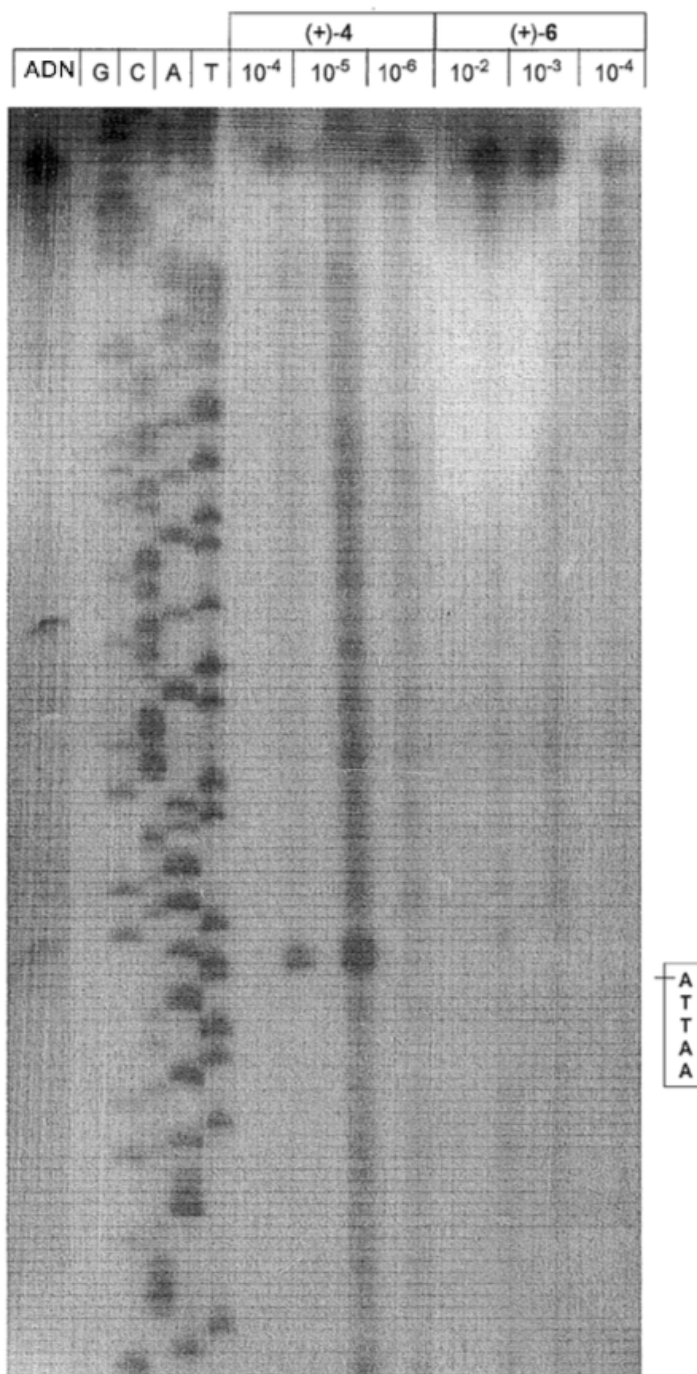


Fig. 4

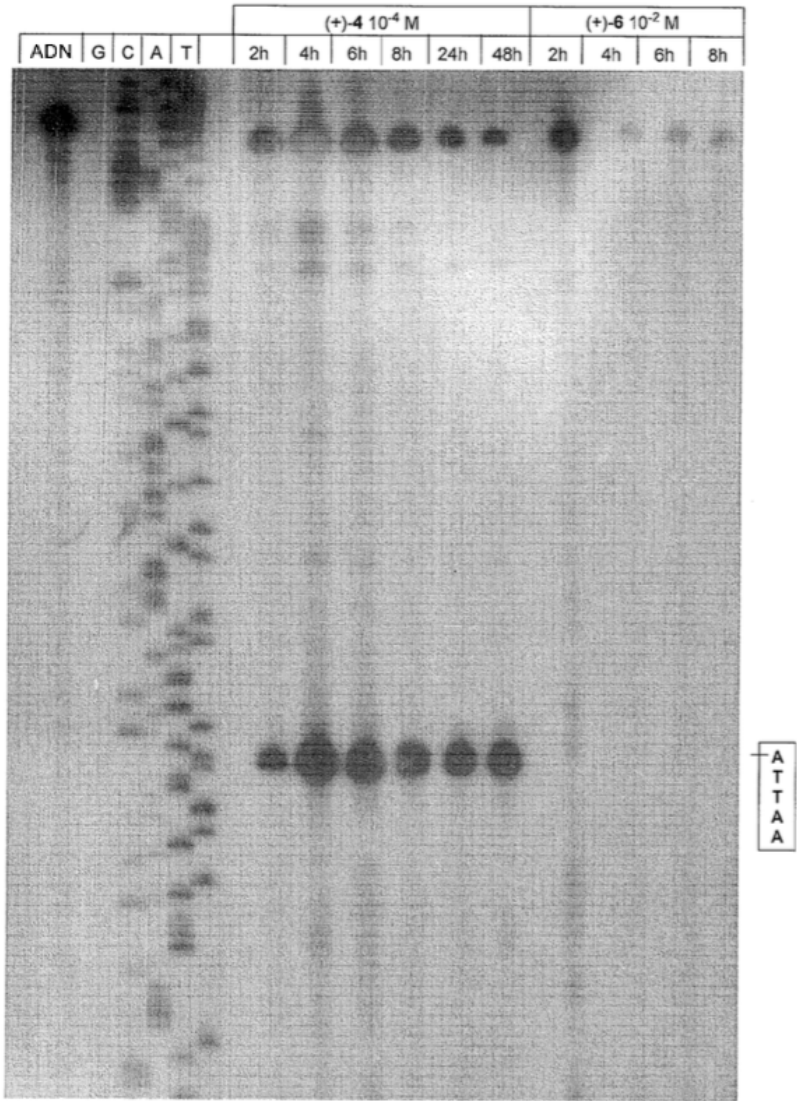


Fig. 5

