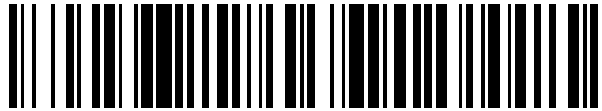


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 701**

51 Int. Cl.:

**C07D 403/14** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015 PCT/US2015/023954**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 15773524 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3126356**

54 Título: **Conjugados de ligando-fármaco del receptor sigma-2 como compuestos antitumorales, métodos de síntesis y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**01.04.2014 US 201461973366 P**

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

**20.02.2020**

73 Titular/es:

**WASHINGTON UNIVERSITY (100.0%)**

**One Brookings Drive**

**Saint Louis, MO 63130 , US**

72 Inventor/es:

**HAWKINS, WILLIAM;**

**MACH, ROBERT;**

**SPITZER, DIRK;**

**VANGVERAVONG, SUWANNA y**

**VAN TINE, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 743 701 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**

Conjugados de ligando-fármaco del receptor sigma-2 como compuestos antitumorales, métodos de síntesis y usos de los mismos

**Campo**

- 5 La presente descripción se refiere a compuestos y composiciones de unión al receptor sigma-2, y a su aplicación como productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades. Más particularmente, las realizaciones están relacionadas con conjugados de ligando-fármaco del receptor sigma-2, su síntesis y su uso para tratar enfermedades hiperproliferativas tales como el cáncer.

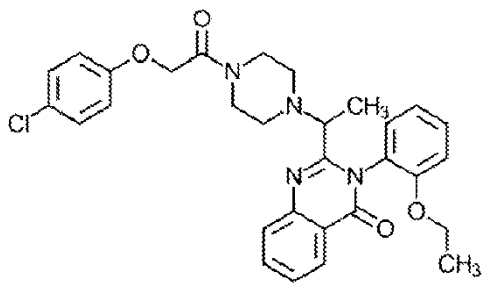
**Descripción de la técnica relacionada**

- 10 El cáncer de páncreas es la cuarta causa de muerte por cáncer, y se espera que sea la segunda causa en 2020. Con las opciones de tratamiento actuales, la tasa de supervivencia a cinco años para el cáncer de páncreas es de solo un 5,8% y existe una necesidad urgente de nuevas terapias.

- 15 Los receptores sigma-2 (S2R) se sobreexpresan en células de adenocarcinomas ductales de páncreas (PDAC) y tienen una alta afinidad por los ligandos de S2R. Los ligandos de S2R se localizan en células PDAC y son internalizados rápidamente por las células cancerosas, lo que finalmente conduce a la apoptosis y la muerte celular. Los ligandos de S2R también potencian las quimioterapias anticancerosas convencionales y mejoran la supervivencia en modelos de adenocarcinoma de páncreas.

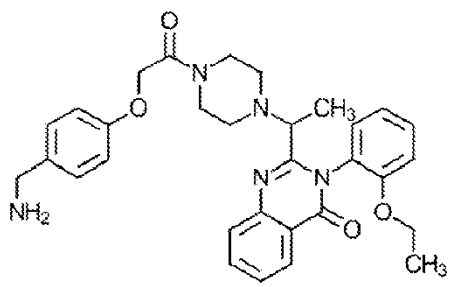
- 20 Para demostrar que los ligandos de S2R se unen preferentemente a adenocarcinomas de páncreas se han utilizado ligandos de S2R unidos a marcadores de imagen de moléculas pequeñas, y éstos se pueden usar para visualizar el S2R en células cancerosas. De modo similar, los ligandos de S2R se pueden unir a péptidos o peptidomiméticos proapoptóticos, que se pueden administrar selectivamente a células cancerosas.

El Erastin, de la estructura:



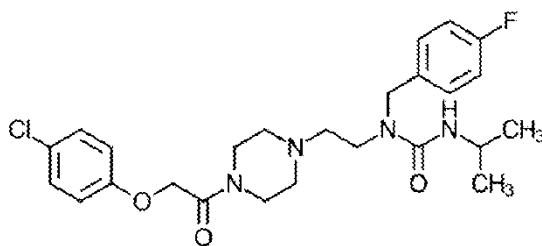
- 25 es un fármaco con selectividad para matar células con mutaciones oncogénicas de K-ras al mediar en la muerte celular mediante un proceso no apoptótico dependiente del hierro denominado ferroptosis. Sin embargo, este fármaco tuvo malos resultados en ensayos clínicos iniciales.

El Erastin se ha descrito en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2007/0161644 de Stockwell, B. R., de acuerdo con la cual tiene propiedades de destrucción celular que no son apoptóticas. Esta referencia también dio a conocer determinados análogos del Erastin, como el Erastin A de la estructura

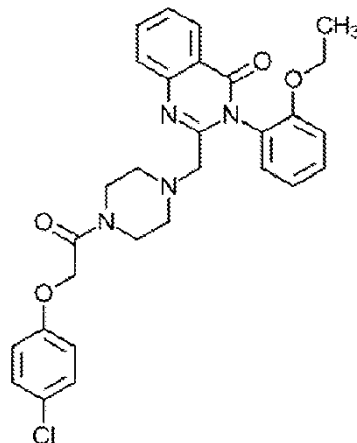


30

el Erastin B de la estructura

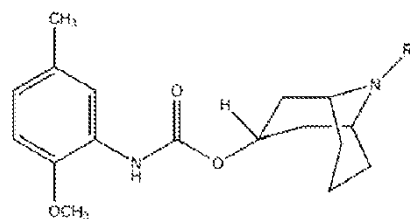


y el des-metil Erastin (designado "compuesto 21") de la estructura

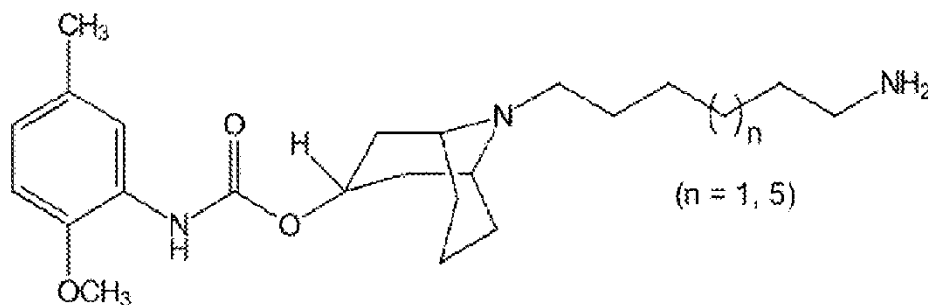


5 (también designado en la presente memoria como SW V-27). El inventor en esta solicitud afirmó que el des-metil Erastin tiene una actividad destructora de células tumorales comparable a la del Erastin. Dixon, S. J., et al., Cell 149: 1060-1072, 2012 describen el Erastin como mediador de una muerte celular oxidante no apoptótica dependiente del hierro ("ferroptosis"). Sin embargo, estas referencias no describen compuestos que comprenden un resto bicíclico, y los compuestos descritos no son también mediadores de la muerte celular apoptótica.

10 La patente de EE. UU. 8,143,222 de McDunn, J. E., et al., así como Spitzer, D. et al., Cancer Res. 72: 201-209, 2012 y Hornick, J. R., et al. Molecular Cancer 9: 298, 2010, describen compuestos para el tratamiento del cáncer. Los compuestos descritos en estas referencias incluyen moléculas que tienen un resto dirigido que se une al receptor sigma-2 (Zeng, C., et al., Cancer Res. 67: 6708-6716, 2007) y un resto inductor de apoptosis tal como un péptido proapoptótico. Los compuestos descritos incluyen un ligando del receptor sigma-2 tal como un resto de fenilcarbamato de 9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -ilo N-sustituido de la estructura:

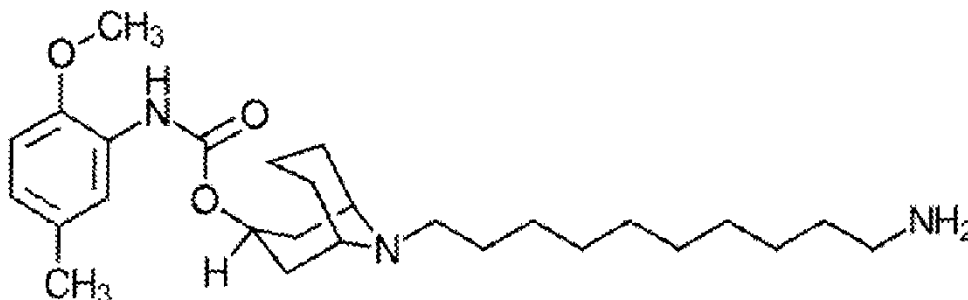


15 en la que R se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un enlace, un C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo, una C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilamina, una C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilamida, un C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> heteroalquilo, un C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> arilo, un C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> heteroarilo, un éster y un polímero hidrófilo. En algunas configuraciones, los compuestos de esta patente incluyen derivados de alquilamina de un resto fenilcarbamato bicíclico, tal como



20

(designado SV119 cuando  $n = 1$ ) y SW43 de la estructura

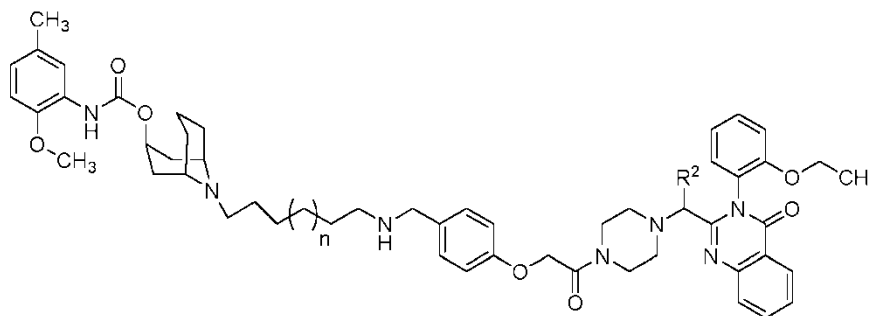


5 Aunque algunos compuestos descritos en estas referencias presentan de acuerdo con las mismas una actividad destructora de células tumorales, ninguno de ellos se describe como mediador de la muerte celular oxidante dependiente del hierro (ferroptosis).

### Compendio

Por consiguiente, los inventores describen en la presente memoria nuevas composiciones y compuestos y métodos de síntesis de los mismos, y métodos para tratar trastornos hiperproliferativos, que incluyen diversos tipos de cáncer.

En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen un compuesto o una sal del mismo, de la estructura



10 en donde  $n$  es un número entero de 1 a 5 y R<sup>2</sup> es H o metilo.

En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen composiciones que comprenden un compuesto tal como se ha descrito más arriba y un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 También se describen métodos para tratar un trastorno hiperproliferativo en un individuo que lo necesite, que comprenden la etapa consistente en administrar al individuo un compuesto tal como se ha descrito más arriba.

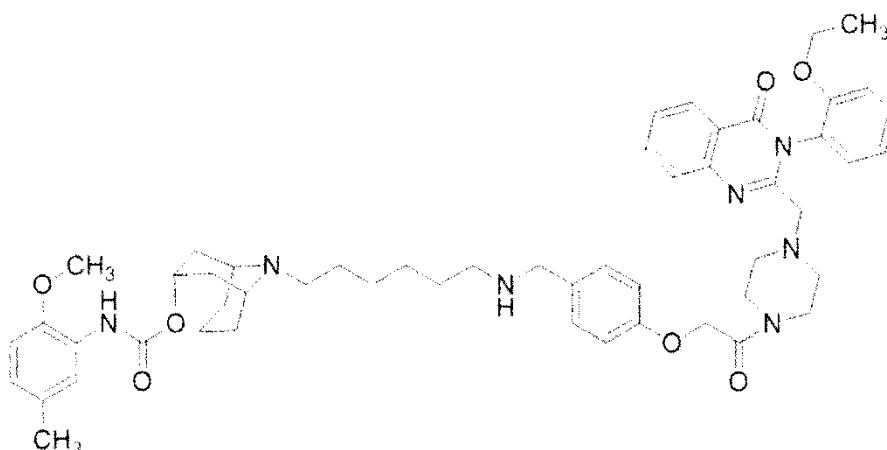
También se describen métodos para tratar un trastorno hiperproliferativo en un individuo que lo necesite, que comprenden la administración secuencial o la coadministración de un compuesto tal como se ha descrito más arriba o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y otro agente terapéutico.

20 En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen compuestos tal como se ha descrito más arriba para uso en terapia humana.

En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen compuestos tal como se ha descrito más arriba para uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo.

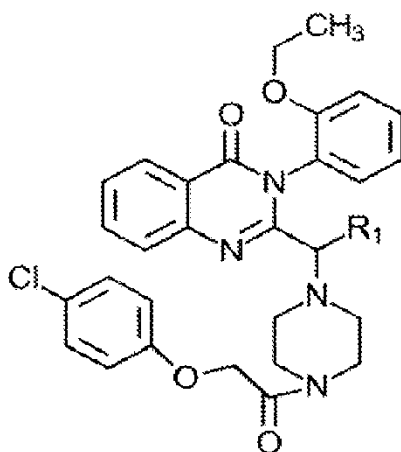
También se describe el uso de un compuesto tal como se ha descrito más arriba para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno hiperproliferativo.

25 En diversas realizaciones, las presentes enseñanzas incluyen un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la estructura



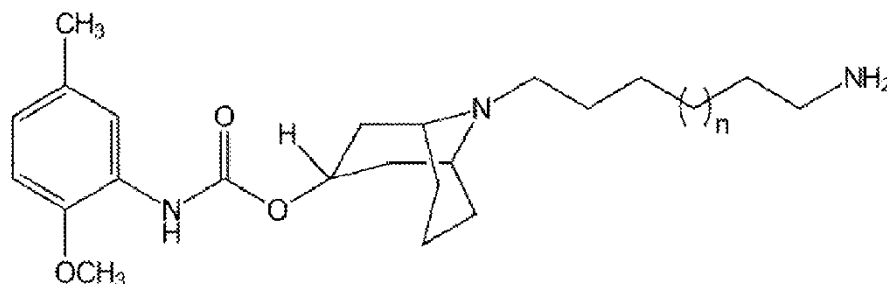
- 5 En diversas realizaciones, estos compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden ser utilizados en métodos para el tratamiento de cánceres. En diversas configuraciones, estos métodos pueden comprender la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de estos compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos a un individuo que lo necesite. En diversas configuraciones, un cáncer que puede ser tratado con cualquiera de estos compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos puede ser cualquier cáncer, tal como, sin limitación, un cáncer de páncreas o un sarcoma sinovial.

Estos compuestos y sales de los mismos se pueden sintetizar mediante métodos descritos en la presente memoria. En algunas configuraciones, estos métodos pueden comprender la reacción de un compuesto de la estructura



10

con un compuesto de la estructura



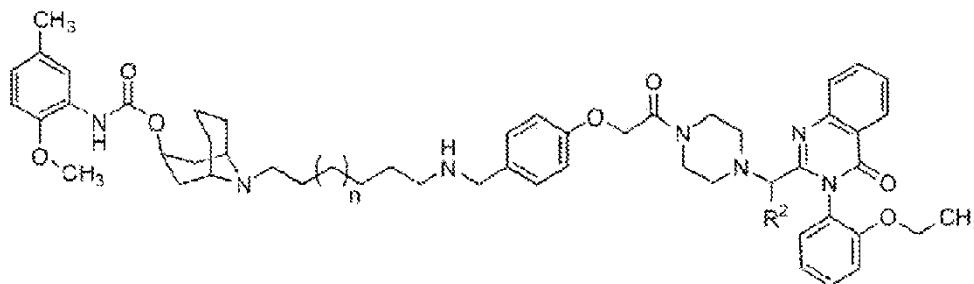
en donde n puede ser un número entero de 1 a 5 y R<sub>1</sub> puede ser metilo o H. En algunas configuraciones, n puede ser 1 y R<sub>1</sub> puede ser un H. En algunas configuraciones, n puede ser 5 y R<sub>1</sub> puede ser un H.

- 15 En algunas configuraciones, las presentes enseñanzas incluyen estos compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en el tratamiento de un cáncer. En algunos aspectos, el cáncer puede ser, sin limitación, un cáncer de páncreas o un sarcoma sinovial.

También se describe el uso de estos compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En algunos aspectos, el cáncer puede ser, sin limitación,

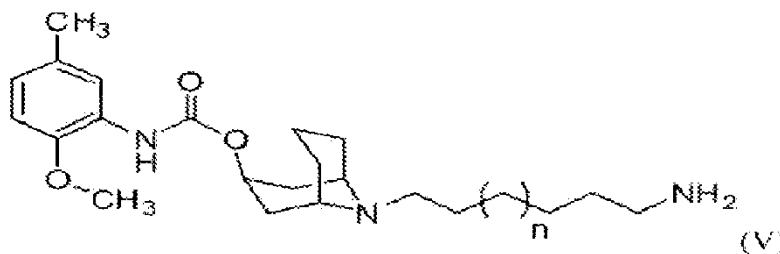
un cáncer de páncreas o un sarcoma sinovial.

También se describen métodos para sintetizar un compuesto de la fórmula IV:



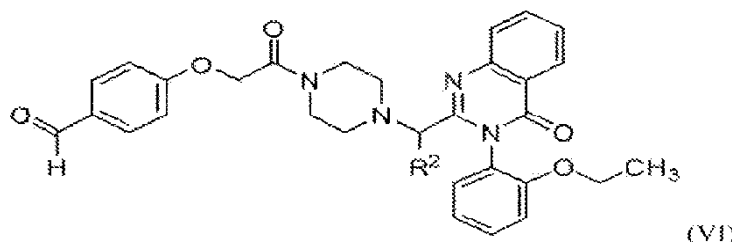
(IV),

que comprende la etapa consistente en someter a reacción un compuesto de la fórmula estructural V:



5

con un compuesto de la fórmula estructural VI:



(VI)

en donde n es un número entero de 1 a 5; y R<sup>2</sup> puede ser H o metilo.

**Breve descripción de los dibujos**

10 La FIGURA 1 ilustra el Erastin y el des-metil Erastin (SW V-27).

Las FIGURAS 2A-C ilustran la síntesis de los compuestos SW V-49s y SW V-50s de las presentes enseñanzas.

La FIGURA 3 ilustra la inhibición de internalización competitiva del ligando de sigma-2 fluorescente SW120 con SW V-49s por células Panc-1.

15 Las FIGURAS 4A-F ilustran ensayos de viabilidad de SW V-49s en diversas líneas celulares de cáncer de páncreas humano (A-D) y múrido (E) *in vitro*.

Las FIGURAS 5A-B ilustran el aumento de la muerte celular apoptótica inducida por SW V-49s analizada después de un tratamiento durante 24 horas (A) o 7 horas (B).

La FIGURA 6 ilustra la muerte celular ferroptótica inducida por SW V-49s.

20 La FIGURA 7 ilustra la disminución de la sizlina tumoral en el cáncer de páncreas después de la administración de SW V-49s en un sistema de modelo múrido.

La FIGURA 8 ilustra un 100% de supervivencia del cáncer de páncreas después de la administración de SW V-49s en un sistema de modelo múrido.

La FIGURA 9 ilustra las características de destrucción celular de SW V-49s y controles.

La FIGURA 10 ilustra un ensayo de viabilidad celular de células tratadas con Erastin.

Las FIGURAS 11A-B ilustran que el SW V-49s inhibe la absorción de cistina dando como resultado la generación de ROS.

Las FIGURAS 12A-C ilustran que el tratamiento con SW V-49s induce una vía apoptótica intrínseca.

La FIGURA 13 ilustran que el SW V-49s induce muerte celular apoptótica y dependiente de ROS.

Las FIGURAS 14A-E ilustran que el SW V49s reduce el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia.

## 5 Descripción detallada

### Abreviaturas y definiciones

Para facilitar la comprensión de la descripción, a continuación se define una serie de términos y abreviaturas tal como se utilizan en la presente memoria, de la siguiente manera:

10 Cuando se introducen elementos de la presente descripción o de la o las realizaciones preferidas de la misma, los artículos "un", "una", "el", "la", "dicho" y "dicha" significan que hay uno o más de los elementos.

Las especies y restos químicos se denominan de acuerdo con *Naming and Indexing of Chemical Substances for Chemical Abstracts™ Edición 2007*, American Chemical Society, 2008, excepto como se especifica a continuación.

El término "inferior", tal como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, cuando no se define específicamente de otro modo, significa que contiene de 1 a 6, éste inclusive, átomos de carbono.

15 La expresión "arilo inferior", tal como se usa en la presente memoria, sola o en combinación, significa fenilo o naftilo, pudiendo cualquiera de los dos estar opcionalmente sustituido según lo dispuesto.

20 La expresión "heteroarilo inferior", tal como se usa en la presente memoria, sola o en combinación, significa 1) heteroarilo monocíclico que comprende cinco o seis miembros de anillo, de los cuales entre uno y cuatro de los miembros pueden ser heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, S, y N, o 2) heteroarilo bicíclico, en donde cada uno de los anillos fusionados comprende cinco o seis miembros de anillo, comprendiendo entre los mismos de uno a cuatro heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, S y N.

La expresión "cicloalquilo inferior", tal como se usa en la presente memoria, sola o en combinación, significa un cicloalquilo monocíclico que tiene entre tres y seis miembros de anillo. Los cicloalquilos inferiores pueden ser insaturados. Los ejemplos de cicloalquilo inferior incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

25 La expresión "heterocicloalquilo inferior", tal como se usa en la presente memoria, sola o en combinación, significa un heterocicloalquilo monocíclico que tiene entre tres y seis miembros de anillo, de los cuales entre uno y cuatro pueden ser heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos de heterocicloalquilos inferiores incluyen pirrolidinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo y morfolinilo. Los heterocicloalquilos inferiores pueden ser insaturados.

30 La expresión "amino inferior", tal como se usa en la presente memoria, sola o en combinación, se refiere a -NRR', en donde R y R' se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, y heteroalquilo inferior, pudiendo cualquiera de ellos estar opcionalmente sustituido. Además, R y R' de un grupo amino inferior se pueden combinar para formar un heterocicloalquilo de cinco o seis miembros, pudiendo cualquiera de ellos estar opcionalmente sustituido.

35 Los términos "oxi" u "oxa", tal como se usan en la presente memoria, solos o en combinación, se refieren a -O-.

El término "oxo", tal como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a =O.

El término "perhaloalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi en el que todos los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de halógeno.

40 El término "perhaloalquilo", tal como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a un grupo alquilo en el que todos los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de halógeno.

Las expresiones "sulfonato", "ácido sulfónico" y "sulfónico", tal como se usan en la presente memoria, solas o en combinación, se refieren al grupo -SO<sub>3</sub>H y a su anión como el ácido sulfónico tal como se utiliza en la formación de sal.

El término "sulfanilo", tal como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a -S-.

El término "sulfinilo", tal como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a -S(O)-.

45 El término "N-sulfonamido" se refiere a un grupo RS(=O)<sub>2</sub>NR', con R y R' tal como se definen en la presente memoria.

El término "S-sulfonamido" se refiere a un grupo S(=O)<sub>2</sub>NRR', con R y R' tal como se definen en la presente memoria.

Los términos "tía" y "tío", tal como se usan en la presente memoria, solos o en combinación, se refieren a un grupo -S o un éter en el que el oxígeno está reemplazado con azufre. Los derivados oxidados del grupo tío, en concreto sulfinilo y sulfonilo, están incluidos en la definición de tía y tío.

5 El término "tiocarbonilo", tal como se usa en la presente memoria, cuando está solo incluye tioformilo -C(S)H y en combinación es un grupo -C(S)-.

El término "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo ROC(S)NR', con R y R' tal como se definen en la presente memoria.

El término "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo -OC(S)NRR', con R y R' tal como se definen en la presente memoria.

El término "tiocianato" se refiere a un grupo -CNS.

10 El término "trihalometanosulfonamido" se refiere a un grupo X<sub>3</sub>CS(O)<sub>2</sub>NR-, en el que X es un halógeno y R es tal como se define en la presente memoria.

El término "trihalometanosulfonilo" se refiere a un grupo X<sub>3</sub>CS(O)<sub>2</sub>-, en el que X es un halógeno.

El término "trihalometoxi" se refiere a un grupo X<sub>3</sub>CO-, en el que X es un halógeno.

15 La expresión "sililo trisustituido", tal como se usa en la presente memoria, sola o en combinación, se refiere a un grupo de silicona sustituido en sus tres valencias libres con grupos que se enumeran en la presente memoria bajo la definición de amino sustituido. Algunos ejemplos incluyen trimetilsililo, terc-butildidimetilsililo, trifenilsililo y similares.

20 En la presente memoria, cualquier definición se puede usar en combinación con cualquier otra definición para describir un grupo estructural compuesto. Por convención, el elemento posterior de cualquier definición de este tipo es el que se une al resto precursor. Por ejemplo, el grupo compuesto alquilamido representaría un grupo alquilo unido a la molécula precursora a través de un grupo amido, y el término alcoxilalquilo representaría un grupo alcoxi unido a la molécula precursora a través de un grupo alquilo.

25 La expresión "opcionalmente sustituido" significa que el grupo precedente puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, los sustituyentes de un grupo "opcionalmente sustituido" pueden incluir, sin limitación, uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre los siguientes grupos o un conjunto de grupos designado particular, solos o en combinación: alquilo, alquenilo inferior, alquinilo inferior, alcanilo inferior, heteroalquilo inferior, heterocicloalquilo inferior, haloalquilo inferior, haloalquenilo inferior, haloalquinilo inferior, perhaloalquilo inferior, perhaloalcoxi inferior, cicloalquilo inferior, fenilo, arilo, ariloxi, alcoxi inferior, haloalcoxi inferior, oxo, aciloxi inferior, carbonilo, carboxilo, alquilcarbonilo, carboxiéster inferior, carboxamido inferior, ciano, hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, amido, nitro, tiol, alquiltío, haloalquiltío inferior, perhaloalquiltío inferior, ariltío, sulfonato, ácido sulfónico, sililo trisustituido, N<sub>3</sub>, SH, SCH<sub>3</sub>, C(O)CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>H, piridinilo, tifenilo, furanilo, carbamato inferior y urea inferior. Se pueden unir dos sustituyentes para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico fusionado de cinco, seis o siete miembros que consiste en cero a tres heteroátomos, por ejemplo formando metilendioxi o etilendioxi. Un grupo opcionalmente sustituido puede no estar sustituido (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), estar completamente sustituido (por ejemplo, -CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>), monosustituido (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F), o sustituido a un nivel en cualquier punto intermedio entre completamente sustituido y monosustituido (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>). Cuando se enumeran sustituyentes sin calificación en cuanto a la sustitución, se incluyen tanto las formas sustituidas como las no sustituidas. Cuando un sustituyente se califica como "sustituido", se hace referencia específicamente a la forma sustituida. Además se pueden definir diferentes conjuntos de sustituyentes opcionales para un resto particular según sea necesario; en estos casos, la sustitución opcional será como se define, a menudo inmediatamente después de la frase "opcionalmente sustituido con".

40 El término R o el término R', cuando aparecen por sí mismos y sin ninguna designación numérica, a menos que se defina otra cosa, se refieren a un resto seleccionado entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo y heterocicloalquilo, pudiendo cualquiera de ellos estar opcionalmente sustituido. Se ha de entender que dichos grupos R y R' están opcionalmente sustituidos tal como se define en la presente memoria. Independientemente de que un grupo R tenga una designación numérica o no, cada grupo R, incluidos R, R' y R<sub>n</sub>, en donde n es un número entero, cada sustituyente y cada término han de ser entendidos como independientes de todos los demás en términos de selección entre un grupo. Si alguna variable, sustituyente o término (por ejemplo, arilo, heterociclo, R, etc.) aparece más de una vez en una fórmula o estructura genérica, su definición en cada aparición es independiente de la definición en cualquier otra aparición. Los expertos en la técnica reconocerán además que determinados grupos se pueden unir a una molécula precursora o pueden ocupar una posición en una cadena de elementos desde cualquiera de los dos extremos según esté escrito. Por lo tanto, solo a modo de ejemplo, un grupo asimétrico como -C(O)N(R)- se puede unir al resto precursor en el carbono o en el nitrógeno.

55 En los compuestos descritos en la presente memoria existen centros asimétricos. Es posible preparar sintéticamente estereoisómeros individuales de compuestos a partir de materiales de partida comercialmente disponibles que contienen centros quirales o mediante la preparación de mezclas de productos enantioméricos seguida de separación tal como la conversión en una mezcla de diastereómeros, seguida de separación o recristalización, técnicas cromatográficas, separación directa de enantiómeros en columnas cromatográficas quirales, o cualquier otro método



apropiado conocido en la técnica. Los compuestos de partida de estereoquímica particular están disponibles comercialmente o se pueden preparar y resolver mediante técnicas conocidas. Adicionalmente, los compuestos descritos en la presente memoria pueden existir como isómeros geométricos. Adicionalmente, los compuestos pueden existir como tautómeros; en esta descripción están previstos todos los isómeros tautoméricos. Adicionalmente, los compuestos descritos en la presente memoria pueden existir tanto en formas no solvatadas como en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas no solvatadas.

El término "enlace" se refiere a un enlace covalente entre dos átomos, o dos restos cuando los átomos unidos por el enlace se consideran parte de una subestructura más grande. Un enlace puede ser simple, doble o triple, a menos que se especifique otra cosa. Una línea discontinua entre dos átomos en un dibujo de una molécula indica que esa posición puede presentar o no un enlace adicional.

El término "enfermedad", tal como se usa en la presente memoria, es sinónimo y se usa indistintamente con los términos "trastorno" y "afección" (como en una afección médica), en el sentido de que todos reflejan un estado anómalo del cuerpo humano o animal o de una de sus partes, que afecta al funcionamiento normal, que generalmente se manifiesta presentando signos y síntomas y que hace que el ser humano o el animal tengan una duración o calidad de vida reducida.

La expresión "terapia de combinación" significa la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico descrito en la presente descripción. Dicha administración incluye la coadministración de estos agentes terapéuticos de un modo sustancialmente simultáneo, como en una sola cápsula que tiene una proporción fija de ingredientes activos o en múltiples cápsulas independientes para cada ingrediente activo. Además, dicha administración también incluye el uso de cada tipo de agente terapéutico de un modo secuencial.

La expresión "terapéuticamente eficaz" tiene el objetivo de calificar la cantidad de ingredientes activos utilizados en el tratamiento de una enfermedad o trastorno o en el logro de un punto final clínico.

La expresión "terapéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos (o sales, profármacos, tautómeros, formas iónicas híbridas, etc.) que son adecuados para utilizarlos en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación y respuesta alérgica indebidas, que corresponden a un relación beneficio/riesgo razonable, y que son eficaces para su uso previsto.

En la presente descripción, el término "radiación" significa radiación ionizante que comprende partículas o fotones que tienen suficiente energía o que pueden producir suficiente energía a través de interacciones nucleares para producir ionización (ganancia o pérdida de electrones). Una radiación ionizante ejemplar y preferida es una radiación X. Los medios para administrar radiación X a un tejido o célula diana son muy conocidos en la técnica. Por regla general, la cantidad de radiación ionizante necesaria en una célula dada depende de la naturaleza de esa célula. Los medios para determinar una cantidad eficaz de radiación son bien conocidos en la técnica. En la presente memoria, la expresión "una dosis eficaz" de radiación ionizante significa una dosis de radiación ionizante que produce un aumento en el daño o la muerte celular.

El término "radioterapia" se refiere al uso de radiación electromagnética o de partículas en el tratamiento de la neoplasia e incluye el uso de radiación ionizante y no ionizante.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden existir como sales terapéuticamente aceptables. La presente descripción incluye los compuestos anteriormente enumerados en forma de sales, incluyendo sales de adición de ácido. Las sales adecuadas incluyen aquellas formadas tanto con ácidos orgánicos como con ácidos inorgánicos. Dichas sales de adición de ácido normalmente serán farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales de sales no aceptables farmacéuticamente pueden ser útiles en la preparación y purificación del compuesto en cuestión. Las sales de adición básicas también se pueden formar y ser farmacéuticamente aceptables. Para una discusión más completa de la preparación y selección de sales, véase *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use* (Stahl, P. Heinrich. Wiley-VCHA, Zurich, Suiza, 2002).

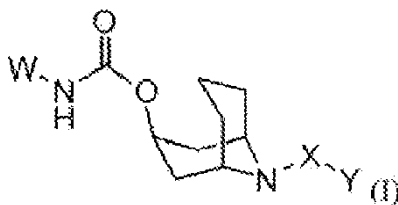
La expresión "sal terapéuticamente aceptable", tal como se usa en la presente memoria, representa sales o formas iónicas híbridas de los compuestos descritos en la presente memoria que son solubles o dispersables en agua o en aceite y terapéuticamente aceptables tal como se define en la presente memoria. Las sales se pueden preparar durante el aislamiento y purificación final de los compuestos o por separado sometiendo a reacción el compuesto apropiado en forma de base libre con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, L-ascorbato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato (besilato), bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, digluconato, formiato, fumarato, genticato, glutarato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hipurato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), lactato, maleato, malonato, DL-mandelato, mesitilenosulfonato, metanosulfonato, naftilenosulfonato, nicotinato, 2-naftilalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfonato, picrato, pivalato, propionato, piroglutamato, succinato, sulfonato, tartrato, L-tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, para-toluenosulfonato (p-tosilato) y undecanoato. Además, los grupos básicos en los compuestos descritos en la presente memoria se pueden cuaternizar con cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo,

propilo y butilo; dimetil, dietil, dibutil y diamil sulfatos; cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y esterilo; y bromuros de bencilo y fenetilo. Los ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición terapéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como los ácidos oxálico, maleico, succínico y cítrico. También se pueden formar sales mediante la coordinación de los compuestos con un metal alcalino o un ion alcalinotérreo. Por lo tanto, la presente descripción contempla sales de sodio, potasio, magnesio y calcio de los compuestos descritos en la presente memoria, y similares.

Las sales de adición básicas se pueden preparar durante el aislamiento y purificación final de los compuestos sometiendo a reacción un grupo carboxi con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico o con amoníaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Los cationes de sales terapéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes de amina cuaternaria no tóxicos tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina, procaína, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina y N, N'-dibenciletilendiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

#### Compuestos

Se describe un compuesto de la fórmula estructural I



o una sal del mismo, en donde: W se selecciona entre C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> arilo y C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroarilo opcionalmente sustituidos; X es un resto de enlace; e Y es un resto inductor de ferroptosis seleccionado entre erastin, un análogo de erastin tal como erastin-A, erastin-B o desmetil-erastin, o un mimético de erastin sintético simplificado.

En algunas configuraciones, W puede ser un C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> arilo.

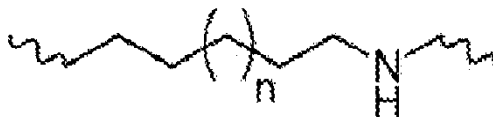
En algunas configuraciones, W puede ser un C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> arilo sustituido.

En algunas configuraciones, W puede ser un ligando del receptor sigma-2.

En algunas configuraciones, el resto de enlace puede comprender una cadena lineal C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>.

En algunas configuraciones, el resto de enlace puede comprender además 1 o más heteroátomos. En algunas configuraciones, cada uno de los 1 o más heteroátomos se puede seleccionar independientemente entre el grupo que consiste en un oxígeno, un azufre y un nitrógeno.

En algunas configuraciones, el resto de enlace puede tener una estructura



en donde



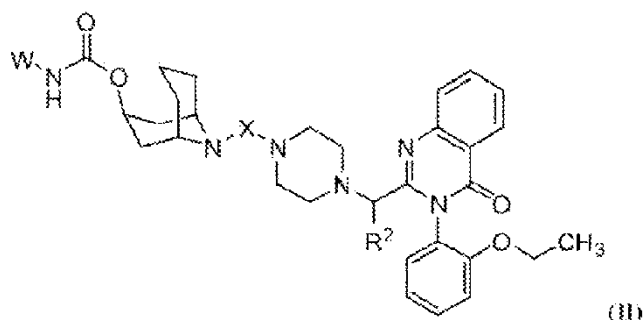
es un enlace, y n es un número entero de 1 a 10, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. 9. En algunas configuraciones, n = 1. En algunas configuraciones, n = 5.

En algunas configuraciones, el resto inductor de ferroptosis de un compuesto de la fórmula estructural I se puede seleccionar entre el grupo que consiste en erastin, erastin-A, erastin-B y desmetil-erastin.

En algunas configuraciones, el resto inductor de ferroptosis de un compuesto de la fórmula estructural I puede consistir en erastin.

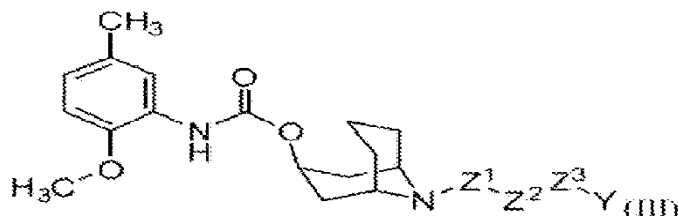
40

También se describen compuestos de la fórmula II



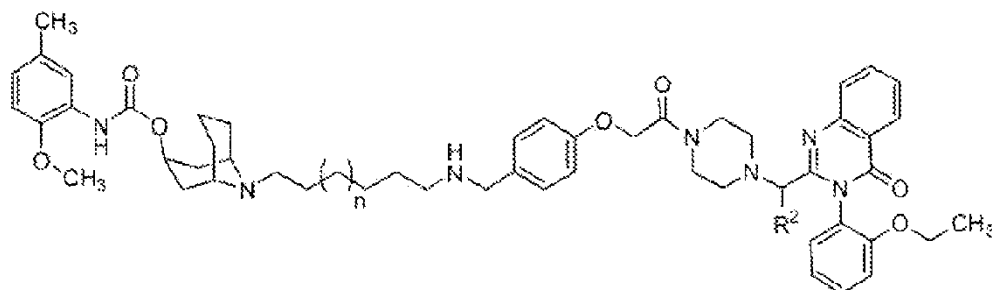
o una sal de los mismos, en donde: W se selecciona entre C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> arilo y C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroarilo opcionalmente sustituidos; X es un resto de enlace; y R<sup>2</sup> se selecciona entre hidrógeno y metilo.

5 También se describen compuestos de la fórmula III



o una sal de los mismos, en donde: cada uno de Z<sup>1</sup> y Z<sup>3</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un enlace, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquenilo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquinilo, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> arilo, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heterocicloalquilalquilo, alquilheterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, alquilocicloalquilo,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{O}(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{O})_2(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{O})(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R}^1)\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R}^1)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R})\text{S}(\text{O})_2(\text{CH}_2)_c\text{---}$ , Z<sup>2</sup> se selecciona entre C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquenilo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquinilo, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> arilo, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heterocicloalquilalquilo, alquilheterocicloalquilo, cicloalquilalquilo, alquilocicloalquilo,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{---}$ , y  $\text{---}(\text{CH}_2)_a(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{O}(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{O})_2(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{O})(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R}^1)\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R}^1)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^1)(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_a\text{N}(\text{R})\text{S}(\text{O})_2(\text{CH}_2)_c\text{---}$ ; en donde cada uno de Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup> y Z<sup>3</sup> puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados entre halo, oxo, y C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo; cada R<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre hidrógeno, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo, y C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> acilo; cada a y c es un número entero seleccionado independientemente entre 0, 1, 2, 3 y 4; cada b es un número entero seleccionado independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6; e Y es un resto inductor de ferroptosis seleccionado entre erastin, un análogo de erastin tal como erastin-A, erastin-B o desmetil-erastin o un mimético de erastin sintético simplificado.

En determinadas realizaciones, un compuesto de las presentes enseñanzas tiene la fórmula estructural IV:



(IV)

o una sal del mismo, en donde: n es un número entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4 y 5; y R<sup>2</sup> se puede seleccionar entre hidrógeno y metilo.

En algunas configuraciones, n puede ser 1; y R<sup>2</sup> puede ser hidrógeno.

En algunas configuraciones, n puede ser 5; y R<sup>2</sup> puede ser hidrógeno.

En algunas configuraciones, la sal puede ser una sal de oxalato.

En algunas configuraciones, el compuesto se puede seleccionar entre los compuestos 1-24 como se describen en la presente memoria.

#### Composiciones farmacéuticas

- 5 Si bien los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden administrar como el producto químico en bruto, también es posible presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de las presentes enseñanzas, o una o más sales, ésteres, profármacos, amidas o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables de los mismos y opcionalmente otro u otros ingredientes terapéuticos. Lo(s) excipiente(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial(es) para el receptor de los mismos. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Cualquiera de las técnicas, vehículos y excipientes bien conocidos pueden ser utilizados de forma adecuada y como se entienden en la técnica; por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden producir de cualquier modo conocido en la técnica, por ejemplo mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o compresión.

- 10 Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, parenteral (incluyendo las administraciones subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarticular e intramedular), intraperitoneal, transmucosal, transdérmica, rectal y tópica (incluyendo las administraciones dérmica, bucal, sublingual e intraocular), aunque la vía más adecuada puede depender, por ejemplo, de la afección y el trastorno del receptor. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma galénica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Normalmente, estos métodos incluyen la etapa consistente en asociar un compuesto de la descripción en cuestión o una sal, éster, amida, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo ("ingrediente activo") con el excipiente que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de modo uniforme e íntimo los ingredientes activos con excipientes líquidos o con excipientes sólidos finamente divididos, o con ambos, y después, en caso necesario, conformando el producto en la formulación deseada.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden administrar de la siguiente manera:

#### Administración oral

- 30 Los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden administrar por vía oral, incluyendo la deglución, por lo que el compuesto entra en el tracto gastrointestinal o es absorbido en el torrente sanguíneo directamente desde la boca, incluyendo la administración sublingual o bucal.

Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formulaciones sólidas tales como tabletas, píldoras, sellos, pastillas y cápsulas duras o blandas, que pueden contener líquidos, geles, polvos o gránulos.

- 35 En una forma galénica en tabletas o cápsulas, la cantidad de fármaco presente puede ser de aproximadamente un 0,05% a aproximadamente un 95% en peso, más típicamente de aproximadamente un 2% a aproximadamente un 50% en peso de la forma galénica.

- 40 Además, las tabletas o cápsulas pueden contener un disgregante, que comprende de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 35% en peso, más típicamente de aproximadamente un 2% a aproximadamente un 25%, de la forma galénica. Los ejemplos de disgregantes incluyen metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio o calcio, croscarmelosa sódica, polivinilpirrolidona, hidroxipropil celulosa, almidón y similares.

Los ligantes adecuados para utilizarlos en una tableta incluyen gelatina, polietilenglicol, azúcares, gomas, almidón, hidroxipropil celulosa y similares. Los diluyentes adecuados para utilizarlos en una tableta incluyen manitol, xilitol, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol y almidón.

- 45 Los agentes tensioactivos y deslizantes adecuados para utilizarlos en una tableta o cápsula pueden estar presentes en cantidades de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 3% en peso, e incluyen polisorbato 80, dodecil sulfato de sodio, talco y dióxido de silicio.

- 50 Los lubricantes adecuados para utilizarlos en una tableta o cápsula pueden estar presentes en cantidades de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 5% en peso, e incluyen estearato de calcio, zinc o magnesio, estearil fumarato de sodio y similares.

Las tabletas se pueden producir por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma que fluye libremente, como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con ligantes, diluyentes inertes o agentes lubricantes, tensioactivos o dispersantes. Las tabletas moldeadas se pueden producir moldeando en una

máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido. Se pueden añadir tintes o pigmentos a las tabletas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

- 5 Las formulaciones líquidas pueden incluir emulsiones, soluciones, jarabes, elixires y suspensiones, que se pueden utilizar en cápsulas blandas o duras. Dichas formulaciones pueden incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua, etanol, polietilenglicol, celulosa o un aceite. La formulación también puede incluir uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión.

Las composiciones para administración oral se pueden formular como liberación inmediata o modificada, incluyendo liberación retardada o sostenida, opcionalmente con recubrimiento entérico.

- 10 En otra realización, una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

#### Administración parenteral

- 15 Los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, músculo u órganos internos mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intracraneal y similares. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores (incluyendo inyectores con aguja y sin aguja) y métodos de infusión. Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados.

- 20 La mayoría de las formulaciones parenterales son soluciones acuosas que contienen excipientes, incluyendo sales, tampones, agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes, antioxidantes, bacteriostáticos, conservantes, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y carbohidratos.

También se pueden preparar formulaciones parenterales en forma deshidratada (por ejemplo, por liofilización) o como soluciones estériles no acuosas. Estas formulaciones se pueden usar con un vehículo adecuado, como agua estéril. En la preparación de soluciones parenterales también se pueden utilizar agentes potenciadores de la solubilidad.

- 25 Las composiciones para administración parenteral se pueden formular como liberación inmediata o modificada, incluyendo liberación retardada o sostenida. Los compuestos también se pueden formular como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

#### Administración tópica

- 35 En algunas configuraciones, los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden administrar por vía tópica (por ejemplo en la piel, membranas mucosas, orejas, nariz u ojos) o por vía transdérmica. Las formulaciones para administración tópica pueden incluir, pero no se limitan a, lociones, soluciones, cremas, geles, hidrogeles, pomadas, espumas, implantes, parches y similares. Los excipientes que son farmacéuticamente aceptables para formulaciones de administración tópica pueden incluir agua, alcohol, aceite mineral, glicerina, polietilenglicol y similares. La administración tópica también se puede realizar, por ejemplo, mediante electroporación, iontoforesis, fonoforesis y similares.

- 40 Normalmente, el ingrediente activo para administración tópica puede comprender de un 0,001% a un 10% p/p (en peso) de la formulación. En determinadas realizaciones, el ingrediente activo puede comprender tanto como un 10% p/p; menos de un 5% p/p; de un 2% p/p a un 5% p/p; o de un 0,1% a un 1% p/p de la formulación.

Las composiciones para administración tópica se pueden formular como liberación inmediata o modificada, incluyendo liberación retardada o sostenida.

#### Administración rectal, bucal y sublingual

- 45 Los supositorios para la administración rectal de los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden preparar mezclando el agente activo con un excipiente no irritante adecuado, como manteca de cacao, mono, di o triglicéridos sintéticos, ácidos grasos o polietilenglicoles que son sólidos a temperaturas normales pero líquidos a la temperatura rectal, y que por lo tanto se derretirán en el recto y liberarán el fármaco.

- 50 Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden estar en forma de tabletas, píldoras, pastillas o geles formulados de manera convencional. Dichas composiciones pueden comprender el ingrediente activo en una base aromatizada tal como sacarosa y acacia o tragacanto.

### Administración por inhalación

Para la administración por inhalación, en algunas configuraciones, los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden administrar desde un insuflador, paquetes presurizados de nebulizador u otros medios convenientes para administrar un spray o polvo en aerosol. Los paquetes presurizados pueden comprender un propelente adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Alternativamente, para la administración por inhalación o insuflación, los compuestos de acuerdo con la descripción pueden tener la forma de una composición en polvo seco, por ejemplo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. La composición en polvo se puede presentar en una forma galénica unitaria, por ejemplo, en cápsulas, cartuchos, paquetes de gelatina o blísteres desde los cuales se puede administrar el polvo con ayuda de un inhalador o insuflador.

También se pueden utilizar otros materiales de excipiente y modos de administración conocidos en la técnica farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de las enseñanzas se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas farmacéuticas bien conocidas, tales como procedimientos eficaces de formulación y administración. Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis eficaz, tal como se menciona en la presente memoria, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo. La cantidad precisa de compuesto administrado a un paciente será responsabilidad del médico encargado. El nivel de dosis específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, las dietas, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, el trastorno preciso que se está tratando, y la gravedad de la indicación o afección que se está tratando. Además, la vía de administración puede variar según la afección y su gravedad. Las consideraciones anteriores sobre formulaciones y procedimientos de administración eficaces son muy conocidas en la técnica y se describen en los manuales estándar. La formulación de fármacos se presenta, por ejemplo, en Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975; Liberman, et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York. N. Y., 1980; y Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients (3ª edición), American Pharmaceutical Association, Washington, 1999.

### Métodos de tratamiento

La presente descripción proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas que presentan un resto dirigido que se une al receptor sigma-2 y que, por lo tanto, puede ser útil en el tratamiento o la prevención de trastornos que están asociados con células que expresan el receptor sigma-2, y que incluyen el cáncer, pero no se limitan al mismo.

### Cáncer

En algunas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención del cáncer.

En determinadas realizaciones, el cáncer se puede seleccionar entre adenocarcinoma, leucemia/linfoma de células T del adulto, cáncer de vejiga, blastoma, cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer cerebral, carcinoma, sarcoma mielóide, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, glioblastoma multiforme, glioma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer intestinal, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de pulmón, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer ocular, tumor del nervio óptico, cáncer bucal, cáncer de ovario, cáncer de hipófisis, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, carcinoma de células renales, cáncer rectal, sarcoma, cáncer de piel, tumor de la médula espinal, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, linfoma de células T, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de garganta, cáncer urogenital, carcinoma urotelial, cáncer de útero, cáncer vaginal o tumor de Wilms.

En realizaciones particulares, el cáncer puede ser cáncer de páncreas. En realizaciones particulares, el cáncer puede ser sarcoma sinovial.

### Combinaciones y terapia de combinación

Los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden utilizar, solos o en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, para tratar afecciones tales como las anteriormente descritas más arriba. El o los compuestos de las presentes enseñanzas y otro(s) compuesto(s) farmacéuticamente activo(s) se pueden administrar simultáneamente (en la misma forma galénica o en formas galénicas independientes) o de forma secuencial. Por consiguiente, en una realización, las presentes enseñanzas comprenden métodos para tratar una afección administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de las presentes enseñanzas y uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

En otra realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de las presentes enseñanzas, uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, el o los compuestos farmacéuticamente activos adicionales se seleccionan entre el grupo que consiste en fármacos anticancerosos, fármacos antiproliferativos y fármacos antiinflamatorios.

Las composiciones de unión al receptor sigma-2 descritas en la presente memoria también se usan opcionalmente en combinación con otros reactivos terapéuticos que se seleccionan por su valor terapéutico para la afección que ha de ser tratada. En general, los compuestos descritos en la presente memoria y, en realizaciones en las que se emplea una terapia de combinación, otros agentes no tienen que ser administrados en la misma composición farmacéutica y, debido a diferentes características físicas y químicas, se administran opcionalmente por vías diferentes. Por regla general, la administración inicial se realiza de acuerdo con los protocolos establecidos y después se modifican la dosis, los modos de administración y los tiempos de administración en función de los efectos observados. En determinados casos es apropiado administrar un compuesto de unión al receptor sigma-2, tal como se describe en la presente memoria, en combinación con otro agente terapéutico. Solo a modo de ejemplo, la eficacia terapéutica de un compuesto de unión al receptor sigma-2 se potencia mediante la administración de otro agente terapéutico (que también incluye un régimen terapéutico) que también tiene un beneficio terapéutico. Independientemente de la enfermedad, trastorno o afección que se esté tratando, el beneficio general experimentado por el paciente es simplemente aditivo de los dos agentes terapéuticos o el paciente experimenta un beneficio mejorado (es decir, sinérgico). Alternativamente, si un compuesto descrito en la presente memoria tiene un efecto secundario, puede resultar apropiado administrar un agente para reducir el efecto secundario; o la eficacia terapéutica de un compuesto descrito en la presente memoria se puede potenciar mediante la administración de un adyuvante.

Las dosis terapéuticamente eficaces varían cuando los fármacos se usan en combinaciones de tratamiento. Los métodos para determinar experimentalmente las dosis terapéuticamente eficaces de fármacos y otros agentes para su uso en regímenes de tratamiento combinado son metodologías documentadas. El tratamiento combinado incluye además tratamientos periódicos que comienzan y se interrumpen en diversos momentos para ayudar en la gestión clínica del paciente. En cualquier caso, los múltiples agentes terapéuticos (uno de los cuales es un compuesto de unión al receptor sigma-2 tal como se describe en la presente memoria) se pueden administrar en cualquier orden, o simultáneamente. Si se administran simultáneamente, los múltiples agentes terapéuticos se proporcionan opcionalmente en una sola forma unificada o en múltiples formas (solo a modo de ejemplo, bien como una sola píldora, bien como dos píldoras independientes).

En algunas realizaciones, uno de los agentes terapéuticos se administra en dosis múltiples, o ambos se administran como dosis múltiples. Si no se administran de forma simultánea, el tiempo entre las dosis múltiples varía opcionalmente de más de cero semanas a menos de doce semanas.

Además, los métodos, composiciones y formulaciones de combinación no han de limitarse al uso de solo dos agentes, también se prevé el uso de múltiples combinaciones terapéuticas. Se entiende que el régimen de dosificación para tratar, prevenir o mejorar la o las afecciones para las cuales se busca alivio se modifica opcionalmente de acuerdo con diversos factores. Estos factores incluyen el trastorno padecido por el individuo, así como la edad, el peso, el sexo, la dieta y el estado de salud del individuo. Por lo tanto, el régimen de dosificación realmente empleado varía ampliamente en algunas realizaciones, y en consecuencia se desvía de los regímenes de dosificación establecidos en la presente memoria.

Los agentes farmacéuticos que forman la terapia de combinación descrita en la presente memoria consisten opcionalmente en una forma galénica combinada o en formas galénicas independientes destinadas a una administración sustancialmente simultánea. Los agentes farmacéuticos que constituyen la terapia de combinación también se administran opcionalmente de forma secuencial, siendo administrado cada agente mediante un régimen que requiere la administración en dos etapas. El régimen de administración en dos etapas requiere opcionalmente la administración secuencial de los agentes activos o la administración separada de los agentes activos independientes. El tiempo entre las etapas de administración múltiple varía de unos pocos minutos a varias horas, dependiendo de las propiedades de cada agente farmacéutico, tales como potencia, solubilidad, biodisponibilidad, vida media en plasma y perfil cinético del agente farmacéutico.

En otra realización, un inhibidor del compuesto de unión al receptor sigma-2 se usa opcionalmente en combinación con procedimientos que proporcionan un beneficio adicional para el paciente. Un inhibidor del compuesto de unión al receptor sigma-2 y cualquier terapia adicional se administran opcionalmente antes, durante o después de la aparición de una enfermedad o afección, y el momento de administrar la composición que contiene un compuesto de unión al receptor sigma-2 varía en algunas realizaciones. Así, por ejemplo, un compuesto de unión al receptor sigma-2 se usa como profiláctico y se administra continuamente a individuos con propensión a desarrollar afecciones o enfermedades con el fin de prevenir la aparición de la enfermedad o afección. Un compuesto y composiciones de unión al receptor sigma-2 se administran opcionalmente a un individuo durante o lo antes posible después de la aparición de los síntomas. Si bien en la presente memoria se han mostrado y descrito realizaciones de las presentes enseñanzas, para los expertos en la materia será obvio que dichas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. A los expertos en la materia se les pueden ocurrir numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de las enseñanzas. En algunas realizaciones de las presentes enseñanzas se pueden emplear diversas alternativas a las realizaciones descritas en la presente memoria para poner en práctica las presentes enseñanzas.

Un compuesto de unión al receptor sigma-2 se puede utilizar en combinación con fármacos anticancerosos, que

incluyen pero no se limitan a las siguientes clases: agentes alquilantes, inhibidores de la angiopoyetina 1 y/o 2, antraciclinas, agentes antimetabolitos, inhibidores de la aurora quinasa, inhibidores de B-raf, inhibidores de BTK, inhibidores de c-met, inhibidores de CDK 4 y/o 6, inhibidores de CDK4 y/o CDK6, inhibidores de cFMS, agentes de reticulación, inhibidores de replicación de ADN, inhibidores del factor de crecimiento endotelial (EGF), inhibidores del factor de crecimiento de hepatocitos/factor de difusión (inhibidores de HGF/SF), inhibidores de HER2 y HER3, inhibidores del receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGFR-1), intercaladores, inhibidores de MEK, disruptores de microtúbulos, inhibidores de mTOR, inhibidores de tirosina quinasa pan-ErbB, inhibidores de PARP, inhibidores de PI3K, inhibidores de PKB, inhibidores de PKB, inhibidores de la quinasa tipo polo, agentes radiomiméticos, radiosensibilizadores, ligandos apo2 humanos recombinantes, agentes de rotura de cadena, inhibidores de topoisomerasa II, agonista de ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) e inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Los compuestos descritos en la presente memoria, incluyendo los compuestos de la fórmula I, también son útiles como quimio- y radiosensibilizadores para el tratamiento del cáncer. Son útiles para el tratamiento de mamíferos que se han sometido previamente o que actualmente están siendo sometidos o serán sometidos a tratamiento contra el cáncer. Dichos otros tratamientos incluyen quimioterapia, radioterapia, cirugía o inmunoterapia, tal como vacunas contra el cáncer.

Los presentes compuestos son particularmente útiles en combinación con agentes terapéuticos, anticancerosos y/o radioterapéuticos. Por lo tanto, la presente descripción proporciona una combinación de los presentes compuestos de la fórmula I con agentes terapéuticos, anticancerosos y/o radioterapéuticos para administración simultánea, independiente o secuencial. Los compuestos de esta descripción y el otro agente anticanceroso pueden actuar de forma aditiva o sinérgica. Una combinación sinérgica de los presentes compuestos y otro agente anticanceroso podría permitir el uso de dosis más bajas de uno de estos agentes, o de ambos, y/o dosis menos frecuentes de uno de los presentes compuestos y otros agentes anticancerosos, o de ambos, y/o la administración de los agentes con menos frecuencia puede reducir cualquier toxicidad asociada con la administración de los agentes a un individuo sin reducir la eficacia de los agentes en el tratamiento del cáncer. Además, un efecto sinérgico podría dar como resultado una eficacia mejorada de estos agentes en el tratamiento del cáncer y/o la reducción de cualquier efecto secundario adverso o no deseado asociado con el uso individual de cualquiera de los dos agentes.

El agente terapéutico, el agente anticanceroso y/o la radioterapia se pueden administrar de acuerdo con protocolos terapéuticos muy conocidos en la técnica. Para los expertos en la técnica será evidente que la administración del agente terapéutico, el agente anticanceroso y/o la radioterapia puede variar dependiendo de la enfermedad que esté siendo tratada y de los efectos conocidos del agente anticanceroso y/o la radioterapia en esa enfermedad. Además, de acuerdo con el conocimiento del médico experto, los protocolos terapéuticos (por ejemplo, las cantidades de dosis y los tiempos de administración) se pueden variar en vista de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados (es decir, el agente antineoplásico o la radiación) sobre el paciente, y en vista de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados, y de los efectos adversos observados.

Los intervalos de dosificación para rayos X van desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante períodos de tiempo prolongados (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2.000 a 6.000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la vida media del isótopo, la intensidad y el tipo de radiación emitida, y la absorción por las células neoplásicas.

En la presente descripción se puede emplear cualquier medio adecuado para administrar radiación a un tejido. Los medios comunes para administrar radiación a un tejido consisten en una fuente de radiación ionizante externa al cuerpo que está siendo tratado. Los métodos alternativos para administrar radiación a un tejido incluyen, por ejemplo, en primer lugar administrar *in vivo* un anticuerpo radiomarcado que inmunoreacciona con un antígeno del tumor, y a continuación administrar *in vivo* una cantidad eficaz del anticuerpo radiomarcado al tumor. Además se pueden utilizar radioisótopos para administrar radiación ionizante a un tejido o célula. Adicionalmente, la radiación se puede administrar por medio de un agente radiomimético. Tal como se usa en la presente memoria, un "agente radiomimético" es un agente quimioterapéutico, por ejemplo melfalán, que causa el mismo tipo de daño celular que la radioterapia, pero sin la aplicación de radiación.

Para su uso en cáncer y enfermedades neoplásicas, un compuesto de unión al receptor sigma-2 se puede utilizar de manera óptima junto con uno o más de los siguientes ejemplos no limitativos de agentes anticancerosos: (1) agentes alquilantes, que incluyen pero no se limitan a cisplatino (PLATIN), carboplatino (PARAPLATIN), oxaliplatino (ELOXATIN), estreptozocina (ZANOSAR), busulfano (MYLERAN) y ciclofosfamida (ENDOXAN); (2) antimetabolitos, que incluyen pero no se limitan a mercaptopurina (PURINETHOL), tioguanina, pentostatina (NIPENT), arabinósido de citosina (ARA-C), gemcitabina (GEMZAR), fluorouracilo (CARAC), leucovorina (FUSILEV) y metotrexato (RHEUMATREX); (3) alcaloides y terpenoides vegetales, que incluyen pero no se limitan a vincristina (ONCOVIN), vinblastina y paclitaxel (TAXOL); (4) inhibidores de topoisomerasa, que incluyen pero no se limitan a irinotecán (CAMPTOSAR), topotecán (HYCAMTIN) y etopósido (EPOSIN); (5) antibióticos citotóxicos, que incluyen pero no se limitan a actinomicina D (COSMEGEN), doxorubicina (ADRIAMYCIN), bleomicina (BLENOXANE) y mitomicina (MITOSOL); (6) inhibidores de la angiogénesis, que incluyen pero no se limitan a sunitinib (SUTENT) y bevacizumab (AVASTIN); y (7) inhibidores de la tirosina quinasa, que incluyen pero no se limitan a imatinib (GLEEVEC), erlotinib (TARCEVA), lapatinib (TYKERB) y axitinib (INLYTA).



El agente terapéutico adicional se puede seleccionar entre 5-fluorouracilo, adriamicina, afatinib, alemtuzmab, altretamina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amsacrina, anastrozol, aprepitant, asparaginasa, axitinib, azacitidina, beg, bertozumab, bevacizumab, bexaroteno, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, bosutinib, buserelina, busulfano, campotecina, capecitabina, carboplatino, carbozantimib, carfilzomib, carmustina, ceritinib, cetuximab, clorambucilo, cloroquina, cisplatino, cladisat, solución acuosa de NaCl, cladribina, clodronato, clofarabina, cobimetinib, colchicina, crizotinib, ciclofosfamida, ciclofosfamina, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, dasatinib, daunorrubicina, debrafinib, decarazina, decitabina, demetoxiviridina, desatinib, dexrazoxano, dicloroacetato, dienestrol, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, estradiol, estramustina, etopósido, everolimus, exemestano, filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab, genisteína, goserelina, hidroxiurea, ibrutinib, idarrubicina, idelalisib, ifosfamida, imatinib, imiquimod, interferón, irinotecan, ironotecan, ixabepilona, lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, lonidamina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metformina, metotrexato, metotrexato, mitram, mitomicina, mitosmicina, mitotano, mitoxano, mitoxantrona, nelarabina, neratinib, nilotinib, nilutamida, nocodazol, octreotida, olaparib, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pazopanib, pegaspargasa, pemretxed, pentostatina, perfosina, plicamicina, pomalidomida, ponatinib, porfimer, procarbazona, raloxifeno, raltitrexed, regorafinib, rituximab, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, suramina, tamoxifeno, temozolomida, temsirolimus, tenipósido, testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecano, trametinib, trastuzumab, tretinoína, veliparib, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, volasertib, vorinostat y ácido zoledrónico.

Cuando un individuo padece o corre el riesgo de padecer una afección inflamatoria, un compuesto de unión al receptor sigma-2 descrito en la presente memoria se usa opcionalmente junto con uno o más agentes o métodos para tratar una afección inflamatoria en cualquier combinación. Los agentes/tratamientos terapéuticos para tratar una afección autoinmune y/o inflamatoria incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes ejemplos: (1) corticosteroides, que incluyen, pero no se limitan a, cortisona, dexametasona y metilprednisolona; (2) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que incluyen, pero no se limitan a, ibuprofeno, naproxeno, acetaminofeno, aspirina, fenoprofeno (NALFON), flurbiprofeno (ANSAID), ketoprofeno, oxaprozina (DAYPRO), diclofenaco sódico (VOLTAREN), diclofenaco potásico (CATAFLAM), etodolaco (LODINE), indometacina (INDOCIN), ketorolaco (TORADOL), sulindaco (CLINORIL), tolmetina (TOLECTIN), meclufenamato (MECLOMEN), ácido mefenámico (PONSTEL), nabumetona (RELAFEN) y piroxicam (FELDENE); (3) inmunosupresores, que incluyen, pero no se limitan a, metotrexato (RHEUMATREX), leflunomida (ARAVA), azatioprina (IMURAN), ciclosporina (NEORAL, SANDIMMUNE), tacrolimús y ciclofosfamida (CYTOXAN); (4) bloqueadores de CD20, que incluyen, pero no se limitan a, rituximab (RITUXAN); (5) bloqueadores del factor de necrosis tumoral (TNF), que incluyen, pero no se limitan a, etanercept (ENBREL), infliximab (REMICADE) y adalimumab (HUMIRA); (6) antagonistas del receptor de interleucina-1, que incluyen, pero no se limitan a, anakinra (KINERET); (7) inhibidores de interleucina-6, que incluyen, pero no se limitan a, tocilizumab (ACTEMRA); (8) inhibidores de interleucina-17, que incluyen, pero no se limitan a, AIN457; (9) inhibidores de la Janus quinasa, que incluyen, pero no se limitan a, tasocitinib; y (10) inhibidores de syk, que incluyen, pero no se limitan a, fosfamatinib.

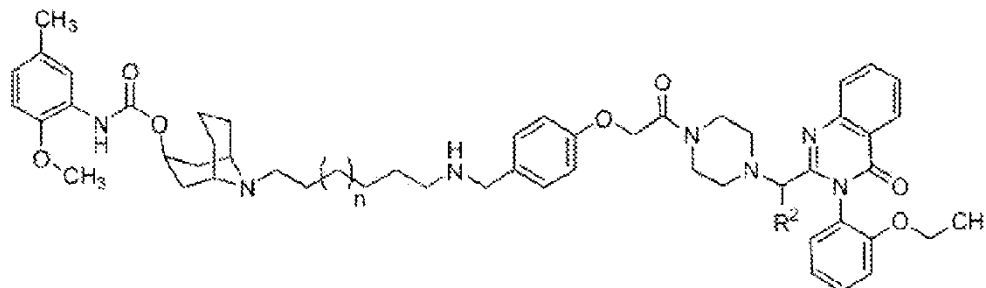
#### Síntesis de compuestos

Los compuestos de las presentes enseñanzas se pueden preparar usando métodos ilustrados en esquemas sintéticos generales y procedimientos experimentales detallados más abajo. Los esquemas sintéticos generales y los procedimientos experimentales se presentan con fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Los materiales de partida utilizados para preparar compuestos de las presentes enseñanzas están disponibles comercialmente o se pueden preparar usando métodos de rutina conocidos en la técnica.

#### Lista de abreviaturas

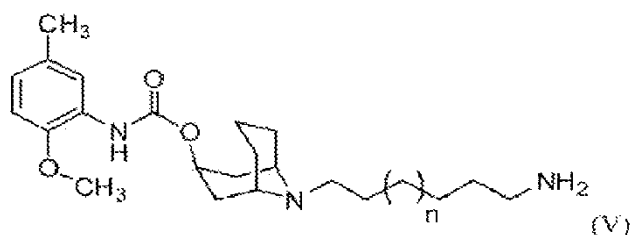
ac. = acuoso;  $\text{CDCl}_3$  = cloroformo deuterado;  $\text{DMSO-d}_6$  = sulfóxido de dimetilo deuterado; DMSO = sulfóxido de dimetilo; h = hora; THF = tetrahidrofurano.

También se describen métodos de síntesis de compuestos de la fórmula IV:

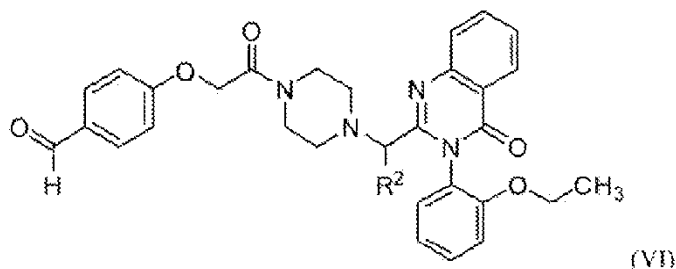


(IV)

En diversas configuraciones, estos métodos incluyen someter a reacción un compuesto de la fórmula estructural V:



con un compuesto de la fórmula estructural VI:



en donde n es un número entero de 1 a 5, y R<sup>2</sup> es hidrógeno o metilo.

5 En algunas configuraciones, n puede ser 1; y R<sup>2</sup> puede ser hidrógeno.

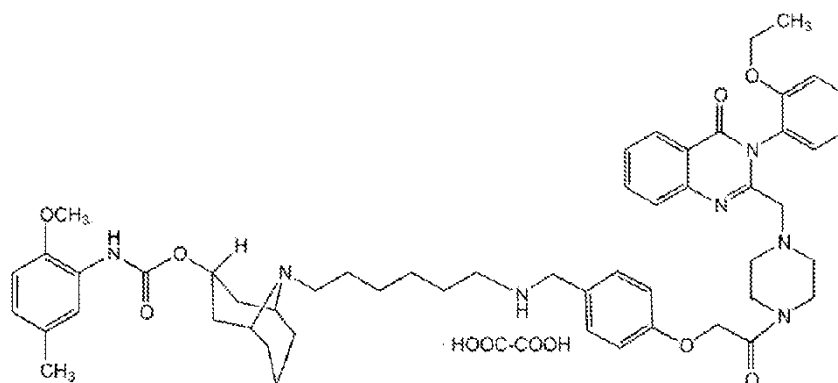
En algunas configuraciones, n puede ser 5; y R<sup>2</sup> puede ser hidrógeno.

10 En algunas configuraciones, la reacción puede tener lugar en presencia de un agente reductor, tal como, sin limitación, hidruro de aluminio, borano-tetrahidrofurano, catecolborano, hidruro de diisobutilaluminio, disiamilborano, hidrazina, hidruro de aluminio y litio, borohidruro de litio, hidruro de tri-t-butoxialuminio y litio, trietilborohidruro de litio, tri-s-butilborohidruro de potasio, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, o mezclas de los mismos.

#### Métodos generales para preparar compuestos

15 Los siguientes esquemas se pueden utilizar para poner en práctica métodos de síntesis de las presentes enseñanzas. Se pueden incorporar grupos estructurales adicionales, que incluyen, pero no se limitan a, los definidos en otra parte de la memoria descriptiva y que no se muestran en los compuestos descritos en los esquemas, para proporcionar diversos compuestos descritos en la presente memoria, o compuestos intermedios que, después de manipulaciones adicionales utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia, se pueden convertir en compuestos de las presentes enseñanzas.

20 EJEMPLO 1: 3-(o-etoxifenil)-2-[[4-(2-[p-[(6-{3-(2-metoxitololuidinocarboxilo)-9-azabicyclo[3.3.1]non-9-il]hexilamino)metil]fenoxi]acetil)-1-piperazinil]metil]-3H-quinazolin-4-ona (SW V-49s)



#### Compuesto intermedio 1A. N-9-bencil-9-azabicyclo [3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -ol (2)

25 Una mezcla de LiAlH (o-terc-Bu)<sub>3</sub> (20,0 g, 78,5 mmol) en THF anhidro (30 ml) se enfrió en un baño de hielo. Se añadió gota a gota una solución del compuesto 9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-ona (1) (5,0 g, 21,8 mmol) en THF anhidro (45 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente a lo largo de la noche. La reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl. El sólido se filtró y se lavó con THF. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a sequedad para obtener N-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -ol como un aceite

amarillo claro (4,8 g, 95% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,20-7,35 (m, 5H), 4,22-4,32 (m, 1H), 3,79 (s, 2H), 3,02-3,06 (m, 2H), 2,33-2,43 (m, 2H), 2,12-2,26 (m, 1H), 1,85-1,99 (m, 3H), 1,30-1,54 (m, 3H), 1,08-1,13 (m, 2H).

Compuesto intermedio 1B. *N*-(9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -il)-*N'*-(2-metoxi-5-metil-fenil)carbamato (3)

5 Una mezcla del compuesto intermedio 1A (4,8 g, 20,6 mmol), isocianato de 2-metoxi-5-metilfenilo (3,8 g, 23,5 mmol), diacetato de dibutilestaño (unas gotas) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (45 ml) se agitó a temperatura ambiente a lo largo de la noche. La mezcla de reacción se lavó con agua, solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera, y después se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El disolvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo/trietilamina, 80:20:1) para obtener *N*-(9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -il)-*N'*-(2-metoxi-5-metil-fenil)carbamato en forma de un sólido blanco (6,8 g, 83% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,97 (s, 1H), 7,16-7,37 (m, 6H), 6,73-6,80 (m, 2H), 5,22-5,30 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,81 (s, 2H), 3,04-3,07 (m, 2H), 2,42-2,52 (m, 2H), 2,30 (s, 3H), 1,91-2,20 (m, 3H), 1,48-1,56 (m, 3H), 1,15-1,18 (m, 2H).

Compuesto intermedio 1C. *O*-(9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -il)-*N*-(2-metoxi-5-metilfenil)-carbamato (4)

15 A una solución de compuesto intermedio 1B (6,8 g, 17,3 mmol) en metanol/acetato de etilo (1:1, 160 ml) se añadió un 20% p/p de hidróxido de paladio/carbono (1,35 g) y formiato de amonio (5,4 g, 86,5 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 h, se enfrió, se filtró a través de una almohadilla de celite y se evaporó. El residuo resultante se disolvió en acetato de etilo, se lavó con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , agua y salmuera, y después se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El disolvente se retiró para obtener la amina bicíclica desprotegida *O*-(9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -il)-*N*-(2-metoxi-5-metilfenil)-carbamato 4 en forma de un aceite marrón claro (cuantitativo).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,94 (s, 1H), 7,16 (s, 1H), 6,73-6,80 (m, 2H), 4,96-5,04 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,33-3,36 (m, 2H), 2,33-2,41 (m, 2H), 2,30 (s, 3H), 2,06-2,14 (m, 1H), 1,45-1,75 (m, 8H).

Compuesto intermedio 1D. *N*-(9-(6-aminohexil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -il)-*N'*-(2-metoxi-5-metil-fenil)-carbamato (6a)

25 Una mezcla de amina secundaria a partir del compuesto intermedio 1C (3,3 g, 11,0 mmol), *N*-(6-bromohexil)ftalimida (3,5 g, 11,3 mmol), KI (2,0 g, 12,4 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (7,8 g, 56,5 mmol) en acetonitrilo (90 ml) se agitó a reflujo a lo largo de la noche. Después de la filtración, los componentes volátiles se evaporaron al vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (5% metanol en diclorometano) para obtener la amina intermedia protegida con ftalimido 5a deseada (5,8 g, 96% de rendimiento) en forma de un aceite marrón claro.

30 El compuesto 5a (2,8 g, 5,3 mmol) se calentó a reflujo con hidrato de hidrazina (540 mg, 10,7 mmol) en etanol (100 ml) durante 5 h. El disolvente se evaporó y se añadió una solución acuosa al 10% de NaOH (20 ml). La mezcla se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se evaporó para obtener el *N*-(9-(6-aminohexil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -il)-*N'*-(2-metoxi-5-metil-fenil)carbamato de amina primaria 6a deseado (1,9 g, 88% de rendimiento) en forma de un aceite amarillo claro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,96 (s, 1H), 7,14 (s, 1H), 6,72-6,80 (m, 2H), 5,10-5,18 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,05-3,07 (m, 2H), 2,66-2,71 (m, 2H), 2,55-2,59 (m, 2H), 2,39-2,49 (m, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,10-2,20 (m, 1H), 1,81-1,94 (m, 2H), 1,18-1,54 (m, 15H).

35 Compuesto intermedio 1E. 2-(4-formilfenoxi)acetato de etilo (7)

40 A una solución de 4-hidroxibenzaldehído (2,4 g, 20,0 mmol) en acetonitrilo (60 ml) se le añadieron 2-bromoacetato de etilo (3,7 g, 22,0 mmol) y carbonato de potasio (8,3 g, 60,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 h. Después de enfriarla, la mezcla de reacción se filtró y se evaporó para obtener 2-(4-formilfenoxi)acetato de etilo en forma de un líquido amarillo claro (cuantitativo).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,90 (s, 1H), 7,85 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,01 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 4,71 (s, 2H), 4,28 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 1,31 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).

Compuesto intermedio 1F. Ácido 2-(4-formilfenoxi)acético (8)

45 La hidrólisis del compuesto intermedio 1E con hidróxido de sodio (2,2 eq.) en metanol/agua (2:1, 90 ml) durante 24 h, seguida de acidificación con solución de HCl al 10% produjo ácido 2-(4-formilfenoxi)acético en forma de un sólido blanquecino (3,1 g, 87% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13,18 (br s, 1H), 9,91 (s, 1H), 7,89 (d, 8,6 Hz, 2H), 7,13 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 4,86 (s, 2H).

Compuesto intermedio 1G. Ácido 2-(2-cloroacetamido)benzoico (9)

50 A una solución de ácido 2-aminobenzoico (5,0 g, 36,5 mmol) en diclorometano (90 ml) se le añadió trietilamina (4,06 g, 40,1 mmol) y la mezcla se enfrió en un baño de agua con hielo. Se añadió gota a gota una solución de cloruro de cloroacetilo (4,5 g, 40,1 mmol) en diclorometano (40 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente a lo largo de la noche. Los sólidos se filtraron y se lavaron con agua fría seguida de éter dietílico al 5% en hexano, y se secaron al aire para proporcionar ácido 2-(2-cloroacetamido)benzoico en forma de un sólido blanco (7,4 g, 95% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11,82 (s, 1H), 8,52 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 8,01 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,63 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,21 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 4,45 (s, 2H).

## Compuesto intermedio 1H. 2-(clorometil)-3-(2-etoxifenil)quinazolin-4(3H)-ona (10)

5 A una mezcla del compuesto intermedio 1G (3,1 g, 14,5 mmol) y 2-etoxianilina (2,0 g, 14,5 mmol) en acetonitrilo (50 ml) se le añadió cloruro de fosforilo (6,5 g, 42,4 mmol) gota a gota. La mezcla se calentó a reflujo a lo largo de la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió en una suspensión de hielo/solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al aire para obtener 2-(clorometil)-3-(2-etoxifenil)quinazolin-4(3H)-ona (10) en forma de un sólido marrón (2,5 g, 53% de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,31 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,78-7,82 (m, 2H), 7,47-7,55 (m, 2H), 7,35 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,06-7,14 (m, 2H), 4,35 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 4,17 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 4,06 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,23 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

## Compuesto intermedio 1I. 3-(2-etoxifenil)-2-(piperazin-1-il-metil)quinazolin-4(3H)-ona (11)

10 A una mezcla del compuesto intermedio 1H (2,5 g, 8,0 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,4 g, 32,0 mmol) y KI (1,7 g, 10,4 mmol) en acetonitrilo (75 ml) se le añadió piperazina (2,7 g, 32,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 85-90 °C a lo largo de la noche. Después de enfriarla, se filtró y el sólido se lavó con acetonitrilo. Las capas orgánicas combinadas se evaporaron. El residuo resultante se dispersó en agua y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna (10% metanol, 0,5% NH<sub>4</sub>OH en diclorometano) para obtener 3-(2-etoxifenil)-2-(piperazin-1-il-metil)quinazolin-4(3H)-ona en forma de un aceite amarillo (2,3 g, 79% de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,30 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,75-7,77 (m, 2H), 7,39-7,50 (m, 2H), 7,28 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,01-7,08 (m, 2H), 4,05 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,18-3,28 (m, 2H), 2,73 (s, 4H), 2,33-2,37 (m, 2H), 2,17-2,20 (m, 2H), 1,22 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

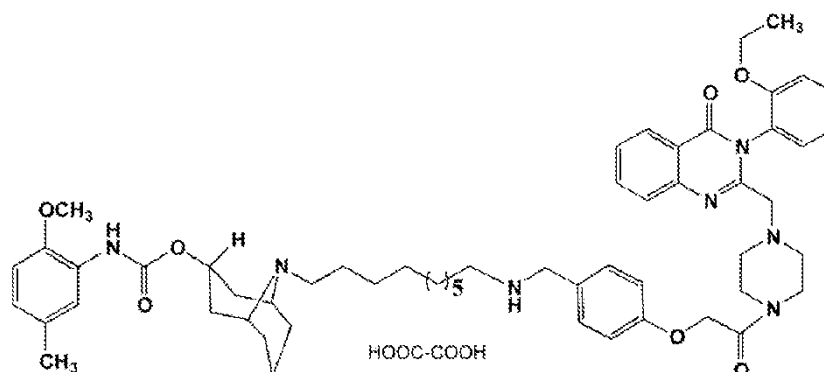
20 Compuesto intermedio 1J. 4-(2-(4-((3-(2-etoxifenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-2-il)metil)-piperazin-1-il)-2-oxoetoxi)benzaldehído (12)

25 A una mezcla enfriada de ácido 8 (360 mg, 2,0 mmol), N-hidroxisuccinimida (280 mg, 2,4 mmol) en acetonitrilo (12 ml) se le añadió una solución de DCC (500 mg, 2,4 mmol) en acetonitrilo (4 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 45 minutos, se añadió una solución del compuesto intermedio 11 (800 mg, 2,2 mmol) en acetonitrilo (10 ml), luego se continuó agitando a lo largo de la noche. El sólido se filtró y el filtrado se evaporó. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (8% metanol en diclorometano) para obtener 4-(2-(4-((3-(2-etoxifenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-2-il)metil)-piperazin-1-il)-2-oxo-etoxi)benzaldehído en forma de un sólido blanquecino (847 mg, 80% de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,89 (s, 1H), 8,27-8,31 (m, 1H), 7,72-7,84 (m, 4H), 7,42-7,52 (m, 2H), 7,25 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H), 7,02-7,09 (m, 4H), 4,74 (s, 2H), 4,05 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,42-3,49 (m, 4H), 3,22-3,31 (m, 2H), 2,18-2,46 (m, 4H), 1,22 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

30 Sal de oxalato de 9-(6-(((4-(2-(4-((3-(2-etoxifenil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-2-il)metil)-piperazin-1-il)-2-oxoetoxi)encil)amino)hexil)-N-(9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3α-il)-N-(2-metoxi-5-metilfenil) carbamato (SW V-49s)

35 A una solución del compuesto intermedio 1J (12) (480 mg, 0,91 mmol) en diclorometano (4 ml) se le añadió una solución de amina del compuesto intermedio 1D (6a) (386 mg, 0,95 mmol) en diclorometano (4 ml). La mezcla se agitó durante 4 h, y después se evaporó el disolvente. El residuo se disolvió en etanol (5 ml) y después se añadió NaBH<sub>4</sub> (100 mg, 2,6 mmol). La mezcla se agitó durante 6 h, luego se inactivó con solución de HCl al 10%. Después de evaporar el disolvente, se ajustó a un valor básico con solución de NaOH al 10%, se extrajo con diclorometano y se evaporó. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (10% metanol, 0,5% NH<sub>4</sub>OH en diclorometano) para obtener el producto en forma de amina libre (460 mg, 55% de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,30 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,74-7,78 (m, 2H), 7,41-7,51 (m, 2H), 7,23-7,26 (m, 3H), 7,14 (s, 1H), 7,03-7,09 (m, 2H), 6,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,73-6,79 (m, 2H), 5,10-5,16 (m, 1H), 4,62 (s, 2H), 4,04 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,74 (s, 2H), 3,43-3,48 (m, 4H), 3,22-3,30 (m, 2H), 3,12 (br s, 2H), 2,60-2,64 (m, 4H), 2,37-2,50 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 2,19-2,25 (m, 3H), 1,90-1,96 (m, 2H), 1,48-1,58 (m, 7H), 1,28-1,34 (m, 6H), 1,22 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). La sal de oxalato se preparó usando 1 equivalente de ácido oxálico en etanol para obtener SW V-49s en forma de un sólido blanquecino (470 mg, 93% de rendimiento), p. f. 164-165 °C. Anal. (C<sub>55</sub>H<sub>69</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>·2H<sub>2</sub>O): calculado, %: C 63,51; H 7,07; N 9,43, hallado, %: C 63,54, H 7,06, N 9,76.

EJEMPLO 2: Sal de oxalato de 3-(*o*-etoxifenil)-2-[[4-(2-{*p*-[(10-{3-(2-metoxitololuinocarboniloxi)-9-azabicyclo[3.3.1]non-9-*il*)decilamino]metil]fenoxi}acetil)-1-piperazinil]metil]-3H-quinazolin-4-ona). (SW V-50s)



Compuesto intermedio 2A. *N*-(9-(10-aminodecil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -*il*)-(2-metoxi-5-metilfenil) carbamato (6b)

- 5 Una mezcla de amina secundaria a partir del compuesto intermedio 1C (3,6 g, 11,8 mmol), *N*-(10-bromodecil)ftalimida (4,4 g, 12,0 mmol), KI (2,0 g, 12,4 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,2 g, 59,4 mmol) en acetonitrilo (90 ml) se agitó a reflujo a lo largo de la noche. Después de la filtración, los componentes volátiles se evaporaron al vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (5% metanol en diclorometano) para obtener el compuesto intermedio protegido con ftalimido 5b deseado (6,0 g, 86% de rendimiento) en forma de un aceite marrón claro.
- 10 El compuesto 5b (2,9 g, 4,9 mmol) se calentó a reflujo con hidrato de hidrazina (700 mg, 13,9 mmol) en etanol (100 ml) durante 5 h. El disolvente se evaporó y se añadió una solución acuosa al 10% de NaOH (20 ml). La mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó para obtener el *N*-(9-(10-aminodecil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 $\alpha$ -*il*)-*N'*-(2-metoxi-5-metilfenil)carbamato de amina primaria 6b (2,2 g, 95% de rendimiento) en forma de un aceite amarillo claro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,96 (s, 1H), 7,14 (s, 1H), 6,72-6,80 (m, 2H), 5,10-5,18 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,04-3,07 (m, 2H), 2,65-2,70 (m, 2H), 2,53-2,58 (m, 2H), 2,39-2,49 (m, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,08-2,20 (m, 1H), 1,83-1,94 (m, 2H), 1,18-1,54 (m, 23H).
- 15

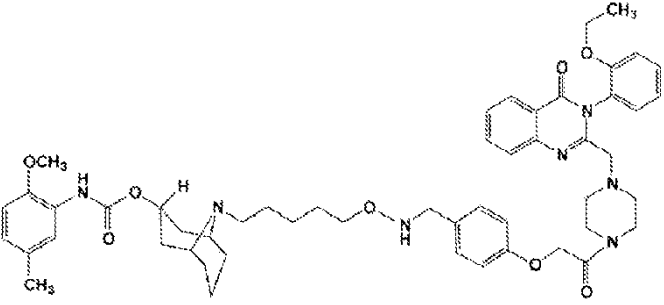
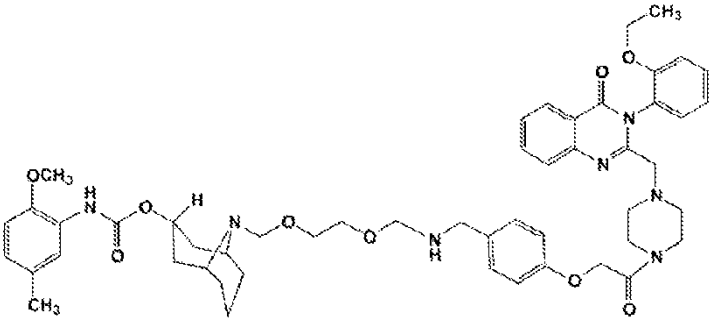
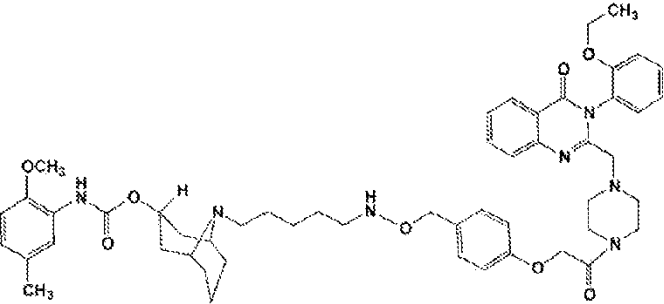
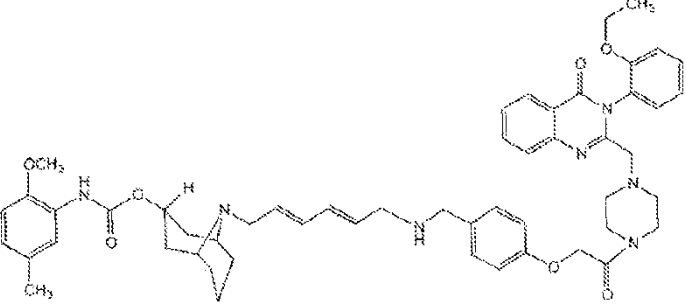
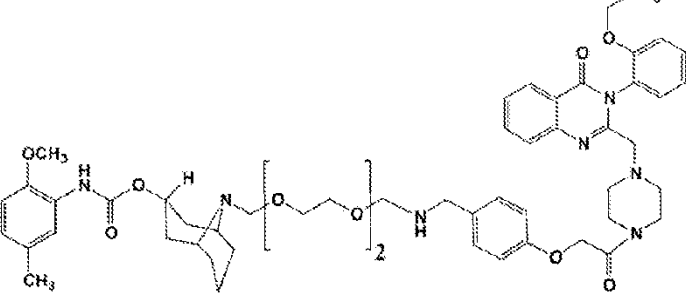
A una solución de 12 (380 mg, 0,72 mmol) en diclorometano (4 ml) se le añadió una solución de amina del compuesto intermedio 2A (343 mg, 0,74 mmol) en diclorometano (4 ml). La mezcla se agitó durante 4 h y después se evaporó el disolvente. El residuo se disolvió en etanol (5 ml), luego se añadió NaBH<sub>4</sub> (100 mg, 2,6 mmol). La mezcla se agitó durante 6 h, luego se inactivó con solución de HCl al 10%. Después de evaporar el disolvente, se ajustó a un valor básico con solución de NaOH al 10%, se extrajo con diclorometano y se evaporó. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (10% metanol, 0,5% NH<sub>4</sub>OH en diclorometano) para obtener el producto en forma de amina libre (295 mg, 42% de rendimiento). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,29 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,73-7,78 (m, 2H), 7,41-7,51 (m, 2H), 7,21-7,24 (m, 3H), 7,14 (s, 1H), 7,02-7,08 (m, 2H), 6,86 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,73-6,79 (m, 2H), 5,10-5,16 (m, 1H), 4,61 (s, 2H), 4,04 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,72 (s, 2H), 3,44-3,48 (m, 4H), 3,21-3,31 (m, 2H), 3,09 (br s, 2H), 2,59-2,62 (m, 4H), 2,36-2,50 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 2,17-2,24 (m, 3H), 1,88-1,94 (m, 2H), 1,40-1,57 (m, 7H), 1,24-1,30 (m, 6H), 1,21 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H). La sal de oxalato se preparó usando 1 equivalente de ácido oxálico en etanol para obtener SW V-50s en forma de un sólido marrón claro (308 mg, 95% de rendimiento), p. f. 183-184 °C. Anal. (C<sub>59</sub>H<sub>77</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub> 2H<sub>2</sub>O): calculado, %: C 64,64; H 7,45; N 8,94, hallado, %: C 64,84, H 7,41, N 8,62.

20

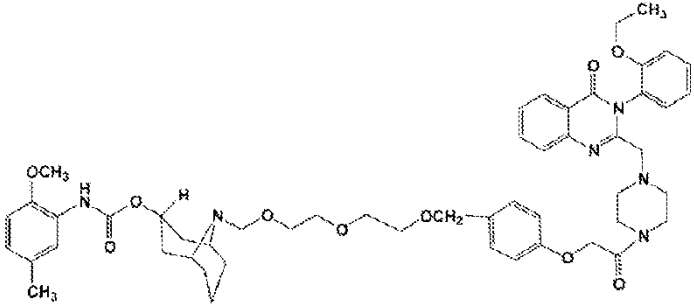
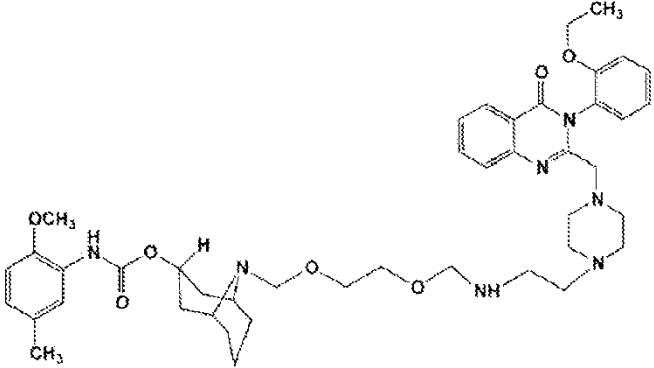
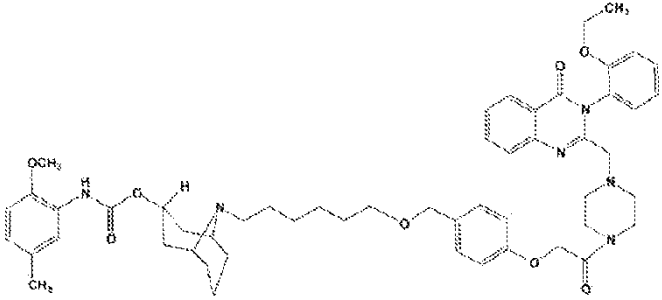
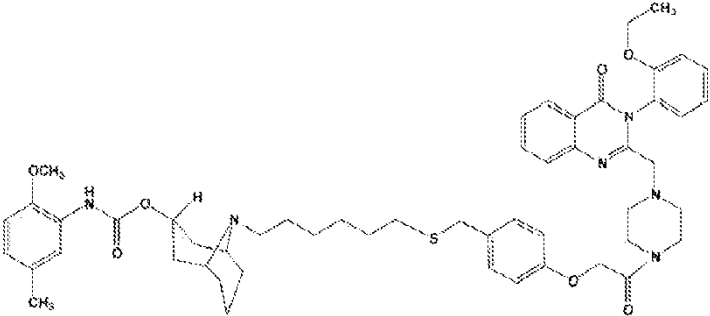
25

- 30 Tabla 1: Ejemplos adicionales de compuestos de conjugado de fármaco de ligando del receptor sigma-2 de doble dominio, incluyendo compuestos de conjugado de erastin de ligando del receptor sigma-2 y compuestos de conjugado de análogo de erastin de ligando del receptor sigma-2. (Los ejemplos 3-20 y 22 son ejemplos de referencia.)

Ej. N°	Estructura
3	

Ej. N°	Estructura
4	
5	
6	
7	
8	

Ej. N°	Estructura
9	
10	
11	
12	

Ej. N°	Estructura
13	
14	
15	
16	







## Ensayos de actividad biológica

A continuación se describen ensayos de arco que pueden ser utilizados para evaluar la eficacia biológica de los compuestos de Fórmula (I).

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria utilizan técnicas de laboratorio bien conocidas por los artesanos expertos, y se pueden encontrar en manuales de laboratorio tales como Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, 2001; Spector, DL *et al.*, Cells: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, 1998; Nagy, A., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Tercera Edición), Cold Spring Harbor, NY, 2003; Harlow, E., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999; y Carruthers, W., y Coldham, L, Modern Methods of Organic Synthesis (4ª Edition), Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido, 2004. Los métodos de administración de productos farmacéuticos y los regímenes de dosificación se puede determinar de acuerdo con los principios estándar de la farmacología bien conocidos por los artesanos expertos, utilizando métodos proporcionados por textos de referencia estándar como Remington: the Science and Practice of Pharmacy (Alfonso R. Gennaro ed. 19 edición 1995); Hardman, J. G., *et al.*, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, novena edición, McGraw-Hill, 1996; y Rowe, R. C., *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, cuarta edición, Pharmaceutical Press, 2003. Tal como se utilizan en la presente descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen también las formas plurales, a menos que el contexto indique otra cosa.

## Métodos de estudio de toxicidad

Seis ratones hembra adultos fueron sometidos a necropsia. La designación de la cepa de los ratones era C57BL/6. Los procedimientos anteriores incluían la administración intraperitoneal diaria de un fármaco inductor de ferroptosis o el control del vehículo en el transcurso de 2 semanas. Los ratones también fueron sometidos previamente a trasplante por vía subcutánea con un xenoinjerto de KCKO (Besmer, D. M., *et al.*, Cancer Res. 17: 4432-4442, 2011).

## Líneas celulares

Las líneas celulares CFPAC-1, BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 y Mia PaCa-2 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va.). La línea celular SYO-1, una línea celular de sarcoma sinovial (Kawai, A., *et al.*, Cancer Lett. 204: 105-113.2004), fue proporcionada por el Dr. Brian Van Tine (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO). La línea celular KCKO se aisló de un tumor pancreático de ratón transgénico que expresa MUC1 humano (Besmer *et al.* Cancer Research 2011; 71: 4432-4442, Tinder *et al.* J Immunol 2008; 181: 3116-3125). La línea celular KCKO fue proporcionada por el Dr. Pinku Mukherjee (University of North Carolina, Charlotte, NC). Las células PANC-1 se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con L-glutamina 4 mM, 1,5 g/l bicarbonato de sodio y suero bovino fetal al 10% (FBS). La línea celular Mia PaCa-2 se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco con 10% de FBS y 2,5% de suero de caballo. Las líneas celulares BxPC-3, AsPC-1 y KCKO se cultivaron en medio RPM1-1640 con 10% de FBS. Las células de sarcoma sinovial SYO-1 se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con 10% FBS. Se agregaron antibióticos, penicilina (100 mg/ml) y estreptomina (100 mg/ml) a los medios y las células se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

## Estadística

Los análisis estadísticos y el trazado de datos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 6 (San Diego, CA). Los resultados se expresaron como media ± SEM de al menos 3 replicaciones biológicas. Los valores IC<sub>50</sub> se calcularon ajustando la curva de viabilidad normalizada frente a la concentración del fármaco. Para analizar las diferencias en valores IC<sub>50</sub> y la inhibición de SW V-49s con pruebas NAC y ZVAD se utilizó ANOVA de una vía. Para evaluar la diferencia en los análisis de CBC y bioquímica, y para confirmar la diferencia en los subgrupos de ensayos de detección de ROS, caspasas y absorción de cistina se utilizó la prueba t de dos colas sin emparejar. Para analizar la diferencia en el volumen del tumor se utilizó ANOVA de dos vías. Se utilizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y la diferencia entre los grupos se comparó con una prueba de log-rango. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo para todos los análisis.

## Examen preneopsia

El ratón A (ID: 732) era un control de vehículo. Se afeitó el pelo sobre el costado derecho, con recrecimiento parcial. En el costado derecho se podía palpar un engrosamiento subcutáneo muy pequeño. No se produjo secreción nasal u ocular ni diarrea. La hidratación y la grasa corporal eran normales. El peso corporal era de 21 gramos.

El ratón B (ID: 727) se trató con el fármaco de ensayo. Se afeitó el pelo sobre el costado derecho, con recrecimiento parcial. Se observó una masa subcutánea que medía 1,5 x 0,6 cm sobre la columna lumbar, con una adherencia firme en la musculatura subyacente. Se observó una úlcera de 4-5 mm de diámetro en la piel que recubría esta masa. No se produjo secreción nasal u ocular ni diarrea. La hidratación y la grasa corporal eran normales. El peso corporal era de 21 gramos.

El ratón C (ID: 735) era un control de vehículo. En este animal se observó una parálisis posterior, con arrastre de las

5 extremidades posteriores. Se podía provocar una respuesta profunda al dolor de la pata trasera izquierda, pero no de la pata trasera derecha. El pelaje era ligeramente ralo sobre el costado derecho. Se observó una masa firme y subcutánea sobre la columna lumbar. Ésta estaba firmemente unida a los tejidos subyacentes. Se observó un engrosamiento de 0,2-0,3 cm de diámetro de la piel dentro del cual había una úlcera de 0,1 cm de diámetro sobre el costado derecho. No se produjo secreción nasal u ocular ni diarrea. La hidratación y la grasa corporal eran normales. El peso corporal era de 20 gramos.

El ratón D (ID: 737) se trató con el fármaco de ensayo. Sobre la columna vertebral se podía palpar una masa subcutánea. El pelaje era normal. No se produjo secreción nasal u ocular ni diarrea. La hidratación y la grasa corporal eran normales. El peso corporal era de 19 gramos.

10 El ratón E (ID: 746) era un control de vehículo. Se afeitó el pelo sobre el costado derecho, con recrecimiento parcial. Se observó un nódulo subcutáneo firme de 0,6 cm de diámetro en el costado derecho. No se produjo secreción nasal u ocular ni diarrea. La hidratación y la grasa corporal eran normales. El peso corporal era de 23 gramos.

15 El ratón F (ID: 738) se trató con el fármaco de ensayo. El pelaje era normal. Sobre la columna lumbar se podía palpar una masa subcutánea firme. La columna vertebral era fácilmente palpable, lo que sugiere un posible desgaste muscular. No se produjo secreción nasal u ocular ni diarrea. La hidratación y la grasa corporal eran normales. El peso corporal era de 22 gramos.

#### Examen de necropsia macroscópica

20 Con respecto al ratón A, el engrosamiento subcutáneo observado en el examen preneecropsia consistía en una masa firme que medía 0,5 x 0,1 cm. Se observó un área engrosada de 0,4 x 0,1 cm en el mesenterio cerca del colon distal, y sin estar limitado por la teoría, posiblemente el resultado de un ganglio linfático agrandado. Se observó un foco enrojecido de 2 mm de diámetro en el pulmón izquierdo. El corazón y el hígado estaban ligeramente pálidos. No había lesiones macroscópicas en el tracto intestinal, sistema musculoesquelético, sistema urinario, sistema genital, cerebro, timo, bazo, glándulas suprarrenales, tiroides, pituitaria, oído medio u ojo.

25 Con respecto al ratón B, la masa subcutánea estaba multilobulada y medía 1,8 x 0,6 cm, con un nódulo unido de 1,0 cm de diámetro. La masa subcutánea estaba localizada subcutáneamente sobre la columna lumbar y el dorso lateral derecho. No se produjo infiltración en la columna vertebral. La masa sobresalía ventralmente incidiendo sobre el abdomen. El hígado estaba ligeramente pálido. El corazón estaba ligeramente pálido. No había lesiones macroscópicas en el sistema respiratorio, tracto intestinal, sistema urinario, sistema genital, cerebro, timo, bazo, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, tiroides, pituitaria, oído medio u ojo.

30 Con respecto al ratón C, la masa subcutánea medía 1,8 x 1,7 x 1,5 cm y parecía abarcar la columna lumbar media. La masa era de color bronce pálido, firme y ligeramente nodular. El corazón y el hígado estaban ligeramente pálidos. No había lesiones macroscópicas en el sistema respiratorio, tracto intestinal, sistema urinario, sistema genital, cerebro, timo, bazo, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, tiroides, pituitaria, oído medio u ojo.

35 Con respecto al ratón D, la masa subcutánea medía 1,2 x 0,8 cm y se extendía sobre la columna lumbar. Sin estar limitado por la teoría, las apófisis espinosas dorsales de las vértebras pueden haber sido erosionadas por el tumor. El hígado estaba ligeramente pálido. No había lesiones macroscópicas en el sistema respiratorio, tracto intestinal, sistema urinario, sistema genital, corazón, cerebro, timo, bazo, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, tiroides, pituitaria, oído medio u ojo.

40 Con respecto al ratón E, los pulmones estaban moteados de color rojo. El hígado estaba ligeramente pálido. No había lesiones macroscópicas en el tracto intestinal, sistema musculoesquelético, sistema urinario, sistema genital, corazón, cerebro, timo, bazo, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, tiroides, pituitaria, oído medio u ojo.

45 Con respecto al ratón F, se observaron dos masas en la piel y los tejidos subcutáneos. Una medía 0,5 x 0,5 x 0,3 cm y estaba situada en la piel, y la otra medía 0,5 x 0,5 x 0,2 cm y estaba en los tejidos subcutáneos que recubren la columna lumbar. No había lesiones macroscópicas en el sistema respiratorio, tracto intestinal, sistema urinario, sistema genital, corazón, cerebro, timo, bazo, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, tiroides, pituitaria, oído medio u ojo.

#### Examen histopatológico

50 Con respecto al ratón A, se observaron infiltrados inflamatorios multifocales leves en la grasa mesentérica que incluía macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas. Se observó un ganglio linfático mesentérico reactivo, con hiperplasia linfoide, histiocitosis y dilatación de los senos medulares. En el pulmón se observó una hemorragia focal moderada en un lóbulo, sin estar limitado por la teoría, probablemente relacionada con la eutanasia con CO<sub>2</sub>. No había lesiones significativas en el cerebro, corazón, hígado, riñón, bazo, páncreas o tracto gastrointestinal.

55 Con respecto al ratón B, se observó peritonitis crónica de leve a moderada en el mesenterio y a lo largo de las superficies serosas del tracto intestinal delgado y grueso y el estómago, así como alrededor del páncreas. Se caracterizaba por infiltrados de macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas, junto con áreas de fibrosis.

Se observó hiperplasia mucosa leve en el íleon. Un ganglio linfático mesentérico situado cerca del páncreas era reactivo, tal como se ha descrito anteriormente. No se observaron lesiones en el parénquima pancreático. Se observó peritonitis leve alrededor de la vesícula biliar y a lo largo de la superficie capsular del riñón derecho. No se observaron otras lesiones en el hígado o los riñones. Se observó un engrosamiento capsular leve e hiperplasia mesotelial a lo largo del bazo. Había un aumento moderado de la eritropoyesis extramedular en la pulpa roja del bazo. No había lesiones significativas en el cerebro, corazón o pulmones.

Con respecto al ratón C, el examen de los pulmones reveló algunos pequeños focos de metástasis del tumor primario. Sin estar limitado por la teoría, el tumor primario parecía haber invadido el hueso, ya que se observaron pequeños fragmentos óseos dentro de la masa. No había lesiones significativas en el cerebro, corazón, hígado, riñón, bazo, páncreas o tracto gastrointestinal.

Con respecto al ratón D, se observó peritonitis crónica de mínima a leve a lo largo de la superficie serosa del estómago, el tracto intestinal y alrededor del páncreas, con células inflamatorias y áreas de fibrosis, tal como se ha descrito anteriormente. También se observaron focos de peritonitis a lo largo de las superficies capsulares del hígado y los riñones. No se observaron otras lesiones en el tracto gastrointestinal, el páncreas, el hígado y los riñones. En el bazo había un aumento moderado de la eritropoyesis extramedular. En el pulmón se observaron 2 pequeños focos de piogranuloma en un lóbulo pulmonar. Esto era de etiología desconocida; no se observó material extraño en asociación. La invasión tumoral en la musculatura lumbar era evidente. Las células tumorales también se acercaron estrechamente al cuerpo vertebral y rodearon un pequeño fragmento de hueso, sin estar limitados por la teoría, se supone que esto representa una apófisis espinosa dorsal del cuerpo vertebral. No había lesiones significativas en el cerebro o el corazón.

Con respecto al ratón E, en la grasa mesentérica había infiltrados de mínimos a leves de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células plasmáticas. Se observó un ganglio linfático levemente reactivo cerca del páncreas, tal como se ha descrito anteriormente. No se observaron lesiones significativas en el cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñones, páncreas, bazo o tracto gastrointestinal.

Con respecto al ratón F, se observó peritonitis crónica leve a lo largo de las superficies serosas del tracto intestinal y en el mesenterio que rodea el páncreas, tal como se ha descrito anteriormente. En un lóbulo pancreático se produjo pérdida de células acinares y reemplazo por macrófagos y fibroblastos, lo que presumiblemente representa una extensión de la reacción observada en el mesenterio. También se observó peritonitis leve en la cápsula y en el mesenterio que rodea los riñones. No se observaron otras lesiones en el tracto intestinal, el hígado o los riñones. En el bazo había un aumento moderado en la eritropoyesis y granulopoyesis extramedulares. No había lesiones graves en el cerebro, el corazón, los pulmones o el estómago.

Pruebas hematológicas

Una diferencia observada entre los animales tratados con el fármaco y los animales de control consistía en la presencia de peritonitis crónica de mínima a moderada a lo largo de las superficies serosas del tracto intestinal y los órganos abdominales y en el mesenterio que rodea el páncreas, observada en los animales tratados con el fármaco. En cambio, los animales de control mostraban infiltrados inflamatorios multifocales de mínimos a leves en el mesenterio, sin fibroplasia. Otros hallazgos incluían la elevación de ALT y AST observada en el ratón C. Sin estar limitado por la teoría, la etiología de este hallazgo no era clara. No había evidencia histológica de lesión hepatocelular, como podría esperarse. Sin estar limitado por la teoría, otras causas potenciales incluían hemólisis de la muestra de sangre o lesión ósea por invasión tumoral.

En el ratón C se produjo invasión tumoral en la musculatura lumbar, con fragmentación del hueso, sin estar limitado por la teoría, probablemente la de un proceso vertebral, así como metástasis pulmonar. En el ratón D se produjo invasión del tumor en la musculatura lumbar y fragmentación de la apófisis espinosa dorsal.

Tabla 2: Resultados del hemograma completo

ID	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	HGB (g/dl)	PCV (%)	MCV (u)	MCH (pg)	MCHC (%)	Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)
A-732	7,72	9,15	12,4	49,2	53,8	13,6	25,2	651
B-735	8,10	8,89	11,2	45,6	51,3	12,6	24,6	745
C-746	554	8,89	11,5	44,7	503	12,9	25,7	788
D-727	4,16	7,66	9,8	37,7	49,2	12,8	26,0	611

## ES 2 743 701 T3

ID	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	HGB (g/dl)	PCV (%)	MCV (u)	MCH (pg)	MCHC (%)	Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)
E-737	5,6S	8,67	10,7	39,3	45,3	12,3	27,2	749*
F-738	3,34	8,40	10,5	42,4	50,3	12,5	24,8	8B5

\* Se observó aglomeración leve de plaquetas.

Tabla 3: Resultados diferenciales

ID	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Bandas (%)	nRBC (%)
A-732	14	83	3	0	0	0	0
B-735	46	49	5	0	0	0	0
C-746	13	81	6	0	0	0	0
D-727	13	87	0	0	0	0	0
E-737	2	96	2	0	0	0	0
F-738	18	78	4	0	0	0	0

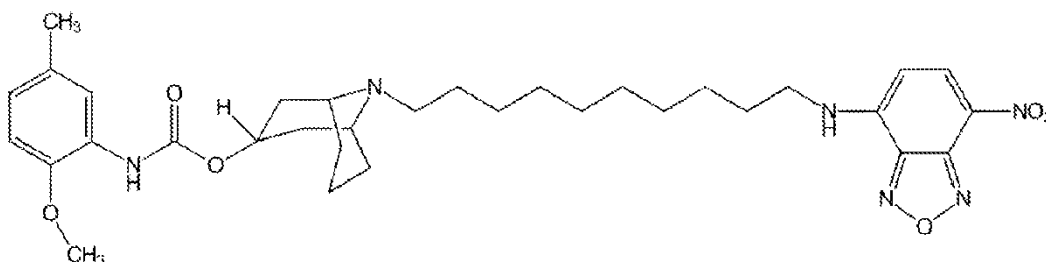
Tabla 4: Resultados de la química clínica

ID	BUN (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (u/l)	AST (u/l)	Glucosa (mg/dl)	Proteína Total (g/dl)
A-732	23	0,33	95	87	179	6,1
B-735	17	0,26	65	73	180	5,4
C-746	28	0,28	506	715	187	5,5
D-727	19	0,22	138	167	178	5,1
E-737	22	0,21	64	147	310	5,7
F-738	17	0,24	63	55	180	5,1

5

Propiedades de unión al receptor Sigma-2 de Compuesto SW V-49s

En estos experimentos se llevaron a cabo ensayos de unión competitiva de SW V-49s con el ligando sigma-2 marcado con fluorescencia SW120 de la estructura



En una placa de 6 pocillos se sembraron células AsPC-1 ( $5 \times 10^5$ /pocillo) durante 24 horas antes del tratamiento. Las células se incubaron después con 0, 10, 30 y 50  $\mu\text{M}$  de SW V-49s durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadieron 10 nM de ligando sigma-2 marcado con fluorescencia SW120 al medio de cultivo celular que contenía SW V-49s. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se cosecharon con tripsina EDTA al 0,05% (Life Technologies, Grand Island, NY). Posteriormente, las células se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos y los sedimentos se lavaron dos veces con PBS. La internalización de SW120 se determinó mediante citómetro de flujo (FACSCalibur™, BD Biosciences, San Jose, California).

La FIGURA 3 muestra una inhibición competitiva de la internalización de 10  $\mu\text{M}$  de SW 120 marcado con fluorescencia (Spitzer, D., et al. Cancer Res. 72: 201-209,2012) frente a SW V-49S en células Panc-1 humanas. Estos datos indican un bloqueo eficiente de la internalización de SW 120 con concentraciones crecientes de SW V-49s. Estos resultados indican que el SW V-49s se une eficientemente a los receptores sigma-2.

El SW V-49s muestra letalidad hacia líneas celulares de cáncer *in vitro*

En estos experimentos se realizaron ensayos de viabilidad después de 24 horas de tratamiento de líneas celulares de cáncer de páncreas humano y murino y líneas celulares de sarcoma sinovial con SW V-49s o sus compuestos precursores SV 119 y Erastin, tanto solos como en combinación. Los datos demuestran una concentración  $\text{IC}_{50}$  de 4,3  $\mu\text{M}$  en el caso del SW V-49s contra la línea celular de cáncer de páncreas humano Panc-1 (ATCC® CRL-1469™) (FIGURA 4A); una concentración  $\text{IC}_{50}$  de 2,3  $\mu\text{M}$  en el caso del SW V-49s contra la línea celular de cáncer de páncreas humano BxPC-3 (ATCC® CRL-1687™) (FIGURA 4B); una concentración  $\text{IC}_{50}$  de 2,3  $\mu\text{M}$  en el caso del SW V-49s contra la línea celular de cáncer de páncreas humano MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™) (FIGURA 4C); una concentración de  $\text{IC}_{50}$  de 3  $\mu\text{M}$  en el caso del SW V-49s contra la línea celular de cáncer de páncreas humano AsPC-1 (ATCC® CRL-1682™) (FIGURA 4D); y una concentración  $\text{IC}_{50}$  de 2,2  $\mu\text{M}$  en el caso del SW V-49s contra una línea celular de cáncer de páncreas murino (células KCKO) (FIGURA 4E). En comparación, el Erastin de forma individual mostraba una  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$  contra todas las líneas celulares de cáncer de páncreas humano y murino analizadas; el SV 119 de forma individual mostraba una  $\text{IC}_{50} > 54 \mu\text{M}$  contra todas las líneas celulares de cáncer de páncreas humano y murino analizadas; y la mezcla equimolar de Erastin y SV 119 mostraba una  $\text{IC}_{50} > 44 \mu\text{M}$  contra todas las líneas celulares de cáncer de páncreas humano y murino analizadas.

Las líneas celulares de sarcoma sinovial (FIGURA 4F, SYO-1, ME1 deficiente) son tan sensibles al SW V-49s que resultó difícil medir la concentración mínima de fármaco requerida para matar un 50% de las células cancerosas, pero la  $\text{IC}_{50}$  medida era de aproximadamente 1,0  $\mu\text{M}$ . En comparación, las  $\text{IC}_{50}$  para otros compuestos ensayados contra células de sarcoma sinovial fueron las siguientes: Erastin,  $> 16 \mu\text{M}$ ; SV119, 6,2  $\mu\text{M}$ ; Erastin + SV119, 4,9  $\mu\text{M}$ .

Estos datos indican que el SW V-49s es mucho más letal contra las células cancerosas, incluyendo las células de cáncer de páncreas humano y murino y las células de sarcoma sinovial, en comparación con sus compuestos precursores, ya sea individualmente o en combinación.

Doble funcionalidad del SW V-49s

En estos experimentos, los inventores investigaron si los compuestos de las presentes enseñanzas eran letales para las células de cáncer de páncreas al desencadenar una vía de muerte celular por apoptosis, una vía de muerte celular por ferroptosis o una combinación de las mismas. Por lo tanto, los inventores realizaron ensayos para la caspasa 3/7 como un indicador de muerte celular apoptótica, y ensayos para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como un indicador de muerte celular ferroptótica. Tal como se muestra en la FIGURA 5A, 24 h de tratamiento de células AsPC-1 con Erastin 50  $\mu\text{M}$ , SV 119 o una mezcla equimolar de Erastin más SV 119 condujo a una actividad de caspasa mucho menor en comparación con SW V-49s 4  $\mu\text{M}$ . En la FIGURA 5B se muestran los resultados de los ensayos con Caspase-Glo® (Promega) de células Aspc-1 tratadas con SW V-49s 8  $\mu\text{M}$ , Erastin 8  $\mu\text{M}$ , SV 119 8  $\mu\text{M}$  u 8  $\mu\text{M}$  de una mezcla equimolar de Erastin y SV 119, durante 7 horas. Las células tratadas con SW V-49s tuvieron un aumento significativo (aproximadamente 3 veces) en la actividad de caspasa 3/7 en comparación con todos los controles \* $p < 0,0001$ .

En la FIGURA 6 se muestran los resultados de los ensayos con especies reactivas de oxígeno (ROS) de Aspc-1 tratadas con 8  $\mu\text{M}$  SW V-49s 8  $\mu\text{M}$ , Erastin 8  $\mu\text{M}$ , SV 119 8  $\mu\text{M}$  u 8  $\mu\text{M}$  de una mezcla equimolar de Erastin y SV 119, o un control positivo durante 30 minutos. Las células tratadas con SW V-49s tuvieron un aumento significativo (50%)

en la caspasa ROS \*p < 0,0001 en comparación con Erastin, SV 119 o una combinación de los mismos, lo que concuerda con la muerte celular ferropoptótica. Los compuestos precursores SV 119 y Erastin, aplicados a células individualmente o en combinación, no tuvieron efecto a la misma concentración.

5 Sin estar limitado por la teoría, estos datos indican que el SW V-49s induce vías de muerte celular tanto apoptóticas como ferropoptóticas en células de cáncer de páncreas.

La administración de SW V-49s puede disminuir el tamaño del tumor pancreático *in vivo*

10 La FIGURA 7 ilustra los cambios en el volumen tumoral medio (en mm<sup>3</sup>) después de la administración al intervalo de ratones C57BL/6 con tumores pancreáticos de ratón KCKO subcutáneos, singénicos y establecidos durante un período de 10 días para SW V-49s, Erastin, SV119, una mezcla de Erastin y SV119, y un control de vehículo. El tratamiento con SW V-49s, pero ningún otro tratamiento, condujo a una disminución significativa en el volumen del tumor (p < 0,05). Estos tratamientos produjeron efectos mínimos fuera del objetivo. Véase en la FIGURA 7 la disminución en el volumen tumoral de aproximadamente 40 mm<sup>3</sup> hasta aproximadamente 20 mm<sup>3</sup> en ratones tratados con SW V 49s, en comparación con un aumento de aproximadamente 40 mm<sup>3</sup> hasta aproximadamente 140 mm<sup>3</sup> en el caso de otros tratamientos.

15 La administración de SW V-49s puede aumentar la supervivencia al cáncer de páncreas en un sistema modelo murino

En estos experimentos, en un estudio de supervivencia de los ratones presentado en el Ejemplo 9, el grupo que recibió SW V-49s sobrevivió en un 100% (FIGURA 8). En todos los demás grupos, la supervivencia media se agrupó en torno a los 18 días.

El SW V-49s induce la muerte celular en el cáncer de páncreas

20 La citotoxicidad de los fármacos se evaluó mediante CELLTITER-GLO®, ensayo de viabilidad celular luminiscente (Promega, Madison, WI). Las líneas celulares pancreáticas se colocaron en placas en una densidad de 2 x 10<sup>4</sup>/pocillo en placas blancas de 96 pocillos de fondo transparente durante 24 horas antes del tratamiento. Los fármacos se disolvieron en DMSO y se diluyeron en serie en medio de cultivo para alcanzar una concentración final de DMSO inferior al 1%. Después, las células se trataron durante 24 horas y se añadieron 100 µl del reactivo CELLTITER-GLO® a cada pocillo. Los contenidos de las placas se mezclaron usando un agitador orbital y posteriormente se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La señal de luminiscencia se midió usando un lector de microplacas multimodo (BioTek instruments, Winooski, VT). Se ensayaron diferentes concentraciones de fármaco por triplicado. Para evaluar la eficacia de los fármacos, se calcularon las IC<sub>50</sub> de los compuestos en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas derivadas de humanos y ratones *in vitro*. Las células se trataron durante 24 horas con SW V-49s, SV119, Erastin y una mezcla equimolar de SV119 y Erastin, luego se realizó el ensayo de viabilidad CELLTITER-GLO®. El Erastin fue el compuesto menos activo, con IC<sub>50</sub> > 150 µM. El SV 119 demostró una eficacia moderada, que se incrementó al agregar Erastin. Sin embargo, el SW V-49s mostró una citotoxicidad robusta con una reducción de la IC<sub>50</sub> de 17-20 veces mayor en comparación con el tratamiento con la mezcla equimolar de SV119 y Erastin (Tabla 4 y FIGURA 9). Estos resultados indican que el SW V49s se aporta selectivamente a las células de cáncer de páncreas.

35 Tabla 5: IC<sub>50</sub> (µM) de líneas celulares pancreáticas tratadas con diferentes compuestos durante 24 horas

Fármacos	Línea celular				
	PANC-1	BxPC-3	AsPC-1	MiaPaCa-2	KCKO
	IC <sub>50</sub> ±SEM	IC <sub>50</sub> ±SEM	IC <sub>50</sub> ±SEM	IC <sub>50</sub> ±SEM	IC <sub>50</sub> ±SEM
SW V-49s	4,1±0,2	2,5±0,1	3,2±0,3	3,0±0,3	2,4±0,2
SW119+Erastin	70±0,3	40,6±2,5	46,5±2,9	50,6±2,5	48,4±0,8
SV119	111,3±5,3	54,2±2,6	111,3±8,3	94,5±1,9	68,7±10,1
Erastin	>150	>150	>150	>150	>150

(Media ± SEM), n ≥ 3. P < 0,05

Dado que el Erastin no demostró ningún efecto en todas las líneas celulares pancreáticas, los inventores realizaron un experimento de control de calidad utilizando células SYO-1. Unas células AsPC-1 y SYO-1 se dispusieron en placas



de 96 pocillos a lo largo de la noche y después se trataron con concentraciones similares de Erastin durante 24 horas. El ensayo de viabilidad se realizó después de 24 horas. El tratamiento con Erastin 40  $\mu\text{M}$  resultó en la muerte de un 84% de las células SYO-1, en comparación con el 2% de las células AsPC-1, ( $p < 0,0001$ ), (FIGURA 10). Este experimento demuestra que el Erastin utilizado es bioactivo y las líneas celulares pancreáticas son resistentes al Erastin.

El SW V-49s inhibe la absorción de cistina y genera especies reactivas de oxígeno

En estos experimentos, el ensayo de absorción de cistina se realizó como se ha descrito anteriormente (Dixon, S. J. et al Cell 2012; 149: 1060-1072). Brevemente, en una placa de 6 pocillos se sembraron  $5 \times 10^5$  células AsPC-1/pocillo a lo largo de la noche. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces en tampón de absorción libre de  $\text{Na}^+$  precalentado (cloruro de colina 137 mM, KCl 3 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, D-glucosa 5 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,7 mM y HEPES 10 mM [pH 7,4]). Posteriormente, las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C en 1 ml del tampón de absorción para agotar los aminoácidos celulares. El tampón se reemplazó luego con 600  $\mu\text{l}$  de tampón de absorción que contenía 200  $\mu\text{M}$  de SW V-49s y 0,12  $\mu\text{Ci}$  (80-110 mCi/mmol) de L- [3,3'- $^{14}\text{C}$ ]-cistina (American Radiolabeled Chemicals, St Louis, MO) y se incubó durante 3 minutos a 37 °C. Después, las células se lavaron tres veces con tampón de absorción helado y se sometieron a lisis en 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 M. A este lisado se le añadió 1 ml de fluido de centelleo, y se obtuvieron recuentos radiactivos por minuto usando un contador de centelleo.

Se ha demostrado que el Erastin bloquea la captación de cistina al inhibir el antiportador de cistina/glutamato (sistema  $x_c^-$ ) que produce la muerte celular dependiente de ROS (Dixon et al Cell 2012: 149: 1060-1072). Para evaluar este mecanismo, las células AsPC-1 se dispusieron en placas de 6 pocillos durante 24 horas. Después, las células se trataron con la misma concentración de SV119, Erastin, combinación de SV 119 y Erastin, SW V-49s y DMSO como control. Después de ello se realizó un ensayo de absorción de cistina. Las células tratadas con SW V-49s demostraron una reducción de la absorción de cistina en un 85% (3,7 veces menos absorción de cisteína) en comparación con el 25%, 41% y 44% en las células tratadas con SV 119, Erastin y combinación de SV 119 y Erastin, respectivamente ( $p = 0,004$ , FIGURA 11A).

La medición de ROS se realizó utilizando el Total ROS/Superoxide Detection Kit (Enzo life sciences, Farmingdale, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, unas células AsPC-1 se sembraron en una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo transparente y pared negra durante 24 horas. Los compuestos se disolvieron en DMSO y se diluyeron en medio de cultivo para alcanzar una concentración final de DMSO inferior al 1%. Las células AsPC-1 se trataron con 8  $\mu\text{M}$  de SV119, Erastin y una mezcla equimolar de SV119 y Erastin. El ensayo ROS se realizó una hora después del tratamiento. Las células se trataron durante una hora, luego se retiraron los medios y se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de ROS/Superoxide Detection Mix. La señal de fluorescencia se midió usando un lector de microplacas multimodo (Bio-Tek, Winooski, VT). El ensayo se realizó en 6 replicaciones.

El nivel de ROS de las células tratadas con SW V-49s era 1,5 veces mayor en comparación con otros. No se produjo aumento en el nivel de ROS en las células tratadas con SV 119, Erastin y la mezcla equimolar de SV119 y Erastin en esa concentración (FIGURA 11B,  $p < 0,0001$ ).

El compuesto SW V-49s puede inducir la vía apoptótica intrínseca

En estos experimentos se midieron las actividades de caspasa-3/7, 8 y 9 en células AsPC-1 usando el ensayo CASPASE-GLO® correspondiente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Este ensayo se basa en un sustrato específico de caspasa, que se escinde para liberar aminoluciferina, un sustrato de luciferasa que produce señales de luminiscencia específicas de caspasa. Las células se sembraron en una densidad de  $2 \times 10^4$  en placas blancas de 96 pocillos de fondo transparente durante 24 horas antes del tratamiento con 4  $\mu\text{M}$  de compuestos. Los contenidos se mezclaron después usando un agitador de placas durante 30 segundos, luego se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. La señal de luminiscencia se midió usando un lector de microplacas multimodo (BioTek). El ensayo se realizó por triplicado, y la actividad caspasa de DMSO se consideró como una línea de base.

Los presentes inventores han demostrado que el SV119 induce apoptosis dependiente de caspasa-3 (Kashiwagi, H., et al. Mol Cancer 2007; 6:48). En estos experimentos, las células AsPC-1 se trataron con 4  $\mu\text{M}$  de SW V-49s, SV119, Erastin y una mezcla equimolar de SV119 y Erastin durante 24 horas. Usando los ensayos CASPASE-GLO® se midió el nivel de caspasa-3 para evaluar la actividad del dominio SW119 del compuesto SW V-49s y se midieron los niveles de caspasa-8 y 9 para identificar qué vía apoptótica estaba involucrada. Las células tratadas con SW V-49s tuvieron un aumento significativo de caspasa-3 y 9 (3,4 y 3,2 veces por encima de la línea de base, respectivamente,  $***p < 0,001$ , Figura 12A y Figura 12B, respectivamente). En cambio, no se produjo ningún aumento significativo de la caspasa 8,  $ns > 0,5$  (FIGURA 12C). Otros compuestos ensayados no activaron ninguna de las caspasas en una concentración similar (FIGURA 12A-C). Estos resultados sugieren que el SW V-49s se puede aportar selectivamente a las células cancerosas y sus dos dominios pueden funcionar de forma sinérgica para activar la vía apoptótica intrínseca.

El SW V-49s puede inducir muerte celular apoptótica y dependiente de ROS

Los presentes inventores han demostrado que el SW V-49s puede inducir apoptosis y generación de ROS. Para evaluar las funciones de estos dos mecanismos en la inducción de la muerte celular se ensayaron los efectos del inhibidor de la pan-caspasa y el antioxidante sobre la eficacia del SW V-49s. En estos experimentos, las células AsPC-1 se trataron previamente con 10 mM del antioxidante N acetil cisteína (NAC), 20 µM del inhibidor de pan-caspasa ZVAD, y DMSO como control durante 1 hora. Después, los 3 grupos fueron tratados con 10 µM de SW V-49s durante 5 horas, tras lo cual se realizó un ensayo de viabilidad CELLTITER-GLO®. Los resultados indicaban que la viabilidad de las células tratadas con SW V-49s de forma individual se redujo al 39% en comparación con el 63% y el 91% en las células previamente tratadas con NAC y ZVAD, respectivamente (Figura 13,  $p < 0,0001$ ). Se descubrió que la NAC es más eficaz para inhibir la actividad del SW V-49s (Figura 13,  $p < 0,002$ ). Estos datos demuestran la doble funcionalidad del SW V-49s e indican que puede inducir la muerte celular tanto apoptótica como dependiente de ROS.

El SW V-49s reduce el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia en modelos de xenoinjerto derivados de ratón y paciente de cáncer pancreático

Los estudios en animales se realizaron de acuerdo con el protocolo de estudios en animales aprobado por Washington University Institutional Animal Care Facility. Se realizaron estudios *in vivo* con ratones para comparar los efectos de SW V-49s, SV119, Erastin, una combinación de SV119 con Erastin, y vehículo. El vehículo utilizado en los estudios *in vivo* es una mezcla de un 25% de Cremophor y un 75% de H2O. A unos ratones C57BL/6 (6 semanas de edad, National Cancer Institute Laboratories) se les inyectaron en el costado derecho 200 µl de suspensión celular simple de células KCKO en medio RPMI ( $25 \times 10^4/10^5$  células por ratón). Los ratones fueron asignados a cuatro grupos ( $n = 15$ ) de forma aleatoria. El tratamiento se inició cuando el diámetro medio del tumor era de ~ 5 mm. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales diarias con 375 nmoles en 100 µl/dosis de SW V-49s y vehículo durante 10 días SV119, Erastin, mezcla equimolar de SV 119 y Erastin. Los tumores se midieron cada dos días con un calibrador digital. Varios ratones de diferentes grupos de tratamiento fueron enviados a la Division of Comparative Medicine de nuestra institución para una evaluación patológica. Se recogió sangre para un hemograma completo (CBC) y un análisis bioquímico (AST, ALT, BUN, bilirrubina total y Cr). Los órganos fueron examinados en bruto e histológicamente.

En el modelo de cáncer singénico (KCKO en C57BL/6), solo el SW V-49s fue capaz de reducir el volumen tumoral medio (FIGURA 14A,  $p = 0,0003$ ). Ninguno de los otros reactivos solos o en combinación dio como resultado una reducción del crecimiento tumoral, y todos presentaban tasas de crecimiento similares a la del vehículo (control), (FIGURA 14A,  $p = 0,9$ ). La supervivencia media en el grupo tratado con SW V49s fue de 48 días en comparación con (18-21) días en los otros grupos (FIGURA 14B, curva de supervivencia de Kaplan-Meier,  $p < 0,001$ ). Se ha de destacar que no se registraron anomalías graves en el comportamiento de los ratones (limpieza) ni ninguna muerte relacionada con el fármaco. Esto fue respaldado por los laboratorios de suero sin cambios (CBC, AST, ALT, BUN, bilirrubina total y Cr) (tablas 5 y 6). Además, los análisis de órganos (cerebro, corazón, pulmones, tracto alimentario, riñones, hígado y páncreas) no revelaron ningún signo obvio de efectos adversos del fármaco, excepto una peritonitis leve.

Tabla 6: El SW V-49s no induce cambios en la citología de la sangre (CBC) después de tratamiento de ratones C57BL/6

ID	WBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )	RBC ( $10^6/\mu\text{l}$ )	HGB (g/dl)	PCV (%)	MCV (u)	MCH (pg)	VCHC (%)	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ )
Control 1	7,72	9,15	12,4	49,2	53,8	13,6	25,2	651
Control 2	8,10	8,89	11,2	45,6	51,3	12,6	24,6	745
Control 3	5,54	8,89	11,5	44,7	50,3	12,9	25,7	788
Fármaco 1	4,16	7,66	9,8	37,7	49,2	12,8	26,0	611
Fármaco 2	5,68	8,67	10,7	39,3	45,3	12,3	27,2	749
Fármaco 3	3,34	8,40	10,5	42,4	50,5	12,5	24,8	885

La Tabla 6 contiene datos de CBC de ratones C57BL/6 tratados con SW V-49s y vehículo (control) durante 10 días. Las diferencias en los recuentos celulares entre los 2 grupos no son estadísticamente significativas.

Tabla 7: El SW V-49s no induce cambios en la química del suero después del tratamiento de ratones C57BL/6 portadores de tumores

ID	BUN (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	ALT ( $\mu$ /L)	AST ( $\mu$ /L)	Glucosa (mg/dL)	Proteína total (g/dL)
Control 1	23	0,33	95	87	179	6,1
Control 2	17	0,26	65	73	180	5,4
Control 3	28	0,28	506	715	187	5,5
Fármaco 1	19	0,22	138	167	178	5,1
Fármaco 2	22	0,21	64	147	310	5,7
Fármaco 3	17	0,24	63	55	180	5,1

5 La Tabla 7 muestra el análisis bioquímico de ratones C57BL/6 tratados con SW IV-134 y vehículo (control) durante 10 días. Las diferencias en los valores de laboratorio entre los 2 grupos no son estadísticamente significativas.

10 El SW V-49s también se ensayó en un modelo de xenoinjerto de ratón derivado del paciente PDAC, que es más relevante clínicamente. Se obtuvieron muestras quirúrgicas de PDAC (piezas de 2 x 2 mm) y se implantaron por vía subcutánea en los flancos de ratones NOD SCID anestesiados. Luego, se extrajeron e implantaron tumores en el costado derecho de ratones atímicos hembra desnudos (6 semanas de edad, National Cancer Institute Laboratories). Estos ratones fueron tratados con inyecciones intraperitoneales diarias de SW IV-134 y vehículo durante 14 días. Los ratones se distribuyeron en 2 grupos (n = 15) de forma aleatoria. El tratamiento farmacológico se inició cuando el diámetro medio de los tumores era de ~ 6 mm. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales diarias con 375 nmoles en 100  $\mu$ l/ratón de SW V-49s y vehículo durante 2 semanas. Los tumores se midieron cada dos días. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 2 cm o se ulceraron.

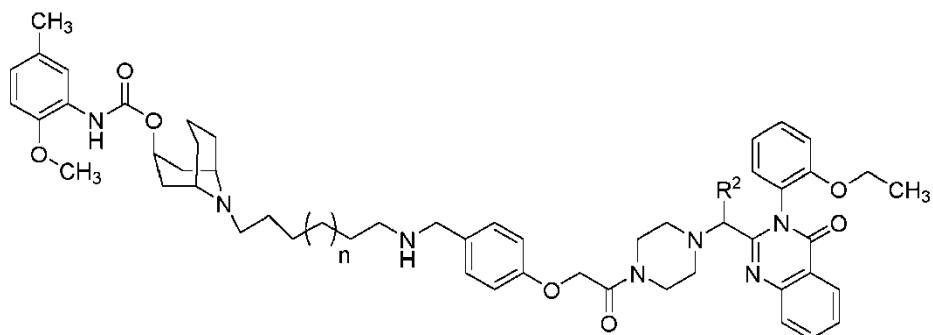
15 En este modelo, el SW V-49s redujo notablemente la tasa de crecimiento de los tumores establecidos (FIGURA 14C,  $p < 0,0001$ ). La supervivencia media para el grupo tratado con SW V-49s fue de 58 días en comparación con 33 días para el grupo de vehículo (FIGURA 14D, curva de supervivencia de Kaplan-Meier,  $p = 0,0002$ ). Los ratones toleraron bien el tratamiento sin efectos obvios fuera del objetivo.

20 También se trataron xenoinjertos de sarcoma sinovial (SS) SYO-1 con 300 nmoles de SW V-49. Se observó inhibición del crecimiento en un modelo de SS de crecimiento rápido. La FIGURA 14E representa xenoinjerto atímico de ratones desnudos de la línea celular SS SYO-1 tratados con SW V-49 (300 nmoles) durante 14 días y después se siguió,  $p < 0,0001$ . Los xenoinjertos SYO requirieron una dosis menor de SW V-49 para lograr resultados similares a los logrados contra PDAC. Estos resultados demuestran la alta eficacia del SW V-49s tanto en el cáncer de páncreas como en el sarcoma sinovial e indican su aportación selectiva.

25

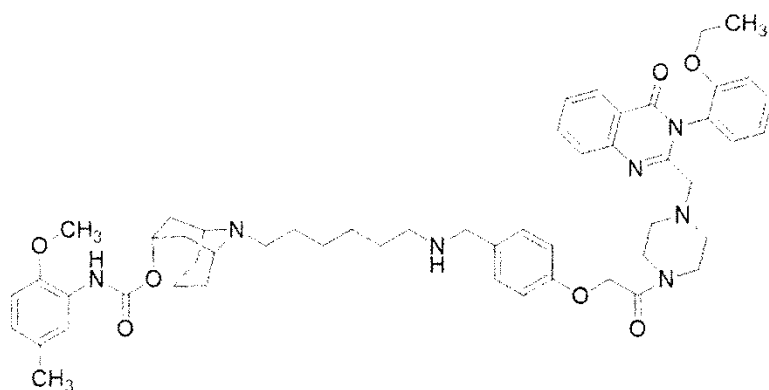
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o una sal del mismo, de la estructura



en donde n es un número entero de 1 a 5 y R<sup>2</sup> es H o metilo.

- 5 2. Un compuesto o una sal del mismo según la reivindicación 1, en donde n = 1 y R<sup>2</sup> es H.  
 3. Un compuesto o una sal del mismo según la reivindicación 1, en donde n = 5 y R<sup>2</sup> es H.  
 4. Un compuesto o una sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la sal es una sal de oxalato.  
 5. Un compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula estructural SW V-49:



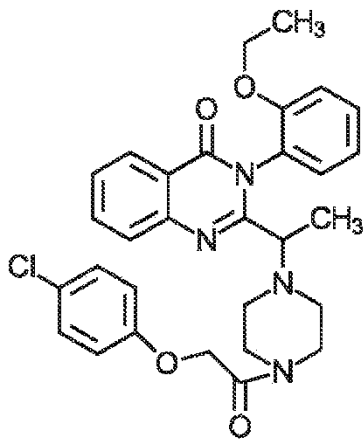
(SW V-49)

- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

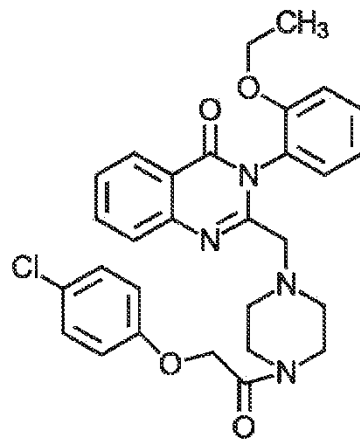
6. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizarlo en el tratamiento del cáncer.  
 7. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para utilizarlo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el cáncer es un cáncer de páncreas.  
 15 8. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para utilizarlo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el cáncer es un sarcoma sinovial.  
 9. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.  
 20 10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 9 para utilizarla en el tratamiento de un cáncer.  
 11. Una composición farmacéutica para utilizarla según la reivindicación 10, en donde el cáncer es un cáncer de páncreas.  
 12. Una composición farmacéutica para utilizarla según la reivindicación 10, en donde el cáncer es un sarcoma sinovial.

FIG. 1

Técnica anterior



Erastin



Des-metil erastin  
SW V-27

FIG. 2A

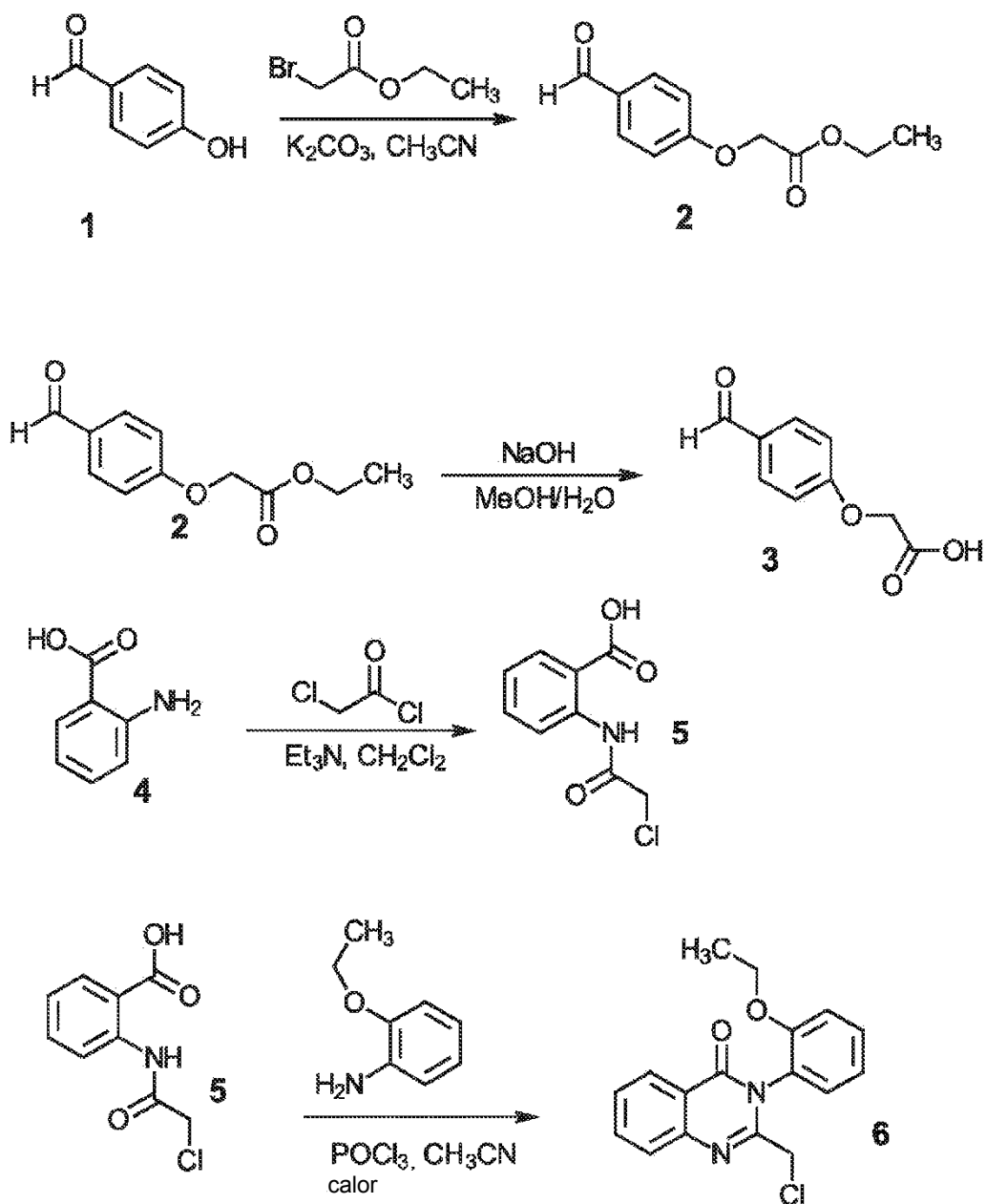


FIG. 2B

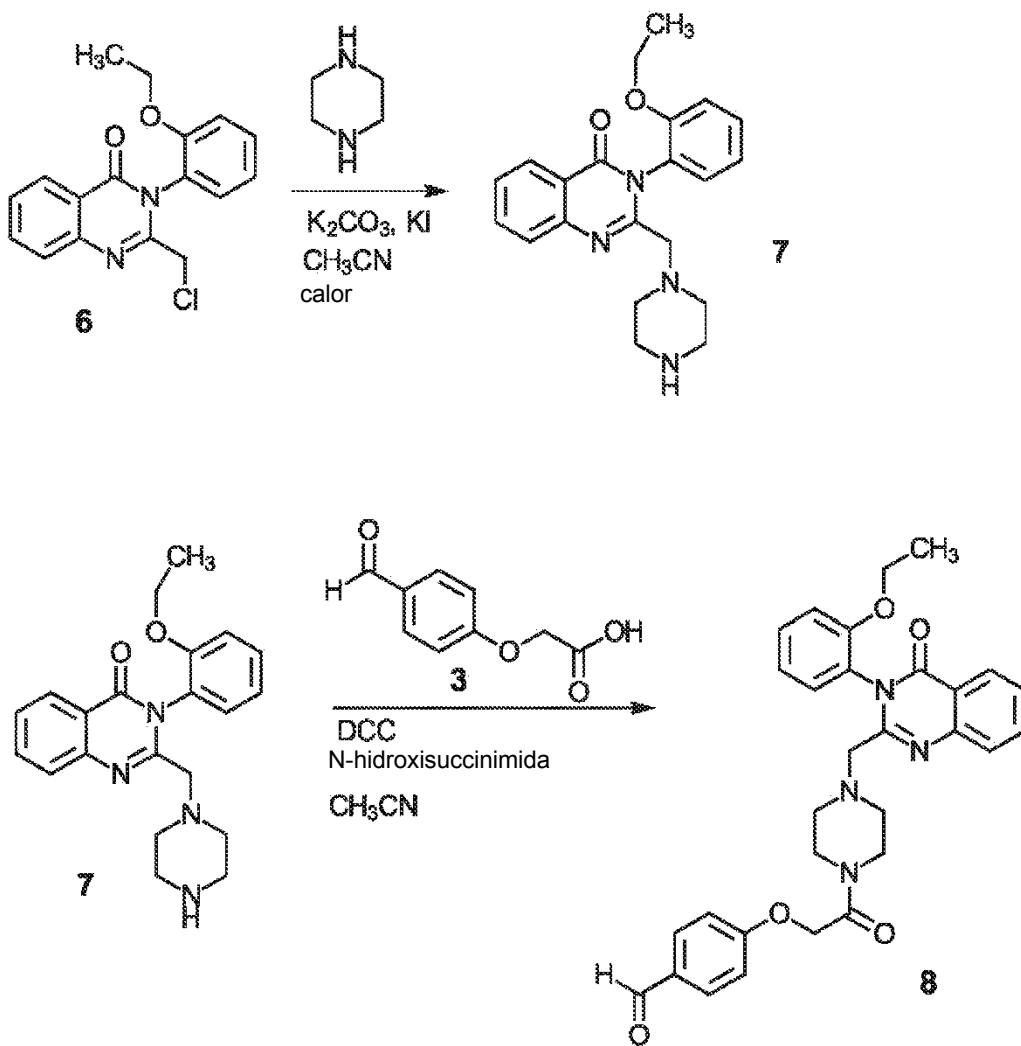


FIG. 2C

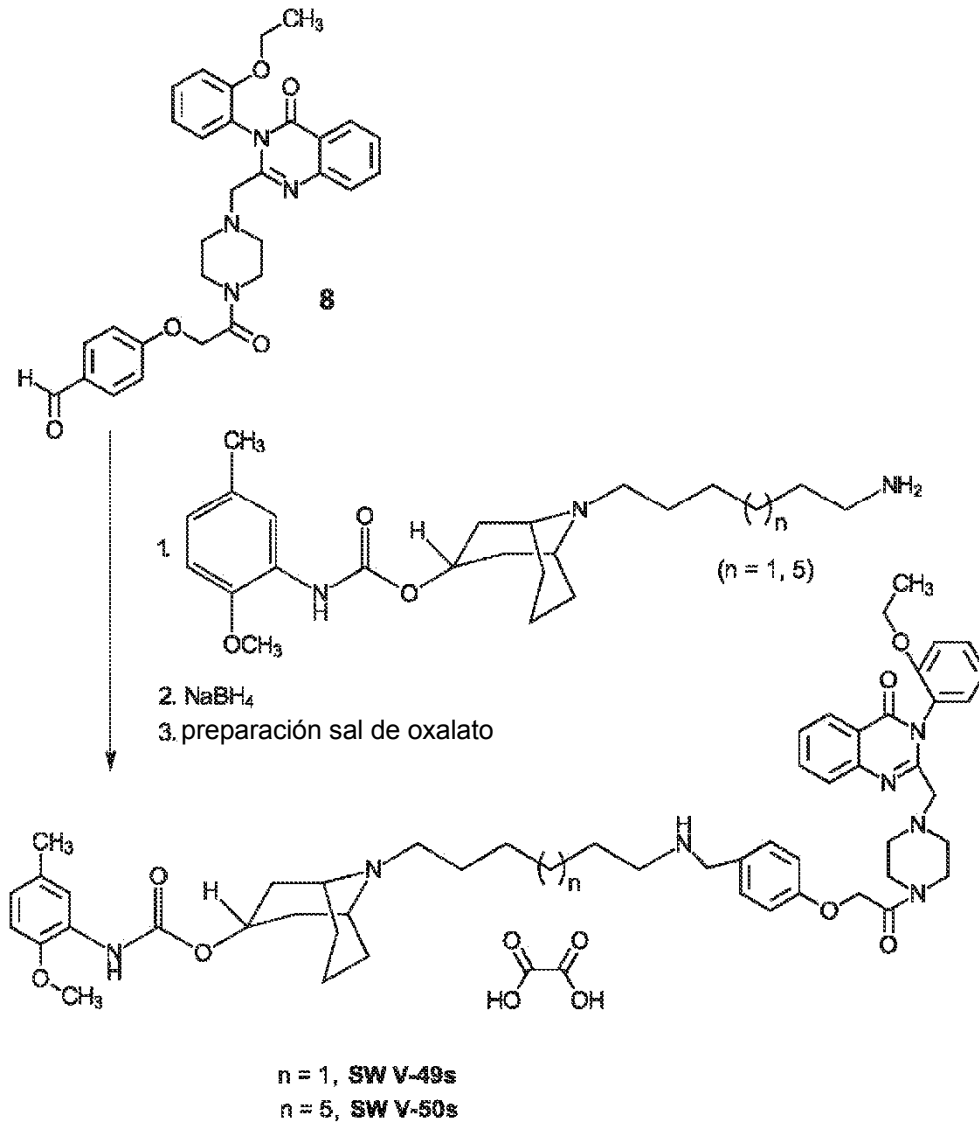




FIG. 3

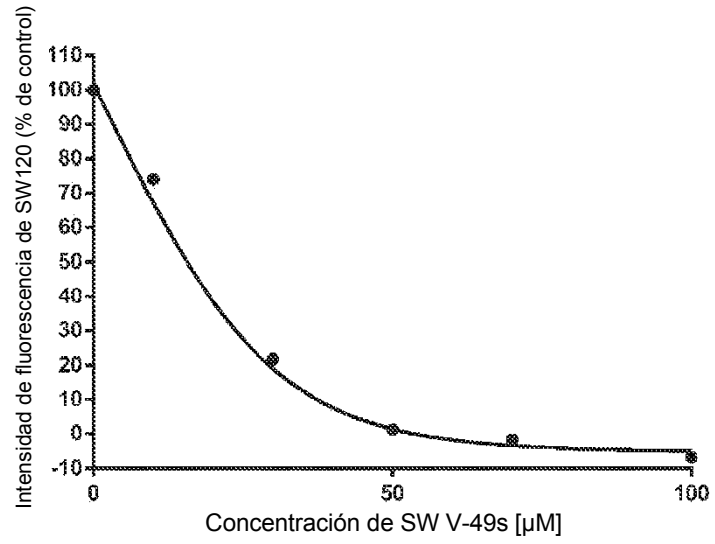


FIG. 4A

IC 50 Pnac-1, 20 K/pocillo, placa de 96 pocillos  
tratada con SW-V-49s y controles

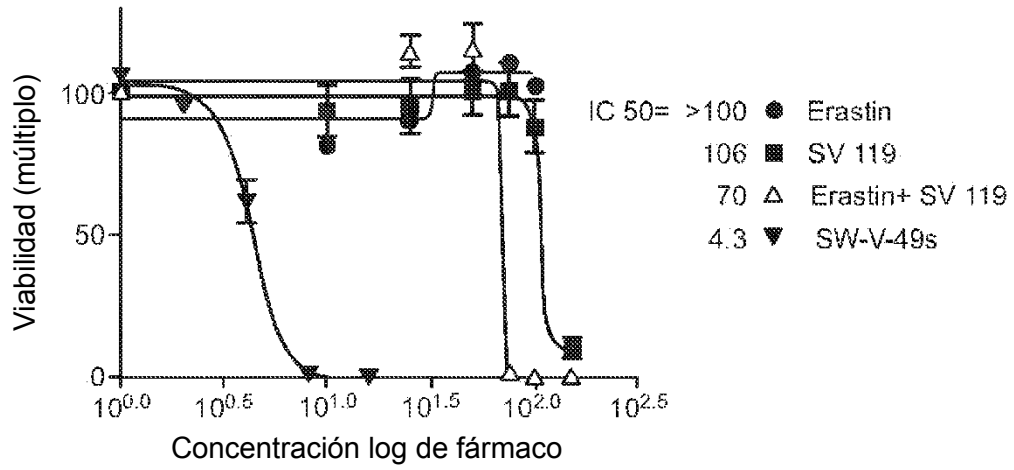


FIG. 4B

IC 50 BCPX 3, 20 K/pocillo, placa de 96 pocillos  
tratada con SW-V-49s y controles

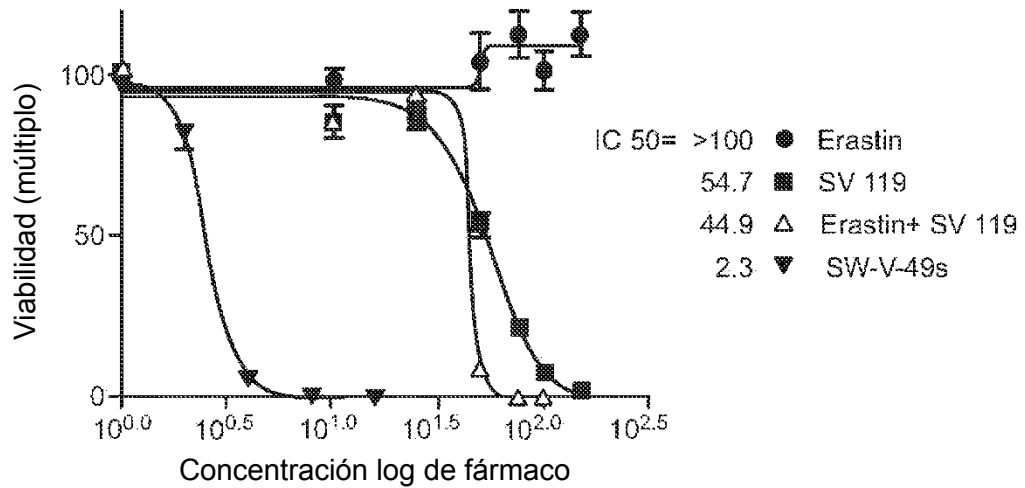


FIG. 4C

IC 50 MIA paca-2 3 20 K/pocillo, placa de 96 pocillos  
tratada con SW-V-49s y controles

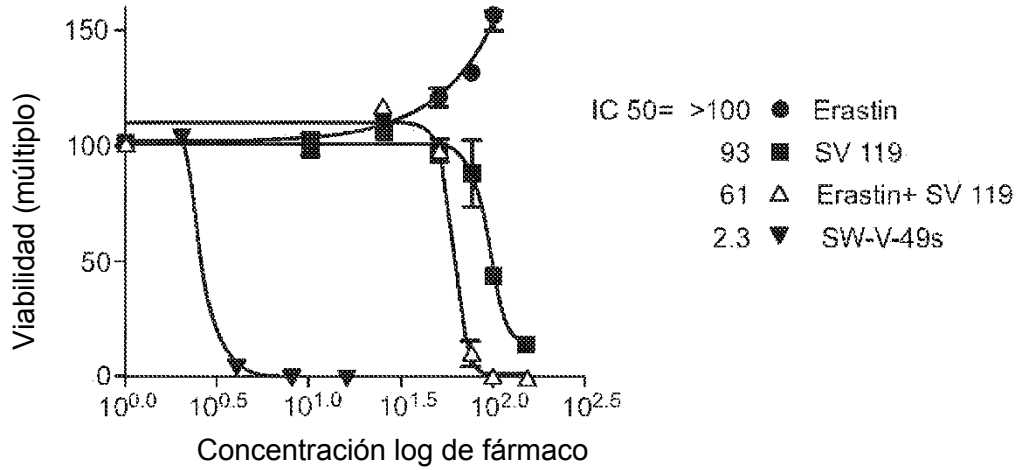


FIG. 4D

IC 50 células ASPC-1 24 horas de tratamiento con SW-V-49s y  
controles

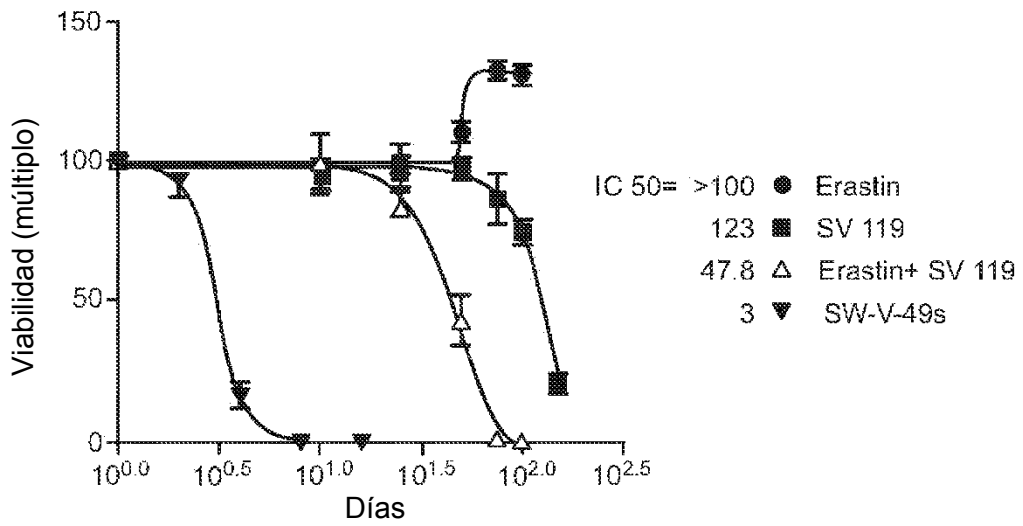


FIG. 4E

IC 50 de KCKO, 15 K células/pocillo, placa de 96 pocillos 24 horas de tratamiento con SW-V-49s y controles

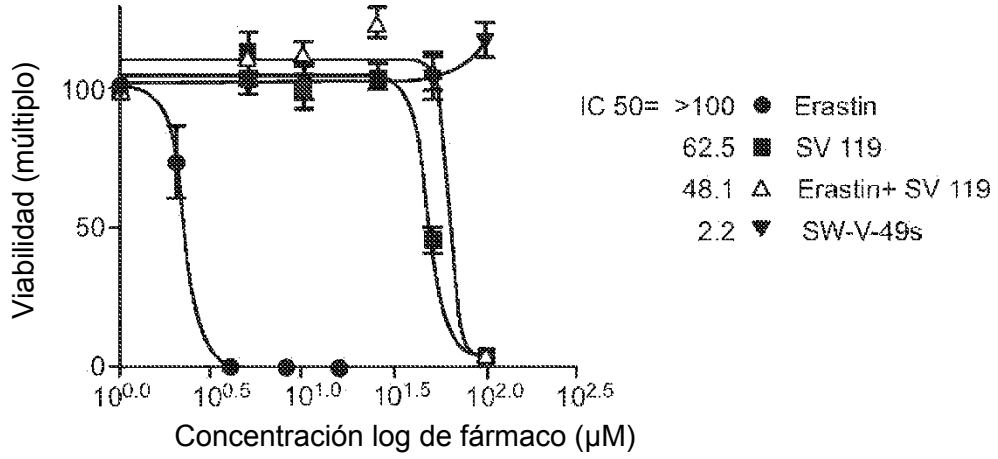


FIG. 4F

Letalidad de SW-V-49s en células SYO (demasiado potente para medir LC-50 con precisión)

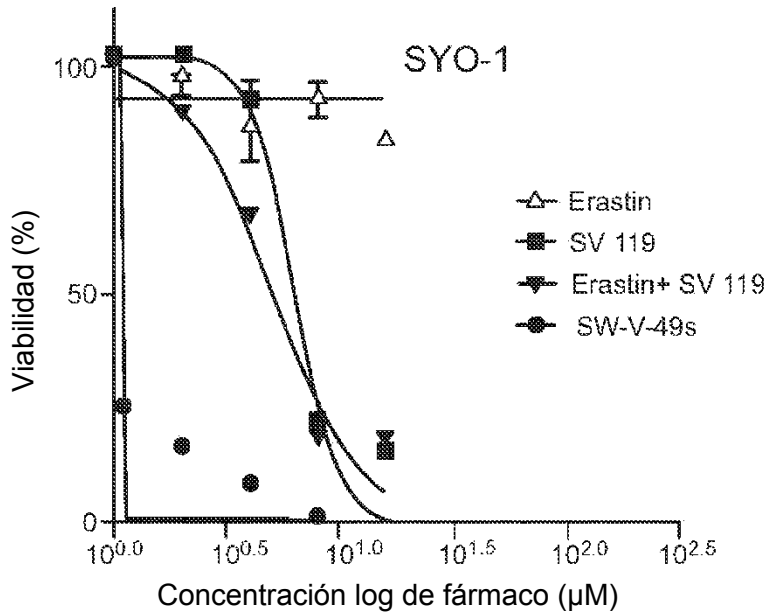


FIG. 5A

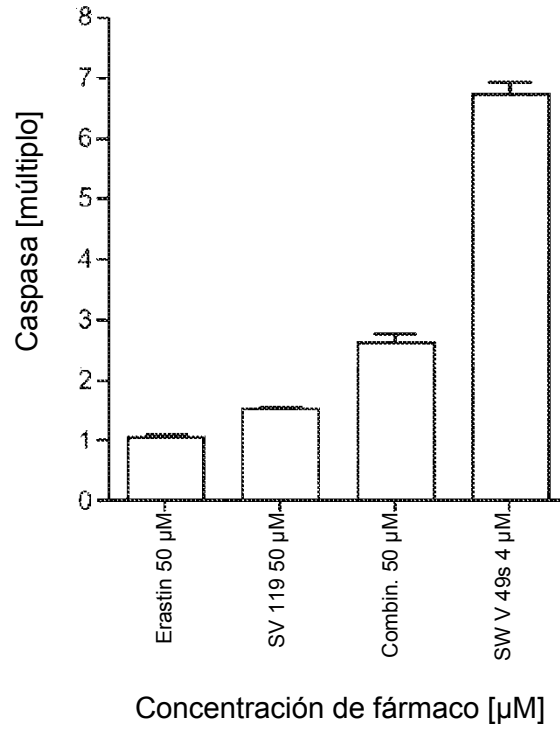


FIG. 5B

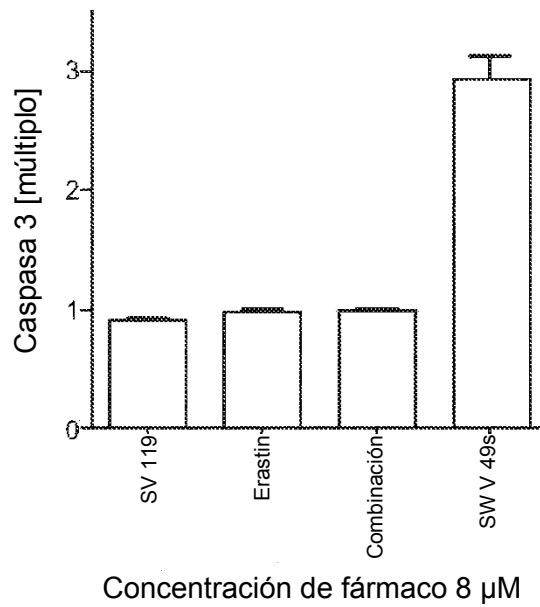


FIG. 6

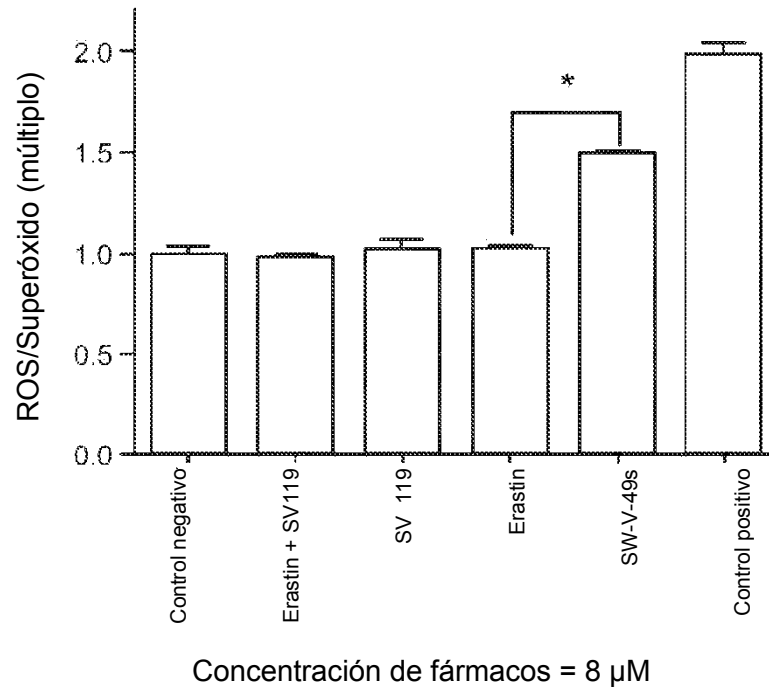


FIG. 7

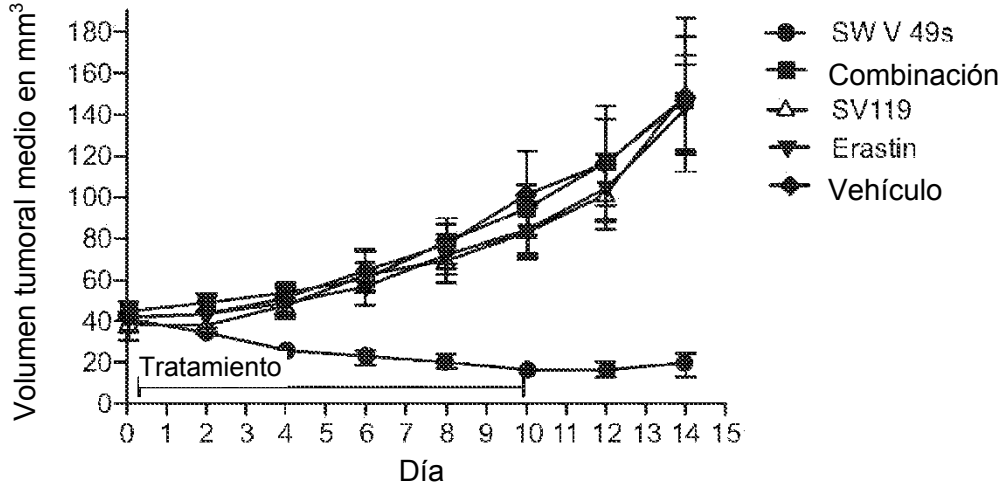


FIG. 8

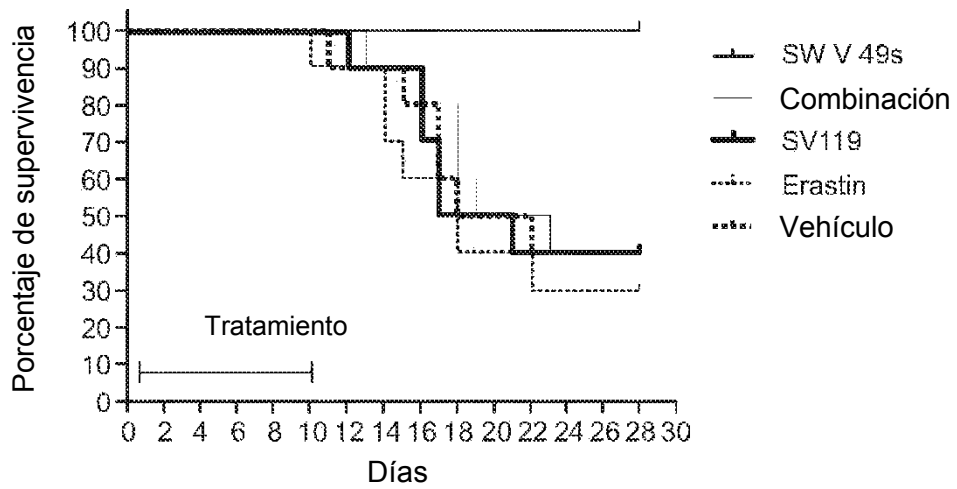


FIG. 9

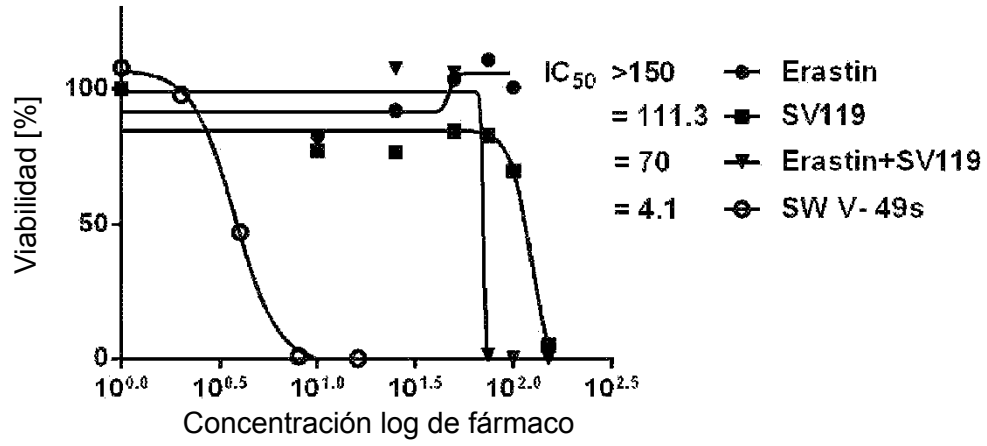


FIG. 10

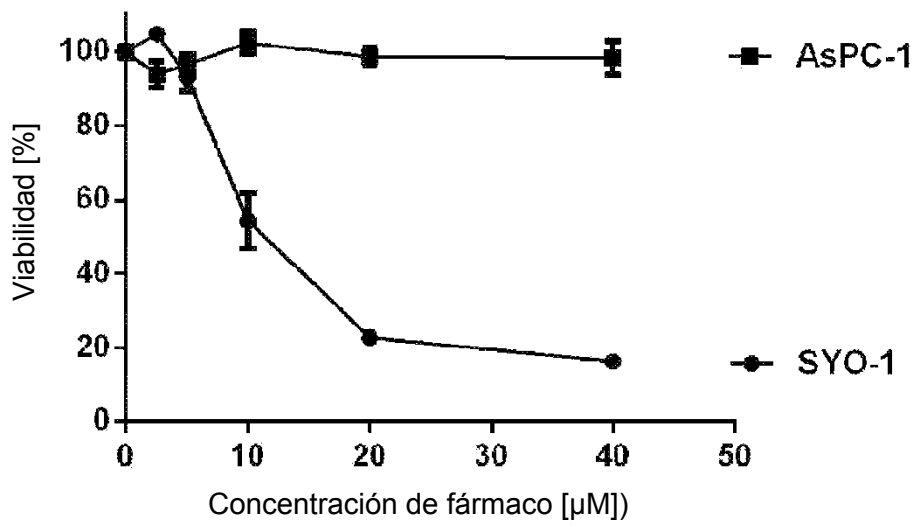




FIG. 11A

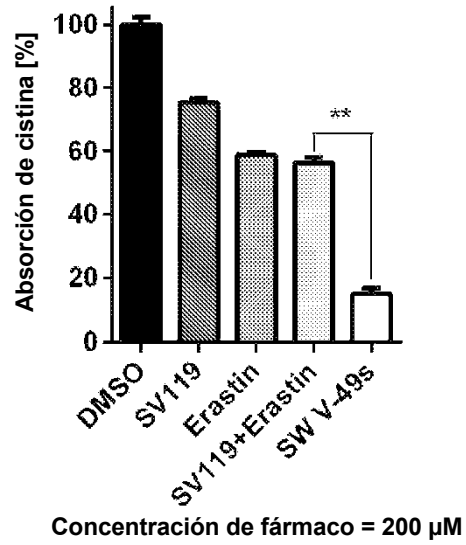


FIG. 11B

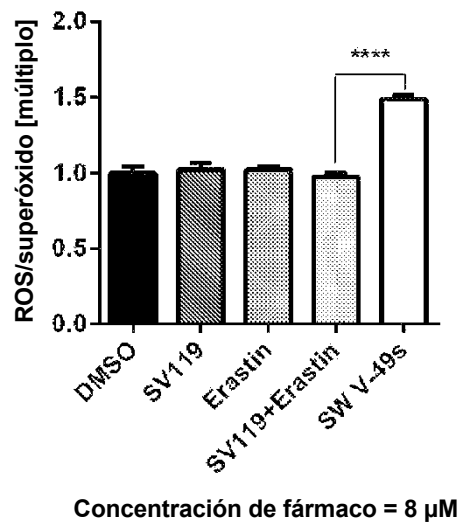


FIG. 12A

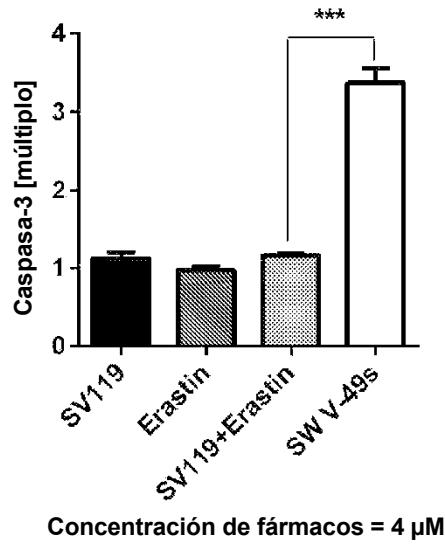


FIG. 12B

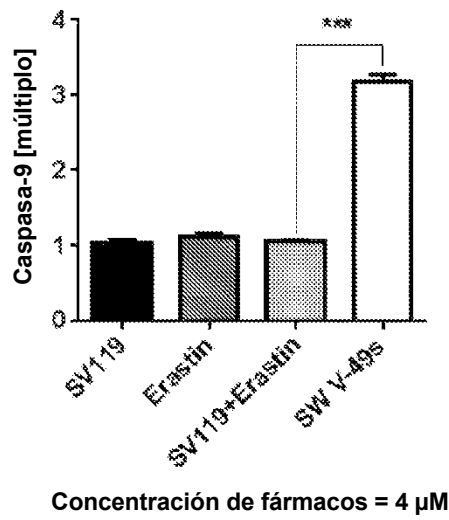


FIG. 12C

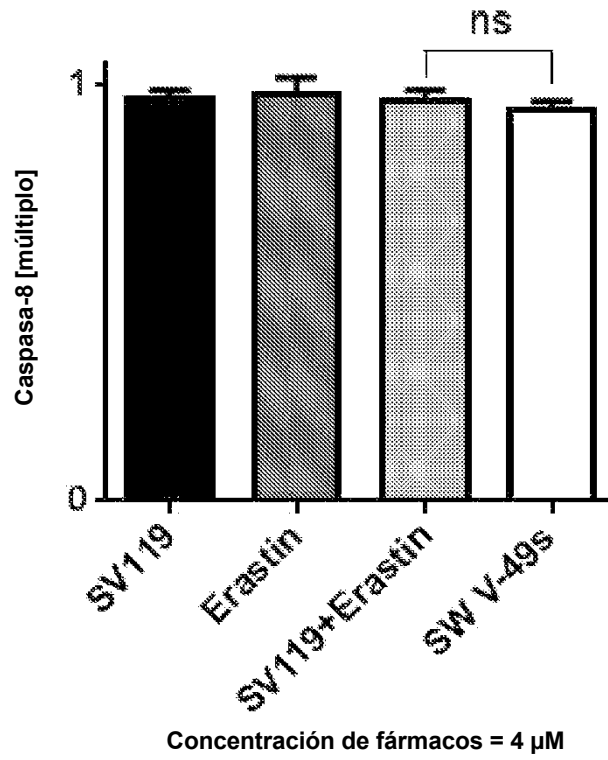


FIG. 13

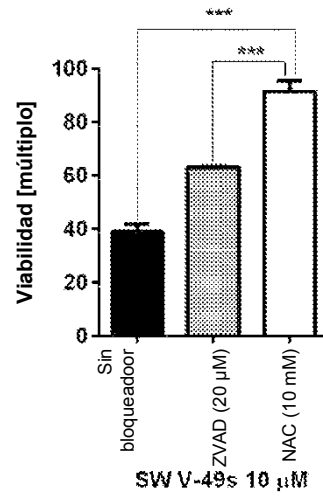


FIG. 14A

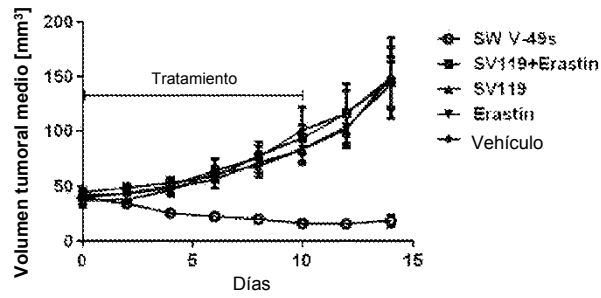


FIG. 14B

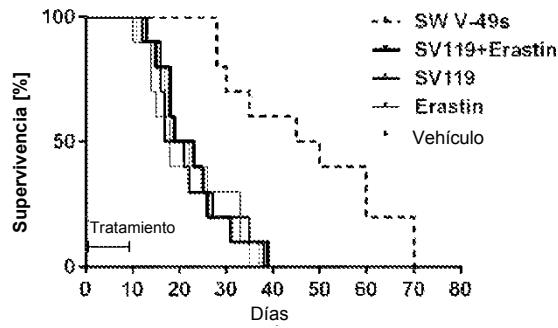


FIG. 14C

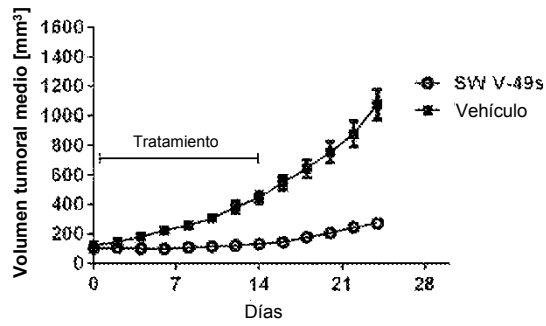


FIG. 14D

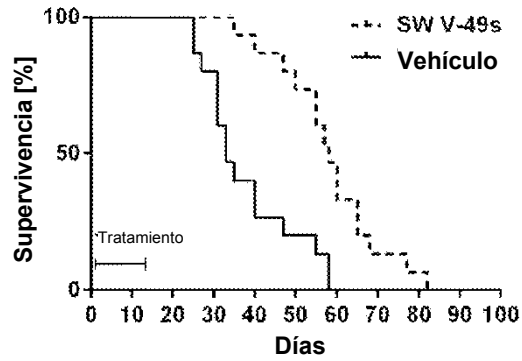


FIG. 14E

