

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 255**

51 Int. Cl.:

C07C 237/22 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07C 233/32 (2006.01)
C07C 323/41 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2010 PCT/CA2010/001199**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11022805**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10811047 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2470499**

54 Título: **Derivados de colchicina novedosos, métodos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

26.08.2009 US 237142 P
04.09.2009 US 240132 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2020

73 Titular/es:

ALBERTA HEALTH SERVICES (100.0%)
14th floor North Tower, 10030-107 Street
Edmonton, Alberta T5J 3E4, CA

72 Inventor/es:

TUSZYNSKI, JACK;
MANE, JONATHAN Y. y
HUZIL, JOHN TORIN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 745 255 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de colchicina novedosos, métodos y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a derivados de colchicina, a métodos y a usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La medicina molecular dirigida es un enfoque de investigación emocionante, que tiene como objetivo desarrollar fármacos y terapias de tratamiento más seguros y eficaces. La proteína estructural tubulina es una diana atractiva para tales investigaciones, ya que se sabe que interacciona con algunos de los fármacos para quimioterapia más exitosos, incluyendo los taxanos, alcaloides de la vinca, epotilonas y dolastatinas (Bai R. *et al.*, *Biochem Pharmacol.* 1990; 39: 1941-9; Schiff P.B. *et al.*, *Nature*, 1979: 277: 665-7; Owellen R.J. *et al.*, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1972; 47: 685-91; y Bollag D.M. *et al.*, *Cancer Res.* 1995: 55: 2325-33) Desafortunadamente, aunque muchos de estos fármacos son clínicamente de valor incalculable, muchos pueden afectar indiscriminadamente a las células cancerosas y no cancerosas. Es esta naturaleza de muchos agentes para quimioterapia la que produce los efectos secundarios no deseados asociados con estos tratamientos.

20 La falta de especificidad plantea actualmente uno de los mayores desafíos en la quimioterapia contra el cáncer. Sin embargo, la expresión de varios isotipos de β -tubulina proporciona una plataforma única para desarrollar fármacos con mayor especificidad solo para aquellos isotipos expresados principalmente en células cancerosas (Lu Q. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 2041-7; Luduena R.F., *Int. Rev. Cytol.* 1998; 178: 207-75; y Roach M.C. *et al.*, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1998; 39: 273-85). Los fármacos anti-tubulina disponibles actualmente parecen unirse a múltiples isotipos de β -tubulina, mostrando una preferencia limitada por uno con respecto a otro (Khan I.A. *et al.*, *Invest. New Drugs.* 2003; 21: 3-13; Banerjee A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 13335-9; Schwarz P.M. *Drug Development Research.* 2002; 55: 91-6; Luduena R.F. *et al.*, *Biochem.* 1995; 34: 15751-9). Por ejemplo, la vinblastina aparentemente se une con mayor afinidad al isotipo de tubulina β II (Khan I.A. *et al.*, *Invest. New Drugs.* 2003; 21: 3-13), mientras que la expresión del isotipo de tubulina β III se ha correlacionado con la resistencia a agentes anti-tubulina (Katsetos C.D. *et al.*, *J. Child Neurol.* 2003; 18: 851-66: discusión 867). Aún no se ha propuesto una explicación precisa para la expresión de isotipos. Sin embargo, resulta evidente que las células cancerosas expresan una amplia gama de isotipos de tubulina, no simplemente los presentes en las células de las que se derivan (Katsetos C.D. *et al.*, *Arch. Pathol. Lab Med.* 2000; 124: 535-44; y Scott C.A., *et al.*, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990; 116: 583-9). Un fármaco para quimioterapia seleccionado para seleccionar como diana un isotipo de tubulina expresado en células cancerosas podría minimizar o eliminar potencialmente el daño a las células no cancerosas.

35 Varias estructuras de los complejos anticancerígenos fármaco-tubulina se han determinado cristalográficamente y se han postulado los mecanismos de acción antimitótica de los fármacos (Ravelli R.B. *et al.*, *Nature.* 2004; 428: 198-202; Gigant B. *et al.*, *Nature.* 2005; 435: 519-22; Nogales E. *et al.*, *Nature.* 1995; 375: 424-7) La colchicina tiene una actividad antimitótica extremadamente fuerte, que solo se observa a niveles tóxicos o casi tóxicos, lo que limita su uso como tratamiento contra el cáncer.

45 La colchicina se ha usado ampliamente en enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, y se notificaron efectos beneficiosos en el tratamiento de la artritis psoriásica (P. Seidemann, B. Fjellner, A. Johannesson, *J. Rheumatol.* 14 (1987) 777-779) y vasculitis leucocitoclástica (J.P. Callen, *J. Am. Acad. Dermatol.* 13 (1987) 193-200) Además, algunos estudios recientes han demostrado que la colchicina inhibe la adhesión de células endoteliales y leucocitos (S.J. Rosenman, A.A. Ganji, W.M. Gallatin, *F.A.S.E.B. J.* 5 (1991) 1603-1609) y activación de células T (Y.A. Mekory, D. Baram, A. Goldberg, A. Klajman, *Cell. Immunol.* 120 (1989) 330-340) al unirse a monómeros de tubulina intracelulares, lo que impide su polimerización (G.O. Borisy, E.W. Taylor, *J. Cell. Biol.* 34 (1967) 533-548). Por tanto, la colchicina tiene el potencial de alterar el proceso de reconocimiento de antígenos y puede inhibir el crecimiento de células cancerosas. Sin embargo, la colchicina antimitótica se usa solo en investigaciones debido a su toxicidad.

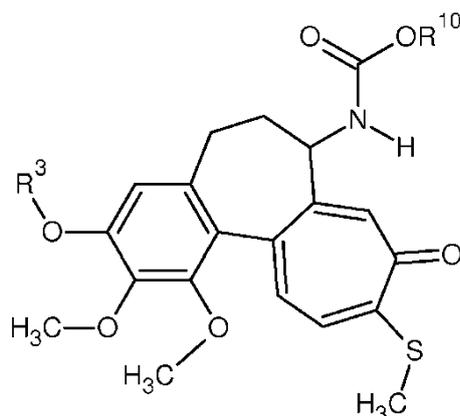
55 Los efectos asociados con el perfil farmacológico de la colchicina y la frecuente aparición de resistencia a fármacos han propiciado la búsqueda de compuestos que sean comparables a la actividad de la colchicina y más adecuados para el tratamiento del cáncer.

60 Kerekes *et al* (*J. Med. Chem.*, 1985, 28, 1204-1208) describieron la síntesis de tiocolchicinas novedosas y evaluaron análogos novedosos y conocidos de tiocolchicina *in vitro* en un ensayo de unión a tubulina e *in vivo* en ratones para determinar la toxicidad aguda y en el ensayo de leucemia linfocítica P388.

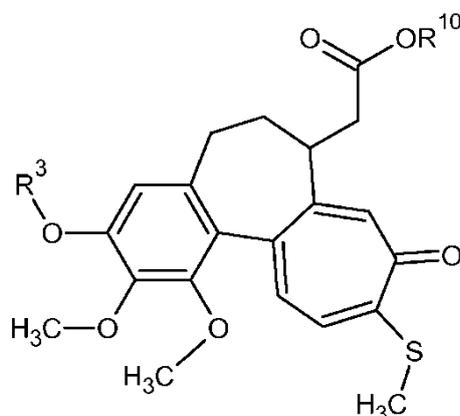
Sumario de la invención

65 La presente invención se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula XE y/o XF:



fórmula XE



fórmula XF

5

una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero óptico, o combinación de los mismos,

10 en el que:

R³ se selecciona de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido, un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido, grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido;

15

en la fórmula XF R¹⁰ es de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido o un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido; y

20

en la fórmula XE R¹⁰ es un grupo alquilo C₁ no sustituido;

en el que el grupo heterogéneo sustituido o no sustituido es una cadena saturada o insaturada sustituida o no sustituida de átomos miembros distintos de hidrógeno que comprende átomos de carbono y al menos un heteroátomo.

25

En otro aspecto, se proporciona el uso de los compuestos mencionados anteriormente en un método para tratar un cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos señalados anteriormente.

30

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de al menos uno de los compuestos señalados anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un mamífero.

35

En otro aspecto, se proporciona el uso de una composición que comprende al menos uno de los compuestos señalados anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un mamífero.

En aún un aspecto adicional, se proporciona al menos uno de los compuestos señalados anteriormente para tratar un cáncer en un mamífero.

En otro aspecto, se proporciona el uso de una composición que comprende al menos uno de los compuestos señalados anteriormente para tratar un cáncer en un mamífero.

5 En un aspecto adicional, se proporciona el uso de células cultivadas en 3D para IRM para determinar el efecto de una composición o compuesto terapéutico sobre las células.

En todavía un aspecto adicional, se proporciona un método para determinar un efecto de una composición o compuesto terapéutico sobre células cultivadas que comprende:

10 hacer crecer células cultivadas en 3D;

introducir la composición o compuesto terapéutico; y

15 monitorizar el efecto de la composición o compuesto terapéutico sobre las células usando IRM.

Otras características y ventajas de la presente invención se volverán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones de la invención, se proporcionan únicamente a modo de ilustración, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención se volverán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

25 Las realizaciones de la presente invención y otros compuestos se describirán ahora, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Se menciona que sólo los compuestos con las fórmulas XE y XF mencionadas anteriormente (ejemplos 89-94 en los dibujos) son parte del objeto reivindicado, y la mayoría de los compuestos mencionados en las figuras son ejemplos de referencia.

30 La figura 1 muestra un esquema de síntesis para elaborar los compuestos (2) y (3);

la figura 2 muestra un esquema de síntesis para elaborar los compuestos (4) y (5);

la figura 3 muestra un esquema de síntesis para elaborar los compuestos (6) a (38);

35 la figura 3A muestra la estructura de colchicina con modificaciones (50) a (54) a colchicina en la posición R;

la figura 4 muestra la estructura de tiocolchicina con modificaciones (39), (3 a-c), (4 a-c) y (5 a-c) a tiocolchicina en las posiciones R y R₁;

40 las figuras 4A a 4G muestran ejemplos de colchicinas de segunda y tercera generación y derivados de tiocolchicina;

la figura 5 muestra valores de CI₅₀ para los compuestos (1) a (38);

45 la figura 6 muestra la viabilidad de células tratadas con (6), (13), (28) y (35);

la figura 7 muestra ¹H IRM de células tratadas con (6) A; ¹H IRM de células tratadas con (13) B; ¹⁹F IRM de células tratadas con (28) C; ¹⁹F IRM de células tratadas con (35) D; en C y D, las flechas de color gris claro indican una región con mayor captación de derivados de flúor y las flechas de color gris más oscuro indican una región con menor captación de derivados de flúor;

50 la figura 8 muestra un aumento de ¹⁹F SI para (28) frente al número de células (el 100% se corresponde con SI de (28) sin células);

55 la figura 9 muestra un aumento de ¹⁹F SI para (35) frente al número de células (el 100% se corresponde con SI de (35) sin células);

la figura 10 muestra cromatogramas de HPLC de derivados: células CEM (A), (6) (B), (13) (C), (28) (D) y (35) (E);

60 la figura 11 muestra cromatogramas de HPLC-UV de células CEM sin tratar (A); células CEM tratadas con (40) (B); células CEM tratadas con (41) (C); y células CEM tratadas con (42) (D);

65 la figura 12 muestra imágenes de RM de las células CEM en el biorreactor de fibras huecas a 9,4 Tesla; la línea sólida de color gris oscuro indica el área de elevadas densidades celulares y la línea sólida de color blanco indica regiones de baja densidad celular; las imágenes: se usó ¹H IRM de células antes del tratamiento con (47) (A); después de 72 h de tratamiento con (47) derivado (B); secuencia de pulsos de eco de espín (SE) (TR/TE= 5000/12,8 ms, FOV = 3 cm × 3cm, grosor de la porción 1 mm y matriz 256 × 256); se usó ¹⁹F IRM de células antes del tratamiento con (47) (C),

después de 72 h de tratamiento con (47) derivado (D); la línea punteada en (C) y (D) indica el contorno de HFB; método de eco de espín de recuperación de inversión (IR) con tiempo de inversión (IT) igual a 400 ms y TE/TR = 16,5/5000 ms, grosor de la porción 1 mm y matriz 256 × 256);

5 la figura 13 muestra diferencias entre residuos encontrados dentro del sitio de unión a colchicina: la figura 13A muestra residuos contenidos dentro de la superficie de unión para colchicina [código pdb 1SA0] que se muestran como letras negras en la secuencia de β 1-tubulina canónica y se muestran diferencias entre los tres tipos de sitios de unión como letras de color gris intermedio, las letras restantes son grises, y las rayas representan posiciones idénticas entre las secuencias, la figura 13B muestra un superficie accesible al disolvente dibujada sobre β -tubulina [código pdb 1SA0] y
10 los residuos que constituyen la superficie de unión a colchicina se muestran en negro en el dibujo, mientras que los residuos que presentan diferencias entre los tres modelos de sitio de unión se muestran como barras negras, y la colchicina se muestra como una estructura molecular, con el anillo A y las posiciones X e Y claramente visibles;

la figura 14 muestra ΔG calculada [kcal mol⁻¹] de colchicina y sus derivados que se unen a los sitios de unión de β -tubulina tipo-I (superior), tipo-II (centro) y tipo-III (abajo) y se generaron diagramas de caja para cada uno de los derivados ((3)-D-20) y colchicina (CH) a partir de evaluaciones de energía de las diez poses acopladas independientes, se muestran fibras cortas monocristalinas para valores de confianza del 5% y el 95%.

La figura 15 muestra la citotoxicidad de los derivados de colchicina: la figura 15A muestra el logCI₅₀ de cada línea celular tal como se agrupa mediante el derivado de colchicina y cada punto se corresponde con un derivado de colchicina para cada una de las seis líneas celulares investigadas; la figura 15B muestra el logCI₅₀ agrupado por grupo funcional de fármaco y cada punto representa un derivado de colchicina y el logCI₅₀ se calcula como medias sobre las líneas celulares A549, HeLa, MCF-7 y CEM; la figura 15C muestra I_{bot} agrupado por línea celular y cada punto es una pareja de fármaco/línea celular. Todos los fármacos excepto, (3) y D14 (para los que estaban disponibles datos de citotoxicidad limitados o ninguno) se incluyeron en este cálculo.

La figura 16 muestra la cinética de unión de derivados de colchicina a los dímeros de tubulina $\alpha\beta$ II y $\alpha\beta$ III: la figura 16A muestra valores de k_{on} [M⁻¹ s⁻¹] para la unión de colchicina y todos los derivados de colchicina (excepto (5) y D14) a tubulina $\alpha\beta$ II y $\alpha\beta$ III a partir de los experimentos de cinética de unión; se muestran valores para $\alpha\beta$ II en el eje x, para $\alpha\beta$ III en el eje y; se marcan fármacos seleccionados, y la línea es un ajuste de los datos con R² = 0,95; y la figura 16B muestra los valores de logCI₅₀ [log₁₀ M] para la citotoxicidad de colchicina y derivados de colchicina seleccionados dieron un promedio sobre las líneas celulares A549, HeLa, MCF-7 y CEM, frente a logK_D [log₁₀ M] para la unión de los mismos fármacos a tubulina $\alpha\beta$ III calculado a partir de los valores de k_{on} suponiendo que k_{off} = 2,5x10⁻⁴ s⁻¹ (Banerjee A. *et al.*, J. Biol Chem. 1992; 267:13335-9); y la línea es un ajuste de los datos con R² = 0,30; y

la figura 17 muestra una correlación entre la ΔG calculada [kcal mol⁻¹] y el logCI₅₀ para los derivados de colchicina estudiados; los valores para la energía de unión computada de colchicina y derivados de colchicina (excepto (5) y D14) con respecto a los modelos de sitio de unión de tipo-I, tipo-II y tipo-III ponderados, se representaron gráficamente frente a los valores de logCI₅₀ a través de las líneas celulares A549, HeLa, MCF-7 y CEM; y la línea es un ajuste de los datos con R²=0,42. A partir de los ejemplos mencionados en los dibujos, sólo los ejemplos 89-94 son parte del objeto reivindicado de la presente solicitud.

Descripción detallada

45 La presente invención se refiere a un derivado de colchicina, a una composición que comprende el derivado, a un método de administración del mismo y al uso del mismo, en particular, para el tratamiento de cáncer. Además, la invención se refiere a técnicas de detección.

Definiciones

50 Cuando se describen los compuestos, composiciones, métodos y usos de esta invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario.

55 El término "derivados de colchicina" tal como se usa en el presente documento puede incluir cualquiera de los derivados descritos en el presente documento, por ejemplo, también puede incluir derivados de tiocolchicina, cuando sea apropiado.

60 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, animal o ser humano que busca un investigador, veterinario, médico u otro facultativo.

Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales (tal como se describe, por ejemplo, en: E. L. Eliel y S. H. Wilen, Stereo-chemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, Nueva York, 1994, páginas 1119-1190), y se producen como racematos, mezclas racémicas, y como diastereómeros individuales, con todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos, incluyendo isómeros ópticos, que se incluyen

en la presente invención. Además, los compuestos dados a conocer en el presente documento pueden existir como tautómeros y se prevé que ambas formas tautoméricas estén abarcadas por el alcance de la invención, aunque sólo pueda representarse una estructura tautomérica.

- 5 Generalmente, la referencia a un determinado elemento tal como hidrógeno o H se pretende que incluya, si es apropiado, todos los isótopos de ese elemento.

10 Cuando se usa el término "grupo alquilo", o bien solo o bien dentro de otros términos tales como "grupo haloalquilo" y "grupo alquilamino", abarca radicales de carbono lineales o ramificados que tienen, por ejemplo, de uno a aproximadamente veinte átomos de carbono o, en realizaciones específicas, de uno a aproximadamente doce átomos de carbono. En otras realizaciones, los grupos alquilo son grupos "alquilo inferiores" que tienen de uno a aproximadamente seis átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero no se limitan a los mismos, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, iso-amilo, hexilo y similares. En realizaciones más específicas, los grupos alquilo inferiores tienen de uno a cuatro átomos de carbono.

15 El término "grupo alqueno" abarca radicales de carbono lineales o ramificados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono. El término "grupo alqueno" puede abarcar dobles enlaces carbono-carbono conjugados y no conjugados o combinaciones de los mismos. Un grupo alqueno, por ejemplo y sin limitarse a lo mismo, puede abarcar de dos a aproximadamente veinte átomos de carbono o, en una realización particular, de dos a aproximadamente doce átomos de carbono. En las realizaciones, los grupos alqueno son grupos "alqueno inferiores" que tienen de dos a aproximadamente cuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen, pero no se limitan a los mismos, etenilo, propenilo, alilo, propenilo, butenilo y 4-metilbutenilo. Los términos "grupo alqueno" y "grupo alqueno inferior", abarcan grupos que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, orientaciones "E" y "Z".

25 El término "grupo alquino" denota radicales de carbono lineales o ramificados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono. El término "grupo alquino" puede abarcar triples enlaces carbono-carbono conjugados y no conjugados o combinaciones de los mismos. Grupo alquino, por ejemplo y sin limitarse a lo mismo, pueden abarcar de dos a aproximadamente veinte átomos de carbono o, en una realización particular, de dos a aproximadamente doce átomos de carbono. En las realizaciones, los grupos alquino son grupos "alquino inferiores" que tienen de dos a aproximadamente diez átomos de carbono. Algunos ejemplos son grupos alquino inferiores que tienen de dos a aproximadamente cuatro átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen propargilo, butinilo, y similares.

El término "halo" significa halógenos tales como átomos de flúor, cloro, bromo o yodo.

35 El término "grupo haloalquilo" abarca grupos en los que uno cualquiera o más de los átomos de carbono de alquilo se sustituye con halo tal como se definió anteriormente. Se abarcan específicamente grupos monohaloalquilo, dihaloalquilo y polihaloalquilo que incluyen perhaloalquilo. Un grupo monohaloalquilo, por ejemplo, puede tener o un átomo o bien de yodo, bromo, cloro o bien fluoro dentro del grupo. Los grupos dihalo y polihaloalquilo pueden tener dos o más de los mismos átomos de halo o una combinación de diferentes grupos halo. "Grupo haloalquilo inferior" abarca grupos que tienen 1-6 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos haloalquilo inferiores tienen de uno a tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos haloalquilo incluyen fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroclorometilo, diclorofluorometilo, difluoroetilo, difluoropropilo, dicloroetilo y dicloropropilo.

45 El término "grupo hidroxialquilo" abarca grupos alquilo lineales o ramificados que tienen, por ejemplo y sin limitarse a los mismos, de uno a aproximadamente diez átomos de carbono, de los cuales uno cualquiera puede estar sustituido con uno o más grupos hidroxilo. En las realizaciones, los grupos hidroxialquilo son grupos "hidroxialquilo inferiores" que tienen de uno a seis átomos de carbono y uno o más grupos hidroxilo. Los ejemplos de tales grupos incluyen hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo e hidroxihexilo.

50 El término "grupo alcoxilo" abarca grupos que contienen oxilo lineales o ramificados teniendo cada uno porciones alquilo de, por ejemplo y sin limitarse a los mismos, de uno a aproximadamente diez átomos de carbono. En las realizaciones, grupos alcoxilo son grupos "alcoxilo inferiores" que tienen de uno a seis átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo y terc-butoxilo. En determinadas realizaciones, los grupos alcoxilo inferiores tienen de uno a tres átomos de carbono. Los grupos "alcoxilo" pueden sustituirse adicionalmente con uno o más átomos de halo, tales como fluoro, cloro o bromo, para proporcionar grupos "haloalcoxilo". En otras realizaciones, los grupos haloalcoxilo inferior tienen de uno a tres átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen fluorometoxilo, clorometoxilo, trifluorometoxilo, trifluoroetoxilo, fluoroetoxilo y fluoropropoxilo.

60 El término "grupo aromático" o "grupo arilo" significa un grupo aromático que tiene uno o más anillos en el que tales anillos pueden unirse juntos de manera colgante o pueden condensarse. En realizaciones particulares, un grupo aromático es uno, dos o tres anillos. Los grupos aromáticos monocíclicos pueden contener de 4 a 10 átomos de carbono, normalmente de 4 a 7 átomos de carbono, y más normalmente de 4 a 6 átomos de carbono en el anillo. Los grupos aromáticos típicos tienen dos o tres anillos. Los grupos aromáticos policíclicos que tienen dos anillos tienen normalmente de 8 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 10 átomos de carbono en los anillos. Los ejemplos

de grupos aromáticos incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antrilo o acenaftilo.

5 El término "heteroátomo" significa un átomo distinto de carbono. Normalmente, se seleccionan heteroátomos del grupo que consiste en átomos de azufre, fósforo, nitrógeno y oxígeno. Los grupos que contienen más de un heteroátomo pueden contener diferentes heteroátomos.

10 El término "grupo heteroaromático" o "grupo heteroarilo" significa un grupo aromático que tiene uno o más anillos en el que tales anillos pueden unirse juntos de manera colgante o pueden condensarse, en el que el grupo aromático tiene al menos un heteroátomo. Los grupos heteroaromáticos monocíclicos pueden contener de 4 a 10 átomos miembros, normalmente de 4 a 7 átomos miembros, y más normalmente de 4 a 6 átomos miembros en el anillo. Los grupos heteroaromáticos policíclicos típicos tienen dos o tres anillos. Los grupos aromáticos policíclicos que tienen dos anillos tienen normalmente de 8 a 12 átomos miembros, más normalmente de 8 a 10 átomos miembros en los anillos. Los ejemplos de grupos heteroaromáticos incluyen, pero no se limitan a los mismos, pirrol, imidazol, tiazol, oxazol, furano, tiofeno, triazol, pirazol, isoxazol, isotiazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina, triazina, indol, benzofurano, benzotiofeno, bencimidazol, benzotiazol, quinolina, isoquinolina, quinazolina, quinoxalina y similares.

20 El término "grupo carbocíclico" significa un anillo de hidrocarburo carbocíclico saturado o insaturado. Los grupos carbocíclicos no son aromáticos. Los grupos carbocíclicos son monocíclicos o policíclicos. Los grupos carbocíclicos policíclicos pueden ser sistemas de anillos condensados, espiro o en puente. Los grupos carbocíclicos monocíclicos pueden contener de 4 a 10 átomos de carbono, normalmente de 4 a 7 átomos de carbono, y más normalmente de 5 a 6 átomos de carbono en el anillo. Los grupos carbocíclicos bicíclicos pueden contener de 8 a 12 átomos de carbono, normalmente de 9 a 10 átomos de carbono en los anillos.

25 El término "grupo heterocíclico" significa una estructura de anillo saturado o insaturado que contiene átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en el anillo. Los grupos heterocíclicos no son aromáticos. Los grupos heterocíclicos son monocíclicos o policíclicos. Los grupos heterocíclicos policíclicos pueden ser sistemas de anillos condensados, espiro o en puente. Los grupos heterocíclicos monocíclicos pueden contener de 4 a 10 átomos miembros (es decir, que incluyen tanto átomos de carbono como al menos 1 heteroátomo), normalmente de 4 a 7, y más normalmente de 5 a 6 en el anillo. Los grupos heterocíclicos bicíclicos pueden contener de 8 a 18 átomos miembros, normalmente 9 ó 10 átomos miembros en los anillos. Los grupos heterocíclicos representativos incluyen, a modo de ejemplo, pirrolidona, imidazolidina, pirazolidina, piperidina, 1,4-dioxano, morfolino, tiomorfolino, piperazina, 3-pirrolina y similares.

35 El término "grupo heterogéneo" significa una cadena saturada o insaturada de átomos miembros distintos de hidrógeno que comprende átomos de carbono y al menos un heteroátomo. Los grupos heterogéneos normalmente tienen de 1 a 25 átomos miembros. Más normalmente, la cadena contiene de 1 a 12 átomos miembros, de 1 a 10, y lo más normalmente de 1 a 6. La cadena puede ser lineal o ramificada. Los grupos heterogéneos ramificados típicos tienen una o dos ramificaciones, más normalmente una ramificación. Normalmente, los grupos heterogéneos están saturados. Los grupos heterogéneos insaturados pueden tener uno o más dobles enlaces, uno o más triples enlaces, o ambos. Los grupos heterogéneos insaturados típicos tienen uno o dos dobles enlaces o un triple enlace. Más normalmente, el grupo heterogéneo insaturado tiene un doble enlace.

45 El término "grupo hidrocarbonado" o "grupo hidrocarbilo" significa una cadena de 1 a 25 átomos de carbono, normalmente de 1 a 12 átomos de carbono, más normalmente de 1 a 10 átomos de carbono, y lo más normalmente de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos hidrocarbonados pueden tener una estructura de cadena lineal o ramificada. Los grupos hidrocarbonados típicos tienen una o dos ramificaciones, normalmente una ramificación. Normalmente, los grupos hidrocarbonados están saturados. Los grupos hidrocarbonados insaturados pueden tener uno o más dobles enlaces, uno o más triples enlaces, o combinaciones de los mismos. Los grupos hidrocarbonados insaturados típicos tienen uno o dos dobles enlaces o un triple enlace; más normalmente los grupos hidrocarbonados insaturados tienen un doble enlace.

50 Cuando se usa el término "insaturado" junto con cualquier grupo, el grupo puede estar completamente insaturado o parcialmente insaturado. Sin embargo, cuando se usa el término "insaturado" junto con un grupo específico definido en el presente documento, el término mantiene las limitaciones de ese grupo específico. Por ejemplo, un "grupo carbocíclico" insaturado, basándose en las limitaciones del "grupo carbocíclico" tal como se define en el presente documento, no abarca un grupo aromático.

60 El término "grupo carboxilo", ya se use solo o con otros términos, tales como "grupo carboxialquilo", denota $-(C=O)-O-$.

El término "grupo carbonilo", ya se use solo o con otros términos, tales como "grupo aminocarbonilo", denota $-(C=O)-$.

65 El término "grupo alquilcarbonilo" denota grupos carbonilos que se han sustituido con un grupo alquilo. En determinadas realizaciones, "grupo alquilcarbonilo inferior" tiene grupo alquilo inferior tal como se describió anteriormente unido a un grupo carbonilo.

- 5 El término “grupo aminoalquilo” abarca grupos alquilo lineales o ramificados que tienen de uno a aproximadamente diez átomos de carbono, de los cuales uno cualquiera puede estar sustituido con uno o más grupos amino. En algunas realizaciones, los grupos aminoalquilos son grupos “aminoalquilo inferiores” que tienen de uno a seis átomos de carbono y uno o más grupos amino. Los ejemplos de tales grupos incluyen aminometilo, aminoetilo, aminopropilo, aminobutilo y aminohexilo.
- 10 El término “grupo alquilaminoalquilo” abarca grupos aminoalquilos que tienen el átomo de nitrógeno independientemente sustituido con un grupo alquilo. En determinadas realizaciones, los grupos alquilaminoalquilos son grupos “alquilaminoalquilo inferiores” que tienen grupos alquilo de uno a seis átomos de carbono. En otras realizaciones, los grupos alquilaminoalquilo inferiores tienen grupos alquilo de uno a tres átomos de carbono. Los grupos alquilaminoalquilo adecuados pueden estar sustituidos con mono o dialquilo, tal como N-metilaminometilo, N,N-dimetil-aminoetilo, N,N-dietilaminometilo y similares.
- 15 El término “grupo aralquilo” abarca grupos alquilo sustituidos con arilo. En las realizaciones, los grupos aralquilo son grupos “aralquilo inferiores” que tienen grupos arilo unidos a grupos alquilo que tienen de uno a seis átomos de carbono. En otras realizaciones, los grupos aralquilo inferiores fenilo se une a porciones alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen bencilo, difenilmetilo y feniletilo. El arilo en dicho aralquilo puede sustituirse adicionalmente con halo, alquilo, alcoxilo, haloalquilo y haloalcoxilo.
- 20 El término “grupo arilalquenilo” abarca grupos alquenilo sustituidos con arilo. En las realizaciones, los grupos arilalquenilo son grupos “arilalquenilo inferiores” que tienen grupos arilo unidos a grupos alquenilo que tienen de dos a seis átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen feniletenilo. El arilo en dicho arilalquenilo puede sustituirse adicionalmente con halo, alquilo, alcoxilo, haloalquilo y haloalcoxilo.
- 25 El término “grupo arilalquinilo” abarca grupos alquinilo sustituidos con arilo. En las realizaciones, los grupos arilalquinilo son grupos “arilalquinilo inferiores” que tienen grupos arilo unidos a grupos alquinilo que tienen de dos a seis átomos de carbono. Los ejemplos de tales grupos incluyen feniletinilo. El arilo en dicho aralquilo puede sustituirse adicionalmente con halo, alquilo, alcoxilo, haloalquilo y haloalcoxilo. Los términos bencilo y fenilmetilo son intercambiables.
- 30 El término “grupo alquiltio” abarca grupos que contienen un grupo alquilo lineal o ramificado, de uno a diez átomos de carbono, unidos a un átomo divalente de azufre. En determinadas realizaciones, los grupos alquiltio inferiores tienen de uno a tres átomos de carbono. Un ejemplo de “alquiltio” es metiltio, ($\text{CH}_3\text{S}-$).
- 35 El término “grupo alquilamino” denota grupos amino que se han sustituido con un grupo alquilo y con dos grupos alquilo, incluyendo los términos “N-alquilamino” y “N,N-dialquilamino”. En las realizaciones, los grupos alquilamino son grupos “alquilamino inferiores” que tienen uno o dos grupos alquilo de uno a seis átomos de carbono, unidos a un átomo de nitrógeno. En otras realizaciones, los grupos alquilamino inferiores tienen de uno a tres átomos de carbono. Grupos “alquilamino” adecuados pueden ser mono o dialquilamino tales como N-metilamino, N-etilamino, N,N-dimetilamino, N,N-dietilamino y similares.
- 40 El término “grupo arilamino” denota grupos amino que se han sustituido con uno o dos grupos arilo, tales como N-fenilamino. Los grupos “arilamino” pueden sustituirse adicionalmente en la porción de anillo de arilo del grupo.
- 45 El término “heteroarilamino” denota grupos amino que se han sustituido con uno o dos grupos heteroarilo, tales como N-tienilamino. Los grupos “heteroarilamino” pueden sustituirse adicionalmente en la porción de anillo de heteroarilo del grupo.
- 50 El término “grupo aralquilamino” denota grupos amino que se han sustituido con uno o dos grupos aralquilo. En otras realizaciones, hay grupos fenil-C₁-C₃-alquilamino, tales como N-bencilamino. Los grupos “aralquilamino” pueden sustituirse adicionalmente en la porción de anillo de arilo del grupo.
- 55 El término “grupo alquilaminoalquilamino” denota grupos alquilamino que se han sustituido con uno o dos grupos alquilamino. En las realizaciones, hay grupos C₁-C₃-alquilamino-C₁-C₃-alquilamino.
- 60 El término “grupo ariltio” abarca grupos arilo de seis a diez átomos de carbono, unidos a un átomo divalente de azufre. Un ejemplo de “ariltio” es feniltio. El término “grupo aralquiltio” abarca grupos aralquilo tal como se describió anteriormente, unidos a un átomo divalente de azufre. En determinadas realizaciones, hay grupos fenil-C₁-C₃-alquiltio. Un ejemplo de “aralquiltio” es benciltio.
- 65 El término “grupo ariloxilo” abarca opcionalmente grupos arilo sustituidos, tal como se definió anteriormente, unidos a un átomo de oxígeno. Los ejemplos de tales grupos incluyen fenoxilo.
- El término “grupo aralcoxilo” abarca grupos aralquilo que contienen oxilo unidos a través de un átomo de oxígeno a otros grupos. En determinadas realizaciones, los grupos aralcoxilo son grupos “aralcoxilo inferiores” que tienen

opcionalmente grupos fenilo sustituidos unidos a grupo alcoxilo inferior tal como se describió anteriormente.

El término "grupo cicloalquilo" incluye grupos carbocíclicos saturados. En determinadas realizaciones, los grupos cicloalquilo incluyen anillos C₃-C₆. En las realizaciones, hay compuestos que incluyen, ciclopentilo, ciclopropilo y ciclohexilo.

El término "grupo cicloalqueno" incluye grupos carbocíclicos que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono; conjugados o no conjugados, o una combinación de los mismos. Los compuestos "cicloalqueno" y "cicloalqueno" se incluyen en el término "cicloalqueno". En determinadas realizaciones, los grupos cicloalqueno incluyen anillos C₃-C₆. Los ejemplos incluyen ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexenilo y cicloheptadienilo. El grupo "cicloalqueno" puede tener de 1 a 3 sustituyentes tales como alquilo inferior, hidroxilo, halo, haloalquilo, nitro, ciano, alcoxilo, alquilamino inferior, y similares.

El término "sustituyente adecuado", "sustituyente" o "sustituido" usado junto con los grupos descritos en el presente documento se refiere a un grupo química y farmacéuticamente aceptable, es decir, un resto que no niega la actividad terapéutica de los compuestos de la invención. Se entiende que un experto habitual en la técnica puede seleccionar sustituyentes y patrones de sustitución en los compuestos de la invención para proporcionar compuestos que son químicamente estables y que pueden sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, así como los métodos expuestos a continuación. Si un sustituyente está por sí mismo sustituido con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar en el mismo átomo miembro/carbono o en diferentes átomos miembros/carbonos, siempre que resulte una estructura estable. Los ejemplos ilustrativos de algunos sustituyentes adecuados incluyen, cicloalquilo, heterociclilo, hidroxialquilo, bencilo, carbonilo, halo, haloalquilo, perfluoroalquilo, perfluoroalcoxilo, alquilo, alqueno, alquino, hidroxilo, oxo, mercapto, alquilo, alquilo, alquilo, arilo o heteroarilo, ariloxilo o heteroariloxilo, aralquilo o heteroaralquilo, aralcoxilo o heteroaralcoxilo, HO--(C=O)--, amido, amino, alquil- y dialquilamino, ciano, nitro, carbamoilo, alquilcarbonilo, alcoxycarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, arilcarbonilo, ariloxycarbonilo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo. Los sustituyentes típicos incluyen grupos aromáticos, grupos aromáticos sustituidos, grupos hidrocarbonados incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, grupos hidrocarbonados sustituidos tales como bencilo, y grupos heterogéneos incluyendo grupos alcoxilo tales como grupos metoxilo.

El término "condensado" significa en el que dos o más átomos miembros/carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, por ejemplo, los anillos son "anillos condensados".

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las sales no tóxicas convencionales de los compuestos de esta invención tal como se forman, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, trifluoroacético y similares.

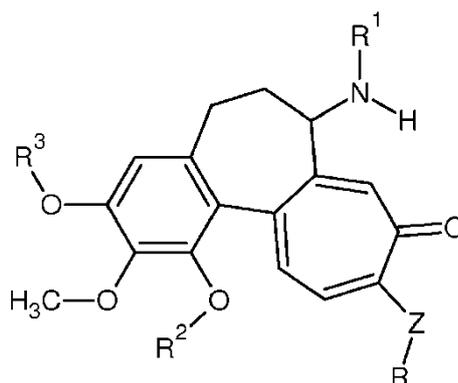
Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención pueden sintetizarse a partir de los compuestos de esta invención que contienen un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, las sales de los compuestos básicos se preparan o bien mediante cromatografía de intercambio iónico o haciendo reaccionar la base libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido inorgánico u orgánico deseado formador de sal en un disolvente adecuado o diversas combinaciones de disolventes. De manera similar, las sales de los compuestos ácidos se forman mediante reacciones con la base inorgánica u orgánica apropiada.

La presente invención incluye sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y profármacos de los compuestos de la invención y mezclas de los mismos.

Los términos "que comprende", "que tiene" y "que incluye", y diversas terminaciones de los mismos, pretenden ser abiertos, incluyendo el componente indicado pero no excluyendo otros elementos.

Derivados de colchicina de primera generación

La primera generación de derivados de referencia de colchicina está representada por un compuesto de fórmula I:



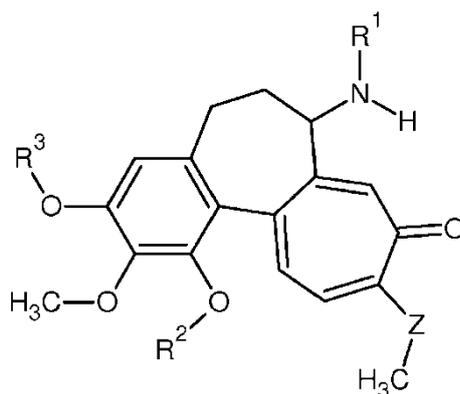
fórmula I

- 5 en la que: Z es O S; R¹ se selecciona de H, un grupo halo, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido; R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de H, un grupo halo, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido, o un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido, con la condición de que cuando R, R² y R³ son grupos metilo, R¹ no es -COCH₃; y/o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero óptico, o combinación de los mismos.
- 10 En realizaciones específicas de fórmula I, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo alquenilo sustituido o no sustituido, un grupo alquinilo sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido, un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido. En más realizaciones particulares, R² y R³
- 15 se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo sustituido o no sustituido, un haloalquilo sustituido o no sustituido, un hidroxialquilo sustituido o no sustituido, un cianoalquilo sustituido o no sustituido, un alquenilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un cicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquilcicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilcicloalquenilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo, alquilen-O-cicloalquilo, alquilen-O-heterocicloalquilo, alquilen-O-alquilen-cicloalquilo o alquilen-O-alquilen-heterocicloalquilo. En otras realizaciones, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un alquenilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo C₁-C₆, un alquilcicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido o un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido.

- R¹ puede seleccionarse de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. Más específicamente, R¹ puede seleccionarse de un -COX sustituido o no sustituido y X se selecciona de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. El -COX puede ser -COCR⁴R⁵R⁶, en el que R⁴R⁵R⁶ se seleccionan cada uno independientemente de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. En particular, R⁴R⁵R⁶ pueden seleccionarse cada uno independientemente de grupos amido sustituidos o no sustituidos. En una realización específica R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente de H, grupo alquilo sustituido o no sustituido, y R⁶ es -NR(CO)CR⁷R⁸R⁹, en el que R⁷, R⁸, y R⁹ se seleccionan cada uno de H, grupo halo, un grupo alquilo sustituido o no sustituido. R⁷, R⁸, y R⁹ pueden seleccionarse de un grupo halo. Más específicamente, R⁷, R⁸, y R⁹ pueden seleccionarse de un grupo fluoro.

- R puede seleccionarse de un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido. Específicamente, R puede seleccionarse de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.

Se representan derivados de colchicina de referencia adicionales mediante un compuesto de fórmula IA:



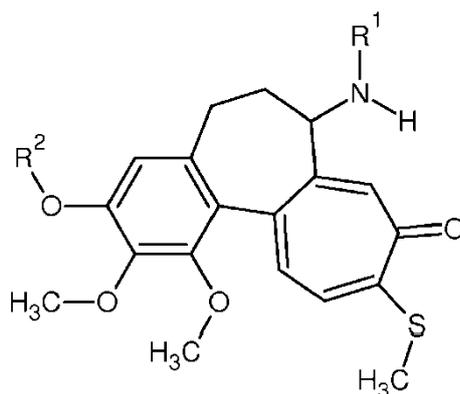
fórmula IA

5 en el que: Z es O S; R¹ se selecciona de H, un grupo halo, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido; R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de H, un grupo halo, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido, un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido, grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, con la condición de que cuando R² y R³ son grupos metilo, R¹ no es -COCH₃; y/o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero óptico, o combinación de los mismos.

15 En realizaciones específicas de fórmula IA, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo alquenilo sustituido o no sustituido, un grupo alquinilo sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido, un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido. En más realizaciones particulares, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo sustituido o no sustituido, un haloalquilo sustituido o no sustituido, un hidroxialquilo sustituido o no sustituido, un cianoalquilo sustituido o no sustituido, un alquenilo sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo sustituido o no sustituido, un alquinilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un cicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquilocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquiheterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquiheterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, un alquiheteroarilo sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo, alquilen-O-cicloalquilo, alquilen-O-heterocicloalquilo, alquilen-O-alquilen-cicloalquilo o alquilen-O-alquilen-heterocicloalquilo. En otras realizaciones, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un alquenilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo C₁-C₆, un alquilocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido o un alquiheteroarilo sustituido o no sustituido. En realizaciones más específicas, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un alquenilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido o alquilen-O-alquilo C₁-C₆.

30 R¹ puede seleccionarse de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. Más específicamente, R¹ puede seleccionarse de un -COX sustituido o no sustituido y X se selecciona de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. El grupo -COX puede ser -COCR⁴R⁵R⁶, en el que R⁴R⁵R⁶ se seleccionan cada uno independientemente de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. En particular, R⁴R⁵R⁶ pueden seleccionarse cada uno independientemente de grupos amido sustituidos o no sustituidos. En una realización específica R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente de H, grupo alquilo sustituido o no sustituido, y R⁶ es -NR(CO)CR⁷R⁸R⁹, en el que R⁷, R⁸, y R⁹ se seleccionan cada uno de H, grupo halo, un grupo alquilo sustituido o no sustituido. R⁷, R⁸, y R⁹ pueden seleccionarse de un grupo halo. Más específicamente, R⁷, R⁸, y R⁹ pueden seleccionarse de un grupo fluoro.

Se representan derivados de colchicina de referencia adicionales mediante un compuesto de fórmula III:



fórmula III

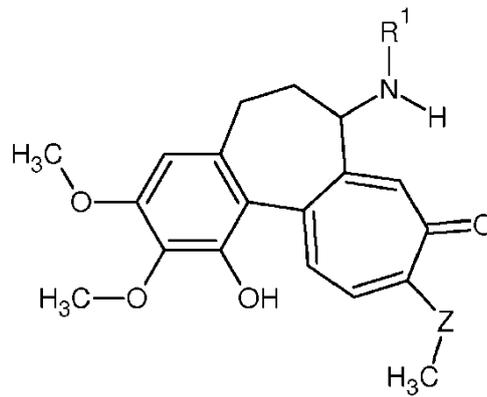
5 en la que: R¹ se selecciona de H, un grupo halo, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido; R² se selecciona de H, un grupo halo, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido, un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido, grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, con la condición de que cuando R² es un grupo metilo, R¹ no es -COCH₃; y/o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero óptico, o combinación de los mismos.

10 En realizaciones específicas de fórmula III, R² se selecciona de un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo alquenilo sustituido o no sustituido, un grupo alquinilo sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido, un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido. En más realizaciones particulares, R² se selecciona de un alquilo sustituido o no sustituido, un haloalquilo sustituido o no sustituido, un hidroxialquilo sustituido o no sustituido, un cianoalquilo sustituido o no sustituido, un alquenilo sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo sustituido o no sustituido, un alquinilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un cicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquilocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo, alquilen-O-cicloalquilo, alquilen-O-heterocicloalquilo, alquilen-O-alquilen-cicloalquilo o alquilen-O-alquilen-heterocicloalquilo. En otras realizaciones, R² se selecciona de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un alquenilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo C₁-C₆, un alquilocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido o un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido. En realizaciones más específicas, R² se selecciona de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un alquenilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido o alquilen-O-alquilo C₁-C₆.

30 R¹ puede seleccionarse de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. Más específicamente, R¹ puede seleccionarse de un -COX sustituido o no sustituido y X se selecciona de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. El -COX puede ser -COCR⁴R⁵R⁶, en el que R⁴R⁵R⁶ se seleccionan cada uno independientemente de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. En particular, R⁴R⁵R⁶ pueden seleccionarse cada uno independientemente de grupos amido sustituidos o no sustituidos. En una realización específica R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente de H, grupo alquilo sustituido o no sustituido, y R⁶ es -NR(CO)CR⁷R⁸R⁹, en el que R⁷, R⁸, y R⁹ se seleccionan cada uno de H, grupo halo, un grupo alquilo sustituido o no sustituido. R⁷, R⁸, y R⁹ pueden seleccionarse de un grupo halo. Más específicamente, R⁷, R⁸, y R⁹ pueden seleccionarse de un grupo fluoro.

40 Los derivados de colchicina descritos en el presente documento pueden ser una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, un hidrato de los mismos, un solvato de los mismos, un tautómero de los mismos, un isómero óptico de los mismos, o una combinación de los mismos. En realizaciones más específicas, los compuestos de referencia de las fórmulas I a III tienen la configuración S en C7, por ejemplo, véanse las figuras 3 a 4. Pueden prepararse determinados compuestos descritos en el presente documento, por ejemplo, tal como sigue:

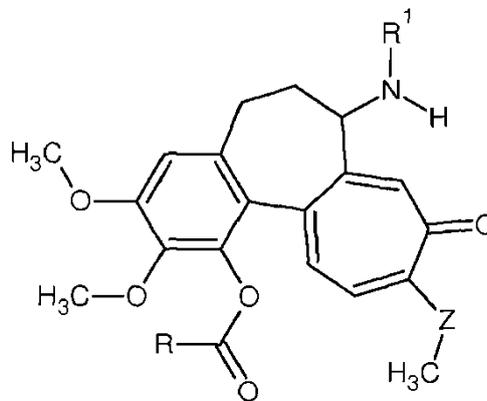
45 a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IV con ROCl:



fórmula IV

para formar:

5



fórmula V

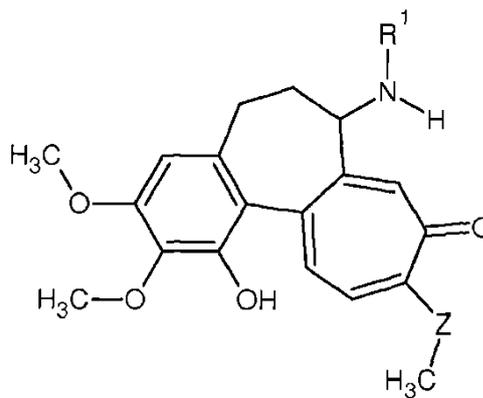
en la que: R y R¹ pueden ser tal como se definió anteriormente.

10

También pueden prepararse determinados compuestos de referencia descritos en el presente documento tal como sigue:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IV con R²Br:

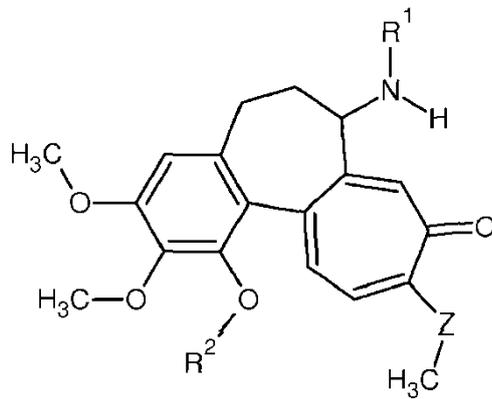
15



fórmula IV

para formar:

20

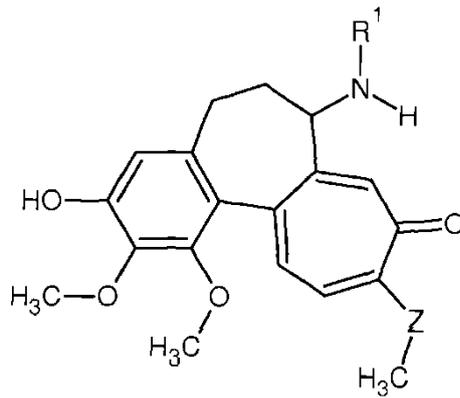


fórmula V

en la que: R¹ y R² pueden ser tal como se definió anteriormente.

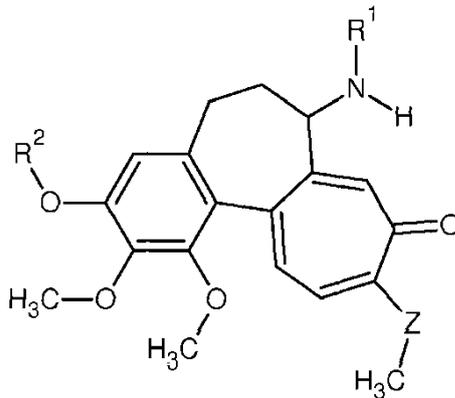
5 También pueden prepararse determinados compuestos de referencia descritos en el presente documento tal como sigue:

10 a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula VII con R²Br:



fórmula VII

15 para formar:

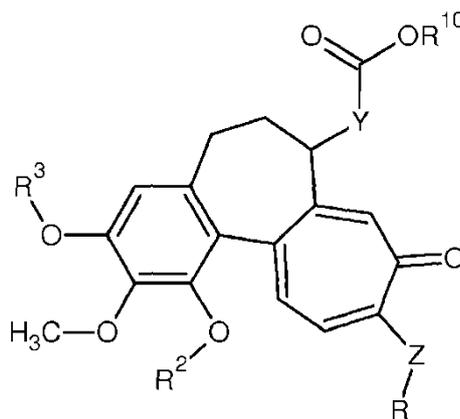


fórmula VIII

en la que: R¹ y R² pueden ser tal como se definió anteriormente.

20 Derivados de colchicina de tercera generación

La tercera generación de derivados de colchicina está representada un compuesto de fórmula X:



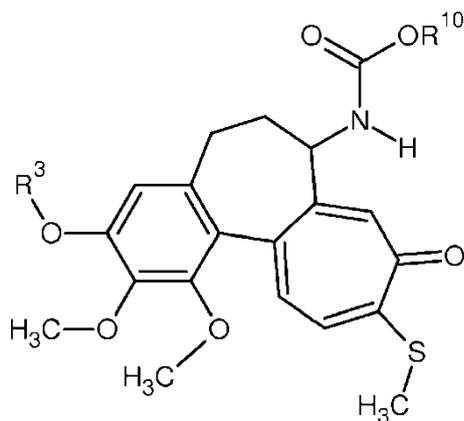
fórmula X

5 en la que: Z es O S; Y es NH o CH₂; R¹⁰ se selecciona de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido o un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido; R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente de H, un grupo halo, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido, un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido, grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido; R se selecciona de H o un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido; y/o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero óptico, o combinación de los mismos.

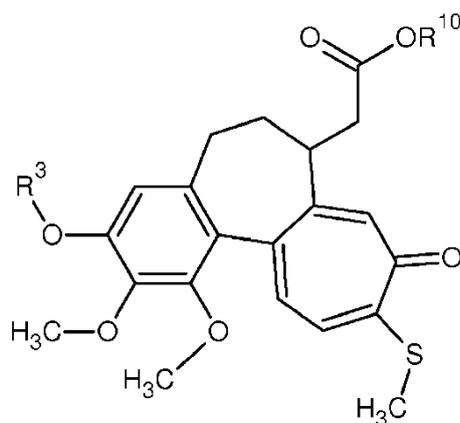
10 En realizaciones específicas de fórmula X, R, R² y R³ pueden ser tal como se indicó anteriormente con respecto a la fórmula I.

15 R¹⁰ puede seleccionarse de un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido o un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido. Más específicamente, R¹⁰ puede seleccionarse de un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo alquenilo sustituido o no sustituido, un grupo alquinilo sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido, un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido. En particular, R¹⁰ puede seleccionarse de un alquilo sustituido o no sustituido, CH₂OH, un haloalquilo sustituido o no sustituido, un hidroxialquilo sustituido o no sustituido, un cianoalquilo sustituido o no sustituido, un alquenilo sustituido o no sustituido, un alquinilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un cicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquilcicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilcicloalquenilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquenilo sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo, alquilen-O-cicloalquilo, alquilen-O-heterocicloalquilo, alquilen-O-alquilen-cicloalquilo o alquilen-O-alquilen-heterocicloalquilo. Incluso más específicamente, R¹⁰ puede seleccionarse de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, un alquenilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un alquinilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo C₁-C₆, un alquilcicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido o un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido. En realizaciones específicas, R¹⁰ puede seleccionarse de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, o un alquenilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido o alquinilo C₁-C₆. En realizaciones particulares, R¹⁰ se selecciona de un alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.

35 En la principal realización de la presente invención, el derivado de colchicina de tercera generación comprende un compuesto de fórmula XE y/o XF:



fórmula XE



fórmula XF

5

Para las fórmulas XE y XF, R^3 y R^{10} pueden ser tal como se indicó anteriormente con respecto a la fórmula X.

10

Los derivados de colchicina de tercera generación descritos en el presente documento pueden ser una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, un hidrato de los mismos, un solvato de los mismos, un tautómero de los mismos, un isómero óptico de los mismos, o una combinación de los mismos. En realizaciones más específicas, los compuestos de las fórmulas XE y XF tienen la configuración S en C7.

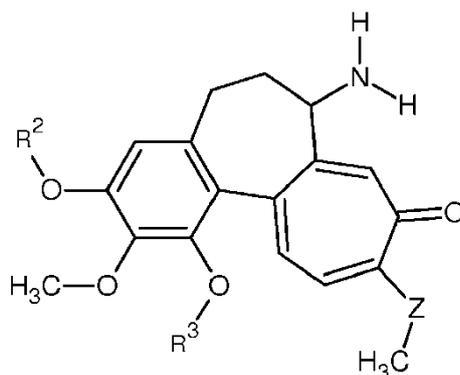
15

Ejemplos de los compuestos de fórmula XE y XF son (89) a (94), tal como se muestra en las figuras 4G y 4H. Tales compuestos pueden usarse tal cual y/o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o cualquier combinación de los mismos.

Pueden prepararse determinados compuestos descritos en el presente documento, por ejemplo, tal como sigue:

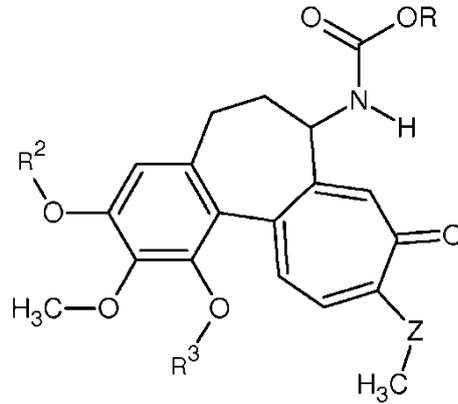
20

- a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula XX con $RO(C=O)Cl$:



fórmula XX

para formar:

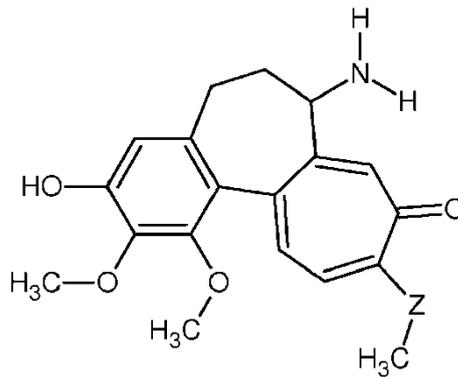


fórmula XXI

5 en la que: R² y R³ pueden ser tal como se definió anteriormente.

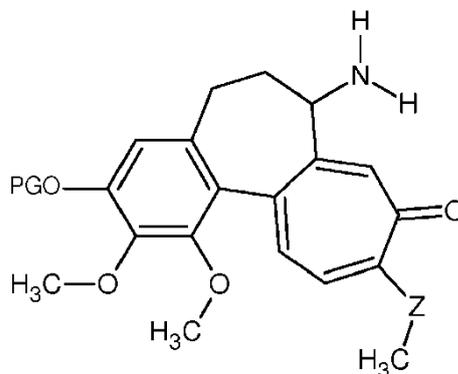
También pueden prepararse determinados compuestos descritos en el presente documento tal como sigue:

10 a) proteger el grupo hidroxilo de un compuesto de fórmula XXII



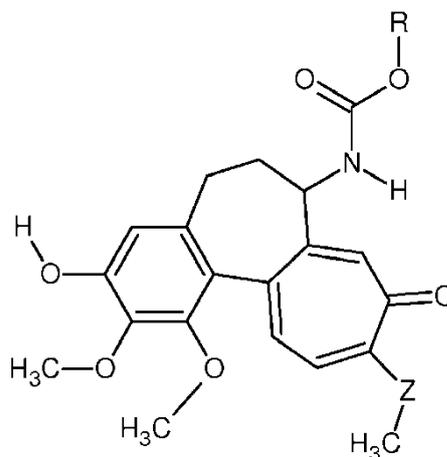
fórmula XXII

15 para proteger (PG=grupo protector):



fórmula XXIIb

20 b) hacer reaccionar un compuesto de fórmula XXIIb con RO(C=O)Cl, seguido por desprotección para formar:



fórmula XXIIIC

5 En general, los compuestos de esta invención pueden prepararse empleando reacciones y manipulaciones convencionales que se conocen en la bibliografía o se ejemplifican en el presente documento.

10 Los compuestos con las fórmulas XE y XF de la presente invención son útiles en el tratamiento de cáncer. El cáncer tratado puede ser, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer del SNC, cáncer de piel, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de mama, leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza, cáncer de cuello o cáncer de riñón. Más normalmente, el cáncer puede ser cáncer de mama, leucemia aguda, leucemia crónica, cáncer colorrectal o leucemia de cerebro. El cáncer puede ser un carcinoma. El carcinoma puede seleccionarse de carcinomas de células pequeñas, carcinomas de cuello uterino, glioma, astrocitoma, carcinomas de próstata, carcinomas de ovario, melanoma, carcinomas de mama o carcinomas colorrectales. Los compuestos de la presente invención pueden ser incluso más particularmente útiles en el tratamiento de carcinoma de pulmón, carcinoma de cuello uterino, adenocarcinoma, glioma, leucemia promielocítica, leucemia de células T, neuroblastoma, linfoma, cáncer pancreático y LLA.

20 En realizaciones específicas, los derivados de ticolchicina se usan para tratar cáncer de mama. La funcionalización del grupo amino en la posición C7 con sustituyentes polares, tales como ésteres de amino, modifica la actividad inhibidora del crecimiento de las líneas celulares. La introducción de un grupo trifluorometilo en la cadena lateral del anillo B aumenta la actividad del fármaco en ticolchicina.

25 Los compuestos de la presente invención pueden tener una CI_{50} para una población de células cancerosas de menos de aproximadamente 40 nM. En realizaciones específicas, los compuestos de la presente invención muestran eficacia contra células cancerosas a CI_{50} de menos de aproximadamente 20 nM, normalmente menos de aproximadamente 15 nM, más normalmente menos de aproximadamente 10 nM.

30 Los compuestos descritos en el presente documento muestran eficacia contra, por ejemplo, líneas celulares de A549 (carcinoma de pulmón humano), HeLa (carcinoma de cuello uterino humano), MCF-7 (adenocarcinoma de las glándulas mamarias humano), CEM (linfoblastoide T humano de LLA (leucemia linfoblástica aguda)), M010B (glioma humano) y M006X (glioma humano).

35 Determinados compuestos de la presente invención pueden mostrar toxicidad reducida en comparación con agentes administrados de manera convencional.

40 Los compuestos de esta invención pueden administrarse a mamíferos, normalmente seres humanos, o bien solos o bien, en combinación con diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables, opcionalmente con adyuvantes conocidos, tales como alumbre, en una composición farmacéutica, según la práctica farmacéutica convencional. Los compuestos pueden administrarse por vía oral o por vía parenteral, incluyendo las vías de administración intravenosas, intramusculares, intraperitoneales y subcutáneas.

45 Tal como se indica, los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía oral. Para uso oral de un compuesto o composición según esta invención, el compuesto seleccionado puede administrarse, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, o como una disolución o suspensión acuosa. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz, y se añaden comúnmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, pueden añadirse determinados agentes edulcorantes y/o aromatizantes. Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, se preparan habitualmente disoluciones estériles del principio activo, y el pH de las disoluciones debe ajustarse y tamponarse

adecuadamente. Para uso intravenoso, la concentración total de solutos debe controlarse para hacer que la preparación sea isotónica.

5 El compuesto/la composición puede administrarse por vía oral. Sin embargo, también pueden usarse otros métodos de administración.

Los compuestos de la presente invención también pueden combinarse y/o coadministrarse con otros agentes terapéuticos que se seleccionan por su utilidad particular contra el cáncer que está tratándose. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden combinarse y/o coadministrarse con agente(s) anticancerígeno(s).

10 Los ejemplos de agentes anticancerígenos incluyen, sin limitarse a los mismos, lo siguiente: moduladores del receptor de estrógeno, moduladores del receptor de andrógeno, moduladores del receptor de retinoides, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, inhibidores de la tirosina cinasa, inhibidores de la prenil-proteína transferasa, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la VIH proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa, otros inhibidores de la angiogénesis y combinaciones de los mismos. Los presentes compuestos también pueden ser útiles con otras terapias tales como cuando se coadministran con radioterapia.

20 “Moduladores del receptor de estrógeno” se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de estrógeno al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores del receptor de estrógeno incluyen, pero no se limitan a los mismos, tamoxifeno, raloxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]-fenil-2,2-dimetilpropanoato, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona y SH646.

25 “Moduladores del receptor de andrógeno” se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de andrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores del receptor de andrógeno incluyen finasterida y otros inhibidores de la 5 α -reductasa, nilutamida, flutamida, bicalutamida, liarozol y acetato de abiraterona.

30 “Moduladores del receptor de retinoides” se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de retinoides al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de tales moduladores del receptor de retinoides incluyen bexaroteno, tretinoína, ácido 13-cis retinoico, ácido 9-cis-retinoico, α -difluorometilomitina, ILX23-7553, trans-N-(4'-hidroxifenil)retinamida y N-4-carboxifenilretinamida.

35 “Agentes citotóxicos” se refieren a compuestos que provocan muerte celular principalmente al interferir directamente con el funcionamiento de la célula o inhiben o interfieren con la miosis celular, incluyendo agentes alquilantes, factores de necrosis tumoral, intercaladores, inhibidores de la microtubulina e inhibidores de la topoisomerasa.

40 Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a los mismos, ciclofosfamida, ifosfamida, hexametilmelamina, tirapazimina, sertenef, caquectina, ifosfamida, tasonermina, lonidamina, carboplatino, mitomicina, altretamina, prednimustina, dibromodulcitol, ranimustina, fotemustina, nedaplatino, oxaliplatino, temozolomida, heptaplatino, estramustina, tosilatato de improsulfano, trofosfamida, nimustina, cloruro de dibrospidio, pumitepa, lobaplatino, satraplatino, profiromicina, cisplatino, irofulvenol, dexifosfamida, cis-aminadicloro(2-metil-piridina)platino, bencilguanina, glufosfamida, GPX100, tetracloruro de (trans, trans, trans)-bis-mu-(hexano-1,6-diamina)-mu-[diamina-platino(II)]bis[diamina(cloro)-platino (II)], diarizidinalespermina, trióxido de arsénico, 1-(11-dodecilamino-10-hidroxiundecil)-3,7-dimetilixantina, zorrubicina, idarrubicina, daunorrubicina, bisantreno, mitoxantrona, pirarrubicina, pináfida, valrubicina, amrubicina, antineoplastón, 3'-desamino-3'-morfolino-13-desoxo-10-hidroxicarminomicina, annamicina, galarrubicina, elinafida, MEN10755, y 4-desmetoxi-3-desamino-3-aziridinil-4-metilsulfonil-daunorrubicina (véase la solicitud de patente internacional n.º WO 00/50032).

50 Los ejemplos de inhibidores de microtúbulos incluyen paclitaxel (Taxol®), sulfato de vindesina, 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-8'-norvincalécoblastina, docetaxel, rizoxina, dolastatina, isetionato de mivobulina, auristatina, cematotina, RPR109881, BMS184476, vinflunina, criptoficina, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)benzenosulfonamida, anhidrovinblastina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolil-L-prolina-tbutilamida, TDX258 y BMS 188797.

55 Algunos ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa son topotecán, hicaptamina, irinotecán, rubitecán, 6-etoxipropionil-3',4'-O-exo-benciliden-cartreusina, 9-metoxi-N,N-dimetil-5-nitropirazolo[3,4,5-k]acridin--2-(6H)propanamina, 1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil--1H,12Hbenzo[de]piran[3',4':b,7]indolizina[1,2b]quinolin-10,13(9H,15H)diona, lurtotecán, 7-[2-(N-isopropilamino)etil]- (20S)camptotecina, BNP1350, BNPI1100, BN80915, BN80942, fosfato de etopósido, tenipósido, sobuzoxana, 2'-dimetilamino-2'-desoxi-etopósido, GL331, N-[2-(dimetilamino)etil]-9-hidroxi-5,6-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazol-1-carboxamida, asulacrina, (5a,5aB,8aa,9b)-9-[2-[N-[2-(dimetilamino)etil]-N-metilamino]etil]-5-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-5,5a,6,8,8a,9-hexahidrofuro(3',4':6,7)nafto(2,3-d)-1,3-dioxol-6-ona, 2,3-(metilendioxi)-5-metil-7-hidroxi-8-metoxibenzo[c]-fenantridino, 6,9-bis[(2-aminoetil)amino]benzo[g]isoquinolina-5,10-diona, 5-(3-aminopropilamino)-7,10-dihidroxi-2-(2-hidroxi-etilaminometil)-6H-pirazolo[4,5,1-de]acridin-6-ona, N-[1-[2(dietilamino)etilamino]-7-metoxi--9-oxo-9H-tioxanten-4-ilmetil]formamida, N-(2-(dimetilamino)etil)acridin-4-carboxamida, 6-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-3-hidroxi-7H-indeno[2-,1-c]quinolin-7-ona y dimesna.

Los "agentes antiproliferativos" incluyen BCNU, oligonucleótidos de ARN y ADN antisentido tales como G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231 e INX3001, y antimetabolitos tales como floxuridina, enocitabina, carmofur, tegafur, pentostatina, doxifluridina, trimetrexato, fludarabina, capecitabina, galocitabina, ocfosfato de citarabina, fosteabina
 5 sódica hidratada, raltitrexed, paltitrexid, emitetur, tiazofurina, decitabina, nolatrexed, pemetrexed, nelzarabina, 2'-desoxi-2'-metilidencitidina, 2'-fluorometilen-2'-desoxi-citidina, N-[5-(2,3-dihidro-benzofuril)sulfonil]-N'-(3,4-diclorofenil)urea, N6-[4-desoxi-4-[N2-[2(E),4(E)-tetradecadienoil]glicilamino]-L-glicero-B-L-mannoheptopiranosil]adenina, aplidina, ecteinascidina, troxacitabina, ácido 4-[2-amino-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-3H-pirimidino[5,4-b][1,4]tiazin-6-il-(S)-etil]-2,5-tienoil-L-glutámico, aminopterina, 5-fluorouracilo, alanosina, éster 11-acetil-
 10 8-(carbamoiloximetil)-4-formil-6-metoxi-14-oxa-1,11-diazatetraciclo(7.4.1.0.0)-tetradeca-2,4,6-trien-9-ílico del ácido acético, swainsonina, lometrexol, dexrazoxana, metioninasa, 2'-ciano-2'-desoxi-N4-palmitoil-1-B-D-arabinofuranosilcitosina y tiosemicarbazona de 3-aminopiridin-2-carboxaldehído.

Los "agentes antiproliferativos" también incluyen anticuerpos monoclonales para factores de crecimiento, distintos de
 15 los indicados bajo "inhibidores de la angiogénesis", tales como trastuzumab, y agentes supresores de tumores, tales como p53, que pueden administrarse por medio de transferencia génica mediada por virus recombinante (véase la patente estadounidense n.º 6.069.134, por ejemplo).

Algunos ejemplos específicos de inhibidores de la tirosina cinasa incluyen N-(trifluorometilfenil)-5-metilsoxazol-4-
 20 carboxamida, 3-[(2,4-dimetilpirrol-5-il)metilidenil]indolin-2-ona, 17-(alilamino)-17-desmetoxigeldanamicina, 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxil]-quinazolina, N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina, 2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-(hidroximetil)-10-hidroxi-9-metil-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-1-ona, SH1382, genisteína, sulfonato de 4-(3-clorofenilamino)-5,6-dimetil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidinametano, 4-(3-bromo-4-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina, 4-(4'-hidroxifenil)amino-6,7-
 25 dimetoxiquinazolina, N-4-clorofenil-4-(4-piridilmetil)-1-ftalazinamina y Tarceva® (erlotinib).

Si se formula como una dosis fija, tales productos de combinación emplean los compuestos de esta invención dentro del intervalo de dosificación descrito a continuación y el/los otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s) dentro de su intervalo de dosificación aprobado. Los compuestos de la presente invención pueden usarse alternativamente de
 30 manera secuencial con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocido(s) cuando una formulación de combinación es inapropiada.

El término "administración" (por ejemplo, "administrar" un compuesto) en referencia a un compuesto de la invención significa introducir el compuesto en el sistema del animal que necesita tratamiento. Cuando se proporciona un
 35 compuesto de la invención en combinación con uno o más de otros agentes activos (por ejemplo, un agente citotóxico, etc.), "administración" y sus variantes se entiende cada uno que incluyen introducción simultánea y secuencial del compuesto o profármaco del mismo y otros agentes.

El término "tratar cáncer" o "tratamiento de cáncer" se refiere a la administración a un mamífero que padece un estado
 40 canceroso y se refiere a un efecto que alivia el estado canceroso destruyendo las células cancerosas, pero también a un efecto que da como resultado la inhibición del crecimiento y/o metástasis del cáncer.

Cuando se administra un compuesto según esta invención a un sujeto humano, la dosificación diaria la determinará el
 45 médico prescriptor, variando la dosificación generalmente según la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, así como la gravedad de los síntomas del paciente.

En una aplicación a modo de ejemplo, se administra una cantidad adecuada de compuesto a un mamífero que se somete a tratamiento para el cáncer. La administración se produce en una cantidad desde aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal hasta más de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día; desde
 50 aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal al día; desde aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal al día; o de 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día. Estas dosificaciones pueden usarse más particularmente por vía oral.

Aunque pueden aplicarse a una amplia variedad de cánceres, estos métodos pueden aplicarse, por ejemplo, a
 55 cánceres en los que la administración de agentes citotóxicos es parte de las prácticas de tratamiento aceptadas, por ejemplo cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer del SNC, cáncer de piel, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de mama, leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza, cáncer de cuello o cáncer de riñón. Más normalmente, el cáncer puede ser cáncer de mama, leucemia aguda, leucemia crónica, cáncer colorrectal o leucemia cerebral. El cáncer puede ser un carcinoma. El carcinoma puede seleccionarse de carcinomas de células
 60 pequeñas, carcinomas de cuello uterino, glioma, astrocitoma, carcinomas de próstata, carcinomas de ovario, melanoma, carcinomas de mama o carcinomas colorrectales. Los compuestos de la presente invención pueden incluso ser más particularmente útiles en el tratamiento de carcinoma de pulmón, carcinoma de cuello uterino, adenocarcinoma, glioma, leucemia promielocítica, leucemia de células T, neuroblastoma, linfoma, cáncer pancreático y LLA.
 65

Puede usarse cualquier combinación de dosis. La combinación puede usarse secuencial o simultáneamente.

Modelos en 3D

5 En las realizaciones, la invención se refiere al uso de células cultivadas en 3D para IRM para determinar el efecto de una composición o compuesto terapéutico sobre las células. La IRM utilizada puede ser ^1H y/o ^{19}F IRM. La composición o fármaco terapéutico puede comprender cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento. El método puede comprender hacer crecer células cultivadas en 3D; introducir la composición o compuesto terapéutico; y monitorizar el efecto de la composición o compuesto terapéutico sobre las células usando IRM.

10 En realizaciones específicas, se examinó la dinámica del crecimiento de células linfoblastoides T (CEM) influida por derivados de colchicina en cultivos celulares tridimensionales (3D). También pueden hacerse crecer otras células cancerosas de esta manera y examinarse, por ejemplo, CCRF-CEM (leucemia), HL-60(TB) (leucemia), K-562 (leucemia), MOLT-4 (leucemia), RPMI-8226 (leucemia), SR (leucemia), A549/ATCC (pulmón de células no pequeñas), EK VX (pulmón de células no pequeñas), HOP-62 (pulmón de células no pequeñas), HOP-92 (pulmón de células no pequeñas), NCI-H226 (pulmón de células no pequeñas), NCI-H23 (pulmón de células no pequeñas), NCI-H322M (pulmón de células no pequeñas), NCI-H460 (pulmón de células no pequeñas), NCI-H522 (pulmón de células no pequeñas), COLO 205 (colon), HCC-2998 (colon), HCT-116 (colon), HCT-15 (colon), HT29 (colon), KM12 (colon), SW-620 (CNS), SF-268 (CNS), SF-295 (CNS), SF-539 (CNS), SNB-19 (CNS), SNB-75 (CNS), U251 (CNS) (melanoma), LOX IMVI (melanoma), MALME-3M (melanoma), M14 (melanoma), MDA-MB-435 (melanoma), SK-MEL-2 (melanoma), SK-MEL-28 (melanoma), SK-MEL-5 (melanoma), UACC-257 (melanoma), UACC-62 (melanoma), IGR-OV1 (de ovario), OVCAR-3 (de ovario), OVCAR-4 (de ovario), OVCAR-5 (de ovario), OVCAR-8 (de ovario), NCI/ADR-RES (de ovario), SK-OV-3 (de ovario), 786-0 (renal), A498 (renal), ACHN (renal), CAKI-1 (renal), RXF 393 (renal), SN12C (renal), TK-10 (renal), UO-31 (renal), PC-3 (próstata), DU-145 (próstata), MCF7 (mama), MDA-MB-231/ATCC (mama), HS 578T (mama), MDA-N (mama), BT-549 (mama), T-47D (mama), DLD-1 (colon), KM20L2 (colon), SNB-78 (CNS), XF 498 (CNS), RPMI-7951 (melanoma), M19-MEL (melanoma), RXF-631 (renal), SN12K1 (renal), MDA-MB-468 (mama), P388 (leucemia) y P388/ADR (leucemia).

30 En una realización, las células se cultivaron en un biorreactor de fibras huecas (HFB), se usó ^1H y ^{19}F IRM para monitorizar cambios en los cultivos de células en 3D. Se usó ^{19}F IRM para visualización de la captación intracelular de derivados de flúor en los cultivos de células en 3D. Se investigaron células CEM de las que se obtuvo un perfil antes y después del tratamiento con cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-UV). La viabilidad de las células se comparó con la eficacia de los compuestos descritos en el presente documento *ex vivo*. El uso de HFB permitió la formación de tejido canceroso de alta densidad para un estudio de IRM *ex vivo*. En el cuerpo humano, el tumor de CEM existe en un entorno 3D, sin embargo, los cultivos celulares monocapa convencionales usados en estudios biológicos y toxicológicos son bidimensionales (2D). Los experimentos *ex vivo* descritos en el presente documento apoyan la monitorización no invasiva de la liberación de fármaco *ex vivo*.

40 En determinadas realizaciones, los derivados fluorados de referencia comprendían modificaciones en la posición C-7 ((28) a (38) y (47) a (49)). Se compararon las propiedades de estos compuestos y proporcionan una nueva visión sobre el mecanismo de interacción con derivados de colchicina *ex vivo*. Puesto que ^{19}F IRM permite la detección de captación de captación derivados de flúor, se realizó cuantificación de las células *ex vivo* y se midió la viabilidad de celular usando azul de tripano. Además, la técnica de IRM usada en este estudio era adecuada para múltiples mediciones repetidas para observar cambios dinámicos en respuesta al tratamiento y proporcionó características no invasivas del tumor en 3D *ex vivo*.

50 El efecto de los derivados presentados en el presente documento mejoró la CI_{50} y provocó la supresión de tumores sólidos. La falta de interés clínico en la colchicina (1) surge de su toxicidad. Sin limitarse a la teoría, pueden presentarse diversos argumentos, por ejemplo, duración de la exposición a análogos de colchicina (2-38), interacción entre células, metabolización de fármaco para explicar la diferencia en la viabilidad celular que se corresponde con la inhibición de crecimiento usando los análogos preparados. El derivado fluorado (28-38) presentó alta potencia antagonista sobre el crecimiento celular en 3D. El uso de ^1H IRM proporciona una posible herramienta para el estudio de la viabilidad y la eficacia del tratamiento de las células CEM. En las células CEM estudiadas, el ^{19}F SI aumentó debido a la captación de ^{19}F , sin embargo las células que se tratan ventajosamente ya no son viables para ensayos con azul de tripano. Por tanto, mediciones combinadas de viabilidad usando azul de tripano y captación de fármaco usando ^{19}F SI dieron un número de células total que es igual al número de células antes del tratamiento.

60 Considerando la técnica aplicada, HPLC ha demostrado ser particularmente eficaz en las determinaciones de proteína apoptótica incluso en bajas concentraciones. Además, HPLC de fase inversa es un método fiable para la separación de un gran número de proteínas y péptidos con alta reproducibilidad. Por tanto, se estableció un procedimiento de fraccionamiento para enriquecer proteínas menos abundantes usando RP HPLC. Se ha sugerido que la viabilidad celular provocada por apoptosis es un factor principal en la muerte celular en el tratamiento de tumores malignos, tales como linfoma. En particular, el perfil de HPLC explica por qué esa célula inviable que expresa receptores específicos se produjo principalmente en células tratadas. También se ha informado que el antígeno Tn determinado se expresa en más del 70% de células de carcinoma humano.

65

¹⁹F IRM y HPLC-UV son adecuados para la monitorización de células viables e inviables antes y después de los tratamientos.

En realizaciones más específicas, las células linfoblastoides T cultivadas *ex vivo* (CEM) responden a tiocolchicina sintetizada y derivados de tiocolchicina de flúor. Estos compuestos se examinaron en células CEM *ex vivo* usando obtención de imágenes de resonancia magnética de ¹H y ¹⁹F y espectroscopía (IRM/S) así como espectrometría de masas con impacto de electrones (IE-EM) y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con ultravioleta (HPLC-UV). La morfología del cultivo de células CEM tridimensional (3D) durante el tratamiento se monitorizó usando un sistema de IRM de 9,4 Tesla.

Las concentraciones eficaces de los derivados descritos en el presente documento requeridas para inducir el bloqueo del crecimiento en células CEM fueron relativamente bajas, en el intervalo de nM. Además, los derivados fluorados tienen una mayor potencia que sus homólogos no fluorados y son más hidrófobos y tienen mayor ingesta intracelular. Sin embargo, los derivados no fluorados son todavía eficaces. Usando técnicas de ¹⁹F IRM no invasivas, la captación de fármaco que contiene flúor *ex vivo* y la supresión de células cancerosas resultaron en el plazo de 72 horas después de la administración del fármaco.

El modelo en 3D de un tumor es un modelo muy útil para monitorizar el crecimiento celular. En cultivo celular, un compuesto está en contacto directo con las células, y su concentración es constante durante su tiempo de acción. El cambio en la concentración se produce sólo con compuestos lábiles o mediante una interacción con las células. Además, los métodos de cultivo convencionales producen concentraciones celulares más bien bajas, que son difíciles o imposibles de detectar con IRM mientras que en 3D proporcionan una concentración lo suficientemente alta. IRM puede identificar regiones suprimidas de células tratadas. Además, IRM puede dar una visión de los efectos del tratamiento dentro de un tumor a lo largo del transcurso de tratamiento.

Sitios de unión de colchicina a β -tubulina

Los microtúbulos son la diana principal de muchos fármacos anticancerígenos ventajosos, la mayoría de los cuales se unen específicamente a β -tubulina. Los modelos de los cinco isotipos de β -tubulina humana más prevalentes se han determinado y se ha identificado el sitio de unión de colchicina en el presente documento como el más prometedor para el diseño de fármacos basándose en la especificidad del isotipo. Usando este sitio de unión como molde, los derivados de colchicina descritos en el presente documento se sondaron computacionalmente para determinar la afinidad a los isotipos de β -tubulina. Estos compuestos presentaron una CI_{50} mucho menor que los valores previamente informados para o bien colchicina o bien paclitaxel. Hay una correlación entre predicciones de unión computacionales y valores de CI_{50} , lo que demuestra la utilidad de la detección computacional en el diseño de más derivados de colchicina eficaces.

Se ha examinado la unión de colchicina. La secuencia de residuos que constituyen el sitio de unión de colchicina muestra la mayor variación (77,8% de identidad) entre todos los isotipos de tubulina humana (Huzil J.T. *et al.*, *Nanotechnology*. 2006;17:S90-S100). Se ha mostrado previamente que este sitio de unión interacciona con varios compuestos naturales incluyendo colchicinoides, los bencimidazoles (Laclette J.P. *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*. 1980; 92:417-23; Tahir S.K., *Biotechniques*. 2000; 29:156-60; Russell G.J. *et al.*, *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1995; 35:1153-9; y Hoebeke J. *et al.*, *Biochem Biophys. Res. Commun*. 1976; 69:319-24) y podofilotoxina (Ravelli R.B. *et al.*, *Nature*. 2004; 428:198-202) haciéndolos susceptible a varias conformaciones de unión (Garland D.L., *Biochemistry*. 1978; 17:4266-72; Sackett D.L. *et al.*, *Biochemistry*, 1993; 32:13560-5; Andreu J.M. *et al.*, *Biochemistry*. 1982; 21:6465-76; Chaudhuri A.R. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2000; 303:679-92). La colchicina tiene una actividad antimitótica extremadamente fuerte que sólo se observa en niveles tóxicos o casi tóxicos, aunque se limita su uso como tratamiento contra el cáncer, se usa en el presente documento como patrón para la comparación de compuestos similares con selectividad aumentada hacia isotipos de tubulina expresados en células cancerosas.

Se diseñó una serie de derivados con modificaciones para reducir la unión a tubulina mediante interacciones de Van der Waals aumentadas, mientras que la segunda serie de derivados incorporaba modificaciones diseñadas para aumentar la unión a tubulina. Los ensayos de citotoxicidad y detección computacional demostraron que se encontró que los derivados de colchicina de mayor afinidad eran superiores a la colchicina en sus efectos contra líneas de células cancerosas, sin embargo, los otros eran eficaces contra líneas celulares cancerosas sin la desventaja de la toxicidad de colchicina.

Aunque hay una multitud de información estructural respecto a las interacciones de tubulina con varios ligandos, la conformación de tubulina decae a lo largo del tiempo y la unión de un fármaco puede en sí provocar cambios conformacionales significativos dentro de la propia proteína (Luduena R.F. *et al.*, *Biochem*. 1995; 34:15751-9; Chaudhuri A.R. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2000; 303:679-92; y Schwarz P.M. *et al.*, *Biochem*. 1998; 37:4687-92). Las predicciones de modelado que usan una conformación particular y fija de un sitio de unión pueden, por tanto, no ser fiables. Esto es especialmente cierto para la unión de colchicina, donde la β -tubulina en su forma no unida muestra una ausencia completa de la cavidad de unión de colchicina (Nogales E. *et al.*, *Nature*. 1995; 375:424-7). Con el fin de superar esta limitación, en primer lugar, se han creado tres modelos representativos del sitio de unión de colchicina

tal como se encuentra en todos los isotipos de β -tubulina humana. En segundo lugar, se ha realizado un procedimiento de acoplamiento sistemático, que intenta mostrar el espacio conformacional del sitio de unión de colchicina a través de un método de apareamiento simulado.

5 Usando métodos de modelado computacional, se han introducido varias modificaciones a la colchicina en un intento por diseñar un sistema de modelo que puede aumentar la especificidad para isotipos de β -tubulina expresados en células cancerosas. Para examinar las diferencias entre isotipos, se sondó una cavidad ubicada por debajo de la colchicina unida en la estructura cristalina. En particular, se sintetizaron varios derivados de C3-desmetiltiocolchicina y derivados de C1-desmetilcolchicina.

10 En general, el grupo de "afinidad superior" de los derivados (posición C3) dio mejores resultados de citotoxicidad que el grupo de "afinidad inferior" (posición C1). Sin embargo, ambos grupos fueron eficaces. Era coherente que los compuestos de referencia (8), (7), (7a) y (9) fueron moderadamente mejores que la colchicina en ensayos de citotoxicidad y (40), (42), (43), (50), (51), (53) y (54) fueron de manera uniforme los más eficaces. Pequeñas modificaciones no polares en la posición C1 tuvieron mejor unión general que la colchicina, mientras que modificaciones no polares de cadena lineal en la posición C3 en tiocolchicina fueron de manera uniforme mucho mejores que la colchicina. Se produjo una correlación significativa que podría implicar un único derivado de colchicina para poder diferenciar entre isotipos, la distribución de tipos de sitio de unión de colchicina (tipo-I y tipo-III) sigue la función esperada de los isotipos de tubulina en tanto resistencia a quimioterapia como desarrollo de cáncer, en donde los isotipos β III y β V están implicados. El derivado más potente (43) tenía una CI_{50} de $2,13 \pm 0,77$ nM, un valor que era al menos 15 veces inferior al informado previamente para o bien colchicina o bien paclitaxel (Cragg G.M. *et al.*, Anticancer agents from natural products. CRC Press; 2005).

25 En última instancia, los fármacos específicos de los isotipos de tubulina deben presentar menos efectos secundarios que sus homólogos actualmente recetados. Esto es porque se unirán a y alterarán los microtúbulos sólo en células que expresan un isotipo de β -tubulina particular asociado con desarrollo o progresión de cáncer. Estos resultados también sugieren que el modelado es probable que genere mejores fármacos y que el diseño de fármaco racional es posible con tubulina.

30 Cuando se introducen elementos dados a conocer en el presente documento, los artículos "un", "una", "el/la" y "dicho/a" se pretende que significan que hay uno o más de los elementos.

35 La divulgación anterior describe en general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen solo con fines de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Se contemplan cambios en la forma y sustitución de equivalentes dado que las circunstancias pueden sugerir o hacerlo conveniente. Aunque se han empleado términos específicos en el presente documento, tales términos se pretenden en un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

40 Ahora se describirán algunas características opcionales de la invención.

45 En los compuestos mostrados en la fórmula I y X, R^2 y R^3 pueden seleccionarse cada uno independientemente de un alquilo sustituido o no sustituido, CH_2OH , un haloalquilo sustituido o no sustituido, un hidroxialquilo sustituido o no sustituido, un cianoalquilo sustituido o no sustituido, un alquenoil sustituido o no sustituido, un alquinoil sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un cicloalquenoil sustituido o no sustituido, un alquilcicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilcicloalquenoil sustituido o no sustituido, un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalquenoil sustituido o no sustituido, un alquilheterocicloalquenoil sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo, alquilen-O-cicloalquilo, alquilen-O-heterocicloalquilo, alquilen-O-alquilen-cicloalquilo o alquilen-O-alquilen-heterocicloalquilo.

En los compuestos mostrados en la fórmula I y X, R^2 y R^3 pueden seleccionarse cada uno independientemente de un alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido, un alquenoil C_2 - C_6 sustituido o no sustituido o alquilen-O-alquilo C_1 - C_6 .

55 Los compuestos de fórmula pueden unirse a β -tubulina en el sitio de unión de colchicina. El compuesto puede tener una energía de unión que es menor que la energía de unión de colchicina.

Ejemplos

60 Materiales y métodos

65 Todos los compuestos químicos y la colchicina, N-[(7S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (1), usados en los estudios se adquirieron de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canadá).

Los compuestos (89) a (94) son de la invención reivindicada. Los compuestos restantes son ejemplos de referencia.

Síntesis de los compuestos de colchicina

5 Véanse las figuras 1-3 para los esquemas de síntesis.

N-[(7S)-2,3,10-Trimetoxi-1-((metil)carboniloxi)-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (2) y N-[(7S)-1-hidroxi-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (3). La síntesis de (2) y (3) se adaptó a partir de Blade-Font (A. Blade-Font, Afinidad, 36 (1979) 329-331) y se presenta en la figura 1.

10 N-[(7S)-1-((Etil)carboniloxi)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (4) y N-[(7S)-1-(((metil)etil)carboniloxi)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (5).

15 Se disolvió 1 mmol de (2) en 2,5 ml de disolución de hidróxido de sodio. Se enfrió la disolución hasta 0°C. Se disolvió 1 mmol de CH₃CH₂COCl o (CH₃)CH(CH₃)COCl en 3,5 ml de acetona, y se añadió a los compuestos (4) o (5). Se permitió que la disolución estuviese en reposo durante 15 h y luego se añadieron 25 ml de agua alcalina. Se usó cloroformo para extraer el producto resultante y secado sobre sulfato de magnesio. Las síntesis de (4) y (5) se presentan en la figura 2.

20 N-[(7S)-1-(Etoxi)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (6);

N-[(7S)-1-(etoxi-1-metil)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (7);

25 N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-1-(2-metilpropoxi)-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (7a);

N-[(7S)-1-(butoxi)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (7b);

N-[(7S)-1-((but(3-en)oxi)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (7c);

30 N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-(propanoxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (8);

N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-((prop(2-en)oxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (9);

35 N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-((fenil)metoxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (10);

N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-(((3-metoxi)propan)oxi)(3-metoxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (11);

40 N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-((fenil(3-cloro))metoxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (12);

N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-((piridin(3)il)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (13);

N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-((fenil(2-cloro))metoxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (14);

45 N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-9-oxo-1-((fenil(4-cloro))metoxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (15);

N-[(7S)-2,3,10-trimetoxi-1-((metil)ciclohexano)-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (16).

50 Se disolvió 1 mmol de (2) compuesto en 2,5 ml de disolución de hidróxido de sodio y se enfrió la disolución hasta 0°C. Se disolvió 1 mmol de derivados de bromuro (por ejemplo 1-bromoetano para (6), 2-bromopropano para (7), 1-bromo-2-metilpropano para (7a), 1-bromo-butano para (7b), 4-bromobut-1-eno para (7c), 1-bromopropano para (8), 3-bromoprop-1-eno para (9), (bromometil)benceno para (10), 1-metoxi-2-bromoetano para (11), 1-bromometil-3-clorobenceno para (12), 3-(bromometil)piridina para (13), 1-bromometil-2-clorobenceno para (14), 1-bromometil-4-clorobenceno para (15) y (bromometil)ciclohexano para (16)) en 3,5 ml de acetona. Se permitió que cada disolución estuviese en reposo durante 15 h. Luego se añadieron 25 ml de agua alcalina. Se usó cloroformo para extraer el compuesto, que se secó sobre sulfato de magnesio. Las síntesis de los compuestos de referencia (6-16) se presentan en la figura 3.

Procedimiento general para la preparación de N-desacetil-N-(N-trifluoroacetilaminoacil)colchicina:

60 Se calentaron 3 mmol del derivado (6-16) en metanol (50 ml) y HCl 2 N (25 ml) a 90°C con agitación durante 1 día. Se enfrió la mezcla de reacción y se neutralizó con NaHCO₃. Se extrajo el producto con cloruro de metileno y se lavó con salmuera. Se secó el extracto sobre Na₂SO₄ y se evaporó. Se cristalizaron los compuestos desacetilados (17-27) en CH₂Cl₂.

65

Se disolvió 1 mmol del compuesto desacetilado (17-27) y ácido [(trifluoroacetil)amino]acético (1 mmol) a temperatura ambiente en diclorometano (6 ml). Se añadió dicitclohexilcarbodiimida (1 mmol). Después de 2 h, se enfrió la suspensión hasta 0°C y se filtró. Se cromatografiaron los productos (28-38) en columna de gel de sílice eluyendo con diclorometano/metanol (de 1:0 a 0:1). Se realizó la cristalización de (28-38) con diclorometano:etil éter (1:1). Todos los compuestos excepto por los compuestos 89-94 son compuestos de referencia.

Análisis analítico

(2) C(23)H(25)O(7)N(1); requiere M, 427, hallado mediante EI-EM m/e 427,1 (M⁺); (3) C(21)H(23)O(6)N(1); requiere M, 385, hallado mediante EI-EM m/e 385,1 (M⁺); (4) C(24)H(27)O(7)N(1); requiere M, 441, hallado mediante EI-EM m/e 441,1 (M⁺); (5) C(25)H(29)O(7)N(1); requiere M, 455 hallado mediante EI-EM m/e 455,0 (M⁺); (6) C(23)H(27)O(6)N(1); requiere M, 413, hallado mediante EI-EM m/e 413,1 (M⁺); anál. calc. C% 66,83, H% 6,55, N% 23,22 hallado: C% 66,82, H% 6,54, N% 23,22; (7) C(24)H(29)O(6)N(1); requiere M, 427, hallado mediante EI-EM m/e 427,1 (M⁺); anál. calc. C% 67,44, H% 6,77, N% 3,22, hallado: C% 67,41, H% 6,73, N% 3,21; (8) C(24)H(29)O(6)N(1); requiere M, 427, hallado mediante EI-EM m/e 427,1 (M⁺); anál. calc. C% 67,44, H% 6,79, N% 32,78, hallado: C% 67,44, H% 6,80, N% 32,77; (9) C(24)H(27)O(6)N(1); requiere M, 425, hallado mediante EI-EM m/e 425,1 (M⁺); anál. calc. C% 67,76, H% 6,35, N% 3,29 hallado: C% 67,77, H% 6,33, N% 3,28; (10) C(28)H(28)O(6)N(1); requiere M, 475, hallado mediante EI-EM m/e 475,2 (M⁺); anál. calc. C% 70,88, H% 5,91, N% 2,95 hallado: C% 70,87, H% 5,92, N% 2,93; (11) C(24)H(29)O(7)N(1); requiere M, 443, hallado mediante EI-EM m/e 443,1 (M⁺); anál. calc. C% 65,01, H% 6,54, N% 3,16 hallado: C% 65,02, H% 6,53, N% 3,11; (12) C(28)H(27)O(6)N(1)Cl(1); requiere M, 509, hallado mediante EI-EM m/e 509,1 (M⁺); anál. calc. C% 71,04, H% 6,13, N% 2,93 hallado: C% 71,05, H% 6,12, N% 2,95; (13) C(27)H(28)O(6)N(2); requiere M, 476, hallado mediante EI-EM m/e 476,1 (M⁺); anál. calc. C% 68,06, H% 5,88, N% 5,88, hallado: C% 68,09, H% 5,86, N 5,89%; (14) C(28)H(28)O(6)N(1)Cl(1); requiere M, 509, hallado mediante EI-EM m/e 509,1 (M⁺); anál. calc. C% 66,01, H% 5,50, N% 2,94, Cl% 6,87 hallado: C% 66,03, H% 5,51, N% 2,95, Cl% 6,88; (15) C(24)H(29)O(7)N(1); requiere M, 509, hallado mediante EI-EM m/e 509,1 (M⁺); anál. calc. C% 65,01, H% 6,09, N% 3,16, Cl% 7,90, hallado: C% 65,02, H% 6,07, N% 3,10, Cl% 7,92; (16) C(28)H(34)O(6)N(1); requiere M, 495, hallado mediante EI-EM m/e 495,2 (M⁺); anál. calc. C% 70,02, H% 7,09, N% 2,91 hallado: C% 70,04, H% 7,08, N% 2,93; (17) C(21)H(25)O(5)N(1); anál. calc. C% 67,92, H% 7,27, N% 3,77 hallado: C% 67,93, H% 7,28, N% 3,78; (18) C(22)H(27)O(5)N(1) anál. calc. C% 68,57, H% 7,01, N% 3,77 hallado: C% 68,59, H% 7,03, N% 3,79; (19) C(22)H(27)O(5)N(1); anál. calc. C% 68,63, H% 7,04, N% 3,78 hallado: C% 68,62, H% 7,05, N% 3,79; (20) C(22)H(25)O(5)N(1); anál. calc. C% 68,92, H% 6,52, N% 3,65 hallado: C% 68,94, H% 6,53, N% 3,67; (21) C(26)H(26)O(5)N(1); anál. calc. C% 72,22, H% 6,01, N% 3,24 hallado: C% 72,21, H% 6,04, N% 3,23; (22) C(22)H(27)O(6)N(1); anál. calc. C% 65,83, H% 6,73, N% 3,49 hallado: C% 65,82, H% 6,73, N% 3,48; (23) C(26)H(25)O(5)N(1)Cl(1); anál. calc. C% 66,95, H% 5,36, N% 3,02, Cl 7,51 hallado: C% 66,93, H% 5,34, N% 3,01, Cl 7,53; (24) C(22)H(26)O(5)N(1); anál. calc. C% 81,25, H% 6,77, N% 3,64 hallado: C% 81,26, H% 6,78, N% 3,66; (25) C(26)H(26)O(5)N(1)Cl(1); anál. calc. C% 66,80, H% 5,56, N% 2,99, Cl% 7,49, hallado: C% 66,81, H% 5,55, N% 2,98, Cl% 7,48; (26) C(22)H(27)O(5)N(1); anál. calc. C% 77,92, H% 7,01, N% 3,63, hallado: C% 77,93, H% 7,03, N% 3,65; (27) C(26)H(32)O(5)N(1); anál. calc. C% 71,23, H% 7,30, N% 3,19 hallado: C% 71,22, H% 7,32, N% 3,20; (28) C(25)H(27)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 57,25, H% 5,15, N% 5,18, F% 10,85, hallado: C% 57,25, H% 4,99, N% 5,34, F% 10,86; (29) C(26)H(29)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 57,99, H% 5,39, N% 5,20, F% 10,59 hallado: C% 56,38, H% 5,3, N% 5,3, F% 10,87; (30) C(26)H(29)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 57,99, H% 5,39, N% 5,20, F% 10,59, hallado: C% 57,58, H% 5,32, N% 5,28, F% 10,59; (31) C(26)H(27)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 57,99, H% 5,39, N% 5,20, F% 10,56, hallado: C% 57,99, H% 5,88, N% 5,28, F% 10,55; (32) C(30)H(28)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 59,92, H% 4,66, N% 4,65, F% 9,46, hallado: C% 59,71, H% 4,65, N% 4,37, F% 9,49; (33) C(26)H(29)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 57,99, H% 5,39, N% 5,20, F% 10,59 hallado: C% 56,38, H% 5,21, N% 4,68, F% 9,55; (34) C(30)H(27)O(7)N(2)Cl(1)F(3); anál. calc. C% 56,77, H% 4,28, N% 4,13, F% 8,41, hallado: C% 56,74, H% 4,29, N% 4,12, F% 8,43; (35) C(26)H(27)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 58,20, H% 4,86, N% 4,69, F% 9,56, hallado: C% 58,12, H% 4,87, N% 4,69, F% 9,57; (36) C(30)H(28)O(7)N(2)Cl(1)F(3); anál. calc. C% 58,06, H% 4,15, N% 4,12, F% 8,41 hallado: C% 58,06, H% 4,14, N% 4,13, F% 8,40; (37) C(26)H(28)O(7)N(2)Cl(1)F(3); anál. calc. C% 54,54, H% 4,87, N% 4,73, F% 9,25, hallado: C% 54,53, H% 4,88, N% 4,72, F% 9,26; (38) C(30)H(34)O(7)N(2)F(3); anál. calc. C% 60,91, H% 5,75, N% 4,73, F% 9,64, hallado: C% 60,79, H% 5,67, N% 4,63, F% 9,67.

Síntesis de los compuestos de tiocolchicina (figura 4) (todos compuestos de referencia)

55 Tiocolchicina, N-[(7S)-1,2,3-trimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (39): se disolvió la colchicina (1) (1 mmol) en 10 ml de metanol/dimetilformamida (1:1) a 70-80°C. Se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente y se añadió metanotiolato de sodio (2 mmol). Se agitó la disolución de mezcla durante la noche. Se añadió agua (20 ml), y se extrajo la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (10 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. La cristalización del residuo en etil éter/acetona (1:1) dio el producto (39) con un rendimiento del 71%.

60 N-[(7S)-3-Hidroxi-1,2-dimetoxi-3-hidroxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (40): se usaron 10 ml de metanol para disolver 1 mmol de tiocolchicina (39) y se añadieron 30 ml de 0,2 N de ácido clorhídrico. Se evaporó el metanol, se enfrió y se añadió disolución de hidróxido de sodio hasta que el valor de pH fue de 11 y se extrajo la disolución alcalina resultante con cloroformo para liberarla de sustancias no fenólicas. Se acidificó la disolución de hidróxido de sodio (de color rojo) con ácido clorhídrico y se extrajo con cloroformo. Después de secado y evaporación, el rendimiento de (40) fue del 58%.

5 N-[(7S)-1,2-Dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-3-(prop(2-en)oxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (41),
 N-[(7S)-3-etoxi-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (42) y N-[(7S)-3-
 propoxi-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]acetamida (43): se disolvió 1 mmol
 de compuesto (40) en 2,5 ml de disolución 1 N de hidróxido de sodio. Se enfrió la disolución resultante hasta 0°C y se
 disolvió 3-bromoprop-1-eno (1 mmol) para obtener el compuesto (41); 1-bromoetano (1 mmol) para obtener el
 compuesto (42); o 1-bromopropano (1 mmol) para obtener el compuesto (43), en 3,5 ml de acetona y se añadió a la
 disolución enfriada. Se permitió que la disolución estuviese en reposo durante 15 h y luego se añadieron 25 ml de
 agua alcalina. Se usó cloroformo para extraer el producto resultante y secado sobre sulfato de magnesio. El
 10 rendimiento de (41) fue del 68% y el rendimiento de (42) fue del 71%.

Una preparación de la N-desacetil-N-(N-trifluoroacetilaminoacil)tiocolchicina:

15 N-[(7S)-3-Hidroxi-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]amina (44);

N-[(7S)-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-3-(prop(2-en)oxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]amina (45);

N-[(7S)-3-etoxi-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]amina (46);

20 N-[(7S)-3-hidroxi-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]-N-
 [(trifluoroacetil)glicil]acetamida (47);

N-[(7S)-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-3-(prop-2-enoxi)-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]-N-
 [(trifluoroacetil)glicil]acetamida (48);

25 N-[(7S)-3-etoxi-1,2-dimetoxi-10-metilsulfanil-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[α]heptalen-7-il]-N-
 [(trifluoroacetil)glicil]acetamida (49).

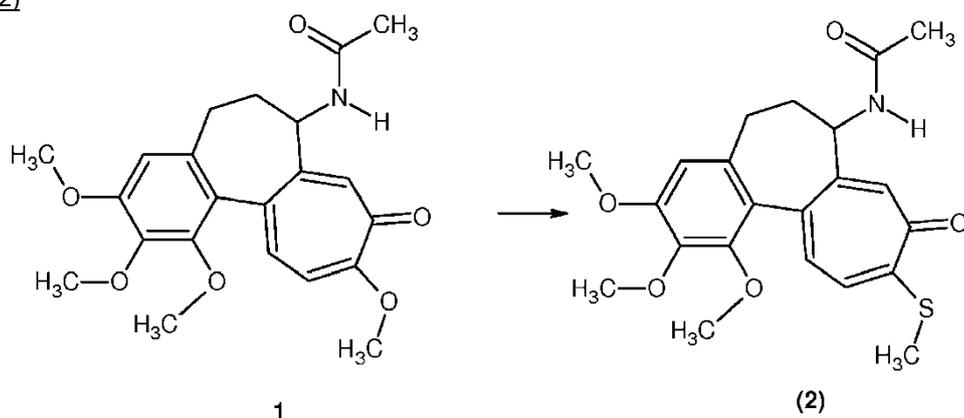
30 Se preparó cada derivado (44-46) y (47-49) de modo similar. Se disolvió 1 mmol del derivado (40) o (41) o (42)
 apropiado en metanol (20 ml) con HCl 2 N (10 ml) y se calentó a 90°C y se agitó durante unas 24 h. Se enfrió la mezcla
 de reacción, se neutralizó con NaHCO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂. Se secó el extracto sobre Na₂SO₄ y se evaporó. La
 cristalización fue en CH₂Cl₂/CH₃OH (1:1). El rendimiento del compuesto desacetilado (44), (45), (46) fue del 58%, el
 63% y el 71%, respectivamente.

35 Se disolvieron 1 mmol del compuesto desacetilado de (44) o (45) o (46) y N-trifluoroacetilaminoácido (1 mmol) a
 temperatura ambiente y se añadió diclorometano (6 ml) con agitación. Se añadió dicitclohexilcarbodiimida (1 mmol) a
 la suspensión y, después de 2 h se enfrió hasta 0°C y se filtró. Se cristalizó cada compuesto (47) o (48) o (49) en
 disolución de diclorometano:etil éter (1:1). El rendimiento de (47), (48) y (49) fue del 64%, el 67% y el 75%,
 respectivamente.

40 Análisis de los compuestos (39), (40-42), (44-46) y (47-49) (compuestos de referencia)

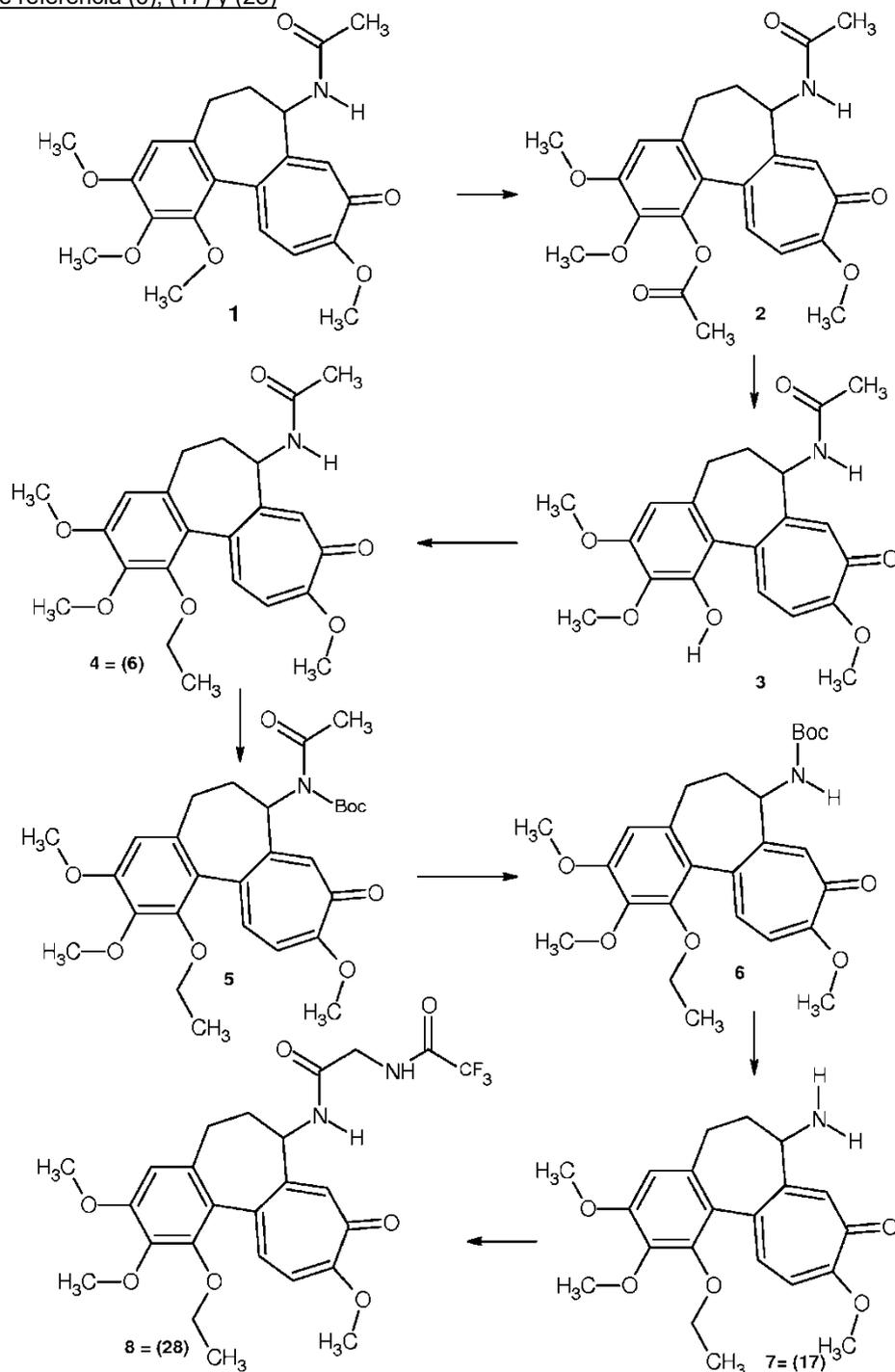
Colchicina (1): p.f. 275 °C; (39): p.f. 250°C-252°C; anál. calc. para C(22)H(25)N(1)O(5)S(1): C% 63,60, H% 6,06, N%
 3,37, S%7,72; hallado: C% 63,71, H% 6,15, N% 3,42, S% 7,79; (40): p.f. 306°C; anál. calc. para
 45 C(21)H(23)O(5)N(1)S(1): C% 62,8, H% 5,8, N% 3,5, S% 8,0, hallado: C% 62,9, H% 5,8, N% 3,3, S% 7,5; requiere M,
 401,1, hallado mediante EI-EM m/e 401,1 (M⁺); (41): p.f. 306°C; anál. calc. para C(24)H(27)O(5)N(1)S(1), C% 65,3,
 H% 6,12, N% 3,17, S% 7,24, hallado: C% 65,07, H% 6,59, N% 3,21, S% 7,28; requiere M, 454,5, hallado mediante
 EI-EM 454,5 (M⁺Na⁺); 442,5; (42): p.f. 273°C; anál. calc. para C(23)H(27)O(5)N(1)S(1), C% 64,33, H% 18,64, N% 3,26,
 S% 7,45, hallado: C% 64,4, H% 18,9, N% 3,27, S% 7,61; requiere M, 452,6, hallado mediante EI-EM 452,6 (M⁺Na⁺);
 50 (44): p.f. 281°C; anál. calc. para C(19)H(21)O(4)N(1)S(1), C% 63,51, H% 5,91, N% 3,88, S% 8,92, hallado: C% 63,55,
 H% 5,83, N% 3,75, S% 8,93; (45): p.f. 254°C; anál. calc. para C(22)H(25)O(4)N(1)S(1), C% 65,8, H% 6,77, N% 3,52,
 S% 7,99, hallado: C% 65,83, H% 6,49, N% 3,63, S% 8,31; (46): p.f. 276°C; anál. calc. para C(21)H(25)O(4)N(1)S(1),
 C% 65,81, H% 6,50, N% 3,6, S% 8,24, hallado: C% 65,12, H% 6,54, N% 3,57, S% 8,27; (47): p.f. 284°C; anál. calc.
 para C(23)H(23)O(6)N(2)S(1)F(3), C% 55,42, H% 4,61, N% 2,92, S% 6,42, F% 11,44 hallado: C% 55,43, H% 4,62,
 55 N% 2,91, S% 6,42, F% 11,44; (48): p.f. 324°C; anál. calc. para C(26)H(27)O(6)N(2)S(1)F(3), C% 56,52, H% 4,89, N%
 5,07, S% 5,79, F% 10,32 hallado: C% 56,52, H% 4,87, N% 7,01, S% 5,79, F% 10,32; (49): p.f. 256°C; anál. calc. para
 C(25)H(27)O(6)N(2)S(1)F(3), C% 57,03, H% 5,13, N% 5,32, S% 6,08, F% 10,87 hallado: C% 53,67, H% 4,5, N% 5,32,
 S% 6,05; F% 10,85.

60 Síntesis específicas de los derivados de colchicina (todos los compuestos excepto por los compuestos 89-94 son
 compuestos de referencia).

Compuesto (2)

5 Se agitó una disolución de 1 (30,0 g) y tioletóxido de sodio (30,0 ml) en agua (2000 ml) a T.A. durante la noche. Se extrajo la disolución de reacción con diclorometano y se concentró la fase orgánica para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (20,0 g, 65%).

Compuestos de referencia (6), (17) y (28)



5 A una disolución de 1 (1,0 g, 2,51 mmol) y cloruro de acetilo (3 ml) se le añadió tetracloruro (1 ml), y se agitó la mezcla a T.A. durante 40 h. Se usó directamente el producto en bruto para la siguiente etapa.

10 Se agitó una disolución de 2 (en bruto) e hidróxido de litio (4 eq.) en metanol/agua a T.A. durante una hora. Se extrajo la fase acuosa y se concentró para dar el producto en bruto. Se obtuvo el producto mediante recrystalización (0,2 g, 21%, dos etapas).

15 Se agitó una mezcla de 3 (800 mg, 2,01 mmol), bromoetano (450 mg, 4,16 mmol) y carbonato de potasio (1,2 g, 8,31 mmol) en DMF (20 ml) a 90°C durante 2 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con acetato de etilo y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,5 g, 60%).

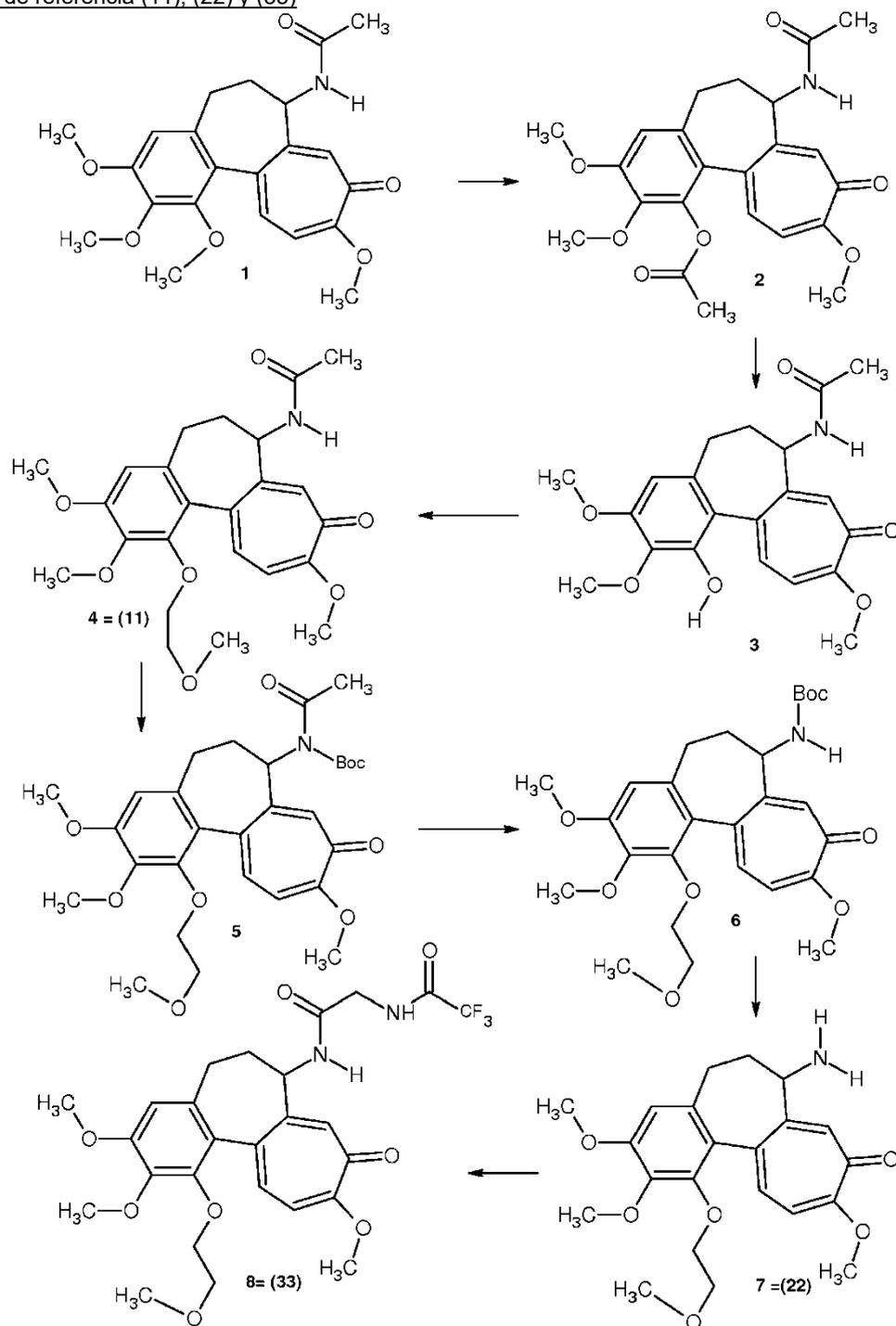
ES 2 745 255 T3

Se puso a reflujo una mezcla de 4 (700 mg, 1,69 mmol), (Boc)₂O (3,7 g, 16,95 mol) y DMAP (83 mg, 0,68 mmol) en THF (15 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

- 5 Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y metóxido de sodio (365,0 mg, 6,76 mmol) en metanol (15 ml) a T.A. durante 2 h. Luego se añadió agua y se extrajo con diclorometano. Se concentraron los extractos para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,6 g).
- 10 Se agitó una disolución de 6 (600 mg, 1,27 mmol) y ácido trifluoroacético (5 ml) en diclorometano (5 ml) a T.A. durante 3 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,45 g, 96%).

- Se agitó una disolución de 7 (50 mg, 0,13 mmol), EDCI (39 mg, 0,20 mmol), HOBT (27 mg, 0,20 mmol), F₃CGlyOH (28 mg, 0,16 mmol) y trietilamina (54 mg, 0,54 mmol) en diclorometano (3 ml) a T.A. durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (22 mg, 31%).
- 15

Compuestos de referencia (11), (22) y (33)



5 A una disolución de 1 (1,0 g, 2,51 mmol) y cloruro de acetilo (3 ml) se le añadió tetracloruro (1 ml), y se agitó la mezcla a T.A. durante 40 h. Se usó directamente el producto en bruto para la siguiente etapa.

10 Se agitó una disolución de 2 (en bruto) e hidróxido de litio (4 eq.) en metanol/agua a T.A. durante una hora. Se extrajo la fase acuosa y se concentró para dar el producto en bruto. Se obtuvo el producto mediante recrystalización (0,2 g, 21%, dos etapas).

15 Se agitó una mezcla de 3 (800 mg, 2,01 mmol), 1-bromo-2-metoxietano (580 mg, 4,16 mmol) y carbonato de potasio (1,15 g, 8,31 mmol) en DMF (20 ml) a 75°C durante 3 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con acetato de etilo y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,5 g, 54%).

ES 2 745 255 T3

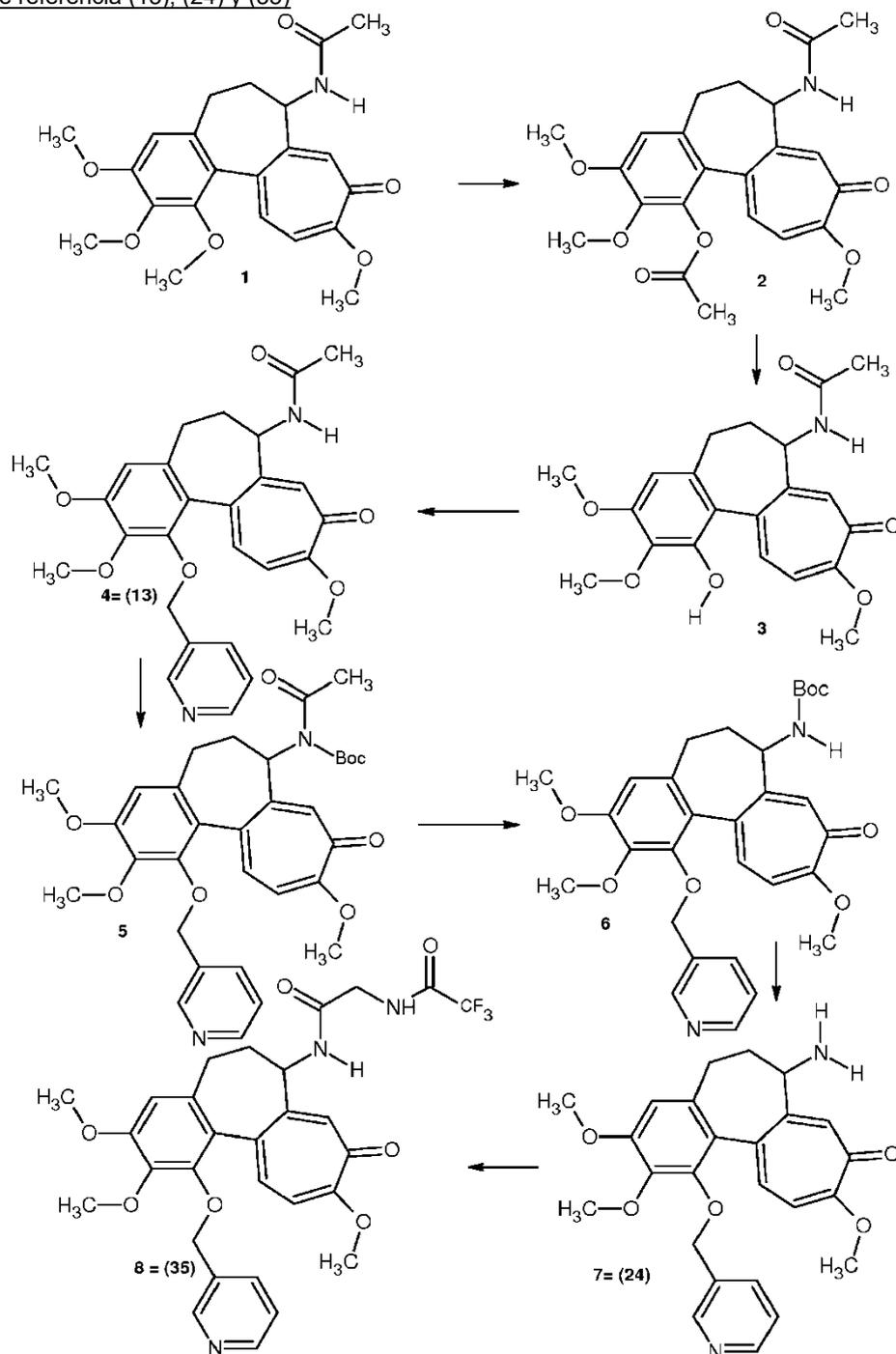
Se puso a reflujo una mezcla de 4 (500 mg, 1,13 mmol), (Boc)₂O (2,5 g, 11,29 mmol) y DMAP (55 mg, 0,45 mmol) en THF (10 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

5 Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y metóxido de sodio (244,0 mg, 4,52 mmol) en metanol (15 ml) a T.A. durante 2 h. Luego se añadió agua y se extrajo con diclorometano. Se concentró el extracto para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,45 g).

10 Se agitó una disolución de 6 (0,6 g, 1,20 mmol) y ácido trifluoroacético (5 ml) en diclorometano (5 ml) a T.A. durante 3 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,45 g, 94%).

15 Se agitó una disolución de 7 (65 mg, 0,16 mmol), EDCI (46 mg, 0,24 mmol), HOBT (32 mg, 0,24 mmol), F₃CGlyOH (42 mg, 0,24 mmol) y trietilamina (65 mg, 0,65 mmol) en diclorometano (3 ml) a T.A. durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (25 mg, 28%).

Compuestos de referencia (13), (24) y (35)



5 A una disolución de 1 (1,0 g, 2,51 mmol), y cloruro de acetilo (3 ml) se le añadió tetracloruro (1 ml), y se agitó la mezcla a T.A. durante 40 h. Se usó directamente el producto en bruto para la siguiente etapa.

10 Se agitó una disolución de 2 (en bruto) e hidróxido de litio (4 eq.) en metanol/agua a T.A. durante una hora. Se extrajo la fase acuosa y se concentró para dar el producto en bruto. Se obtuvo el producto mediante recrystalización (0,2 g, 21%, dos etapas).

15 Se agitó una mezcla de 3 (1,0 g, 2,6 mmol), 3-(clorometil)piridina (0,64 g, 3,9 mmol) y carbonato de potasio (1,08 g, 7,8 mmol) en DMF (20 ml) a 90°C durante 8 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con acetato de etilo y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,7 g, 58%).

Se puso a reflujo una mezcla de 4 (700 mg, 1,47 mmol), (Boc)₂O (3,2 g, 14,71 mol) y DMAP (72 mg, 0,59 mmol) en

THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto (0,7 g, 87%).

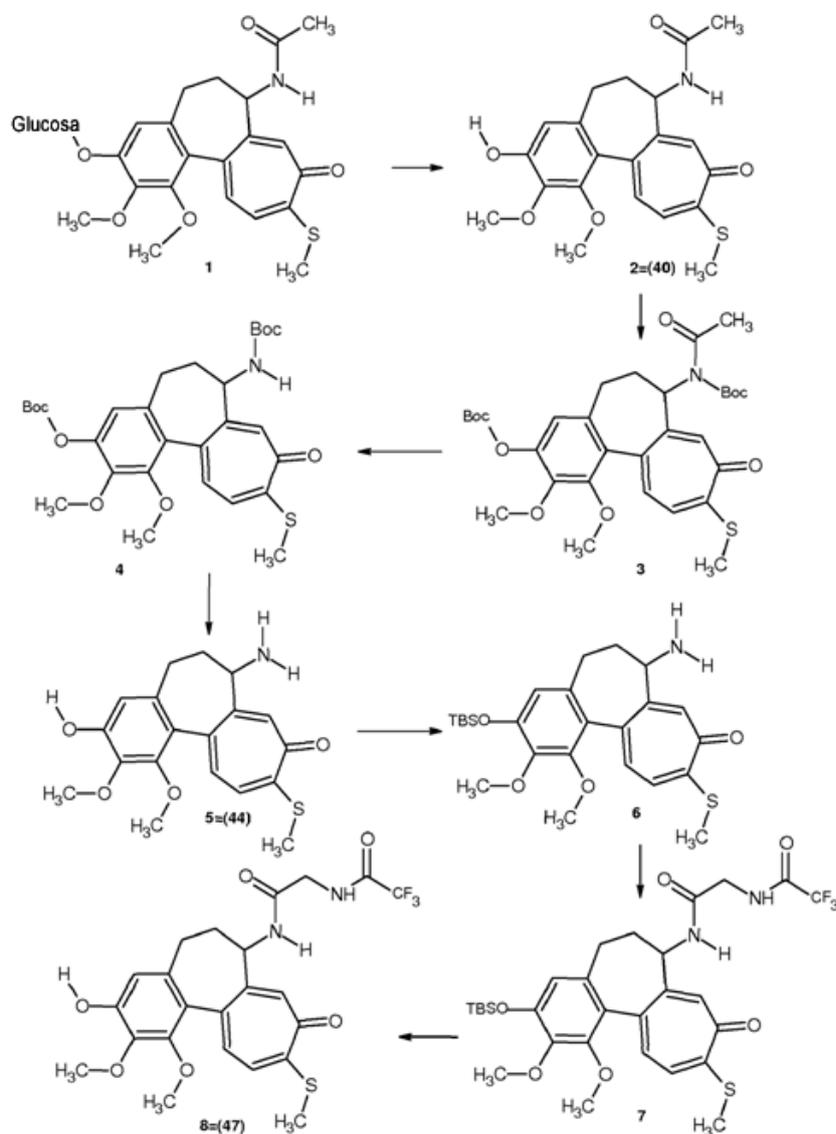
5 Se agitó una disolución de 5 (0,7 g, 1,22 mmol) y metóxido de sodio (131,0 mg, 2,43 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

Se agitó una disolución de 6 (en bruto) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,3 g).

10 Se agitó una disolución de 7 (50 mg, 0,13 mmol), EDCI (44 mg, 0,23 mmol), HOBT (31 mg, 0,23 mmol), F₃CGlyOH (39 mg, 0,23 mmol) y trietilamina (47 mg, 0,46 mmol) en diclorometano (3 ml) a T.A. durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (22 mg, 32%).

15

Compuestos de referencia (40), (44) y (47)



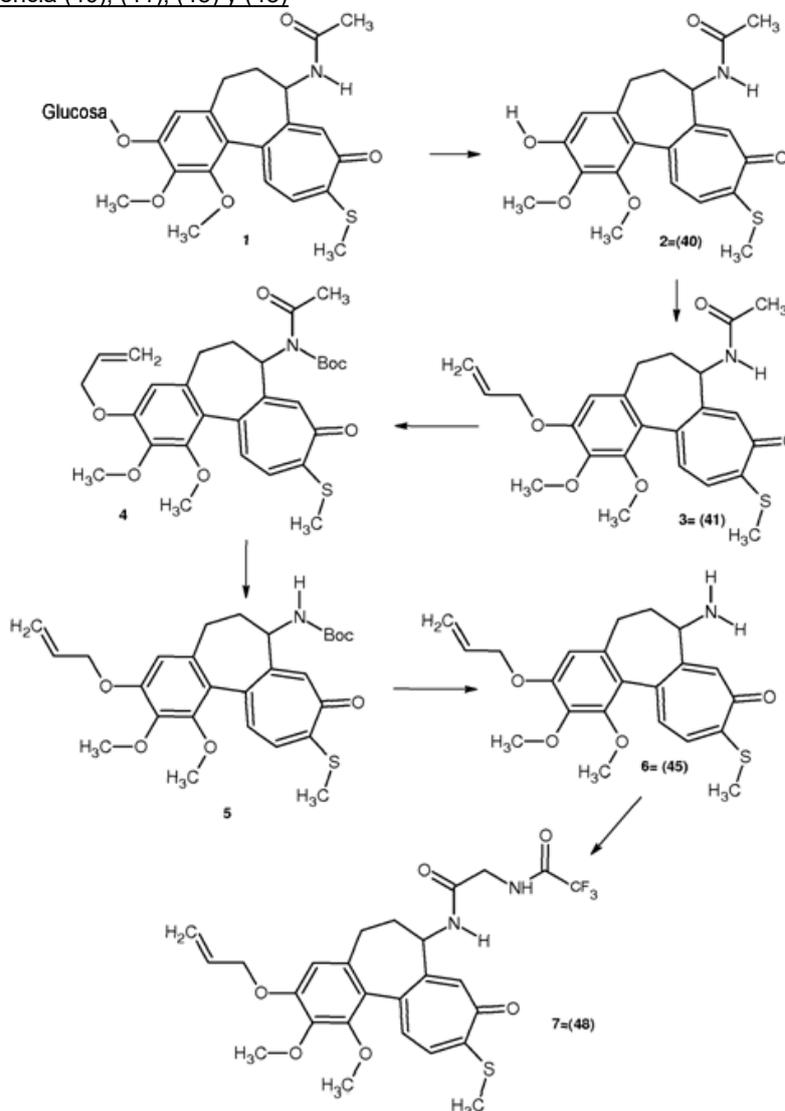
20 Se agitó una mezcla de 1 (4,0 g) en ácido fosfórico (120 ml) a T.A. durante la noche. Se vertió la mezcla en hielo, se ajustó a pH 5 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 15%, seguido por varias extracciones con diclorometano.

ES 2 745 255 T3

Se concentraron las fases orgánicas combinadas para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cristalización con acetona para proporcionar el compuesto del título (1,8 g, 67%).

- 5 Se puso a reflujo una mezcla de 2 (600 mg, 1,50 mmol), (Boc)₂O (3,3 g, 14,96 mmol) y DMAP (73 mg, 0,60 mmol) en THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.
- 10 Se agitó una disolución de 3 (en bruto) y metóxido de sodio (120,0 mg, 2,3 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.
- Se agitó una disolución de 4 (en bruto) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,4 g).
- 15 A una disolución de 5 (50 mg, 0,14 mmol) e imidazol (9 mg, 0,14 mmol) en diclorometano (3 ml) enfriada hasta 0°C se le añadió cloruro de terc-butildimetilsililo (21 mg, 0,14 mmol). Se agitó la mezcla resultante a T.A. durante 10 min. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (30 mg, 45%).
- 20 Se agitó una disolución de 6 (30 mg, 0,06 mmol), EDCI (24 mg, 0,13 mmol), HOBT (17 mg, 0,13 mmol), F₃CGlyOH (22 mg, 0,13 mmol) y trietilamina (26 mg, 0,26 mmol) en diclorometano (3 ml) a T.A. durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 25 A una disolución de 7 (en bruto) en THF (3 ml) se le añadió TBAF (28 mg, 0,11 mmol). Se agitó la mezcla resultante a T.A. durante 30 min. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía para dar el producto deseado (20 mg).

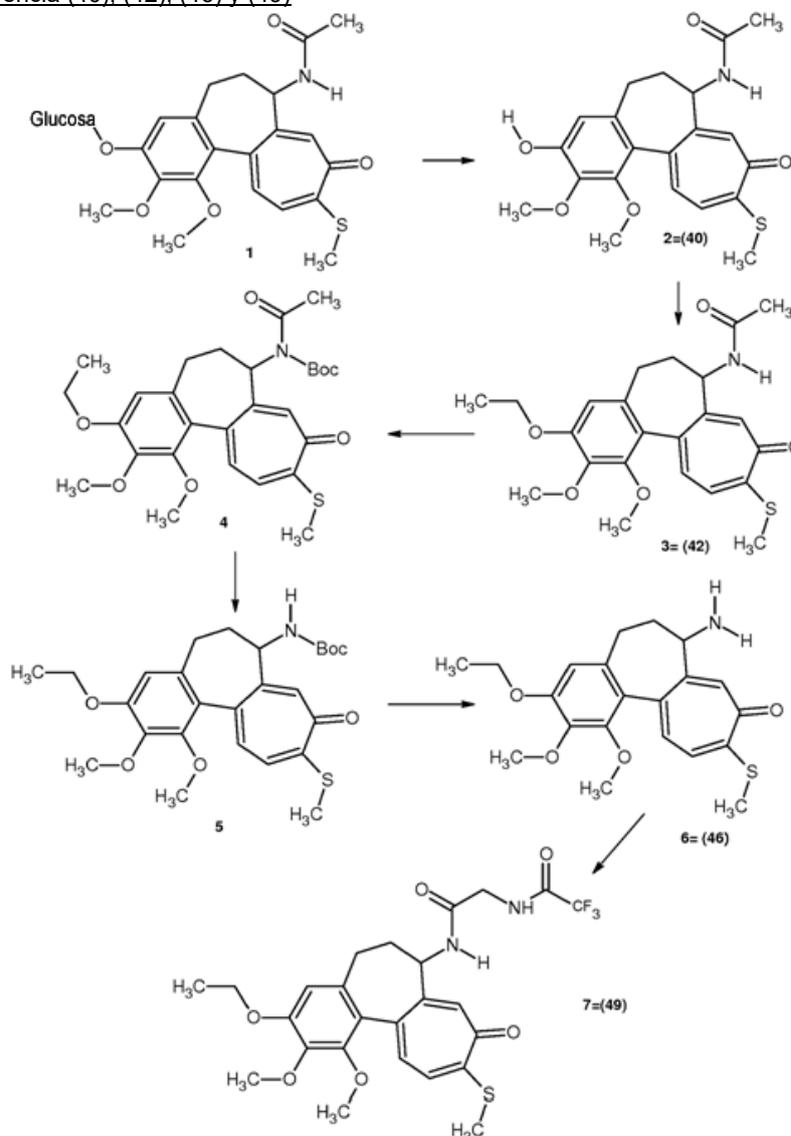
Compuestos de referencia (40), (41), (45) y (48)



- 5 Se agitó una mezcla de 1 (4,0 g) en ácido fosfórico (120 ml) a T.A. durante la noche. Se vertió la mezcla en hielo, se ajustó a pH 5 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 15%, seguido por varias extracciones con diclorometano. Se concentraron las fases orgánicas combinadas para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cristalización con acetona para proporcionar el compuesto del título (1,8 g, 67%).
- 10 Se puso a reflujo una mezcla de 2 (50 mg, 0,12 mmol), 3-bromoprop-1-eno (23 mg, 0,19 mmol) y carbonato de potasio (52 mg, 0,37 mmol) en acetona (3 ml) durante 2 h. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró el filtrado para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (30 mg, 55%).
- 15 Se puso a reflujo una mezcla de 3 (500 mg, 1,13 mmol), (Boc)₂O (2,5 g, 11,31 mol) y DMAP (55 mg, 0,45 mmol) en THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para lo siguiente.
- 20 Se agitó una disolución de 4 (en bruto) y metóxido de sodio (120,0 mg, 2,21 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para lo siguiente.
- Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,4 g).
- 25 Se agitó una disolución de 6 (50 mg, 0,13 mmol), EDCI (48 mg, 0,25 mmol), HOBT (34 mg, 0,25 mmol), F₃CGlyOH (43 mg, 0,25 mmol) y trietilamina (63 mg, 0,63 mmol) en diclorometano (3 ml) a T.A. durante la noche. Se lavó la

mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (25 mg, 36%).

Compuestos de referencia (40), (42), (46) y (49)



5

Se agitó una mezcla de 1 (4,0 g) en ácido fosfórico (120 ml) a T.A. durante la noche. Se vertió la mezcla en hielo, se ajustó a pH 5 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 15%, seguido por varias extracciones con diclorometano. Se concentraron las fases orgánicas combinadas para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cristalización con acetona para proporcionar el compuesto del título (1,8 g, 67%).

10

Se puso a reflujo una mezcla de 2 (50 mg, 0,12 mmol), bromoetano (21 mg, 0,19 mmol) y carbonato de potasio (52 mg, 0,37 mmol) en acetona (3 ml) durante 2 h. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró el filtrado para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (35 mg, 65%).

15

Se puso a reflujo una mezcla de 3 (500 mg, 1,16 mmol), (Boc)₂O (2,5 g, 11,63 mol) y DMAP (57 mg, 0,47 mmol) en THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

20

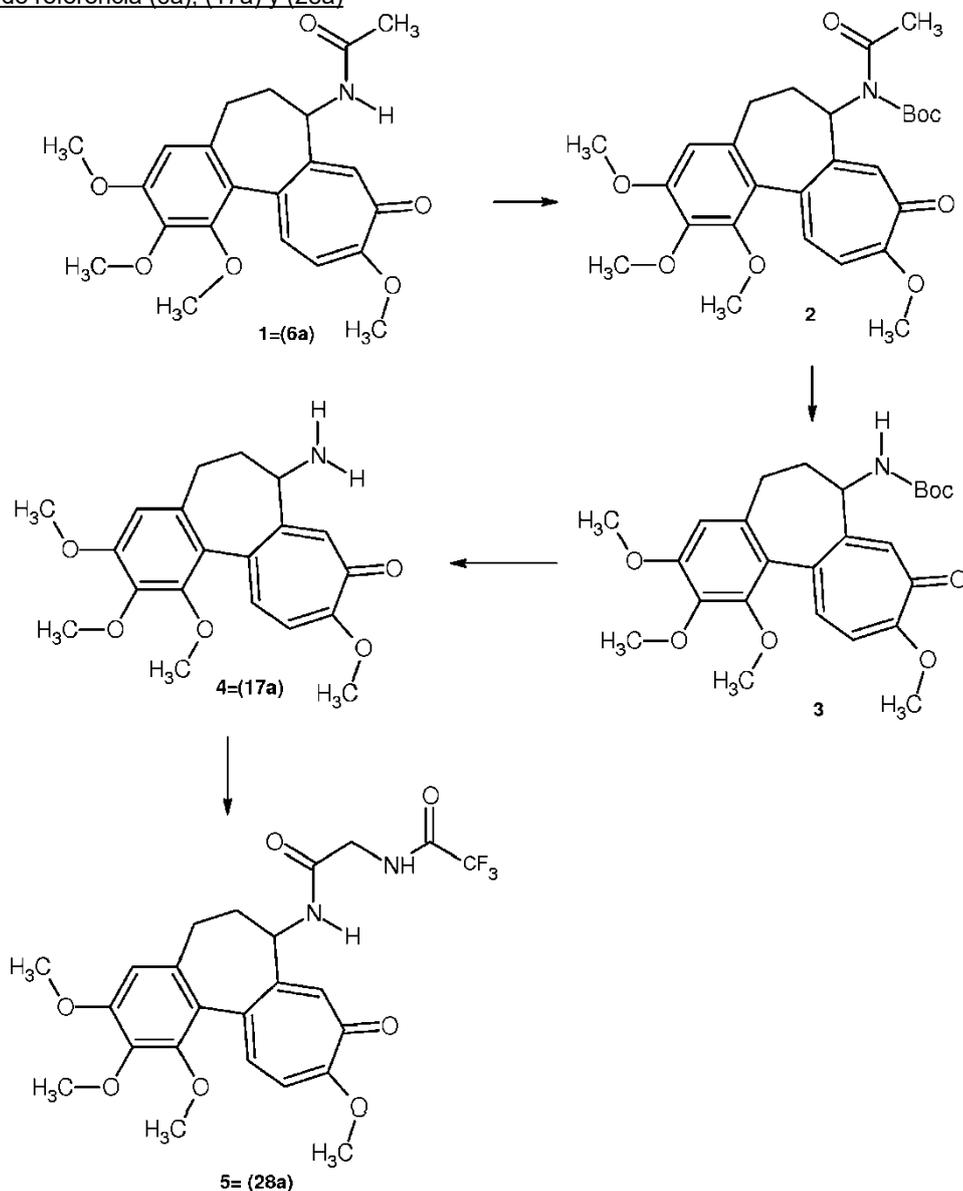
Se agitó una disolución de 4 (en bruto) y metóxido de sodio (122,0 mg, 2,26 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

25

Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,4 g).

Se agitó una disolución de 6 (50 mg, 0,13 mmol), EDCI (49 mg, 0,26 mmol), HOBT (35 mg, 0,26 mmol), F₃CGlyOH (44 mg, 0,26 mmol) y trietilamina (65 mg, 0,65 mmol) en diclorometano (3 ml) a T.A. durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (25 mg, 36%).

Compuestos de referencia (6a), (17a) y (28a)



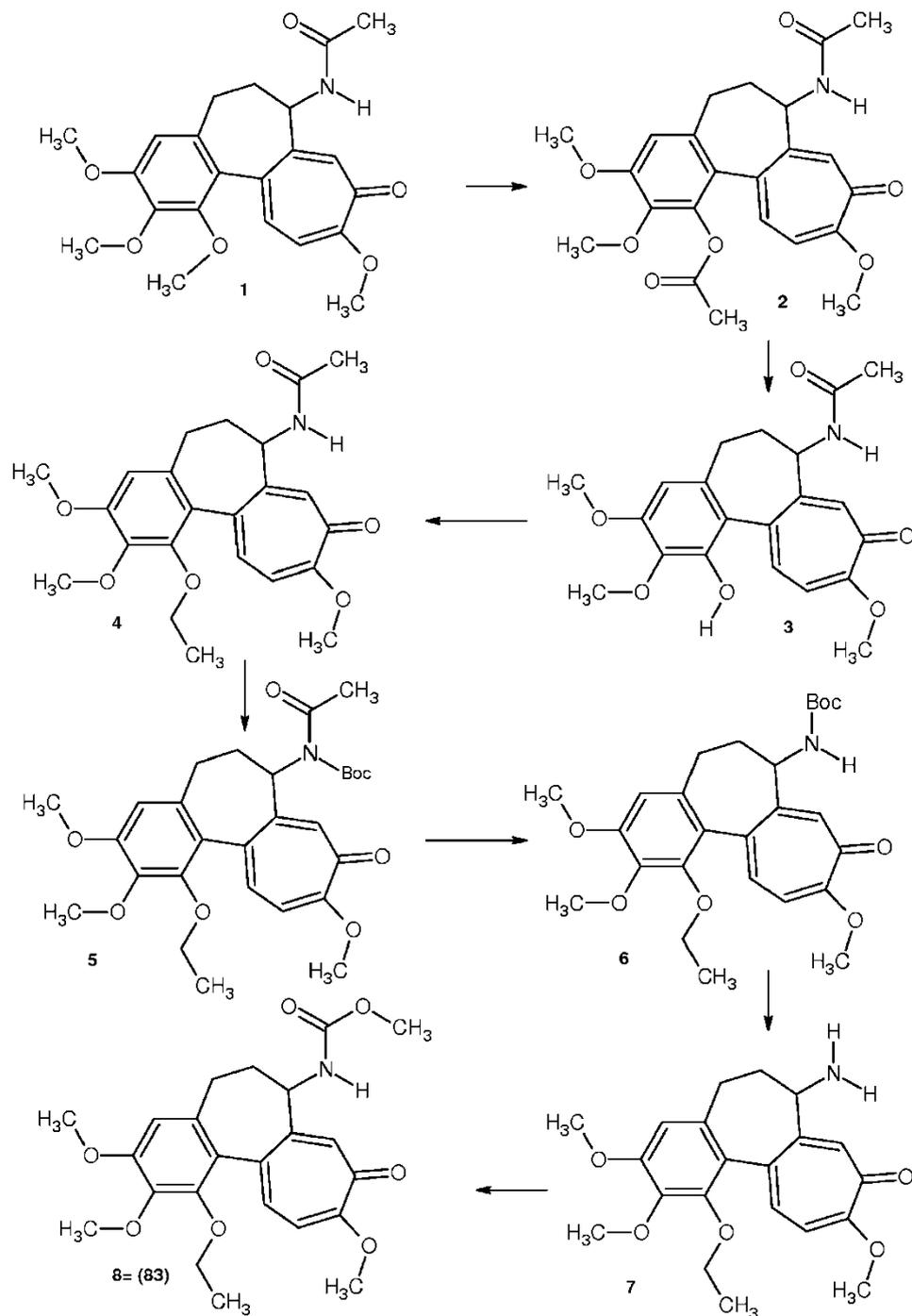
10 Se puso a reflujo una mezcla de 1 (20,0 g, 0,05 mmol), (Boc)₂O (109,3 g, 0,50 mol) y DMAP (2,4 g, 0,02 mol) en THF (300 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente en la siguiente etapa.

15 Se agitó una disolución de 2 (en bruto) y metóxido de sodio (5,4 g, 0,1 mol) en metanol (400 ml) a T.A. durante 2 h. Luego se añadió agua y se extrajo con diclorometano. Se concentraron los extractos para dar el producto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (20,0 g, 87%).

20 Se agitó una disolución de 3 (2,95 g, 6,46 mmol) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 3 h. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (2,1 g, 91%).

Se agitó una disolución de 4 (200 mg, 0,56 mmol), DCC (138 mg, 0,67 mmol), DMAP (82 mg, 0,67 mmol), y trietilamina (115 mg, 1,12 mmol) en diclorometano (5 ml) a T.A. durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (110 mg, 39%).

Referencia



- 5 A una disolución de 1 (1,0 g, 2,51 mmol) y cloruro de acetilo (3 ml) se le añadió tetracloruro (1 ml), y se agitó la mezcla a T.A. durante 40 h. Se usó directamente el producto en bruto para la siguiente etapa.

Se agitó una disolución de 2 (en bruto) e hidróxido de litio (4 eq.) en metanol/agua a T.A. durante una hora. Se extrajo la fase acuosa y se concentró para dar el producto en bruto. Se obtuvo el producto mediante recrystalización (0,2 g, 21%, dos etapas).

10

Se agitó una mezcla de 3 (800 mg, 2,01 mmol), bromoetano (450 mg, 4,16 mmol) y carbonato de potasio (1150 mg, 8,31 mmol) en DMF (20 ml) a 90°C durante 2 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con acetato de etilo y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,5 g, 60%).

15

ES 2 745 255 T3

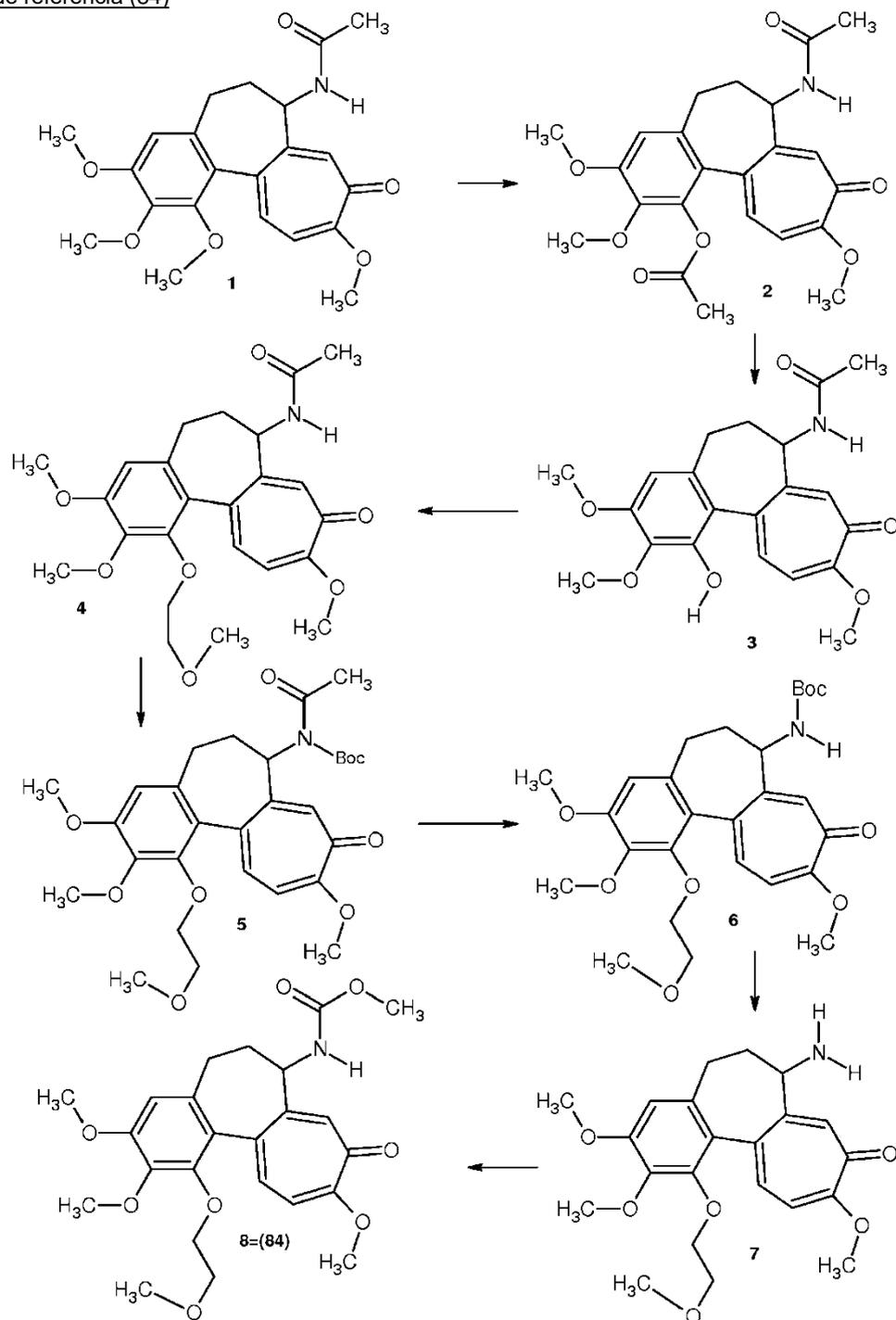
Se puso a reflujo una mezcla de 4 (700 mg, 1,69 mmol), (Boc)₂O (3,7 g, 16,95 mol) y DMAP (83 mg, 0,68 mmol) en THF (15 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

- 5 Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y metóxido de sodio (365,0 mg, 6,76 mmol) en metanol (15 ml) a T.A. durante 2 h. Luego se añadió agua y se extrajo con diclorometano. Se concentraron los extractos para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,6 g).
- 10 Se agitó una disolución de 6 (600 mg, 1,27 mmol) y ácido trifluoroacético (5 ml) en diclorometano (5 ml) a T.A. durante 3 h. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,45 g, 96%).

A una disolución de 7 (50 mg, 0,13 mmol) y trietilamina (27 mg, 0,27 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añadió carbonocloridato de metilo (19 mg, 0,20 mmol) a 0°C. Se agitó la disolución resultante a T.A. durante 1 h. Se lavó la

- 15 mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (15 mg, 26%).

Compuesto de referencia (84)



5 A una disolución de 1 (1,0 g, 2,51 mmol), y cloruro de acetilo (3 ml) se le añadió tetracloruro (1 ml), y se agitó la mezcla a T.A. durante 40 h. Se usó directamente el producto en bruto para la siguiente etapa.

10 Se agitó una disolución de 2 (en bruto) e hidróxido de litio (4 eq.) en metanol/agua a T.A. durante una hora. Se extrajo la fase acuosa y se concentró para dar el producto en bruto. Se obtuvo el producto mediante recrystalización (0,2 g, 21%, dos etapas).

15 Se agitó una mezcla de 3 (800 mg, 2,01 mmol), 1-bromo-2-metoxietano (580 mg, 4,16 mmol) y carbonato de potasio (1,15 g, 8,31 mmol) en DMF (20 ml) a 75 °C durante 3 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con acetato de etilo y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,5 g, 54%)

ES 2 745 255 T3

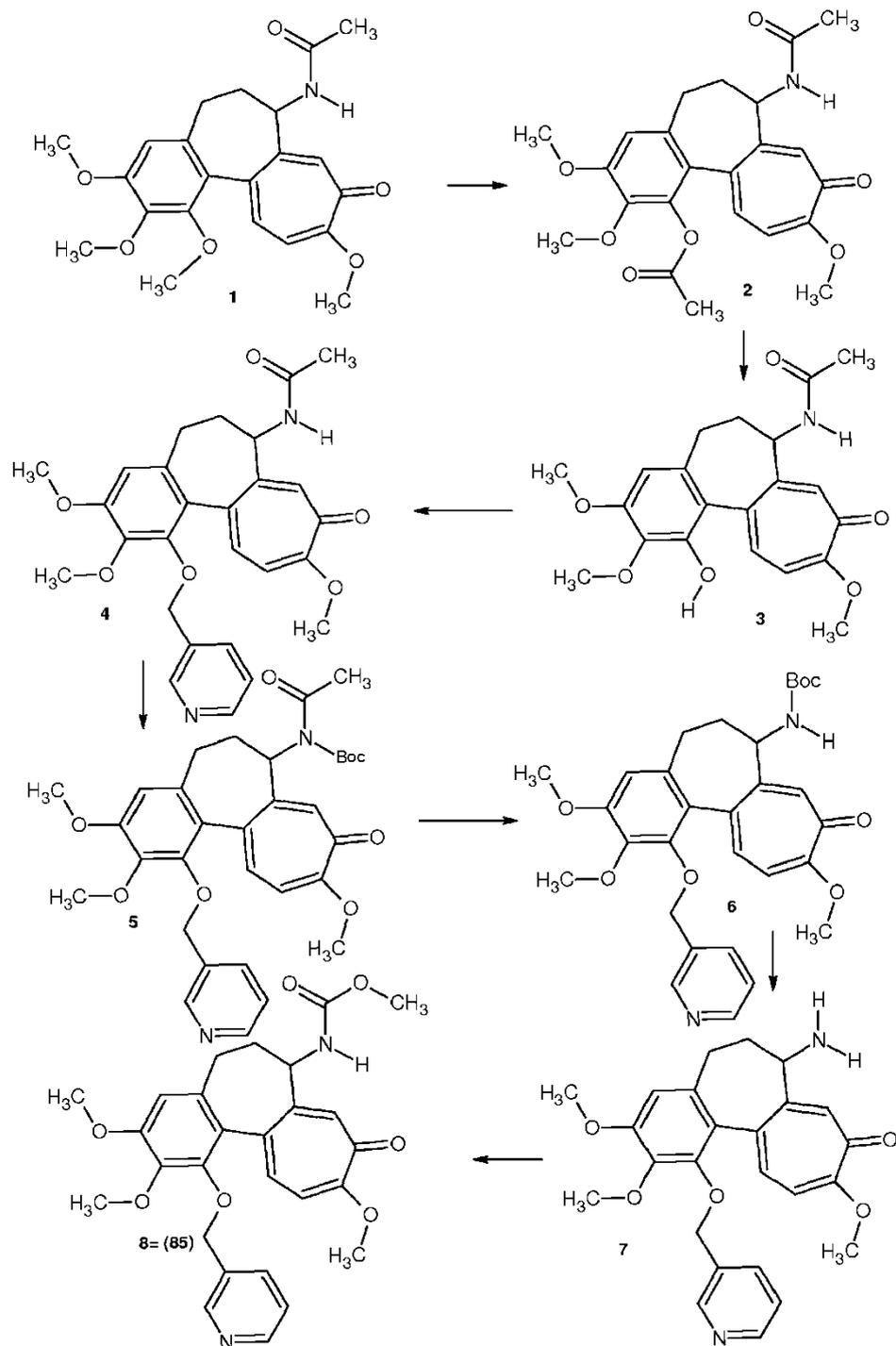
Se puso a reflujo una mezcla de 4 (500 mg, 1,13 mmol), (Boc)₂O (2,5 g, 11,29 mmol) y DMAP (55 mg, 0,45 mmol) en THF (10 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

- 5 Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y metóxido de sodio (244,0 mg, 4,52 mmol) en metanol (15 ml) a T.A. durante 2 h. Luego se añadió agua y se extrajo con diclorometano. Se concentraron los extractos para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,4 g).
- 10 Se agitó una disolución de 6 (0,6 g, 1,20 mmol) y ácido trifluoroacético (5 ml) en diclorometano (5 ml) a T.A. durante 3 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,45 g, 94%).

A una disolución de 7 (50 mg, 0,12 mmol) y trietilamina (25 mg, 0,25 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añadió carbonocloridato de metilo (18 mg, 0,19 mmol) a 0°C. Se agitó la disolución resultante a T.A. durante 1 h. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (16 mg, 28%).

- 15

Compuesto de referencia (85)



5 A una disolución de 1 (1,0 g, 2,51 mmol), y cloruro de acetilo (3 ml) se le añadió tetracloruro (1 ml), y se agitó la mezcla a T.A. durante 40 h. Se usó directamente el producto en bruto para la siguiente etapa.

Se almacenó una disolución de 2 (en bruto) e hidróxido de litio (4 eq.) en metanol/agua a T.A. durante una hora. Se extrajo la fase acuosa y se concentró para dar el producto en bruto. Se obtuvo el producto mediante recristalización (0,2 g, 21%, dos etapas).

10

Se agitó una mezcla de 3 (1,0 g, 2,6 mmol), 3-(clorometil)piridina (0,64 g, 3,9 mmol) y carbonato de potasio (1,08 g, 7,8 mmol) en DMF (20 ml) a 90°C durante 8 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con acetato de etilo y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto deseado (0,7 g, 58%).

15

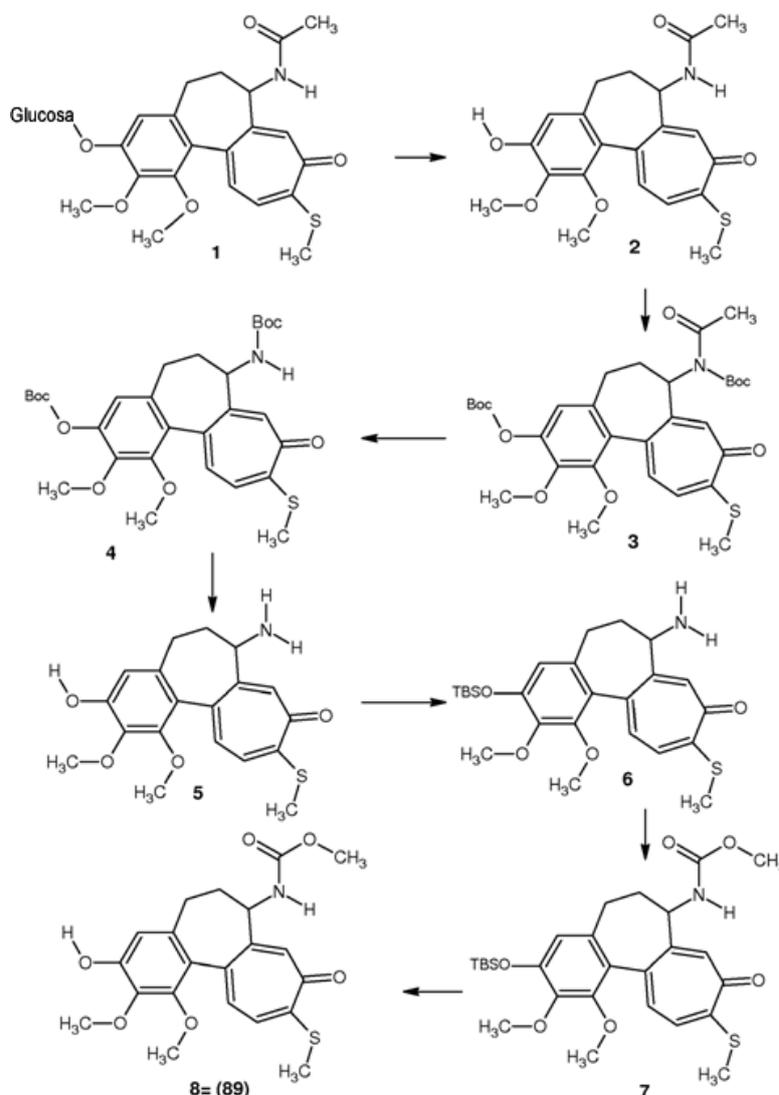
Se puso a reflujo una mezcla de 4 (700 mg, 1,47 mmol), (Boc)₂O (3,2 g, 14,71 mol) y DNP (72 mg, 0,59 mmol) en THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto (0,7 g, 87%).

5 Se agitó una disolución de 5 (0,7 g, 1,22 mmol) y metóxido de sodio (131,0 mg, 2,43 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

10 Se agitó una disolución de 6 (en bruto) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,3 g).

A una disolución de 7 (50 mg, 0,12 mmol) y trietilamina (35 mg, 0,35 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añadió carbonocloridato de metilo (16 mg, 0,17 mmol) a 0°C. Se agitó la disolución resultante a T.A. durante 1 h. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (12 mg, 21%).

Compuesto (89)



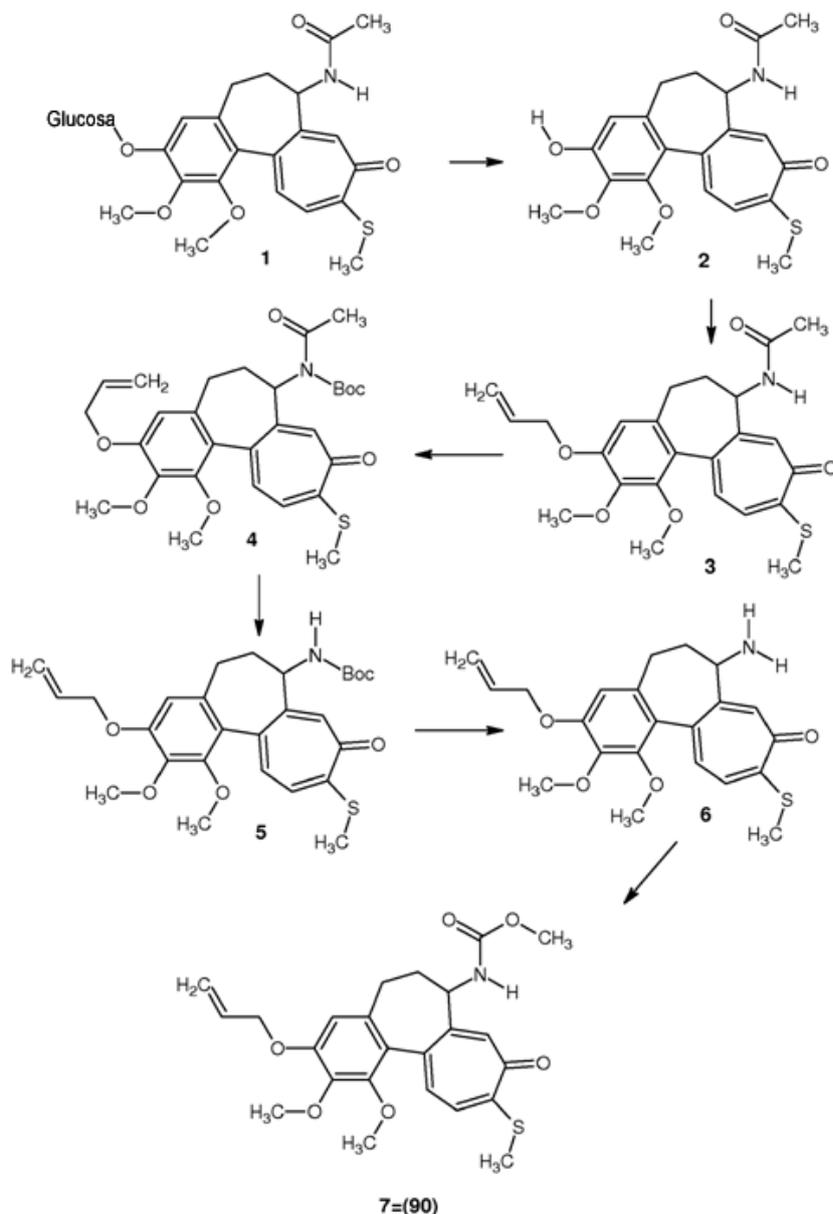
20 Se agitó una mezcla de 1 (4,0 g) en ácido fosfórico (120 ml) a T.A. durante la noche. Se vertió la mezcla en hielo, se ajustó a pH 5 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 15%, seguido por varias extracciones con diclorometano. Se concentraron las fases orgánicas combinadas para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cristalización con acetona para proporcionar el compuesto del título (1,8 g, 67%).

25 Se puso a reflujo una mezcla de 2 (600 mg, 1,50 mmol), (Boc)₂O (3,3 g, 14,96 mmol) y DMAP (73 mg, 0,60 mmol) en THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto

en bruto que se usó directamente para lo siguiente.

- 5 Se agitó una disolución de 3 (en bruto) y metóxido de sodio (120,0 mg, 2,3 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para lo siguiente.
- Se agitó una disolución de 4 (en bruto) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,4 g).
- 10 A una disolución de 5 (50 mg, 0,14 mmol) y Im (9 mg, 0,14 mmol) en diclorometano (3 ml) enfriada hasta 0°C se le añadió terc-butildimetilclorosilano (21 mg, 0,14 mmol). Se agitó la mezcla resultante a T.A. durante 10 min. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (30 mg, 45%).
- 15 A una disolución de 6 (100 mg, 0,13 mmol) y trietilamina (64 mg, 0,64 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añadió carbonocloridato de metilo (40 mg, 0,42 mmol) a 0°C. Se agitó la disolución resultante a T.A. durante 1 h. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (50 mg, 45%).
- 20 A una disolución de 7 (50 mg, 0,09 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) se le añadió TBAF (29 mg, 0,11 mmol). Se agitó la mezcla resultante a T.A. durante 30 min. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía para dar el producto deseado (20 mg, 51%).

Compuesto 90



5 Se agitó una mezcla de 1 (4,0 g) en ácido fosfórico (120 ml) a T.A. durante la noche. Se vertió la mezcla en hielo, se ajustó a pH 5 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 15%, seguido por varias extracciones con diclorometano. Se concentraron las fases orgánicas combinadas para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cristalización con acetona para proporcionar el compuesto del título (1,8 g, 67%).

10 Se puso a reflujo una mezcla de 2 (50 mg, 0,12 mmol), 3-bromoprop-1-eno (23 mg, 0,19 mmol) y carbonato de potasio (52 mg, 0,37 mmol) en acetona (3 ml) durante 2 h. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró el filtrado para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (30 mg, 55%).

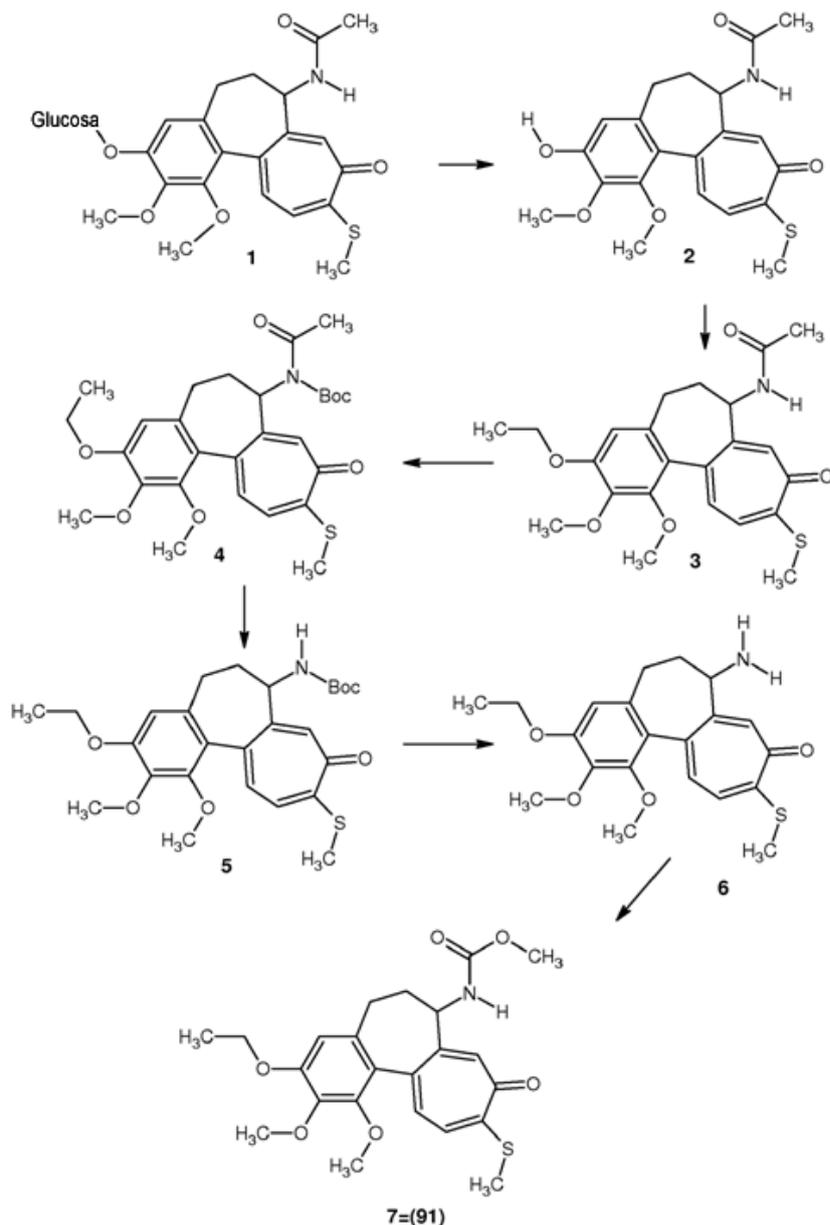
15 Se puso a reflujo una mezcla de 3 (500 mg, 1,13 mmol), (Boc)₂O (2,5 g, 11,31 mol) y DMAP (55 mg, 0,45 mmol) en THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

20 Se agitó una disolución de 4 (en bruto) y metóxido de sodio (120,0 mg, 2,21 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y ácido trifluoroacético (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,4 g).

A una disolución de 6 (50 mg, 0,13 mmol) y trietilamina (25 mg, 0,25 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añadió carbonocloridato de metilo (24 mg, 0,25 mmol) a 0°C. Se agitó la disolución resultante a T.A. durante 1 h. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (20 mg, 35%).

Compuesto (91)



- 10 Se agitó una mezcla de 1 (4,0 g) en ácido fosfórico (120 ml) a T.A. durante la noche. Se vertió la mezcla en hielo, se ajustó a pH 5 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 15%, seguido por varias extracciones con diclorometano. Se concentraron las fases orgánicas combinadas para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cristalización con acetona para proporcionar el compuesto del título (1,8 g, 67%).
- 15 Se puso a reflujo una mezcla de 2 (50 mg, 0,12 mmol), bromoetano (21 mg, 0,19 mmol) y carbonato de potasio (52 mg, 0,37 mmol) en acetona (3 ml) durante 2 h. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró el filtrado para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (35 mg, 65%).
- 20 Se puso a reflujo una mezcla de 3 (500 mg, 1,16 mmol), (Boc)₂O (2,5 g, 11,63 mol) y DMAP (57 mg, 0,47 mmol) en THF (20 ml) durante la noche. Se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

Se agitó una disolución de 4 (en bruto) y metóxido de sodio (122,0 mg, 2,26 mmol) en metanol (10 ml) a T.A. durante 1 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró para dar el producto en bruto que se usó directamente para la siguiente etapa.

- 5 Se agitó una disolución de 5 (en bruto) y trietilamina (10 ml) en diclorometano (10 ml) a T.A. durante 2 horas. Se concentró la disolución de reacción para dar el producto (0,4 g).

- 10 A una disolución de 6 (50 mg, 0,13 mmol) y trietilamina (25 mg, 0,25 mmol) en diclorometano (3 ml) se le añadió carbonocloridato de metilo (24 mg, 0,25 mmol) a 0°C. Se agitó la disolución resultante a T.A. durante 1 h. Se lavó la mezcla de reacción con agua y se concentró para dar el producto en bruto. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía para dar el producto deseado (20 mg, 35%).

Crecimiento de células CEM y tratamiento con compuestos de colchicina (2-16 y 28-38)

- 15 Preparación de medios con derivados de colchicina (2-16) y (28-38)

- 20 Se prepararon medios tratados con derivados de colchicina (2-16) y (28-38) usando: 1 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM, 500 nM y 1000 nM de (2-16) o (28-38) que se pusieron en viales de vidrio de 1,5 ml y se disolvieron en 10 µl de dimetilsulfóxido. El dimetilsulfóxido fue el disolvente para los derivados (2-16) y (28-38). Una vez disueltos, se añadieron el dimetilsulfóxido (2-16) y las mezclas de dimetilsulfóxido (28-38) a los medios y se incubaron durante la noche en 37°C. No se observó ninguna disminución del crecimiento de células que se pusieron en 10 µl de dimetilsulfóxido únicamente.

Cultivos celulares

- 25 Se mantuvieron células CEM (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) en matraces de cultivo tisular y se cultivaron como monocapa en 20 ml de medios RPMI que contenían suero bovino fetal (FBS) al 10%. Cuando el número de células en el matraz de cultivo alcanzó $5 - 6 \times 10^6$ células/ml, se recogió el cultivo y luego se inoculó en seis biorreactores de fibra hueca (HFB, FiberCells System, Frederick, MD) y se cultivaron de manera continua a 37°C
- 30 y el 5% de CO₂. HFB consiste en una única fibra hidrófila y de polisulfona con poros de 0,1 µm de diámetro. Los medios que circulan dentro del cartucho de HFB y el tubo de polisulfona, a una velocidad de flujo de 14 ml/min, transportan oxígeno y nutrientes a las células y retiran el CO₂ y otros desechos. Se usó disolución de colágeno para crear una matriz celular adicional entre las células y la fibra. Se recubrió la fibra de polisulfona con proteína mediante lavado con 10 ml de disolución de recubrimiento que contenía 1 mg de colágeno por 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se mantuvo el pH en el espacio extracelular en toda la duración de los experimentos entre 6,8 y 7,0. Debido a la perfusión, el HFB absorbió suficiente oxígeno del depósito con medios nuevos para mantener vivas las células. Se cambió el medio de perfusión semanalmente cuando el nivel de glucosa alcanzó 2 g/l medido con un glucómetro. La concentración de oxígeno en 100 ml de medios fue de 7,6 µg/ml, debido a su solubilidad a 37°C.

- 40 Viabilidad de las células

- 45 Se evaluó la viabilidad usando azul trípano (K. Takahashi, G. Loo, Biochem. Pharm 67 (2004) 315-324). En resumen, se recogieron las células CEM de HFB, se sembraron en microplacas de 6 pocillos y se expusieron a una disolución de colorante azul trípano al 0,4% (p/v). Se determinó manualmente el número de células con una cámara de hemocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA).

Tratamiento de células

- 50 Se trataron aproximadamente 4×10^4 células CEM/ml en placas de cultivo y se pusieron para la incubación de 72 h con los derivados (2-16) y (28-38). Se usaron todos los compuestos para experimentos *in vitro* y luego se seleccionaron los derivados para estudios de HFB para tratar 10^9 CEM células/ml en los cultivos 3-D. Se trataron las células 4 semanas después de la inoculación de las células en el HFB. Después de 72 h, se inhibió el crecimiento más del 50% para 20 nM y concentraciones mayores en células tratadas con (6), (13), (28) y (35).

- 55 Resonancia magnética

- 60 Todos los experimentos de IRM se realizaron con un imán de 9,4 Teslas con un orificio de 21 cm (MagneX, R.U.) y una consola TMX (NRC-IBD, Canadá). Se obtuvieron imágenes de ¹⁹F-RM usando bobina de volumen de radiofrecuencia (RF) de transmisión/recepción de sintonización doble (¹⁹F y ¹H) funcionando a 376 MHz y 400 MHz correspondientes a la frecuencia de Larmor de ¹⁹F y ¹H a 9,4 Teslas, respectivamente. Se recopilaron imágenes de ¹H-RM en la misma sesión de obtención de imágenes que ¹⁹F-IRM. La RM de protón proporcionó imágenes anatómicas del cultivo. Las imágenes de resonancia magnética monitorizaron la localización de las células alrededor de la fibra en HFB, así como el volumen de las células. Además, ¹⁹F-IRM visualiza selectivamente solo la captación de flúor intracelular sin fondo, por tanto, permite el recuento celular. Se obtuvieron imágenes de las células antes y después del tratamiento con (6), (13), (28) y (35) con ¹H-IRM, esto permitió observar cambios en la agregación celular 3-D. También se obtuvieron imágenes de las células tratadas con 20 nM (28) y (35) con ¹⁹F-IRM para medir el

contenido de flúor usando la intensidad de señal (SI) de ^{19}F -RMN en cada HFB tratado con (28) y (35). Usando las curvas de calibración para los valores de SI de ^{19}F , se estimó el número de células CEM marcadas con ^{19}F -derivados de colchicina. Para obtener las curvas de calibración (para cada derivado por separado), se usaron modelos que consistían en tubos de HFB llenos de 1 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM, 500 nM y 1000 nM de (28) o (35) y 10^3 células, 10^4 células, 10^5 células, 10^6 células, 10^7 células, 10^8 células y 10^9 células. Se usó la regresión lineal para hallar la dependencia de SI de los números de células. Se compararon los números de células estimados a partir de la obtención de imágenes de ^{19}F -RM con la viabilidad celular obtenida a partir de los ensayos con azul trípano. Para ^1H -IRM, se usó una secuencia de pulsos de eco de espín con tiempo de eco (TE)/tiempo de repetición (TR) = 16,5/5000 ms. Para la obtención de imágenes de ^{19}F -RM, se usó el método de eco de espín de inversión-recuperación (IR) con tiempo de inversión (IT) de 400 ms y TE/TR = 16,5/5000 ms. Se adquirió un corte de 1 mm con un tamaño de matriz de 256 x 256 y un campo de visión de 3 x 3 cm tanto para ^{19}F como para ^1H . La viabilidad evaluada mediante azul trípano mostró células viables, mientras que SI de ^{19}F contó células no viables con captación intracelular de los derivados de flúor de colchicina. Además, las imágenes de ^{19}F -RM mostraron una distribución de derivados en los cultivos celulares.

HPLC-UV

Se fraccionaron muestras de células digeridas con un sistema de cromatógrafo Gold HPLC equipado con un detector ultravioleta (UV) Gold 166 y el software 32-Karat (Beckman-Coulter, Mississauga, ON, Canadá). Para la HPLC de fase inversa, se usó una columna analítica C18 para proteínas y péptidos 218 TP54 de Vydac, tamaño de poro de 300 Å, 0,46 cm x 25 cm (Separation Group, Hesperia, CA, EE. UU.). El cromatógrafo estaba equipado con un inyector Rheodyne (5 μl). La detección UV se realizó a 245 nm. El eluyente A consistió en una disolución en agua de acetonitrilo (ACN) al 5% y eluyente B en ácido trifluoroacético al 0,01% en una disolución en agua de ACN al 95%. Se aplicó un gradiente lineal del 5 al 70% de ACN durante 60 min.

Análisis estadístico

Se expresaron los resultados como una media \pm D.E. Las diferencias entre los grupos en cada punto de tiempo fueron identificadas por Anova de un factor. La comparación estadística entre dos variables independientes se determinó mediante Anova de dos factores con la corrección de Dunnett realizada de manera *post-hoc* para corregir comparaciones múltiples. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los datos informados en este caso son de conjuntos de 3 experimentos independientes. Las barras de error en todos los gráficos representan el error estándar de la media. Se analizaron los datos usando el software Sigma Stat Soft (Chicago, IL).

Resultados

Los análogos de colchicina sintetizados y sometidos a prueba para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento celular *ex vivo* se separaron en tres grupos presentados en las figuras 1 a 3 de acuerdo con sus estructuras químicas y preparación. La síntesis de los derivados de colchicina partió de la conversión de la estructura de colchicina clásica conocida en la estructura de éter o éster en la posición C1. La sustitución y el alargamiento de la cadena lateral de alquilo en la posición C1 se realizó siguiendo el protocolo de eterificación en presencia de sal protegida de SnCl_4 . Se activó la eliminación del grupo CH_3COO - en C1 en el producto (2) usando hidrólisis mediante K_2CO_3 (figura 1). El uso de este procedimiento dio como resultado un rendimiento del 71% de (3). La acilación de (2) proporcionó los derivados de éster (4-5) (figura 2) mientras que la alquilación de los derivados de éter (6-16) (figura 3). Entre estos compuestos, se sintetizaron los derivados del flúor (28-38) usando la introducción del grupo ($-\text{COCH}_2\text{NHCOCF}_3$) en la cadena lateral en la posición C7.

Las incubaciones de 72 h de células CEM con (6-16) y (28-35) disminuyeron la viabilidad celular mostrando la capacidad de los análogos de acumularse e interactuar dentro de las células. La CI_{50} observada de la inhibición del crecimiento celular usando análogos de colchicina se resume en la figura 5. Los análogos de (6-16) presentaron un efecto similar con el valor principal $\text{CI}_{50} = 13 \pm 1$ nM. Sin embargo, los análogos (28-35) mostraron una mayor disminución de la viabilidad celular y la CI_{50} principal = 7 ± 2 nM. Los análogos fluorados (28-35) fueron los compuestos más eficaces en todas las series estudiadas (1-38). Los compuestos (6) y (13) mostraron cambios significativos en los valores de CI_{50} . Basándose en estos resultados, se estudiaron los compuestos de referencia (6) y (13) y sus análogos fluorados (28) y (35) en el dispositivo de HFB. Se confirmó la influencia de los compuestos investigados sobre el crecimiento de células CEM en 3-D con ensayos de unión de viabilidad celular. Tal como se muestra en la figura 6, los compuestos (6) o (13) y análogos de referencia fluorados (28) o (35) fueron capaces de inducir el alto efecto de inhibición del crecimiento en cultivos de HFB. La viabilidad de las células de control (no tratadas) durante el cultivo fue del $93 \pm 2\%$. Se proporcionó una configuración de la estructura celular 3-D fue proporcionada mediante imagen de ^1H de células tratadas con (6) y (13). La pérdida del número de células durante la captación de los derivados (figuras 7A-7D) fue visible en un plazo de 72 h. El estudio mostró que la exposición celular a 1000 nM de (28) y (35), el número de células viables disminuyó desde 10^9 células/ml hasta $3,45 \times 10^8$ células/ml y desde 10^9 células/ml hasta $2,9 \times 10^8$ células/ml, respectivamente, en un plazo de 72 h.

La distribución de las células, medida con IRM, dependía enormemente de las densidades de las células (figuras 7A-

7D). Se destruyó un número significativamente mayor de células en las regiones en las que la densidad de las células era alta. La SI de ^{19}F media de las células tratadas con (28) aumentó durante el tratamiento y corresponde a una concentración media de células de $6,03 \times 10^8$ células/ml. La densidad de células CEM media en la región con menores densidades corresponde a $2,4 \times 10^8$ células/ml mientras que el número medio de células con mayores densidades celulares $3,5 \times 10^8$ células/ml. Al mismo tiempo, la viabilidad de las células en HFB tratadas con (28) fue del 35% y corresponde a $3,45 \times 10^8$ células/ml de células viables en HFB.

La SI de ^{19}F media de las células tratadas con (35) también aumentó durante el tratamiento y correspondió a una concentración celular media de $6,9 \times 10^8$ células/ml. La viabilidad de las células en HFB tratadas con (35) fue del 30% y correspondió a células vivas $2,9 \times 10^8$ células/ml después de 3 días de tratamiento. La densidad de células CEM media en la región con menores densidades correspondió a $1,4 \times 10^8$ células/ml, mientras que el número medio de células con mayores densidades celulares fue de $4,8 \times 10^8$ células/ml. Tal como se esperaba, los valores de SI de ^{19}F dependían de la concentración de células y derivados de flúor en las células tratadas con (28) (figura 8) y (35) (figura 9).

Además, se halló que la alta densidad tisular en 3-D era necesaria para el estudio debido a la limitada sensibilidad de IRM. También se halló que el HFB proporciona una concentración suficientemente alta de cultivos celulares 3D para obtener las imágenes de ^{19}F -RM, por tanto, las técnicas de IRM y el dispositivo HFB combinados pueden usarse para estudiar la eficacia de fármacos y la viabilidad celular.

Los resultados del análisis por HPLC de las células CEM tratadas *ex vivo* se muestran en las figuras 10A-10E. Tal como se muestra en las figuras 10C y 10D, las células CEM en respuesta al tratamiento con (13) y (35) expresaron el receptor del complejo menor de histocompatibilidad (CMH (clase I) que eluyó a los 53 minutos. Cuando la viabilidad fue del 45% y el 35%, se observó la expresión del receptor de CMH (clase I) con intensidades de 0,05 V y 0,7 V, respectivamente. El receptor de CMH (clase I) tratado con IgG mostró una disminución de la viabilidad de las células en un 10% en comparación con las células antes del tratamiento. La exposición de las células a (6), (13) y (28) mostró un nuevo pico de HPLC con baja intensidad, el receptor Tn. La señal de Tn en células tratadas con (13) tuvo una intensidad 10 veces mayor en un 45% del cultivo celular viable que el tratado con (6) en un 50% del cultivo celular viable y (28) en un 38% del cultivo celular viable. Se supuso que las señales que eluyeron a los 30 - 35 min eran derivados sin reaccionar con una intensidad variable de 0,1 V para (28) y (35) así como 0,35 V para (13) y 0,9 V para (6). La viabilidad de los cultivos celulares fue mayor para las muestras en las que los derivados de colchicina sin reaccionar se presentaron con mayores intensidades y fueron los siguientes: el $38\% \pm 4$ para (28), el $35\% \pm 5$ para (35), el $45\% \pm 2$ para (13) y el $50\% \pm 4$ para (6). Se produjo una señal adicional que eluyó a los 57 minutos en muestras tratadas con (35) y (28) (figuras 10D y 10E). Las señales a los 57 min difieren en aproximadamente 5 min en la elución presente de una cascada de proteína apoptótica en las células tratadas. La intensidad máxima de 0,3 V (28) y 0,2 V (35) correspondió a la viabilidad de las células del 38% (28) y el 35% (35) y derivados sin reaccionar el 0,1 (28), el 0,1 (35), respectivamente. Los picos adicionales indefinidos con intensidades muy bajas, menos de 0,05 V, son los metabolitos de derivados o compuestos sin reaccionar.

Crecimiento de células CEM y tratamiento con compuestos de tiocolchicina (40-42 y 44-49) (todos compuestos de referencia).

Cultivos celulares

Se mantuvieron células CEM, Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA), en matraces de cultivo tisular y se cultivaron como monocapa en 20 ml de medios RPMI que contenían suero bovino fetal (FBS) al 10% y se dividieron de 5×10^5 células/ml a $2,5 \times 10^4$ células/ml dos veces a la semana. Cuando el número de células en el matraz de cultivo alcanzó $5-6 \times 10^6$ células/ml, se recogió el cultivo y luego se inoculó en seis biorreactores de fibra hueca (HFB, FiberCells System Inc., Frederick, MD) y luego se cultivó de manera continua en 37°C y el 5% de CO_2 . El HFB consiste en una única fibra hidrófila y de polisulfona con poros de $0,1 \mu\text{m}$ de diámetro. Los medios circulan dentro del cartucho de HFB y el tubo de polisulfona, a una velocidad de flujo de 14 ml/min, transportando oxígeno y nutrientes a las células y retirando el CO_2 y otros desechos. Se usó disolución de colágeno para crear una matriz extracelular entre las células y la fibra. Se recubrió la fibra de polisulfona con proteína mediante lavado con 10 ml de disolución de recubrimiento que contenía 1 mg de colágeno por 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). De esta manera, las células CEM que crecieron originariamente en suspensión acumulan un tumor sólido 3-D. Durante 4 semanas de cultivo, se reemplazaron los medios cada semana.

Preparación de medios con derivados de colchicina (40), (41) y (42)

Se prepararon los medios tratados con derivados de colchicina (40), (41) y (42) usando 1 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM, 500 nM y 1000 nM de (40) o (41) o (42) que se pusieron en un vial de vidrio de 1,5 ml y se disolvieron en 10 μl de dimetilsulfóxido. El dimetilsulfóxido es un disolvente de los derivados (40), (41), y (42). Una vez disueltos, se añadió la mezcla de (40), (41) o (42) en dimetilsulfóxido a los medios y se incubó durante la noche a 37°C .

Preparación de medios con derivados de colchicina (47), (48) y (49)

Se complementaron los medios con 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM, 500 nM y 1000 nM de los derivados (47), (48) o (49) disueltos en 10 μ l de dimetilsulfóxido. Los derivados (47), (48) o (49) eran solubles en disolución de medios. Sin embargo, el régimen de dimetilsulfóxido usado para los derivados (40), (41) o (42) también se usó para (47), (48) o (49).

5

Tratamiento de células

Se trataron aproximadamente 4 x 10⁴ células CEM/ml en placas de cultivo y se pusieron durante las 72 horas de incubación con los derivados (40), (41), (42), (47), (48) y (49). Después de 72 horas, se inhibió el crecimiento en más del 50% para 20 nM de (40), 10 nM de (41) y (42), 5 nM de (47), (48) y (49). Por tanto, se seleccionaron estas concentraciones para concentraciones de 10⁹ células CEM/ml para el tratamiento celular en HFB, después de 4 semanas en cultivo.

10

Viabilidad

15

Se determinó el número de células usando el método de exclusión de azul trípiano (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) (K. Takahashi, G. Loo, Biochem. Pharmacol 67 (2004) 315-324). En resumen, se recogieron las células CEM de HFB, se sembraron en microplacas de 6 pocillos y se expusieron a una disolución de colorante azul trípiano al 0,4% (p/v). Se determinó manualmente el número de células con una cámara de hemocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA).

20

Preparación celular para la obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM) de ¹H y ¹⁹F

Se realizaron mediciones de RM de ¹H y ¹⁹F de las células en el HFB en células de control (n = 2, HFB) y tratadas (n = 6, HFB) usando 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM, 500 nM y 1000 nM de los derivados (40), (41), (42), (47), (48) y (49), respectivamente. En todos los experimentos de IRM, se mantuvieron los HFB en condiciones de tipo incubador (37°C, el 5% de CO₂ y el 95% de aire). Se recopilaron todas las imágenes de RM con imanes de 9,4 Teslas/21 cm (Magnex, R.U.) y consola TMX (NRC-IBD). Se pusieron los HFB con cultivos celulares en una bobina de volumen de radiofrecuencia (RF) de transmisión/recepción de sintonización doble funcionando a 376 MHz y 400 MHz correspondientes a la frecuencia de Larmor de ¹⁹F y ¹H a 9,4 Teslas, respectivamente. Todos los parámetros de obtención de imágenes de ¹H y ¹⁹F fueron los mismos para cada HFB tratado con los derivados (40), (41), (42) y (47), (48) y (49), respectivamente. Para la obtención de imágenes de ¹H-RM, se usó una secuencia de pulsos de eco de espín con tiempo de eco (TE)/tiempo de repetición (TR) = 16,5/5000 ms. Para la obtención de imágenes de ¹⁹F-RM, se usó el método de eco de espín de inversión-recuperación (IR) con tiempo de inversión (IT) igual a 400 ms y TE/TR = 16,5/5000 ms. Se adquirió un único corte de 1 mm con un tamaño de matriz de 256 x 256 y un campo de visión de 3 x 3 cm.

25

30

35

Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución-ultravioleta (HPLC-UV)

Se fraccionaron muestras de células digeridas con un sistema de cromatógrafo Gold HPLC equipado con un detector ultravioleta (UV) Gold 166 y el software 32-Karat (Beckman-Coulter, Mississauga, ON). Para la HPLC de fase inversa, se usó una columna analítica C18 para proteínas y péptidos 218 TP54 de Vydac, tamaño de poro de 300 Å, 0,46 cm x 25 cm (Separation Group, Hesperia, CA). El cromatógrafo estaba equipado con un inyector Rheodyne (5 μ l). La detección UV se realizó a 245 nm. El eluyente A consistió en una disolución en agua de acetonitrilo (ACN) al 5% y el eluyente B en ácido trifluoroacético al 0,01% en una disolución en agua de ACN al 95%. Se aplicó un gradiente lineal del 5 al 70% de ACN durante 60 min.

40

45

Anticuerpo que selecciona como diana el receptor de CMH clase I

Se usó la disolución madre de anticuerpos 0,2 mg/ml en PBS, pH 7,2 con albúmina sérica bovina (BSA) 10 mg/ml para tratar 10⁹ células/ml.

50

Análisis estadístico

Se expresaron los resultados como una media \pm D.E. Se identificaron las diferencias entre los grupos en cada punto de tiempo mediante Anova de un factor. Se determinó la comparación estadística entre dos variables independientes mediante Anova de dos factores con la corrección de Dunnett realizada de manera *post-hoc* para corregir comparaciones múltiples. Los valores de p < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Todos los datos informados en este caso son de conjuntos de 6 experimentos independientes. Las barras de error en todos los gráficos representan el error estándar de la media. Se analizaron los datos usando el software Sigma Stat Soft (Chicago, IL).

55

60

Resultados

La tiocolchicina (39) fue el compuesto de partida para la preparación de una serie de derivados de referencia de tiocolchicina (40-42), (44-46) y (47-49) (figura 4). Fue posible producir los compuestos (41) y (42) mediante la reacción de alquilación del compuesto (40) en el que R era un átomo de hidrógeno en C3. Con este propósito, se hizo reaccionar una disolución acuosa de sal de sodio alcalina con el derivado (40) en presencia de acetona y generalmente el

65

rendimiento fue mayor del 50% mientras se procedía de esta manera. La hidrólisis de las acetamidas. (40), (41) y (42) con el 20% de HCl metanólico dio las aminas (44), (45) y (46), respectivamente. La elección de la introducción del grupo trifluoroacetilo en el fragmento de aminoácidos en el C-7 dio como resultado los compuestos (47), (48) y (49). Estas N-fluoroacetilticolchicinas funcionalizadas se prepararon a partir de los compuestos (44), (45) y (46), respectivamente.

Las células CEM de control cultivadas en el HFB alcanzaron una densidad de 10^9 células/ml con una viabilidad mayor del 95% en 4 semanas. Específicamente, se usaron células CEM en cultivo convencionales para establecer originariamente valores de CI_{50} . La actividad inhibitoria del crecimiento de ticolchicina con $CI_{50} = 8,5$ nM fue aproximadamente 5 veces menor que la CI_{50} de colchicina (40 nM). Considerando la ticolchicina como el compuesto modelo, se evaluó el efecto de la sustitución del grupo 3-metoxilo o 7-acetamido en el anillo A o B en la serie de derivados de ticolchicina sobre el crecimiento de las líneas de células CEM. Por tanto, se determinaron los valores de CI_{50} para todos los compuestos sintetizados. Todos los derivados de ticolchicina demostraron una fuerte citotoxicidad con valores de CI_{50} medios de $6,8 \pm 3$ nM. El compuesto (40), con sustitución en la posición C-3, mostró una $CI_{50} = 5,1 \pm 1,3$ nM que fue menor que los valores de CI_{50} de (41) y (42).

Se examinaron *in vitro* las estructuras (47), (48) y (49) en presencia de núcleos de flúor en el C-7 en forma del grupo (-COCH₂NHCOCF₃). Se observaron las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) en los valores de CI_{50} para (47), (48) y (49) y se compararon con (44), (45), (46) y (40), (41) y (42), respectivamente, *in vitro*. Los valores de CI_{50} de (47), (48) y (49) fueron aproximadamente 8 veces menores que la CI_{50} de (39). Los derivados de ticolchicina con sustitución en C-7 y C-3 mostraron una CI_{50} 5 veces menor que los derivados de ticolchicina con sustitución en C-3. No hubo disminución del crecimiento celular para las células que se pusieron en 10 μ l de dimetilsulfóxido solamente.

Los resultados del análisis por HPLC de las células CEM no tratadas y tratadas se muestran en la figura 11. Los cromatogramas mostraron la expresión del receptor de complejo menor de histocompatibilidad (CMH clase I) que eluyó a los 53 minutos en muestras tratadas con (41) y (42). El tratamiento con anticuerpo monoclonal dirigido al receptor de CMH (clase I) dio como resultado un efecto de destrucción de más del 90%. Los compuestos (41) y (42) fueron más activos en la inhibición del crecimiento. La fracción de HPLC de las células no tratadas contiene solo un pico principal a los 5 min. Por tanto, los cambios en los perfiles de las células tratadas corresponden a los cambios en la viabilidad celular y la patogénesis celular.

El uso de células cultivadas tridimensionales (3-D) demostró que las células CEM cultivadas originariamente en suspensión pueden formar una estructura de alta densidad adecuada para experimentos de IRM. Los derivados de ticolchicina suprimieron el número de células durante 72 h de tratamiento y estos cambios son visibles en la figura 12B en comparación con el tamaño del tumor inicial en la figura 12A. La imagen de ¹H-RM muestra agregación celular en HFB antes y después de 72 h de tratamiento. Porque los compuestos sintetizados (47), (48) y (49) tienen núcleos de flúor, se usó ¹⁹F-IRM para mostrar cambios en la formación de células 3-D después de 72 h. Las imágenes de ¹⁹F (figura 12C) mostraron regiones de células suprimidas en comparación con ¹H (figura 12B) realizada en el mismo cartucho de HFB. Los experimentos de IRM (figura 12B y figura 12C) se realizaron en el tiempo requerido para alcanzar la CI_{50} y fue de 72 h. Sin embargo, la ¹⁹F-IRM mostró una diferencia de solo 1,5 ppm entre picos individuales de los grupos trifluorometilo en los espectros realizados con los compuestos (47), (48) y (49).

Citotoxicidad de derivados de colchicina frente a líneas celulares cancerosas

Materiales y métodos

Las líneas celulares usadas fueron A549 (carcinoma de pulmón humano), HeLa (carcinoma de cuello uterino humano), MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria humana), CEM (células T linfoblastoides humanas de ALL (leucemia linfoblástica aguda), M010B (glioma humano), M006X (glioma humano) y Jurkat (leucemia de células T humanas).

Preparación del modelo de tubulina

Las secuencias de consenso para los isotipos de β -tubulina humana se han descrito previamente (Huzil J.T. *et al.*, Nanotechnology. 2006: 17: S90-S100) Los residuos que componen el sitio de unión a colchicina se determinaron examinando la cadena B dentro de las coordenadas pdb 1SA0 (Ravelli R.B. *et al.*, Nature. 2004; 428: 198-202.). Usando PyMol v1.0 (Delano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002), se seleccionaron residuos con cualquier átomo hallado dentro de 6 Å de colchicina. A partir de este subconjunto de residuos, se definió un conjunto mínimo de residuos de contacto hallados dentro del sitio de unión a colchicina (figuras 13A y 13B). El examen de las secuencias primarias para β I, β IIa, β IIb, β III, β IVa, β IVb y β V, basado en este conjunto de contacto reducido, colocó los isotipos de tubulina en uno de los tres sitios de unión a colchicina; tipo I (β I y β IV), tipo II (β II) y tipo III (β III y β V) (figura 13A). La estructura de molde de β -tubulina obtenida de a partir de las coordenadas de cadena B 1SA0 (Ravelli *et al.*, 2004, Nature, 428, 198-202.), se usó luego para crear los modelos reemplazando los residuos apropiados de una biblioteca de confórmers convencional usando la función de mutación que se encuentra en PyMol v1.0 (Delano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002).

La minimización de cada modelo de sitio de unión se realizó en el paquete de dinámica molecular (MD) GROMACS (versión 3.2.1) (Lindahl F. *et al.*, GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. J Mol. Mod. 2001; 7: 306-17) usando el campo de fuerza molecular CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) (Brooks B.R., Brooks CLr, Mackerell AD.J. *et al.*, CHARMM: The biomolecular simulation program. J. Comput. Chem 2009) Los criterios de convergencia para los descensos más pronunciados y la minimización del gradiente conjugado se establecieron en un gradiente de $0,05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Después de la minimización, se realizó un ciclo de recocido simulado corto (100 ps) en una caja periódica completamente solvatada ($100 \times 100 \times 100 \text{ \AA}$). Las cargas no restringidas se contrarrestaron con iones de sodio y se calculó la electrostática de largo alcance usando malla de partículas de Ewald (PME).

Generación de derivados de colchicina

La estructura de la colchicina unida a la tubulina se extrajo del archivo estructural pdb 1SA0 (Ravelli R.B. *et al.*, Nature. 2004; 428: 198-202) y se importó a MarvinSketch (ChemAxon, Hungría). La derivatización de los grupos metoxilo C1 y C3 (figuras 2-4) se logró mediante la construcción de modificaciones usando las herramientas de dibujo 3D. Luego, cada uno de los derivados se exportó en coordenadas 3D como archivos MDL Mol (Symyx Technologies, EE. UU.).

Parametrización y minimización de colchicina

Se prepararon estructuras de colchicina y sus derivados y parametrizaron usando el campo de fuerza CHARMM (Brooks B.R., Brooks CLr, Mackerell AD.J. *et al.*, CHARMM: The biomolecular simulation program. J. Comput. Chem 2009) tal como se implementó en Discovery Studio v2.1 (Accelrys, Inc., EE. UU.). Antes de la reintroducción de cada derivado en los modelos de sitio de unión de tipo I, II y III, se realizó una etapa de minimización en el vacío. Debido a que las coordenadas iniciales de colchicina se obtuvieron de una estructura cristalográfica, se impusieron restricciones armónicas (10 kcal mol^{-1}) en los átomos de carbono contenidos en cada uno de los tres anillos. Se añadieron hidrógenos, se fijaron los órdenes de enlace y se optimizaron las posiciones atómicas usando el campo de fuerza CHARMM y el protocolo Newton Raphson de conjunto de base adoptada (ABNR) hasta que el gradiente de desviación cuadrática media (RMS) fue menor de $0,05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Los derivados de colchicina de segunda generación se prepararon de manera ligeramente diferente; se pusieron sistemas individuales en una caja de agua TIP3 usando GROMACS y se minimizaron. Tras un breve equilibrado, se obtuvieron las energías del sistema para tres condiciones independientes. La energía para los complejos solvatados de tubulina-colchicina E(P+L) se restó de la energía obtenida de un sistema de tubulina-colchicina, en el que la colchicina no estaba unida al sitio de unión a colchicina E(P-L). Se usó una gran caja de agua para garantizar que no se introdujeran interacciones no unidas entre colchicina y tubulina en el caso de E(P-L).

Detección computacional de colchicina

Se realizó el acoplamiento de los 20 derivados de colchicina a los sitios de unión de tipo I, II y III usando CDOCKER (Wu G. *et al.*, J. Comput Chem. 2003; 24: 1549-62), tal como se implementó en Discovery Studio v2.1 (Accelrys, Inc., EE. UU.). En resumen, se realizó una búsqueda conformacional de los derivados usando un enfoque de MD de recocido simulado con el campo de fuerza CHARMM (Brooks B.R., Brooks CLr, Mackerell AD.J. *et al.*, CHARMM: The biomolecular simulation program. J. Comput. Chem 2009) La selección de una esfera de sitio de entrada se definió por todo el sitio de unión a colchicina. Luego se calentó cada derivado hasta una temperatura $T = 700\text{K}$ y se recoció hasta $T = 300\text{K}$. Se llevaron a cabo diez de tales ciclos para cada uno de los 20 derivados de colchicina, produciendo 600 poses. Luego, se sometió cada conformación a minimización de energía local, usando el método de ABNR descrito anteriormente.

Evaluación de energía de unión

Usando mm-GBSA (área superficial de Born generalizada de mecánica molecular), se evaluó la energía de unión para cada sistema usando electrostática en el vacío y se aproximó la solvatación usando el modelo de Born generalizado. Las energías de unión se calcularon obteniendo la energía potencial total del sistema y restando la energía del derivado y del dímero vacío:

$$E_{\text{unión}} = E_{\text{complejo}} - E_{\text{tubulina}} - E_{\text{fármaco}}$$

Para los derivados de colchicina de segunda generación, se determinó la energía de manera ligeramente diferente:

$$E_{\text{unión}} = E(\text{P-L}) - E(\text{P+L})$$

Unión de fármacos a isotipos de tubulina purificados

La tubulina se purificó a partir de la proteína de microtúbulos a granel mediante cromatografía en fosfocelulosa (Fellous A., *et al.*, Eur. J. Biochem. 1977; 78: 167-74) Los dímeros de tubulina $\alpha\beta\text{II}$ y $\alpha\beta\text{III}$ se purificaron posteriormente mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos monoclonales tal como se describió previamente (Banerjee A. *et al.*, J. Biol. Chem 1992; 267: 13335-9; y Baneljee A. *et al.*, J. Biol. Chem 1988; 263: 3029-34). Para las

mediciones de fluorescencia cinética, se incubaron alícuotas de 500 µl de tubulina (0,1 mg/ml) a 37°C en cubetas de fluorescencia de cuarzo (camino óptico de 0,5 cm) en presencia de una serie de concentraciones de fármaco. La cinética se realizó en condiciones de pseudoprimer orden usando fármacos en gran exceso con respecto a la tubulina. Las longitudes de onda de excitación y emisión usadas fueron de 380 nm y 437 nm, respectivamente.

5 Los valores de fluorescencia corregidos se representaron gráficamente en función del tiempo (*t*) y se ajustaron a la curva:

$$F_{m\acute{a}x} - F_t = Ae^{(-k_{on,ap})(t)}$$

10 En estas condiciones, $k_{on,ap}$ es un buen índice del grado de interacción entre un fármaco y un isotipo de tubulina. Una representación gráfica lineal esperada de $\ln(F_{m\acute{a}x} - F_t)$ frente a t tiene una pendiente $k_{on,ap}$. Se representaron gráficamente los valores de $k_{on,ap}$ en función de los valores informados previamente para $\alpha\beta$ II y $\alpha\beta$ III, 132 y 30 M⁻¹s⁻¹ respectivamente (Banerjee A. *et al.*, J. Biol. Chem 1992; 267: 13335-9).

15 Citotoxicidad

Se prepararon disoluciones de fármaco disolviéndolo en dimetilsulfóxido al 4,5% y diluyendo con agua destilada hasta una concentración final de 1 mM. Se preparó una serie de diluciones y se usó un barrido de longitud de onda de la disolución diluida para determinar la longitud de onda de la absorbancia máxima para cada compuesto. Se barrieron cinco concentraciones de fármaco normalizadas a esta longitud de onda predeterminada para obtener una estimación del coeficiente de extinción del compuesto.

25 Se usó un ensayo de MTS primario para evaluar el número óptimo de células para los ensayos de citotoxicidad. Se tripsinizaron las células, se contaron y se introdujeron en siete carriles de una placa de 96 pocillos con diferentes números de células (ocho réplicas por carril). Se determinaron los números de células óptimos después de 72 y 96 horas de crecimiento y se usaron en ensayos de citotoxicidad posteriores. Se sembraron las células adherentes en placas en nueve carriles de una placa de 96 pocillos con el número de células predeterminado y veinticuatro horas después, se añadieron concentraciones establecidas de derivados de colchicina a ocho de los carriles que contenían células. Se prepararon las mismas disoluciones de fármacos con líneas celulares en suspensión a las concentraciones celulares predeterminadas, se sembraron en placas y se cultivaron con los derivados de colchicina correspondientes durante 48 y 72 horas. Se determinó la viabilidad celular usando el ensayo de proliferación celular Cell Titer 96 AQueous One Solution (Promega, EE. UU.).

35 Ajuste de datos de citotoxicidad

Se realizaron ajustes usando un modelo de dosis-respuesta ideal para datos que muestran una meseta de respuesta inicial, una región de transición y una meseta de respuesta final.

40
$$respuesta = \frac{I_{inf} - I_{sup}}{1 + 10^{COLINA}(\log CI_{50} - [conc])} + I_{sup}$$

45 *COLINA* es una medida de la inclinación de la región de transición y se fijó en un valor de 2,5. I_{sup} es la respuesta obtenida a una concentración de fármaco muy baja/nula. Los datos y todos los parámetros se normalizaron para $I_{sup} - I_{inf}$, una medida del efecto máximo del fármaco. Entonces se usó un método de Monte Carlo (N. Metropolis (1987), "The beginning of the Monte Carlo method", número especial de Los Alamos Science dedicado a Stanislaw Ulam: págs. 125-130) para medir la sensibilidad de los parámetros a pequeños cambios en los datos, y se calcularon las desviaciones estándar para los parámetros (tablas 1 y 2).

50 Tabla 1. Valores de log de CI_{50} [\log_{10} M] para colchicina y diversos derivados de colchicina, determinados mediante pruebas de citotoxicidad con seis líneas celulares diferentes (todos compuestos de referencia).

	A549	HeLa	MCF-7	CEM	M010B	M006X
CH	-6,46±0,04	-6,86±0,05	-7,83±0,06	-8,03±0,04	-7,70±0,05	-8,35±0,29
2	-5,89±0,06	-6,48±0,13	-6,32±0,10	-6,65±0,08	X	X
3	-5,29±0,11	X*	-5,25±0,10	X	X	X
4	-5,07±0,04	-5,41±0,13	-5,23±0,07	-5,39±0,11	X	X
5	-5,09±0,06	-5,46±0,13	-5,25±0,08	-5,51±0,13	-5,22±0,06	-6,12±0,04
6	-7,83±0,10	-7,89±0,06	-7,42±0,13	-8,64±0,08	-7,94±0,04	-8,41±0,08
7	-7,66±0,08	-8,25±0,09	-8,10±0,05	-8,49±0,10	X	X

ES 2 745 255 T3

	A549	HeLa	MCF-7	CEM	M010B	M006X
7a	-6,52±0,13	-6,66±0,11	-6,17±0,06	-6,76±0,08	-6,60±0,14	-7,12±0,06
8	-7,80±0,07	-7,68±0,09	-7,50±0,12	-8,48±0,10	-7,49±0,13	-7,98±0,03
9	-6,66±0,10	-7,35±0,09	-7,10±0,05	-7,46±0,08	-6,74±0,08	-7,47±0,09
10	-5,77±0,10	-6,17±0,07	-6,27±0,08	-6,45±0,09	-5,66±0,10	-6,42±0,09
11	-6,47±0,12	-7,23±0,09	-7,05±0,04	-7,45±0,09	-6,74±0,08	-7,40±0,09
12	-6,00±0,04	-6,43±0,15	-6,30±0,12	-6,46±0,09	-6,39±0,11	-6,47±0,12
13	-4,51±0,32	-5,33±0,14	-5,19±0,09	-5,50±0,10	-4,90±0,09	-5,67±0,12
15	-6,23±0,08	-6,22±0,09	-6,35±0,12	-6,57±0,11	-6,38±0,14	-6,45±0,13
16	-4,95±0,07	-5,33±0,11	-5,22±0,08	-5,53±0,10	-5,20±0,08	-5,44±0,12
40	-7,38±0,14	-7,77±0,09	-7,37±0,11	-8,47±0,13	-7,65±0,10	-8,34±0,12
41	-8,50±0,11	-8,45±0,11	-8,31±0,12	-8,29±0,10	X	X
42	-8,37±0,10	-8,47±0,14	-8,28±0,10	-8,64±0,09	-8,27±0,12	-8,83±0,08
43	-8,76±0,11	-8,66±0,12	-8,71±0,10	-8,55±0,09	-8,51±0,15	X
*Datos insuficientes						
†No se disolvió a pH normal						

Tabla 2. Fracción de células que sobreviven a los mayores valores de concentración de fármaco (I_{inf}) para colchicina y diversos derivados de colchicina, determinada mediante pruebas de citotoxicidad con seis células diferentes (todos compuestos de referencia).

	A549	HeLa	MCF-7	CEM	M010B	M006X
CH	0,118±0,042	0,061±0,048	0,377±0,010	0,016±0,021	0,107±0,017	0,026±0,005
2	0,283±0,022	0,074±0,031	0,424±0,019	0,027±0,021	X	X
3	0,235±0,048	X*	0,518±0,033	X	X	X
4	0,332±0,028	0,058±0,048	0,399±0,021	-0,031±0,049	X	X
5	0,265±0,043	0,025±0,044	0,451±0,025	-0,003±0,048	0,258±0,024	0,031±0,018
6	0,249±0,030	0,089±0,026	0,605±0,015	-0,062±0,026	0,108±0,013	0,039±0,011
7	0,229±0,014	0,066±0,022	0,464±0,009	0,000±0,014	X	X
7a	0,222±0,026	0,051±0,032	0,406±0,014	0,022±0,020	0,239±0,031	0,197±0,024
8	0,246±0,013	0,044±0,020	0,433±0,013	0,000±0,013	0,181±0,020	0,072±0,014
9	0,227±0,021	0,082±0,018	0,484±0,009	-0,004±0,015	0,299±0,017	0,037±0,015
10	0,256±0,032	0,080±0,026	0,387±0,016	0,012±0,022	0,250±0,031	0,088±0,022
11	0,223±0,024	0,078±0,023	0,388±0,012	0,012±0,016	0,288±0,017	0,063±0,016
12	0,245±0,024	0,040±0,038	0,390±0,025	-0,015±0,021	0,328±0,022	0,051±0,027
13	0,218±2,644	0,059±0,059	0,364±0,038	-0,026±0,039	0,305±0,053	0,055±0,046
15	0,288±0,020	0,039±0,034	0,381±0,024	-0,016±0,032	0,382±0,028	0,058±0,030
16	0,189±0,052	-0,001±0,051	0,331±0,033	-0,014±0,042	0,266±0,036	0,026±0,043
40	0,230±0,027	0,039±0,026	0,459±0,013	0,015±0,022	0,118±0,026	0,061±0,029
41	0,243±0,012	0,039±0,016	0,472±0,016	-0,050±0,022	X	X
42	0,256±0,015	0,046±0,026	0,538±0,010	0,026±0,018	0,327±0,023	0,184±0,021
43	0,198±0,024	0,025±0,025	0,399±0,015	0,010±0,014	0,214±0,022	X
*Datos insuficientes						

A549	HeLa	MCF-7	CEM	M010B	M006X
†No se disolvió a pH normal					

RESULTADOS

Análisis de secuencia de isotipos

5 La estructura terciaria de la tubulina se puede dividir en tres dominios distintos: dominio I (residuos 1-198), dominio II (residuos 199-373) y dominio III (residuos 374-428) (Nogales E. *et al.*, Nature. 1995; 375: 424-7) Los isotipos β I, β IIa, β IIb, β III, β IVa, β IVb y β V comparten respectivamente una identidad del 87,4%, el 88,1% y el 96,3% dentro de estos dominios. Para residuos implicados en la unión a paclitaxel (Nogales E. *et al.*, Nature. 1995; 375: 424-7), hubo una
10 identidad de secuencia mayor a la esperada del 91,7% en comparación con la identidad global entre los isotipos de β -tubulina. Esta tendencia mayor que la media continúa con el sitio de unión a *Vinca* (Gigant B. *et al.*, Nature. 2005: 435: 519-22) (identidad del 92,3%) y el sitio de unión a GDP (Nogales E. *et al.*, Nature. 1995; 375: 424-7) (identidad del 100%). Se halló que la superficie de unión a colchicina (Ravelli R.B. *et al.*, Nature. 2004; 428: 198-202) consistía en
15 18 residuos: V236, C239, L246, A248, K252, L253, N256, M257, T312, V313, A314, A315, V316, N348, K350, T351, A352 e I368 (figura 13A) y a diferencia de los sitios de unión a paclitaxel y *Vinca* comparten solo una identidad del 77,9% entre los siete isotipos de β -tubulina examinados.

En general, el sitio de unión es predominantemente apolar con una ligera carga positiva introducida en el reborde exterior de la superficie por los residuos K252 y K350. Se halló que sustituciones específicas dentro de la superficie
20 de unión a colchicina eran C236S (β III y β V), A315T (β III y β V), V316I (β II) y T351V (β III y β V) (figura 13A). Basándose en la distribución de isotipos de las sustituciones dentro de este sitio, los isotipos de β -tubulina se dividieron en tres clases. El sitio de unión de tipo I se caracteriza por la secuencia canónica de β I y contiene, en su mayor parte, los isotipos β II y β IV. El sitio de unión de tipo II es idéntico al sitio de tipo I con la excepción de una sustitución V316I que se encuentra solo dentro de los isotipos β II. El sitio de unión de tipo III tiene la mayor variación (C236S, A315T y
25 T351V) e incluye los isotipos β III y β V. Cuando las sustituciones halladas dentro de los sitios de unión de tipo II y tipo III se mapearon en la estructura de tubulina β I (Lowe J. *et al.*, J. Mol. Biol. 2001; 313: 1045-57), se observó que todos estaban ubicados dentro de una región que rodea el anillo A de colchicina (figura 13B). Si bien ninguna de estas sustituciones altera la carga de la superficie, C239S y A315T cambian la polaridad de la superficie que interacciona con el anillo A, específicamente los tres grupos metoxilo fenólicos apolares.

30

Derivados de colchicina

Tal como se describe en las figuras 2-4, se realizaron varias modificaciones a los armazones básicos de colchicina y tiocolchicina. Estas modificaciones se componían de alcano/alqueno, éster/éter, modificaciones aromáticas de C1-
35 desmetilcolchicina y C3-desmetilcolchicina (figuras 3 y 3A) o modificaciones de alcano/alqueno realizadas en C3-desmetiltiocolchicina (figura 4). Se eligieron modificaciones específicas para investigar las diferencias espaciales y químicas entre las clases de sitios de unión de isotipos. Se diseñaron las modificaciones realizadas en C1 para investigar las diferencias halladas entre los residuos 315, 316 y 351, mientras que las realizadas en C3 se diseñaron principalmente para investigar una cavidad apolar que se observa en el cocrystal y se encuentra debajo de la colchicina
40 (Ravelli R.B. *et al.*, Nature. 2004; 428: 198-202).

Acoplamiento de derivados de colchicina

La estrategia básica empleada para investigar computacionalmente los derivados de colchicina implicó la generación de varias orientaciones de ligando, seguidas de recocido simulado basado en MD y una etapa de refinamiento final que incorpora los descensos más pronunciados y la minimización del gradiente conjugado. Usando CDOCKER (Accelrys, Inc., EE. UU.), se generaron un total de diez réplicas para cada uno de los derivados de colchicina y se distribuyeron aleatoriamente alrededor del centro de los modelos de sitios de unión. Después de la situación inicial de los derivados, cada uno de ellos se sometió a recocido simulado basado en MD y refinamiento final mediante
50 minimización, produciendo diez poses acopladas para cada derivado y colchicina en cada uno de los tres modelos de sitios de unión. La etapa final en el procedimiento de acoplamiento fue la puntuación de las poses acopladas refinadas usando el protocolo Score Ligand Poses de Discovery Studio. Debe tenerse en cuenta que se usaron los valores de energía promedio para las diez poses de cada experimento para construir las puntuaciones de energía de unión. Este procedimiento produjo 630 conformeros de ligando, cuyas evaluaciones de energía se realizaron.

55

Determinación de la energía de unión

Se determinaron las energías de unión calculando la energía potencial total de cada sistema completo determinado en las etapas de acoplamiento y luego restando la energía del ligando unido y la del apo-dímero (tablas 3 a 3B).
60 Cuando se representaron gráficamente las energías de unión medias para cada uno de los derivados de colchicina, las tendencias fueron sistemáticas en todos los modelos y no hubo una diferenciación evidente entre los sitios de unión de tipo I, tipo II o tipo III (figura 14; CH representa colchicina) Sin embargo, en todos los modelos, los derivados

aromáticos y éster/éter en la posición C1 presentaron energías de unión elevadas en comparación con la colchicina, mientras que los derivados de alcano/alqueno y tiocolchicina en las posiciones C1 y C3 tenían afinidades de unión superiores (tabla 3 y figura 14) Estas representaciones gráficas también demostraron el intervalo de energías de unión para cada uno de los derivados, lo que sugiere la idoneidad global del ajuste de acoplamiento (figura 14).

5 Específicamente, aquellos derivados que presentan mayores energías de unión que la colchicina tendieron a tener una distribución más grande en sus energías de unión, mientras que aquellos con menores energías de unión generales tuvieron una distribución más estrecha. Esta tendencia parecía correlacionarse con la polaridad de cada uno de los grupos funcionales en la posición C1. Para examinar el papel que tuvieron estas modificaciones *in vitro* se sintetizaron todos los derivados de colchicina y se sometieron a prueba tanto en ensayos de citotoxicidad como de
10 unión a tubulina.

A partir de estos cálculos, está claro que la modificación del grupo amida de colchicina aumenta la unión con la tubulina en la mayoría de los derivados de segunda y tercera generación (tablas 3A y 3B). Estos resultados también sugieren que, en promedio, las modificaciones realizadas al mejor de los derivados de primera generación ((40), (42), (43))
15 tenía las menores energías.

Tabla 3. Valores calculados y experimentales para la unión de derivados de colchicina. CH es colchicina. Las primeras tres columnas representan el valor medio de diez experimentos de acoplamiento computacional. Las energías de unión (BE) [kcal mol⁻¹] promedio para los tres modelos de sitios de unión con errores estándar se informan. La columna cuatro presenta los valores medios de log de CI₅₀ [log₁₀ M] según se determina mediante pruebas de citotoxicidad con las líneas celulares A549, HeLa, MCF-7 y CEM. Las columnas cinco y seis son las velocidades *k_{on}* [M⁻¹ s⁻¹] para los isotipos αβII y αβIII, (todos compuestos de referencia).
20

Fármaco	Tipo I (BE)	Tipo II (BE)	Tipo III (BE)	CI ₅₀ [log ₁₀ M]	<i>K_{on}</i> αβII	<i>K_{on}</i> αβIII
CH	-14,47±0,45	-14,95±0,36	-16,29±0,21	-7,30±0,05	132±5	30±2
(2)	-16,06±0,18	-18,78±0,44	-10,45±1,24	-6,34±0,09	35,9	9,4±1,0
(3)	-13,89±1,08	-11,42±0,43	-17,99±0,57	X [‡]	36,6 [†]	12±2,4
(4)	-14,63±1,45	-14,65±0,82	-14,73±1,60	-5,27±0,09	33,2	21,3±5,2
(5)	-7,04±1,36	-10,09±1,17	-12,75±1,93	-5,33±0,10	X [‡]	X
(6)	-16,15±0,85	-19,04±0,31	-16,36±1,25	-7,95±0,09	45,7	15,3±2,2
(7)	-18,72±0,27	-17,24±1,33	-20,92±0,14	-8,12±0,08	45,2	10,8±0,7
(7una)	-10,83±1,07	-15,75±1,52	-17,19±1,69	-6,53±0,10	41,9±0,4	10±0,4
(8)	-17,9±0,91	-17,54±0,73	-21,52±0,36	-7,86±0,10	67,7	14,9±0,6
(9)	-16,27±0,58	-15,37±0,57	-15,32±1,69	-7,15±0,08	50,4	13,7±0,7
(10)	-12,92±0,79	-11,59±1,08	-14,2±0,69	-6,16±0,08	74,9	15,1±0,4
(11)	-13,44±0,87	-16,83±0,63	-16,44±0,76	-7,05±0,09	37,9	9,2±0,7
(12)	-9,07±0,95	-8,02±0,70	-15,42±0,91	-6,30±0,10	54,2	16
(13)	-10,84±1,15	-6,91±1,51	-8,78±1,63	-5,13±0,17	35,1	11,6
(14)	-11,85±1,32	-7,67±0,91	-10,65±0,93	X [*]	X	16,5
(15)	-10,02±0,97	-7,24±0,94	-8,82±0,22	-6,34±0,10	49,4	14,1
(16)	-8,9±1,85	-9,18±1,08	-7,32±0,63	-5,26±0,09	35,7	9,1
(40)	-17,06±0,33	-10,15±1,31	-19,84±0,32	-7,74±0,12	201,2±10,5	66,9±1,4
(41)	-12,2±0,94	-10,79±0,86	-12,7±0,53	-8,39±0,11	185,2±7,8	65,5±1,3
(42)	-13,34±0,42	-12,3±0,78	-12,6±1,52	-8,44±0,11	138,3±6,5	53,4±0,8
(43)	-14,51±0,63	-13,02±1,05	-17,25±0,34	-8,67±0,11	301,4±20,1	98,5±3,4

*No se disolvió a pH normal
[†]Desviación estándar no disponible
[‡]Datos insuficientes

Tabla 3A. Valores calculados para la unión de derivados de colchicina de segunda generación. Las energías de unión (BE) [kcal mol⁻¹] promedio para los tres modelos de sitios de unión se informan. El derivado principal de primera generación puede hallarse en la primera celda de cada bloque de la tabla ((7) a (9), (40), (42) y (43)) siguen los
25

derivados de segunda generación. (todos compuestos de referencia).

Fármaco	Unión	Fármaco	Unión
(8)	-245,00	(40)	-390,00
(55)	-455,00	(67)	-70,00
(56)	-195,00	(68)	-625,00
(57)	-700,00	(69)	-485,00
(76)	-445,00	(80)	-260,00
(7)	-470,00	(42)	-330,00
(58)	-265,00	(70)	-385,00
(59)	110,00	(71)	-300,00
(60)	-520,00	(72)	-660,00
(77)	-550,00	(81)	-220,00
(7una)	-575,00	(43)	-290,00
(61)	-515,00	(73)	-455,00
(62)	-505,00	(74)	-415,00
(63)	-475,00	(75)	-665,00
(78)	-705,00	(82)	-545,00
(9)	-255,00		
(64)	-390,00		
(65)	-240,00		
(66)	-545,00		
(79)	-510,00		

Tabla 3B. Energía libre de unión relativa computada de los derivados de colchicina de ChemRoutes en isotipos de β -tubulina humana (I, IIa, III, IVa) con respecto a la colchicina convencional. Unidades en kJ/mol. Los compuestos 83-88 son compuestos de referencia)

5

Fármaco	Tipo I (BE)	Tipo IIa (BE)	Tipo III (BE)	Tipo IVa (BE)
(83)	1,18	-7,76	-12,07	-10,21
(84)	7,00	-0,21	-8,70	5,40
(85)	13,51	-12,97	1,12	0,42
(86)	-15,14	-11,91	-18,30	-16,66
(87)	8,76	-12,51	-7,70	2,38
(88)	-5,01	-8,15	3,41	8,25
(89)	4,50	-10,43	-16,65	-15,38
(90)	1,04	-10,66	-13,01	-6,79
(91)	-6,92	-20,69	-25,44	-12,86
(92)	-0,09	-21,63	-5,43	-6,29
(93)	-3,46	-19,87	-20,13	-13,69
(94)	-1,28	-13,34	-20,85	-14,53

Citotoxicidad de los derivados de colchicina sintetizados

10 Se realizó un examen de citotoxicidad con varias líneas celulares basadas en el cáncer de origen y diferentes morfologías. Las observaciones iniciales sugirieron que la CI_{50} dependía del derivado (figura 15A) y no de la línea celular usada (tabla 4). Basándose en esta observación, la media de los valores de $\log deCI_{50}$ para cada fármaco se tomaron con respecto a un conjunto de líneas celulares, y se usó ese valor como propiedad del fármaco. La fracción

de células que sobrevivieron a altas concentraciones de fármacos (I_{inf}) dependía de la línea celular sometida a prueba (figura 15C). Con respecto a todos los derivados sometidos a prueba, el 30-60% de las células MCF-7 sobrevivieron. Las líneas de células CEM, HeLa y Jurkat tuvieron los valores más bajos de CI_{50} . Tabla 4 (4A y 4B). Valores de CI_{50} de colchicina y varios derivados de colchicina, determinados mediante pruebas de citotoxicidad con siete líneas celulares diferentes. (todos ejemplos de referencia)

5

Tabla 4A:

Fármaco	Células A549	Células HeLa	Células MCF-7	Células CEM
Colchicina	3,84x10(-7)	1,423x10(-7)	3,040x10(-7)	1,684x10(-8)
Tiocolchicósido	2,917x10(-6)	1,85x10(-2)	----	----
2	1,482x10(-6)	3,438x10(-7)	5,181x10(-7)	2,930x10(-7)
3	5,273x10(-6)	1,543x10(-8)	7,274x10(-6)	4,269x10(-7)
4	1,038x10(-5)	4,143x10(-6)	6,851x10(-6)	3,496x10(-6)
5	7,067x10(-6)	4,028x10(-6)	6,065x10(-6)	2,480x10(-6)
7a	2,408x10(-8)	6,760x10(-9)	9,039x10(-9)	3,219x10(-9)
7b	2,681x10(-8)	2,740x10(-8)	3,985x10(-8)	3,020x10(-9)
7c	2,853x10(-7)	4,044x10(-8)	7,587x10(-8)	3,366x10(-8)
8	2,804x10(-8)	2,483x10(-8)	5,055x10(-8)	2,231x10(-9)
10	2,337x10(-6)	7,081x10(-7)	5,362x10(-7)	3,535x10(-7)
11	3,646x10(-7)	6,217x10(-8)	1,641x10(-7)	3,762x10(-8)
12	1,671x10(-4)	4,035x10(-7)	6,372x10(-7)	3,660x10(-7)
13	1,081x10(-6)	4,612x10(-6)	7,489x10(-6)	3,954x10(-6)
14	3,153x10(-6)	3,118x10(-6)	3,392x10(-6)	5,094x10(-6)
15	5,362x10(-7)	7,279x10(-7)	4,936x10(-7)	3,066x10(-7)
16	1,746x10(-5)	5,315x10(-6)	5,408x10(-6)	4,236x10(-6)
50	3,481x10(-8)	2,673x10(-8)	3,783x10(-8)	3,003x10(-9)
51	2,767x10(-9)	3,308x10(-9)	3,777x10(-9)	3,547x10(-9)
52	3,039x10(-7)	3,305x10(-7)	4,788x10(-7)	2,519x10(-7)
53	3,611x10(-9)	3,373x10(-9)	4,399x10(-9)	1,806x10(-9)
54	3,278x10(-9)	2,947x10(-9)	3,524x10(-9)	2,694x10(-9)

Tabla 4B: (todos ejemplos de referencia)

Fármaco	Células MO10B	Células MOO6X	Células Jurkat	ε
Colchicina	1,806x10(-8)	1,832x10(-9)	3,818x10(-9)	16,6
Tiocolchicósido	----	----	----	13,6
2	----	----	2,713x10(-7)	18,3
3	----	----	----	14,4
4	----	----	4,660x10(-6)	12
5	6,441 x10(-6)	7,912x10(-7)	----	11,9
7a	----	----	----	14,6
7b	2,738x10(-8)	1,278x10(-8)	----	17,7
7c	2,475x10(-7)	3,676x10(-8)	----	7,3
8	1,865x10(-8)	3,605x10(-9)	3,524x10(-9)	16,6
10	4,238x10(-6)	3,854x10(-7)	----	17,3
11	2,719x10(-7)	3,635x10(-8)	----	19,5

Fármaco	Células MO10B	Células MOO6X	Células Jurkat	ϵ
12	3,977x10(-7)	3,439x10(-7)	----	14,5
13	2,804x10(-5)	2,745x10(-6)	----	9,9
14	4,030x10(-6)	3,385x10(-6)	----	5,9
15	4,035x10(-7)	3,436x10(-7)	----	13,2
16	5,646x10(-6)	3,929x10(-6)	----	14
50	2,989x10(-8)	4,413x10(-9)	----	18,8
51	----	----	3,478x10(-9)	15,1
52	2,879x10(-7)	3,750x10(-8)	----	11,4
53	3,346x10(-9)	1,698x10(-9)	3,235x10(-9)	17,3
54	2,957x10(-9)	----	2,705x10(-9)	13,6

Al examinar los valores promedio de los valores de CI_{50} (tabla 3), resultó evidente un reparto de los derivados de colchicina (figuras 15A y 15B). Los derivados con valores de CI_{50} similares a los de la colchicina ((8), (9), (11) y (40)), contenían alcanos de cadena lineal apolares en la posición C1. Esos derivados con valores de CI_{50} más fuertes que la colchicina ((6), (7), (41), (42), y (43)) eran grupos apolares en las posiciones o bien C1 o bien C3. Sin querer restringirse por la teoría, los valores de CI_{50} más fuertes observados para estos compuestos pueden ser indicativos del aumento de las interacciones de superficie apolares con la tubulina debido al aumento de la ocupación del sitio de unión. Los resultados computacionales también se ven reforzados por los experimentos de citotoxicidad. El derivado más potente en los experimentos (43) tenía una CI_{50} de $2,13 \pm 0,77$ nM, un valor al menos 15 veces más fuerte que el informado previamente para colchicina ($29 \pm 2,2$ nM) o paclitaxel ($36,7 \pm 2,4$ nM) (Cragg G.M. *et al.*, Anticancer agents from natural products. CRC Press; 2005).

Cinética de unión

Una vez establecido un reparto de los efectos de derivados en los ensayos de citotoxicidad, se examinó su cinética de unión a los isotipos de tubulina bovina βII o βIII purificados (tabla 3). Se calcularon todos los valores de K_d suponiendo una $k_{off} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para colchicina tal como se determinó para βII o βIII previamente (Banerjee A. *et al.*, J. Biol. Chem 1992; 267: 13335-9). Puesto que la tubulina se aísla normalmente del tejido cerebral bovino, los isotipos predominantes disponibles fueron solo βII y βIII (Banerjee A. *et al.*, J. Biol. Chem 1992; 267: 13335-9). Esto proporcionó una muestra representativa de los sitios de unión a colchicina de tipo I y tipo III. Comparando $k_{on}(\alpha\beta II)$ con $k_{on}(\alpha\beta III)$, se demostró que todos los derivados tienen una alta correlación positiva ($r^2 = 0,94$). Los compuestos de referencia (40) a (43) tenían k_{on} mejorada para ambos, y supuestamente una mayor afinidad. Se determinó una correlación entre los valores de CI_{50} y la velocidad de activación para la unión a $\alpha\beta III$ (figura 16B). Debe tenerse en cuenta que $k_{on}(\alpha\beta II)$ y $k_{on}(\alpha\beta III)$ se correlacionan mutuamente (figura 16A), por tanto, solo una de ellas debe estar vinculada a la CI_{50} . Una correlación razonable entre estos dos conjuntos de datos ($r^2 = 0,44$) apoya que la citotoxicidad diferente de los compuestos frente a cada una de las líneas celulares es el resultado de una afinidad de unión diferente a la β -tubulina.

Correlaciones con la energía de unión calculada

Al comparar los resultados de citotoxicidad ponderada con las energías de unión calculadas a partir de los modelos de β -tubulina, se observó una correlación positiva moderada ($R^2 = 0,42$) (figura 17). La información de expresión para los cinco isotipos de β -tubulina en las líneas celulares A549, HeLa, MCF-7 y CEM se obtuvo de varias fuentes y se usó un valor de expresión promedio del 95% para los sitios de unión tipo I y el 5% para los sitios de unión tipo III para ponderar los valores de ΔG obtenidos de los cálculos de unión (Cuechiarelli V. *et al.*, Cell Motil. Cytoskeleton; 2008; 65: 675-85; Kavallaris M. *et al.*, J. Clin. Invest. 1997; 100: 1282-93; Tommasi S. *et al.*, Int. J. Cancer, 2007; 120: 2078-85; y Banerjee A., Biochem. Biophys Res. Commun. 2002; 293: 598-601) Una correlación positiva confirma que el modelado del sitio de unión a colchicina es útil para diseñar derivados de colchicina que puedan diferenciar entre isotipos de tubulina.

Citotoxicidad de derivados de colchicina

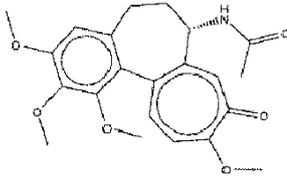
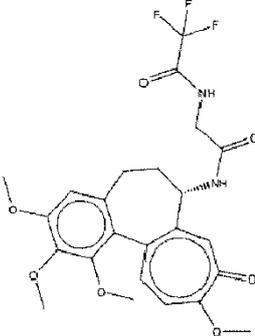
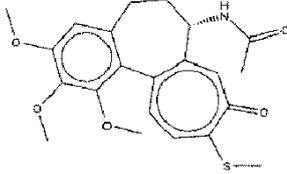
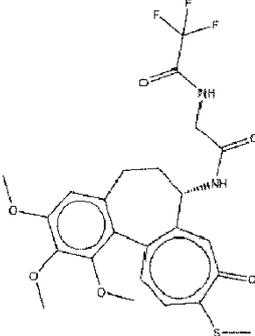
Materiales y métodos

Se analizó un conjunto de siete derivados de colchicina adquiridos de ChemRoutes frente a un conjunto de cuatro líneas celulares obtenidas de la colección de líneas celulares humanas congeladas del Cross Cancer Institute. Se usó un diseño experimental factorial completo, para un total de 28 casos.

Las líneas celulares usadas fueron A549 (adenocarcinoma de pulmón humano), NCI-H226 (carcinoma de células escamosas de pulmón humano), CCRF-CEM (células T linfoblastoides humanas de ALL) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria humana).

5

Los compuestos de referencia usados se enumeran en la siguiente tabla:

Nombre de compuesto	Estructura
1	
28a	
39	
47a	

Para cada par (línea celular, compuesto), se usaron las siguientes condiciones, asignándose cada condición a un carril en una placa de microtitulación:

10

a. Siete u ocho niveles de concentración entre 1×10^{-10} M y 1×10^{-3} M.

b. Un control solo con células y medios.

15

c. Un control solo con células, medios y DMSO. El DMSO estaba en una concentración aproximadamente igual a la usada en el mayor nivel de concentración de fármaco.

20

Además, se realizaron 6-8 réplicas (pocillos) de cada condición en la placa. Se prepararon disoluciones de fármaco disolviendo los compuestos sólidos en DMSO y luego diluyendo con agua. Se introdujo un número aproximadamente igual de células en cada pocillo de la placa y se incubaron las células durante 72 horas. Se realizó un ensayo de MTS

ES 2 745 255 T3

y se midieron los valores de absorbancia con un espectrofotómetro. Finalmente, se calculó un parámetro de log de CI_{50} ajustando un modelo logístico de 4 parámetros a los datos usando una implementación del algoritmo de Levenberg-Marquardt.

5 Resultados

Se obtuvieron los siguientes valores de log de CI_{50} , indicando menores valores de log de CI_{50} un compuesto de referencia más potente, es decir un compuesto que tiene actividad citotóxica a menor concentración.

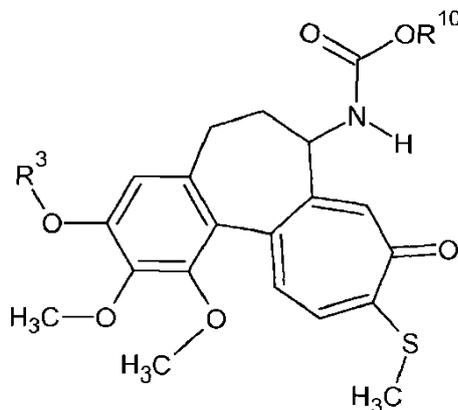
Línea celular	Compuesto	log de CI_{50} [1]
A549	1	-7,3
A549	28a	-6,2
A549	39	-7,0
A549	47a	-7,2
CCRF-CEM	1	-8,1
CCRF-CEM	28a	-7,4
CCRF-CEM	39	-8,7
CCRF-CEM	47a	-8,2
MCF-7	1	[2]
MCF-7	28a	[2]
MCF-7	39	-4,0
MCF-7	47a	-3,9
NCI-H226	1	-7,3
NCI-H226	28a	-6,5
NCI-H226	39	-8,1
NCI-H226	47a	-7,3
[1]: los valores de log de CI_{50} tienen una precisión de +/-0,5 o mejor		
[2]: no se obtuvo log de CI_{50}		
[3]: se confundió el efecto del tratamiento con la toxicidad de DMSO		

10 En resumen, si se promedian los valores de log de CI_{50} , sobre las líneas celulares A549, CCRF-CEM y NCI-H226, entonces se halla que el orden de potencia de los compuestos de referencia sometidos a prueba, del más potente al menos potente, es: (39) > (1) > (47a) > (28a).

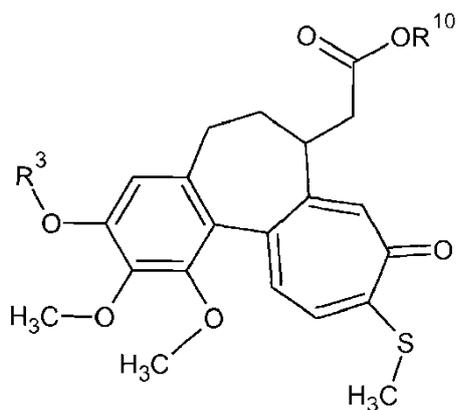
15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de:



fórmula XE



fórmula XF

sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero óptico, o combinación del mismo, en las que:

R^3 se selecciona de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido, un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido, un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido, grupo aromático sustituido o no sustituido o un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido;

en la fórmula XF R^{10} es de H, un grupo hidrocarbonado sustituido o no sustituido o un grupo heterogéneo sustituido o no sustituido; y

en la fórmula XE R^{10} es un grupo alquilo C_1 no sustituido;

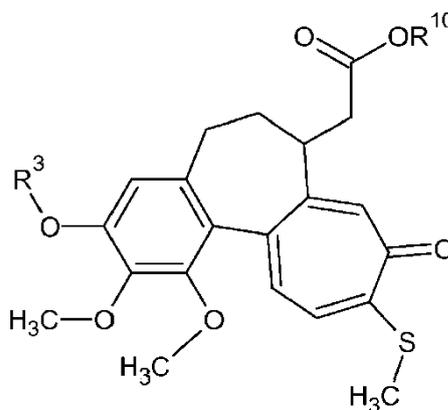
en el que el grupo heterogéneo sustituido o no sustituido es una cadena saturada o insaturada sustituida o no sustituida de átomos miembros distintos de hidrógeno que comprenden átomos de carbono y al menos un heteroátomo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 se selecciona de un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo alqueno sustituido o no sustituido, un grupo alquino sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido, un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 se selecciona de un alquilo sustituido o no sustituido, CH_2OH , un haloalquilo sustituido o no sustituido, un hidroxialquilo sustituido o no sustituido, un cianoalquilo sustituido o no sustituido, un alqueno sustituido o no sustituido, un alquino sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un cicloalqueno sustituido o no sustituido, un alquilocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilocicloalqueno sustituido o no sustituido, un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquiheterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterocicloalqueno sustituido o no

sustituido, un alquilheterocicloalqueno sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido, un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo, alquilen-O-cicloalquilo, alquilen-O-heterocicloalquilo, alquilen-O-alquilen-cicloalquilo o alquilen-O-alquilen-heterocicloalquilo.

- 5 4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 se selecciona de un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, un alqueno C_2-C_6 sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo C_1-C_6 , un alquilocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido o un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido.
- 10 5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 se selecciona de un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, un alqueno C_2-C_6 sustituido o no sustituido o alquilen-O-alquilo C_1-C_6 .
- 15 6. Compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que R^{10} es un grupo alquilo C_1 no sustituido.
7. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto es un compuesto de fórmula XF:



fórmula XF

- 20 8. Compuesto según la reivindicación 6, en el que R^{10} se selecciona de un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo alqueno sustituido o no sustituido, un grupo alquino sustituido o no sustituido, un grupo aromático sustituido o no sustituido, un grupo heteroaromático sustituido o no sustituido, un grupo carbocíclico sustituido o no sustituido o un grupo heterocíclico sustituido o no sustituido.
- 25 9. Compuesto según la reivindicación 7, en el que R^{10} se selecciona de un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, un alqueno C_2-C_6 sustituido o no sustituido, un alquino C_2-C_6 sustituido o no sustituido, un alquilcarbonilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, alquilen-O-alquilo C_1-C_6 , un alquilocicloalquilo sustituido o no sustituido, un alquilarilo sustituido o no sustituido o un alquilheteroarilo sustituido o no sustituido.
- 30 10. Compuesto según la reivindicación 8, en el que R^{10} se selecciona de un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, o un alqueno C_2-C_6 sustituido o no sustituido o alquino C_1-C_6 .
- 35 11. Compuesto según la reivindicación 9, en el que R^{10} se selecciona de un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido.
- 40 12. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un mamífero.
13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un mamífero.
- 45 14. Uso según la reivindicación 12, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer del SNC, cáncer de piel, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de mama, leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza, cáncer de cuello o cáncer de riñón.
15. Uso según la reivindicación 12, en el que el cáncer es un carcinoma.
- 50 16. Uso según la reivindicación 15, en el que el carcinoma se selecciona de carcinomas de células pequeñas, carcinomas de cuello uterino, glioma, astrocitoma, carcinomas de próstata, carcinomas de ovario, melanoma, carcinomas de mama o carcinomas colorrectales.

FIG. 1

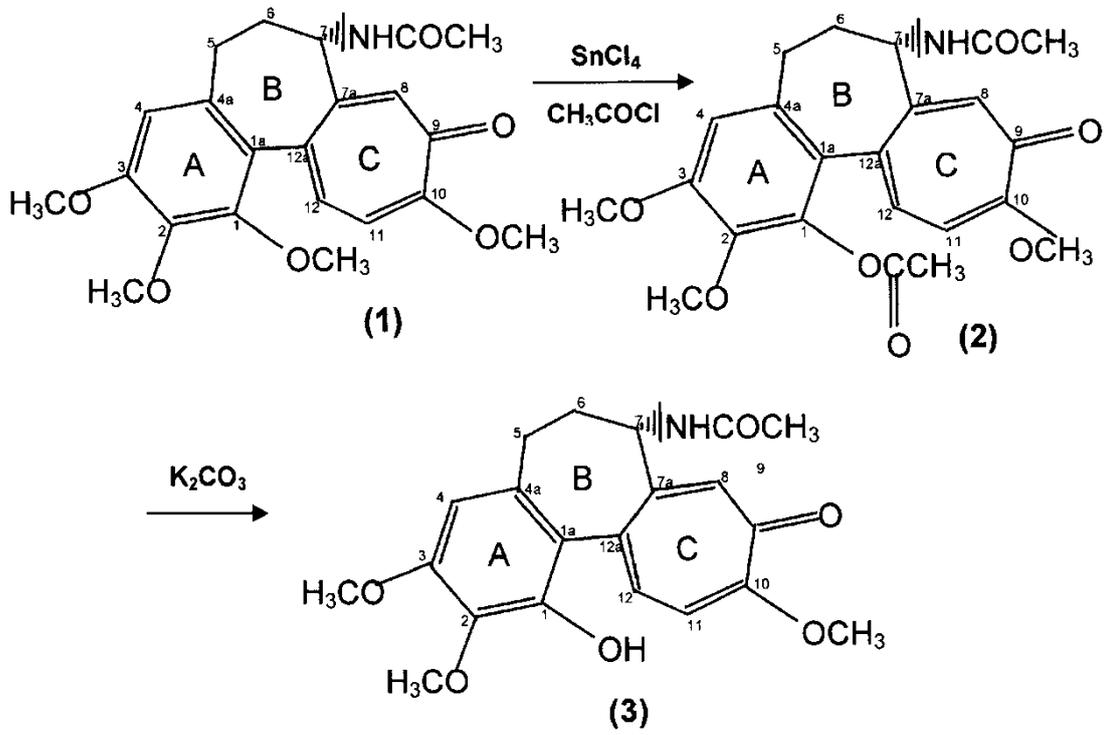
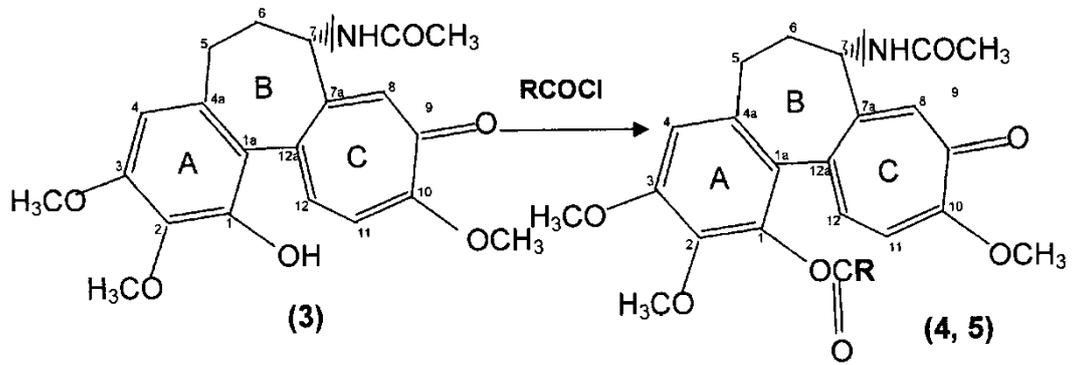


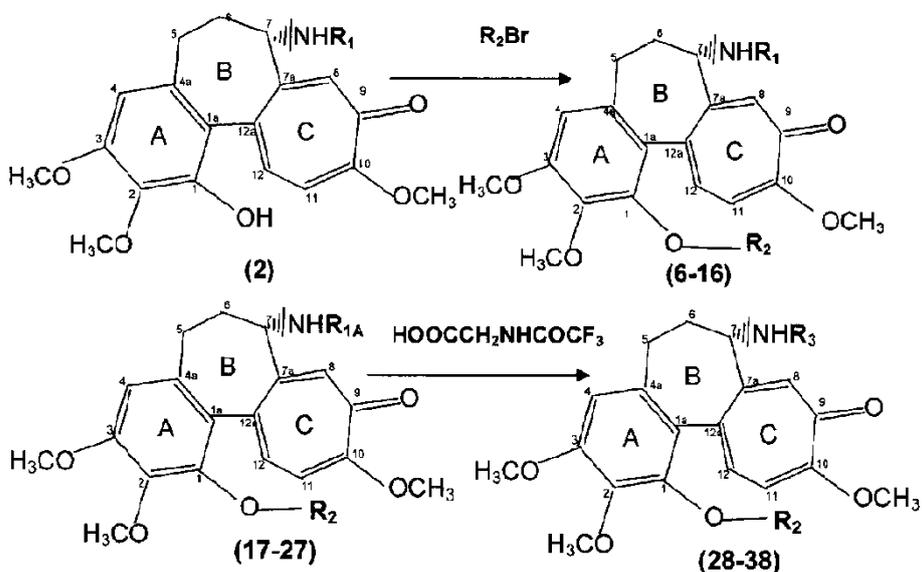
FIG. 2



(4) $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$

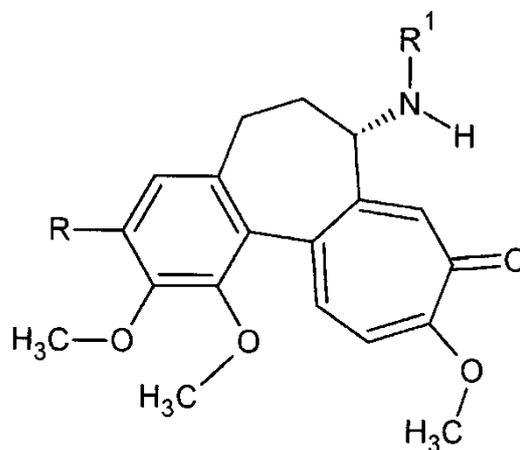
(5) $R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$

FIG. 3



- | | | |
|---|---|---|
| (6) $R_2 = CH_2CH_3$, $R_1 = COCH_3$ | (15) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-p-Cl$, $R_1 = COCH_3$ | (27) $R_2 = CH_2(C_6H_{11})$, $R_{1A} = H$ |
| (6a) $R_2 = CH_3$, $R_1 = COCH_3$ | | |
| (7) $R_2 = CH(CH_3)_2$, $R_1 = COCH_3$ | (16) $R_2 = CH_2(C_6H_5)$, $R_1 = COCH_3$ | (28) $R_2 = CH_2CH_3$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (7a) $R_2 = CH_2CH(CH_3)_2$, $R_1 = COCH_3$ | (17) $R_2 = CH_2CH_3$, $R_{1A} = H$ | (28a) $R_2 = CH_3$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (7b) $R_2 = (CH_2CH_2)_2CH_3$, $R_1 = COCH_3$ | (17a) $R_2 = CH_3$, $R_{1A} = H$ | (29) $R_2 = CH(CH_3)_2$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (7c) $R_2 = CH_2CH_2CH=CH_2$, $R_1 = COCH_3$ | (18) $R_2 = CH(CH_3)_2$, $R_{1A} = H$ | (30) $R_2 = (CH_2)_2CH_3$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (8) $R_2 = (CH_2)_3CH_3$, $R_1 = COCH_3$ | (19) $R_2 = (CH_2)_2CH_3$, $R_{1A} = H$ | (31) $R_2 = CH_2CH=CH_2$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (9) $R_2 = CH_2CH=CH_2$, $R_1 = COCH_3$ | (20) $R_2 = CH_2CH=CH_2$, $R_{1A} = H$ | (32) $R_2 = CH_2(C_6H_5)$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (10) $R_2 = CH_2(C_6H_5)$, $R_1 = COCH_3$ | (21) $R_2 = CH_2(C_6H_5)$, $R_{1A} = H$ | (33) $R_2 = CH_2CH_2OCH_3$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (11) $R_2 = CH_2CH_2OCH_3$, $R_1 = COCH_3$ | (22) $R_2 = CH_2CH_2OCH_3$, $R_{1A} = H$ | (34) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-m-Cl$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (12) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-m-Cl$, $R_1 = COCH_3$ | (23) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-m-Cl$, $R_{1A} = H$ | (35) $R_2 = CH_2(C_7H_7N)$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (13) $R_2 = CH_2(C_6H_4N)$, $R_1 = COCH_3$ | (24) $R_2 = CH_2(C_6H_4N)$, $R_{1A} = H$ | (36) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-o-Cl$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (14) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-o-Cl$, $R_1 = COCH_3$ | (25) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-o-Cl$, $R_{1A} = H$ | (37) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-p-Cl$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |
| (15) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-p-Cl$, $R_1 = COCH_3$ | (26) $R_2 = CH_2(C_6H_4)-p-Cl$, $R_{1A} = H$ | (38) $R_2 = CH_2(C_6H_{11})$, $R_3 = COCH_2NHCOCF_3$ |

FIG. 3A



(50) $R = (-OH)$; $R_1 = (-COCH_3)$

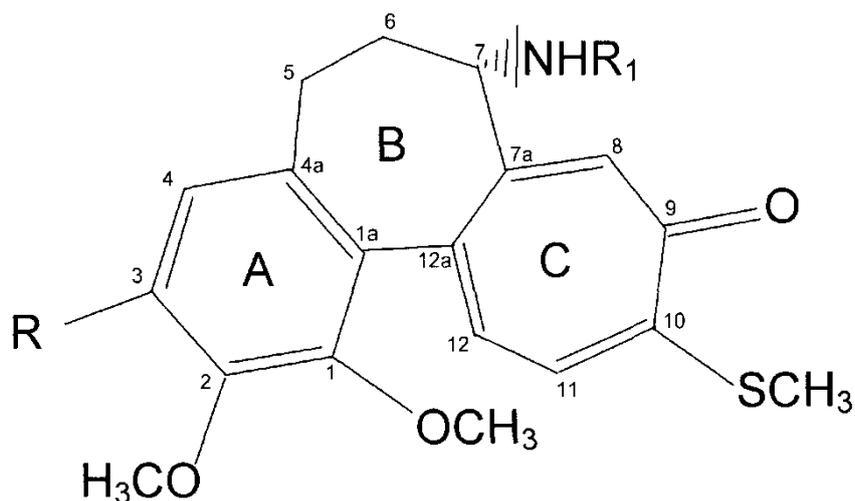
(51) $R = (-OCH_2CH_2CH=CH_2)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(52) $R = (-OCH_2CH(CH_3)_2)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(53) $R = (-OCH_2CH_2CH_3)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(54) $R = (-OCH_2CH_2CH_3)$; $R_1 = (-COCH_3)$

FIG. 4



(39) $R = (-OCH_3)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(40) $R = (-OH)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(41) $R = (-OCH_2CH=CH_2)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(42) $R = (-OCH_2CH_3)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(43) $R = (-OCH_2CH_2CH_3)$; $R_1 = (-COCH_3)$

(44) $R = (-OH)$; $R_1 = (-H)$

(45) $R = (-OCH_2CH=CH_2)$; $R_1 = (-H)$

(46) $R = (-OCH_2CH_3)$; $R_1 = (-H)$

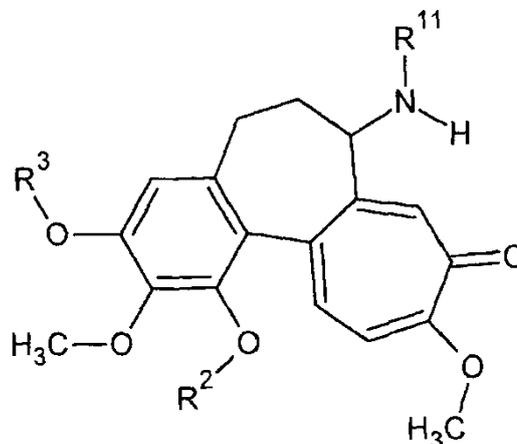
(47) $R = (-OH)$; $R_1 = (-COCH_2NHCOCF_3)$

(47a) $R = (-OCH_3)$; $R_1 = (-COCH_2NHCOCF_3)$

(48) $R = (-OCH_2CH=CH_2)$; $R_1 = (-COCH_2NHCOCF_3)$

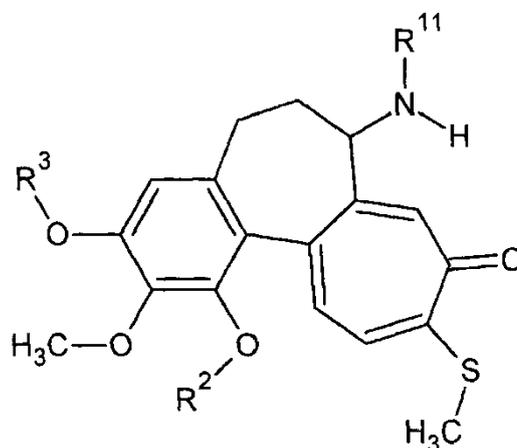
(49) $R = (-OCH_2CH_3)$; $R_1 = (-COCH_2NHCOCF_3)$

FIG. 4A



- (55) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R^{11} = (\text{C}=\text{O})\text{H}$
 (56) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R^{11} = \text{OCH}_3$
 (57) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $R^{11} = \text{H}$
 (58) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R^{11} = (\text{C}=\text{O})\text{H}$
 (59) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R^{11} = \text{OCH}_3$
 (60) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R^{11} = \text{H}$
 (61) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R^{11} = (\text{C}=\text{O})\text{H}$
 (62) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R^{11} = \text{OCH}_3$
 (63) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R^{11} = \text{H}$
 (64) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$; $R^{11} = (\text{C}=\text{O})\text{H}$
 (65) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$; $R^{11} = \text{OCH}_3$
 (66) $R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$; $R^{11} = \text{H}$

FIG. 4B



(67) $R^3 = H$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = (C=O)H$

(68) $R^3 = H$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = OCH_3$

(69) $R^3 = H$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = H$

(70) $R^3 = CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = (C=O)H$

(71) $R^3 = CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = OCH_3$

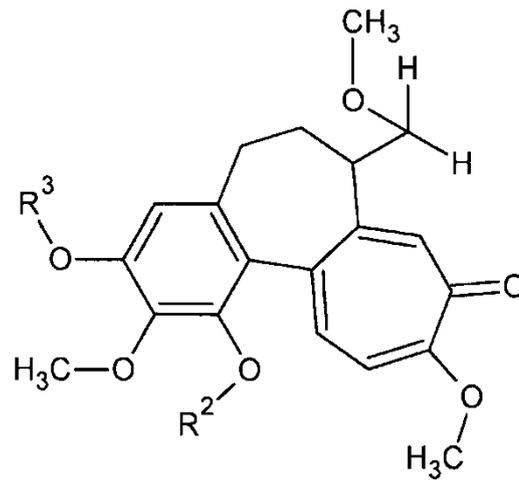
(72) $R^3 = CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = H$

(73) $R^3 = CH_2CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = (C=O)H$

(74) $R^3 = CH_2CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = OCH_3$

(75) $R^3 = CH_2CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{11} = H$

FIG. 4C



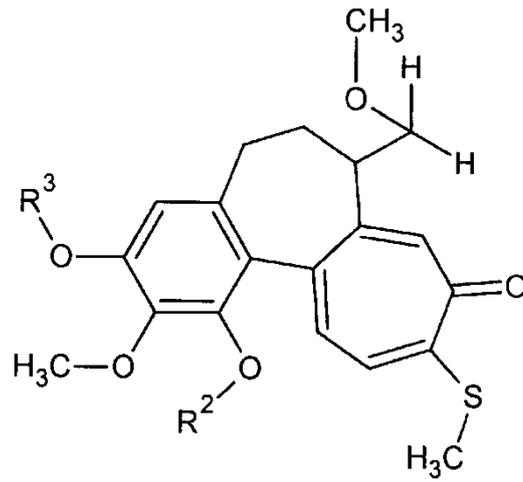
(76) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2CH_2CH_3$

(77) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH(CH_3)_2$

(78) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2CH(CH_3)_2$

(79) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2CH=CH_2$

FIG. 4D

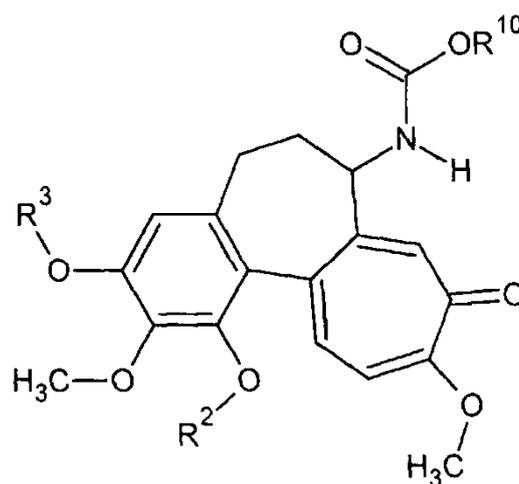


(80) $R^3 = H$; $R^2 = CH_3$

(81) $R^3 = CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$

(82) $R^3 = CH_2CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$

FIG. 4E

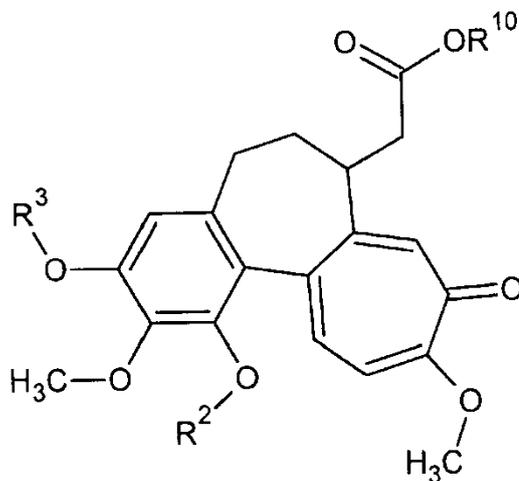


(83) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2CH_3$; $R^{10} = CH_3$

(84) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2CH_2OCH_3$; $R^{10} = CH_3$

(85) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2(C_5H_4N)$; $R^{10} = CH_3$

FIG. 4F

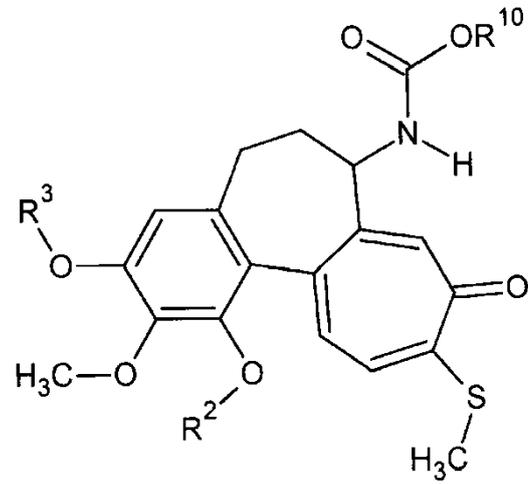


(86) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2CH_3$; $R^{10} = CH_3$

(87) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2CH_2OCH_3$; $R^{10} = CH_3$

(88) $R^3 = CH_3$; $R^2 = CH_2(C_5H_4N)$; $R^{10} = CH_3$

FIG. 4G

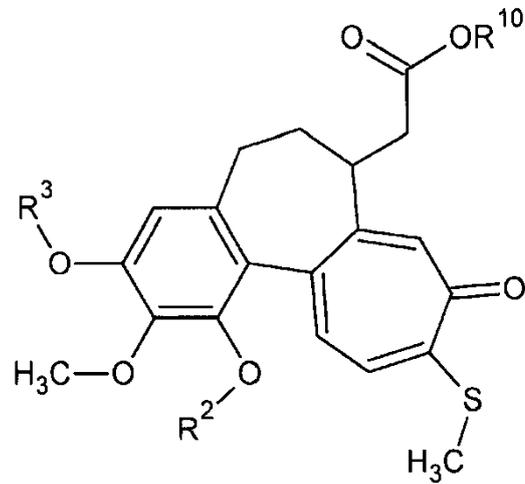


(89) $R^3 = H$; $R^2 = CH_3$; $R^{10} = CH_3$

(90) $R^3 = CH_2CH=CH_2$; $R^2 = CH_3$; $R^{10} = CH_3$

(91) $R^3 = CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{10} = CH_3$

FIG. 4H



(92) $R^3 = H$; $R^2 = CH_3$; $R^{10} = CH_3$

(93) $R^3 = CH_2CH=CH_2$; $R^2 = CH_3$; $R^{10} = CH_3$

(94) $R^3 = CH_2CH_3$; $R^2 = CH_3$; $R^{10} = CH_3$

FIG. 5

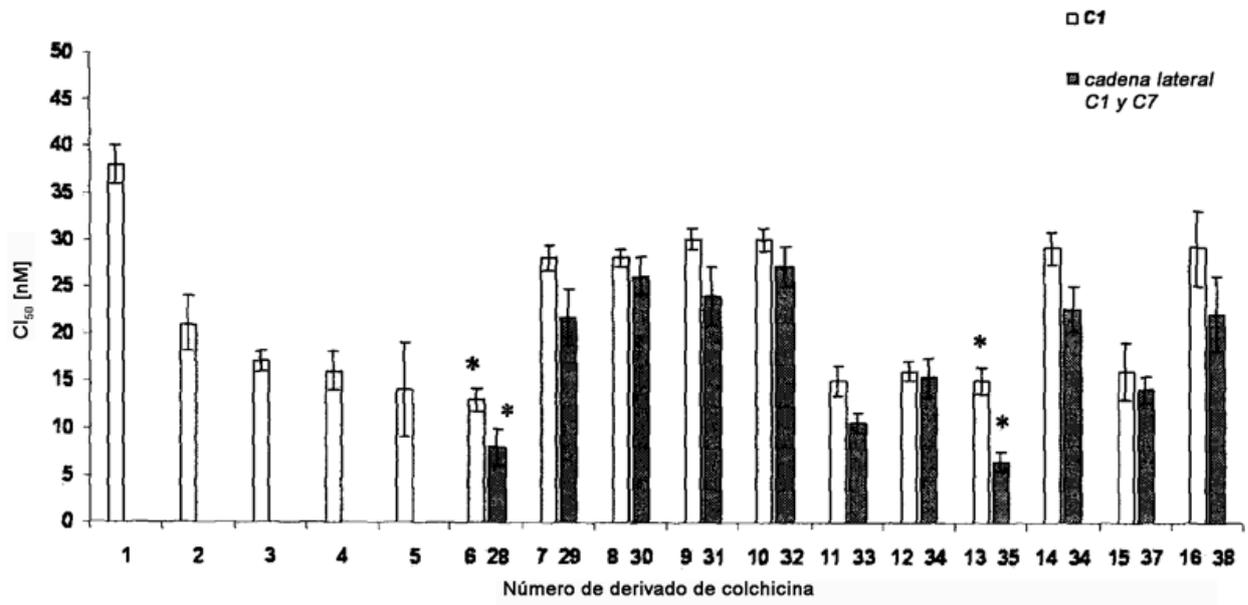


FIG. 6

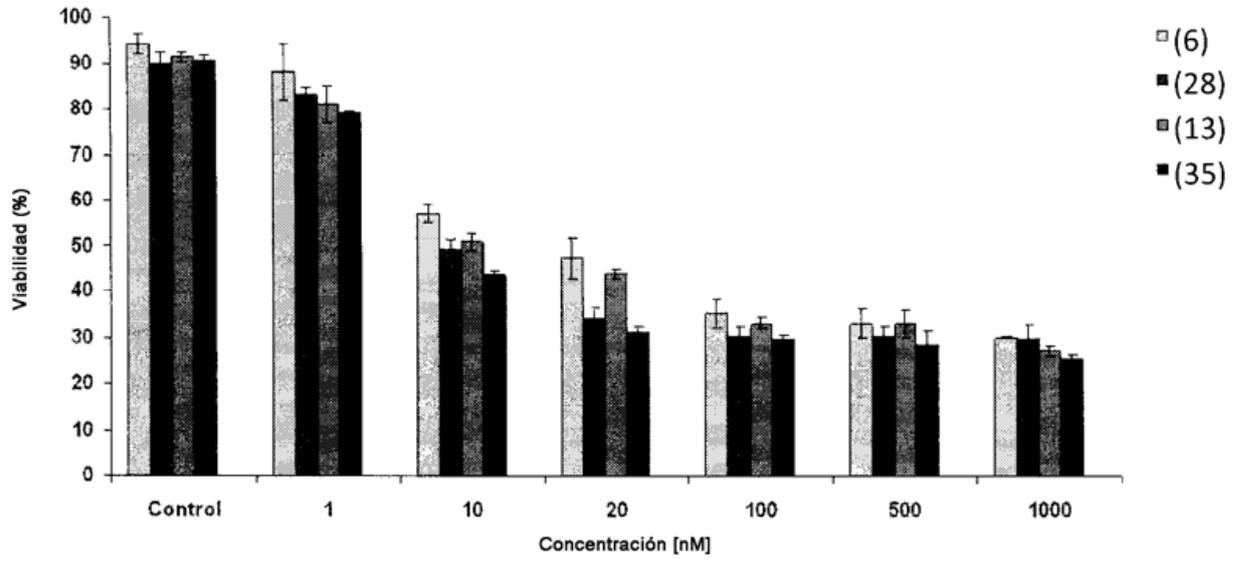


FIG. 7

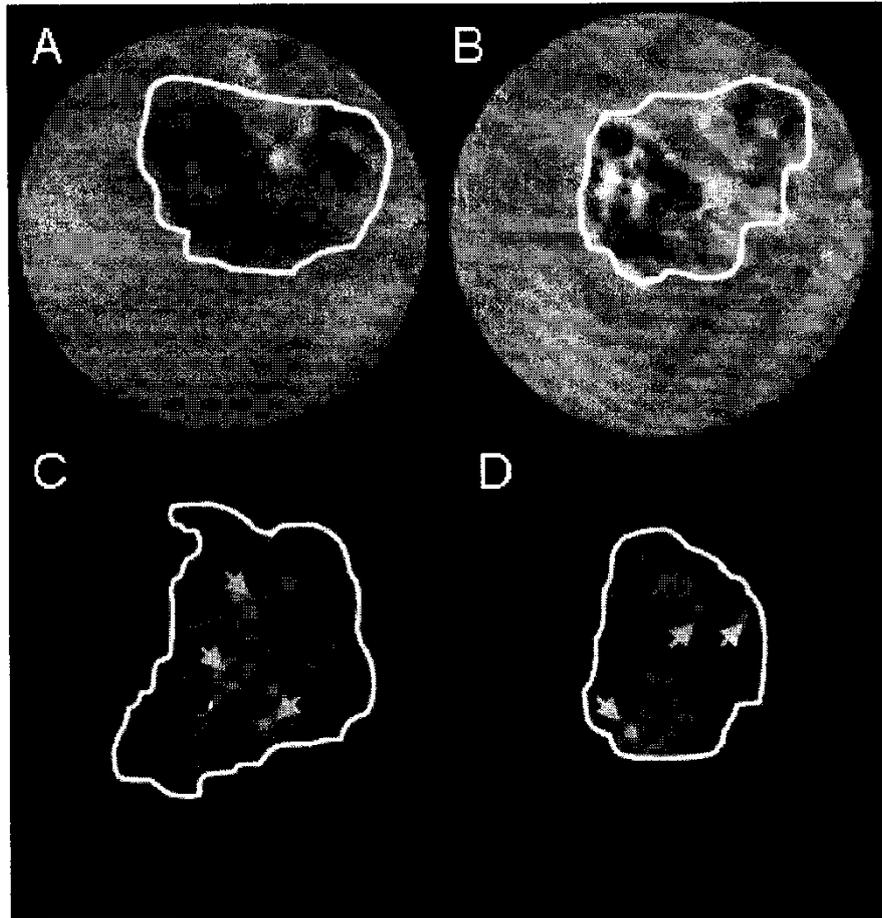


FIG. 8

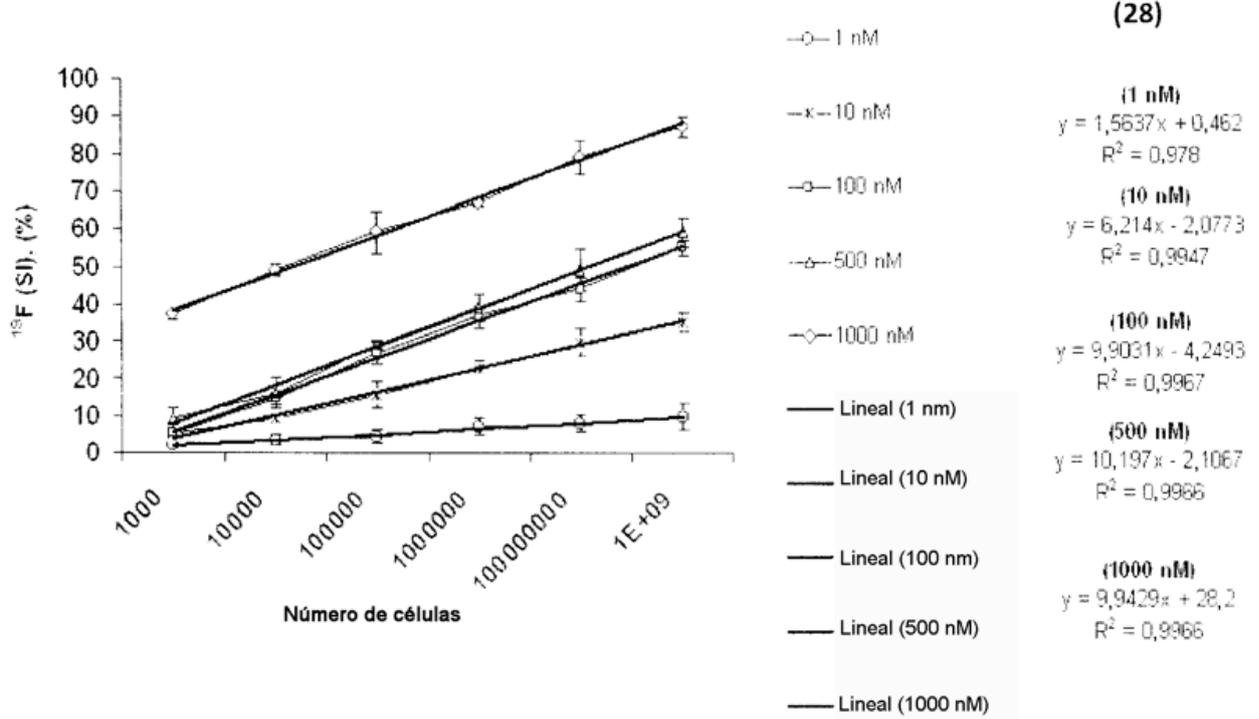


FIG. 9

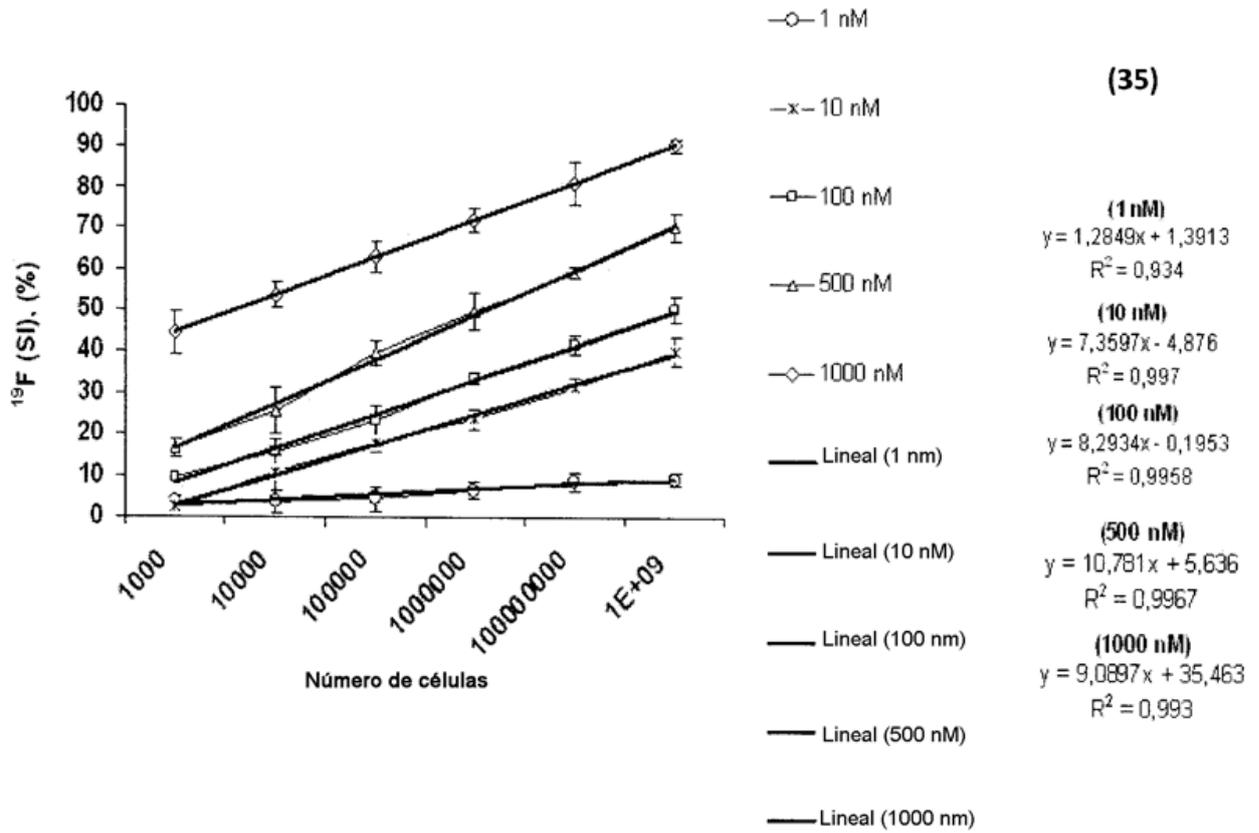


FIG. 10

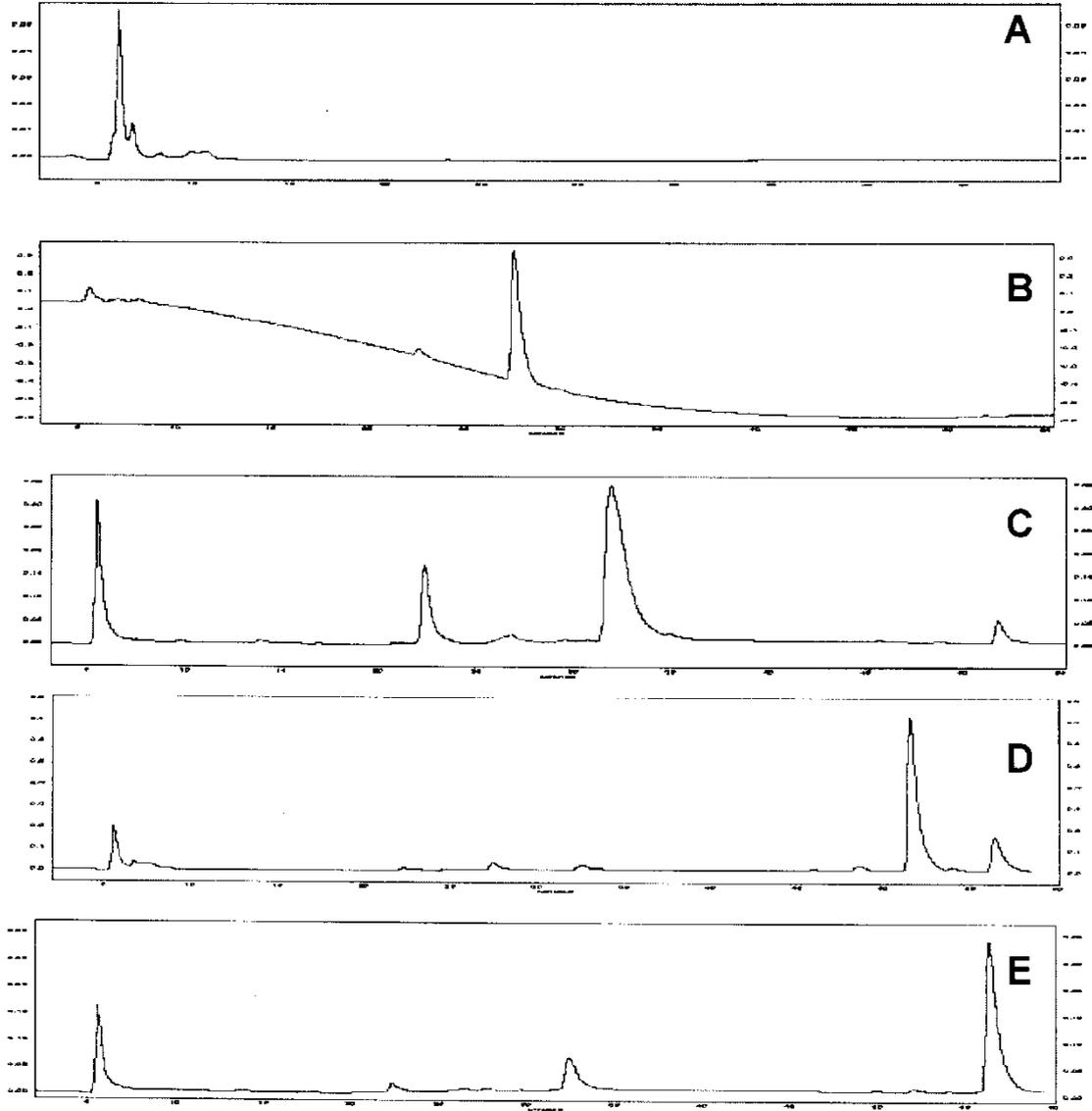


FIG. 11

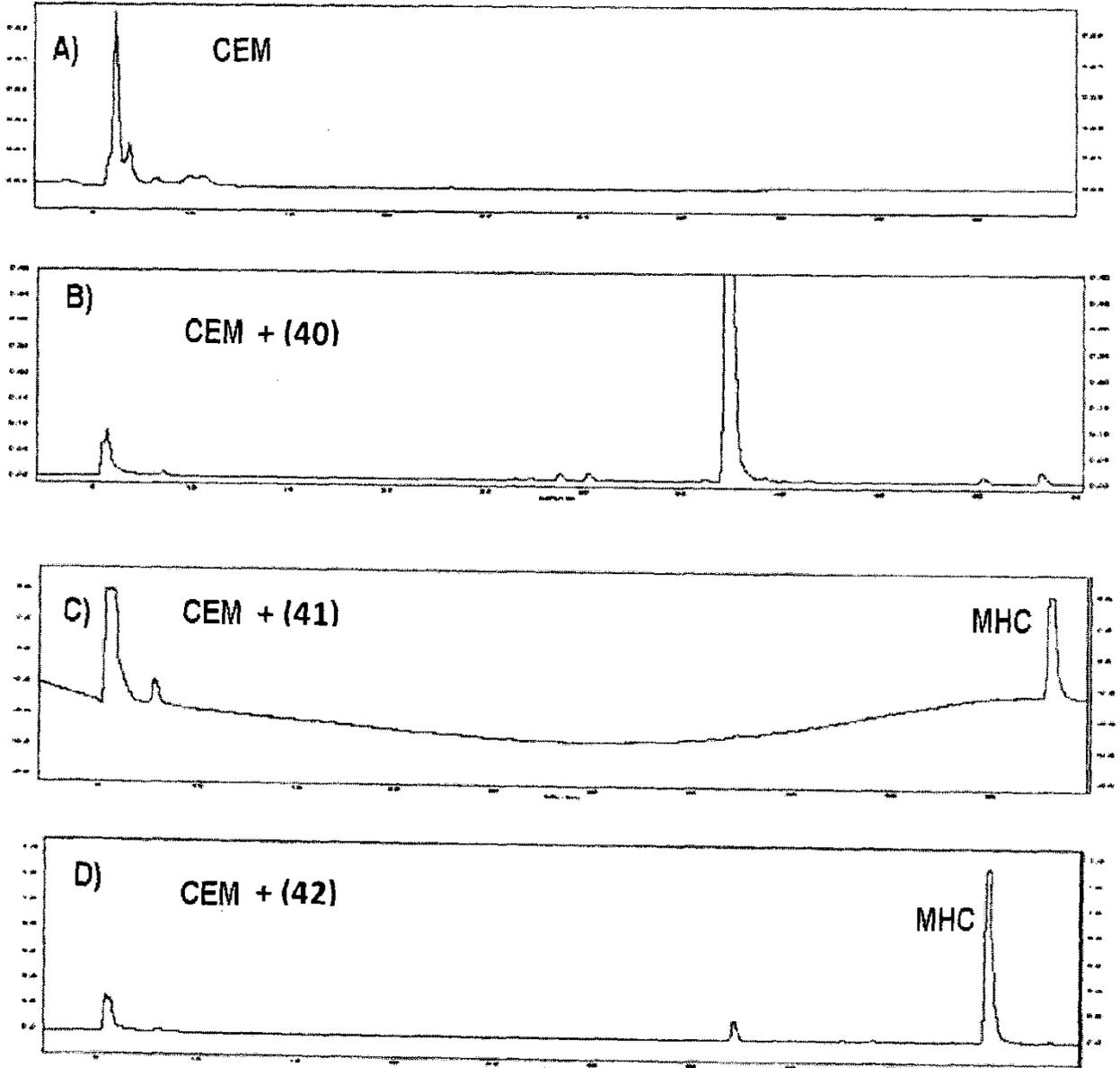


FIG. 12

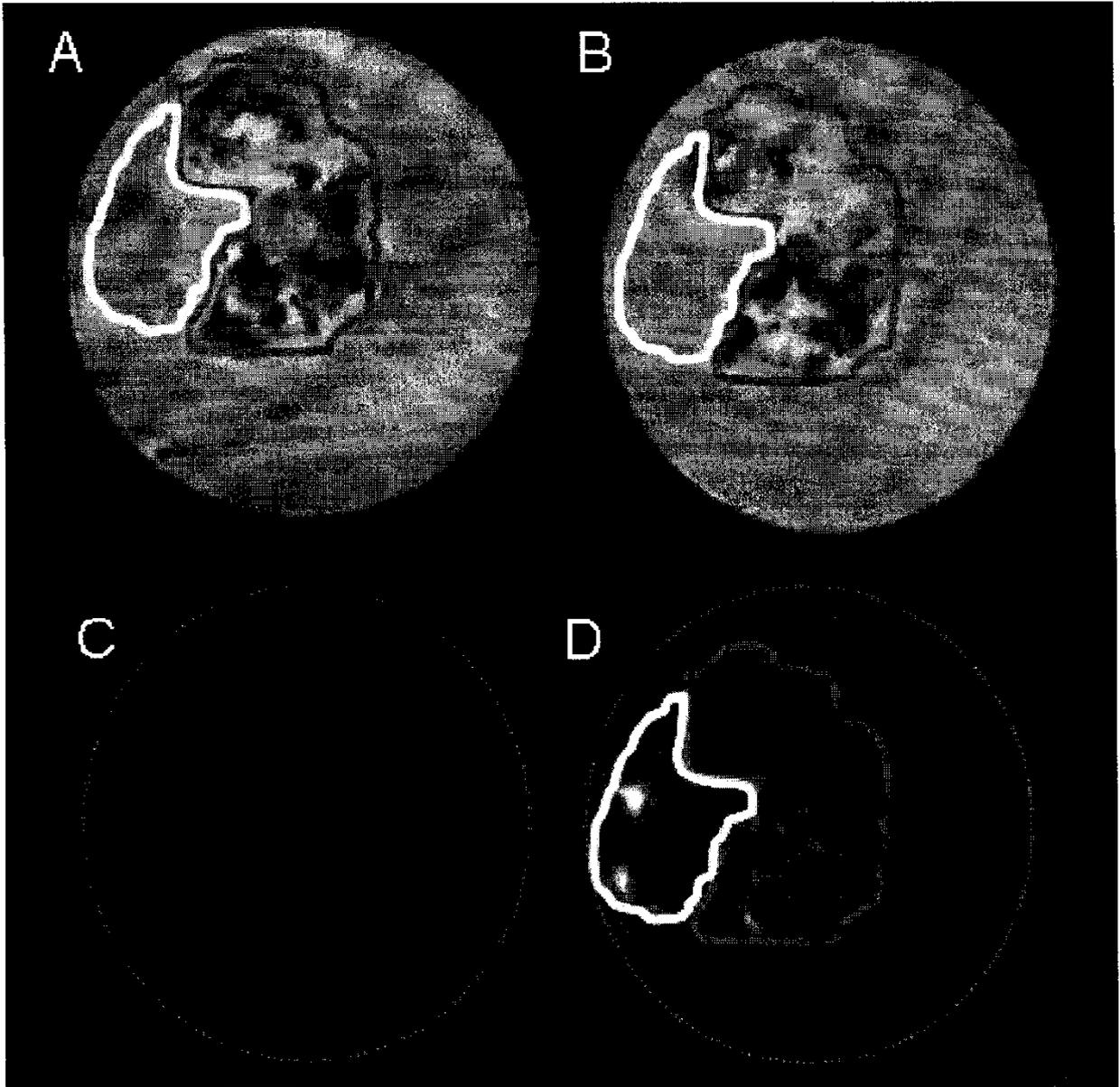


FIG. 13

A)

236		312	348	367	Residuo
VTTCLRFPQG L NADLR K LAVNMV		TVA A VE	N V KTAV	FIG	Tipo I
- -	- -	----I	- - -	-	Tipo II
- s	- -	---T-	- -v-	-	Tipo III

B)

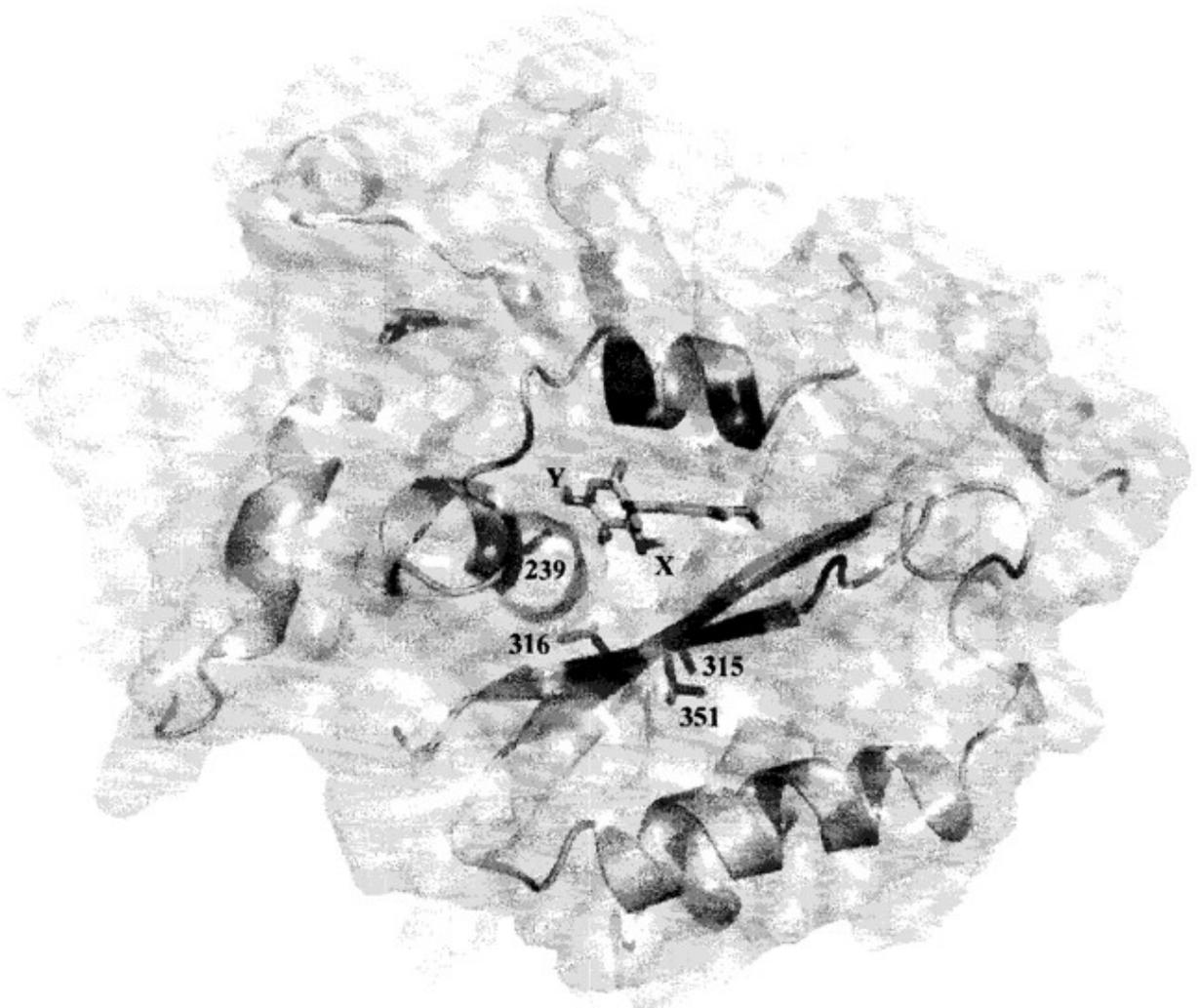


FIG. 14

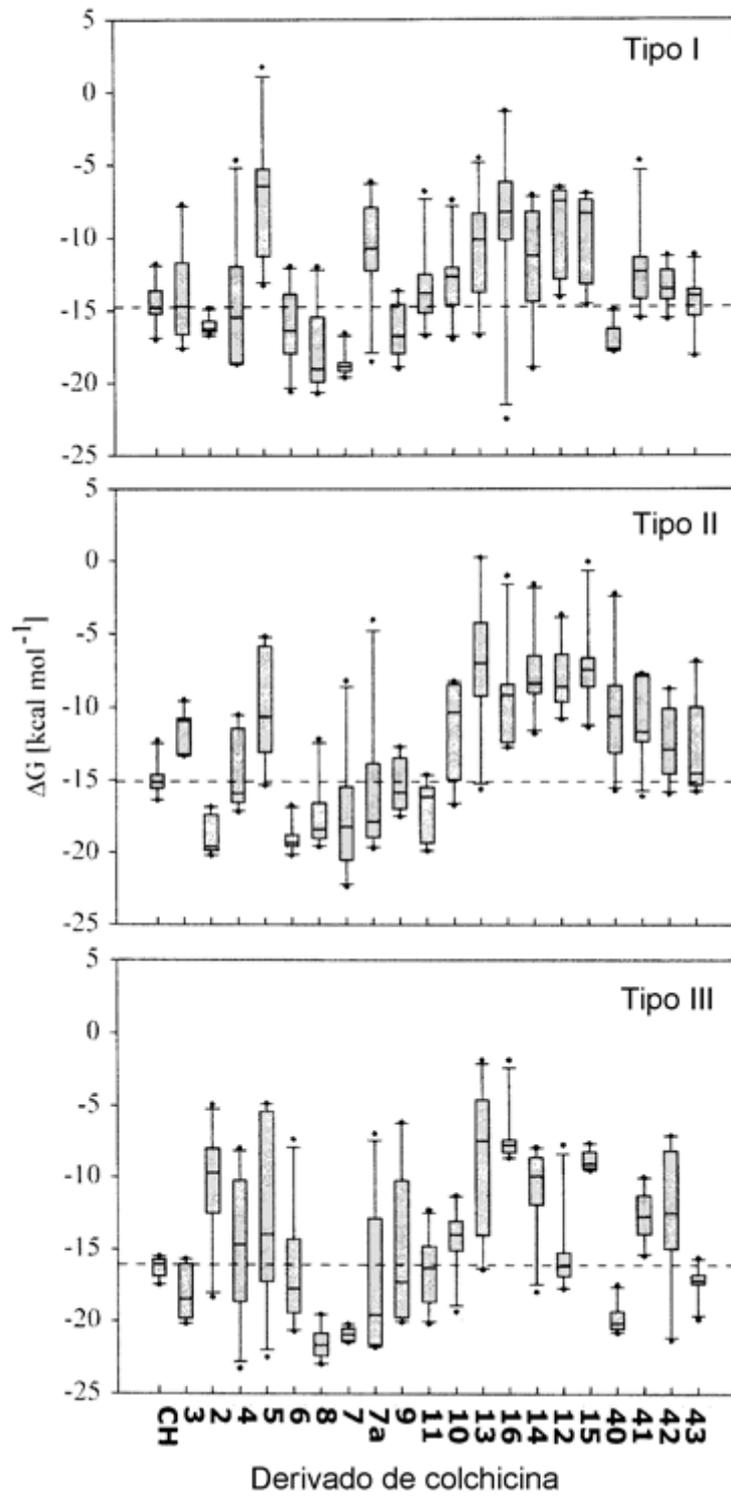


FIG. 15

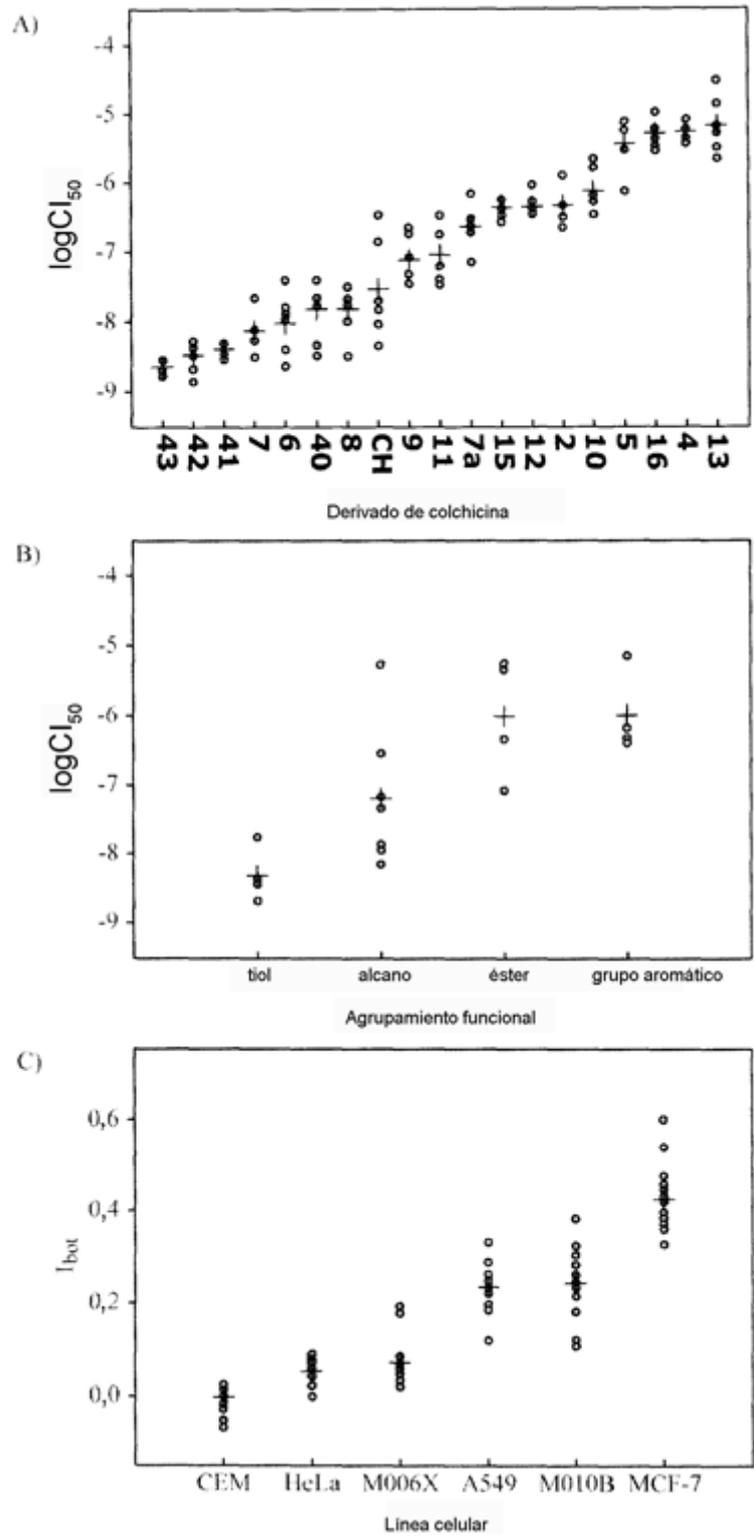


FIG. 16

4

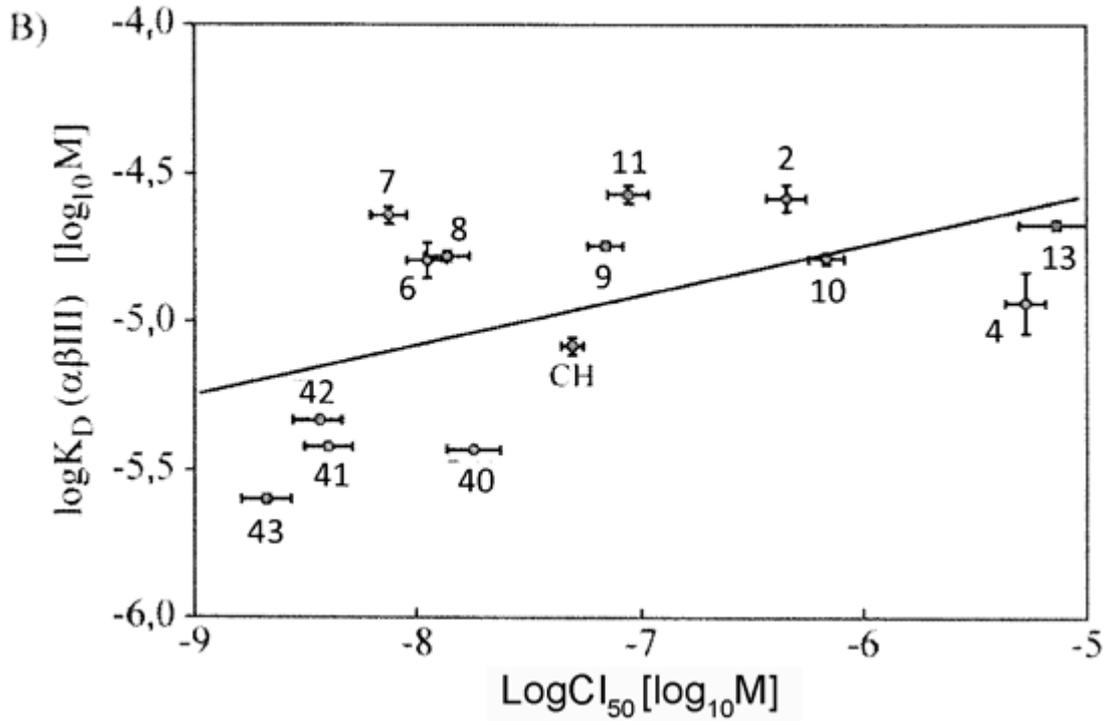
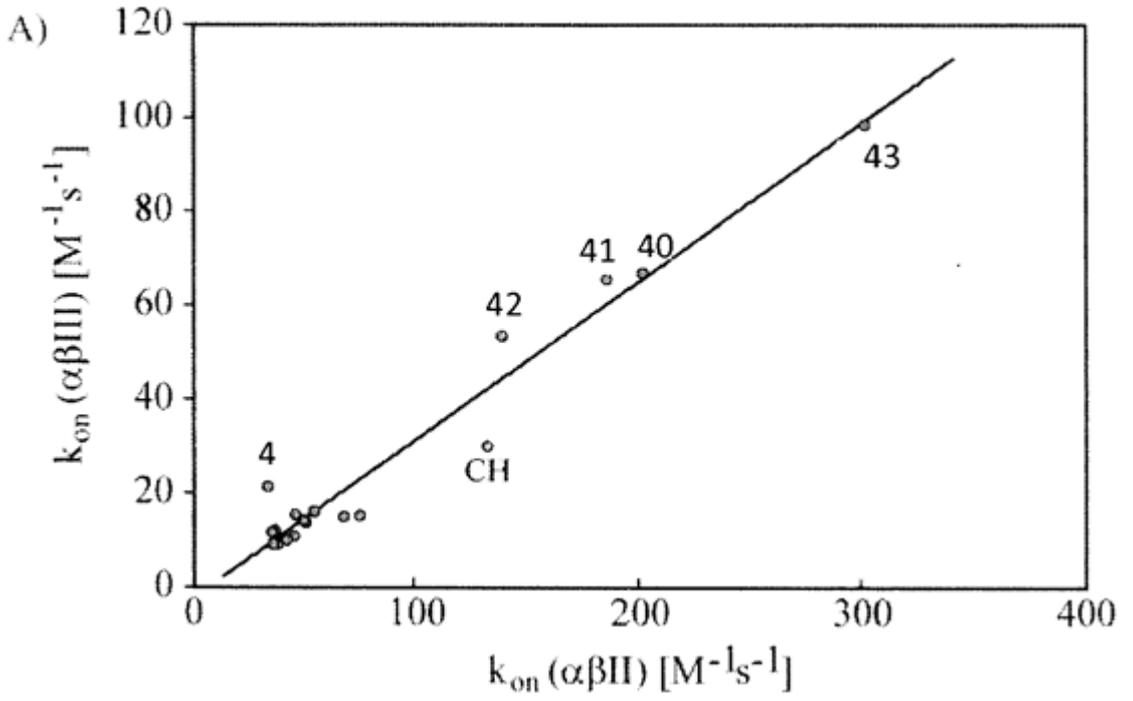


FIG. 17

